

---

**Aus der Medizinischen Klinik II**  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. H. Schunkert

---

**Genetische Untersuchungen zum *Dyscalc1* Locus  
und seinem Einfluss auf arterielle Verkalkung  
bei speziellen Mausstämmen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

**- aus der medizinischen Klinik II -**

vorgelegt von

**Lars Doehring**

aus Bremen

Lübeck 2005

---

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Universität zu Lübeck

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Heribert Schunkert

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Potratz

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2005

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 01.12.2005

gez. Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann

- Dekan der medizinischen Fakultät -

---

---

## INHALTSVERZEICHNIS

---

### 1. Einleitung

- 1.1. Grundlagen heterotoper (extraossärer) Verkalkung.....
- 1.2. Grundlagen dystropher arterieller Verkalkung..
- 1.3. Verkalkung als regulierter Prozess.....
- 1.4. genetische Grundlagen der dystrophen arteriellen Verkalkung.....
- 1.5. Aortenverkalkung durch Diätmaßnahmen.....
- 1.6. Problemstellung der Arbeit.....

### 2. Material und Methoden

- 2.1. Material.....
  - 2.1.1. Reagenzien.....
  - 2.1.2. Antikörper.....
  - 2.1.3. Kits.....
  - 2.1.4. Puffer.....
  - 2.1.5. Labormaterialien.....
  - 2.1.6. Instrumente.....
- 2.2. Tierhaltung.....
- 2.3. Züchtung des kongenen Mausstamms.....
- 2.4. Molekularbiologische Methoden.....
  - 2.4.1. DNA-Isolation von Mausschwänzen.....
  - 2.4.2. DNA-Amplifikation mittels PCR.....
  - 2.4.3. Gel-Elektrophorese.....
  - 2.4.4. Genotypisierung der polymorphen Mikrosatellitenmarker zur Züchtung der *Dyscalc1*-positiven kongenen Tiere.....
- 2.5. Aorten-Kryopexie.....
- 2.6. Histologische Untersuchungen.....
- 2.7. Immunhistologische Methoden.....

---

2.8.	<b>Statistik</b> .....
<b>3. Ergebnisse</b>	
3.1.	<b>Aorten-Kryopexie</b> .....
3.2.	<b>histologische Beobachtungen</b> .....
3.2.1.	HE und Calcein Färbung.....
3.2.2.	Alizarin red S Färbung.....
3.3.	<b>Expression von Knochmatrix assoziierten Proteinen mittels Immunhistologie</b> .....
3.3.1.	Osteopontin Expression.....
3.3.2.	BMP 2/4 Expression .....
3.4.	<b>Statistische Auswertung</b> .....
<b>4. Diskussion</b> .....	
4.1.	<b>Pathologie</b> .....
4.2.	<b><i>Dyscalc1</i> Locus</b> .....
4.3.	<b>dystrophe Verkalkung von <i>Dyscalc1</i>-positiven kongenen Tieren</b> .....
4.4.	<b>Verkalkung als regulierter Prozess</b> .....
4.5.	<b>Intima- vs. Media-Verkalkung</b> .....
4.6.	<b>Pathophysiologie der Gefäßverkalkung</b> .....
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	
<b>Glossar</b> .....	
<b>Danksagungen</b> .....	
<b>Lebenslauf</b> .....	

---

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Modell zur dystrophen Aortenklappen-Verkalkung.....
- Abb. 2:** Modell zur Entstehung einer dystrophen Verkalkung.....
- Abb. 3:** Dystrophe Verkalkung der Aorta ascendens eines C3H/He Tieres nach 15 Wochen hf-Diät.....
- Abb. 4:** Züchtung des *Dyscalc1*-positiven kongenen Mausstamms.....
- Abb. 5:** zeitliches Auftreten der dystrophen Verkalkungen in der infrarenalen Aorta nach Verletzung (Kryopexie) mittels Calcein Färbung.....
- Abb. 6:** zeitliches Auftreten der dystrophen Verkalkungen in den Mm. quadratus lumborum et psoas major nach Verletzung (Kryopexie) mittels Calcein Färbung.....
- Abb. 7:** nicht verletzte C57BL/6 Aorta, 10x HE.....
- Abb. 8:** Aorta C57BL/6, 3 Tage nach Verletzung (Kryopexie), 10x HE.....
- Abb. 9:** Aorta *Dyscalc1*-positives kongenes Tier, 1 Tag nach Kryopexie, 20x Calcein-Färbung.....
- Abb. 10:** Aorta C3H/He, 3 Tage nach Kryopexie, 10x Calcein.....
- Abb. 11:** Aorta *Dyscalc1*-positives kongenes Tier, 3 Tage nach Kryopexie, 20x HE.....
- Abb. 12:** Aorta *Dyscalc1*-positives kongenes Tier, 3 Tag nach Kryopexie, 20x Calcein.....
- Abb. 13:** Aorta C3H/He, 7 Tage nach Kryopexie, 10x, Alizarin red S.
- Abb. 14:** Mm. psoas major et quadr. lumb. eines C3H/He Tieres, 3 Tage nach Kryopexie, 10x HE.....
- Abb. 15:** Muskulatur eines C3H/He Tieres, 7 Tage nach Kryopexie, 10x Alizarin red S.....
- Abb. 16:** Aorta C3H/He, 3 Tage nach Kryopexie, 40x OPN.....

---

**Abb. 17:** Aorta + Muskulatur eines kongenen Tieres, 3 Tage nach Kryopexie, 10x OPN.....

**Abb. 18:** Aorta kongenes Tiere, 3 Tage nach Kryopexie, 20x OPN.....

**Abb. 19:** Aorta und Muskulatur eines C3H/He Tieres, 3 Tage nach Kryopexie, 10x BMP.....

**Abb. 20:** Aorta *Dyscalc1*-positives kongenes Tier, 7 Tage nach Kryopexie, 20x BMP.....

**Abb. 21:** Aorta *Dyscalc1*-positives kongenes Tier mit eingekreuztem LDLr<sup>-/-</sup>, hf-Diät + Kryopexie, 6 Wochen nach Verletzung, 10x Calcein.....

## Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1:** zeitliches Auftreten der dystrophen Verkalkungen in der infrarenalen Aorta nach Verletzung (Kryopexie)...

**Tabelle 2:** zeitliches Auftreten der dystrophen Verkalkungen in den Mm. quadratus lumborum et psoas major nach Kryopexie.....

**Tabelle 3:** P-Werte des zeitlichen Auftretens einer dystrophen Verkalkung in der infrarenalen Aorta nach Kryopexie....

**Tabelle 4:** P-Werte des zeitlichen Auftretens einer dystrophen Verkalkung in den Mm. quadratus lumborum et psoas major nach Kryopexie.....

---

## **1. Einleitung**

### **1.1. Grundlagen heterotoper (extraossärer) Verkalkung**

Im Vergleich zur Mineralisation des Knochens, bei der es sich um einen orthotopen Prozess handelt, liegt bei der heterotopen, extraossären Gewebsverkalkung (Kalzinose, Kalzifikation) ein pathologischer Vorgang vor. Grundsätzlich werden drei Formen der pathologischen extraossären Verkalkung unterschieden, für die verschiedene Ätiologien bekannt sind (Seifert 1997):

- 1) Metastatische Verkalkung bei krankhafter Erhöhung des Kalziumspiegels im Blutserum, die über den Weg der Hyperkalzämie zu einer ausgeprägten Kalkeinlagerung in zahlreiche Organe führt,
- 2) dystrophe Verkalkung, bei der es zu amorphen Kalziumeinlagerungen in nekrotische oder degenerativ veränderte Gewebe bei normalem Kalziumphosphatstoffwechsel kommt,
- 3) genetisch-hereditäre Verkalkung mit einer Reihe von familiär gehäuft auftretenden Krankheitsformen wie der Chondrokalzinose.

### **1.2. Grundlagen dystropher arterieller Verkalkung**

Kardiovaskuläre Erkrankungen infolge von Atherosklerose und Gefäßwandverkalkung stellen in den westlichen Industrienationen unverändert eine der Haupttodesursachen dar. In Autopsien konnten bei 75-95% aller Menschen unabhängig vom Alter oder der Todesursache Koronarverkalkungen festgestellt werden (Eggen et al., 1965). Die Mehrheit der komplexen atherosklerotischen Läsionen verkalkt. Besonders schwere Formen arterieller Gefäßverkalkung werden bei Patienten mit chronischem Nierenversagen sowie Diabetes mellitus beobachtet (Chen und Moe, 2003; Goodman et al., 2004). Ansammlungen von Kalziumablagerungen in der Gefäßwand bedingen eine Starre der Gefäßwand und reduzieren die Compliance des Gefäßes. Diese Veränderungen führen zu erhöhten systolischen Blutdrücken, einem Anstieg der Blutdruckamplitude und einer linksventrikulären Hypertrophie (Detrano et

---

al., 1997). Welchen Einfluss Gefäßverkalkungen für die Bedeutung der atherosklerotischen Plaquestruktur haben, ist noch ungeklärt (Hayden et al., 2001). Nichtinvasive Methoden zur Messung des quantitativen Kalziumgehalts der Gefäßwand (koronarer „Calcium Score“) erlauben eine Einschätzung über das Fortschreiten einer arteriosklerotischen Gefäßerkrankung sowie eine Vorhersage über die Wahrscheinlichkeit des Eintretens kardiovaskulärer Ereignisse (Thompson und Partridge, 2004). Quantitative Kalziummessungen werden mittels Ultraschall zur Bestimmung des Intima-Media-Verhältnisses der A. Carotis, mittels Elektronenstrahl-CT zur Bestimmung des koronaren Calcium-Scores sowie mit MRT zur Darstellung der Plaquestruktur in der Aorta durchgeführt (Jacoby et al., 2004; Lazem et al., 1997). Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass Gefäßverkalkung positiv mit dem atherosklerotischen Plaquegehalt und einem erhöhten Myokardinfarkt-Risiko korreliert sind sowie einer größeren Wahrscheinlichkeit, eine Gefäßdissektion nach Angioplastie zu erleiden (Fitzgerald et al., 1992). In einer Studie zum plötzlichen Herztod konnte gezeigt werden, dass sowohl der Framingham Risiko Index wie auch der koronare Calcium Score unabhängig voneinander Voraussagen über das Eintreten zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse erlauben (Taylor et al., 2000).

Die Verkalkung arterieller Gefäße zeigt sich in zwei unterschiedlichen Strukturen innerhalb der Gefäßwand und zwar in der Intima sowie in der Tunica media. Intima-Verkalkung tritt im Zusammenhang mit einem atherosklerotischen Umbau der Gefäßwand auf und ist mit Lipidakkumulation, Makrophagen-Infiltration sowie Proliferation glatter intimaler Gefäßmuskelzellen assoziiert (Hirsch et al., 1993). Einwandernde Makrophagen und Mastzellen sowie glatte Gefäßmuskelzellen bilden die zelluläre Grundlage dieser atherosklerotischen Intima-Verkalkung (Jeziorska et al., 1998). Verkalkung der Tunica media tritt unabhängig vom Vorhandensein von Atherosklerose auf und erscheint als lineare Verkalkung, wobei sich Kalziumapatitkristalle zwischen Schichten von elastischen Fasern und glatten Gefäßmuskelzellen ablagern (Proudfoot und Shanahan, 2001). Diese Form der Erkrankung tritt bei älteren Patienten mit Mönckebergscher Media-Sklerose oder jüngeren Patienten mit Diabetes mellitus, Urämie oder chronischem Nierenversagen auf (Mohr und Gorz 2002;

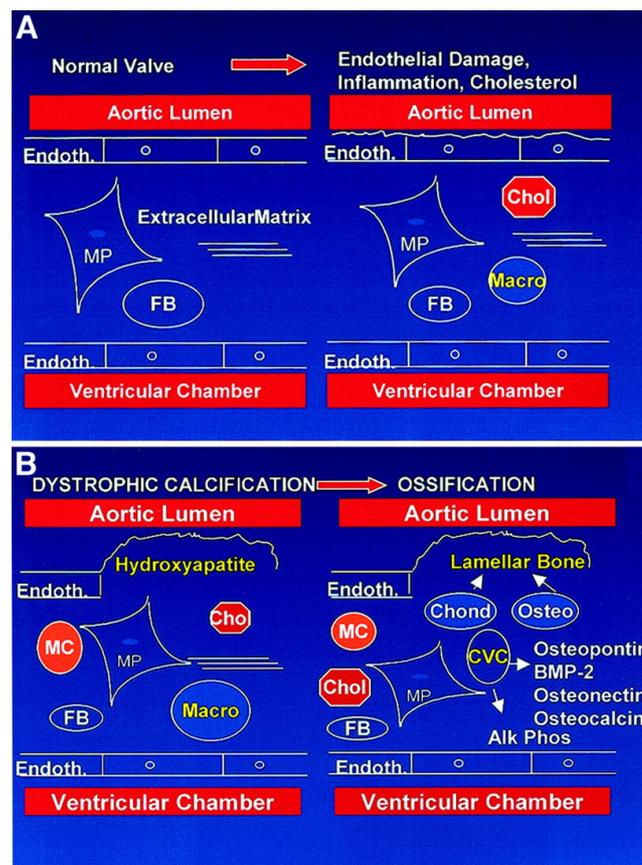
---

London et al., 2003; Shioi et al., 2001; Tomson 2003). Die glatten Muskelzellen der Media bilden die zelluläre Grundlage dieser dystrophen Verkalkung, wobei diese Zellen einen osteogenetischen Phänotyp zeigen und osteoblastische Gene exprimieren können (Shanahan et al., 1999). Perizyten, Endothelzellen sowie Fibroblasten scheinen ebenso an der Entstehung dieser dystrophen Verkalkung beteiligt zu sein (Watanabe et al., 2002; Shin et al., 2004).

### **1.3. Verkalkung als regulierter Prozess**

Dystrophe arterielle Gefäßverkalkung zeigt viele Gemeinsamkeiten mit embryonaler Knochenentwicklung und normalem Knochenstoffwechsel. Um verkalkten Knochen zu bilden, produzieren Osteoblasten Matrixvesikel und Osteoid, eine extrazelluläre Matrix, die Kollagen I, Osteocalcin, Osteopontin und andere Knochen-Matrixproteine enthält (Stein und Lian, 1993). In diesem Milieu kommt es zu einer kontrollierten Mineralisierung von Kalziumapatitkristallen. Normale Blutgefäße, atherosklerotische Läsionen sowie verkalkte Herzklappen enthalten alle Komponenten von Knochen-Osteoid wie Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2), Osteopontin, Kollagen I, Matrix Gla-Protein (MGP) und Osteocalcin (Boström und Demer, 2000; Sweatt et al., 2003; Isoda et al., 2002; Dhore et al., 2001; Denhardt et al., 2001). Während Osteopontin und Matrix Gla-Protein einen inhibitorischen Effekt auf die Kalzifizierung haben, scheint Bone Morphogenetic Protein 2/4 die Bildung von Kalziumapatitkristallen zu fördern. In einer Untersuchung von chirurgisch exzidierten humanen Aortenklappen konnte dystrophe Verkalkung in 83% und lamelläre Knochenformationen in 13% der Fälle nachgewiesen werden. In allen verkalkten Klappen erfolgte der Nachweis einer BMP 2/4 Expression (Mohler et al., 2001). Das Phosphoprotein Osteopontin (OPN) wurde ursprünglich in lamellärem Knochen isoliert und konnte zudem in humanen atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden (Giachelli und Steitz, 2000; O'Regan et al., 2000). Es wird von Makrophagen, glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen der Intima synthetisiert (O'Brien et al., 1994; Giachelli 1999). OPN akkumuliert an Orten von Gefäßverkalkung (Giachelli et al., 1993) und inhibiert in der Zellkultur Verkalkung von glatten Gefäßmuskelzellen der

Aorta (Wada et al., 1999; Steitz et al., 2002). Bone Morphogenetic Proteine (BMP) gehören zu einer Gruppe von Wachstumsfaktoren, der TGF- $\beta$  Familie. BMP-2 wird in humanen atherosklerotischen Läsionen exprimiert (Boström et al., 1993) und zeigt das volle Potenzial zu osteoinduktiver Differenzierung (Riley et al., 1996). In der Zellkultur mit verkalkenden Gefäßmuskelzellen führte der Zusatz von BMP-2 zu einer erheblichen Ausdehnung und Größenzunahme der Kalziumablagerungen (Zebboudj et al., 2003). Matrix Gla-Protein (MGP) kommt im Knorpel, in der Knochenmatrix und in normalen Arterien vor (Wallin et al., 1999; Shanahan et al., 1998). In der Intima von arteriellen Gefäßen wird MGP von Makrophagen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen exprimiert, in der Tunica media hauptsächlich von den glatten Muskelzellen der Media (Shanahan et al., 1994). In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass MGP einen inhibitorischen Effekt auf die Gefäßverkalkung hat, wahrscheinlich durch eine Bindung an BMP-2 (Zebboudj et al., 2003).



**Abb. 1 Modell zur dystrophischen Aortenklappen-Verkalkung:** **A** frühes Stadium der Aortenklappen-Verkalkung mit einer endothelialen Verletzung, Cholesterin-Ablagerung und Entzündungsreaktion **B** nach Apoptose/Nekrose kommt es zu Hydroxyapatit-Kristallablagerungen und nachfolgend in einem Teil

---

der Fälle zu lamellärer Knochenformation durch verkalkende Gefäßmuskelzellen. Aus Mohler ER, Gannon F, Reynolds C, Zimmermann R, Keane MG, Kaplan FS: Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation* 2001

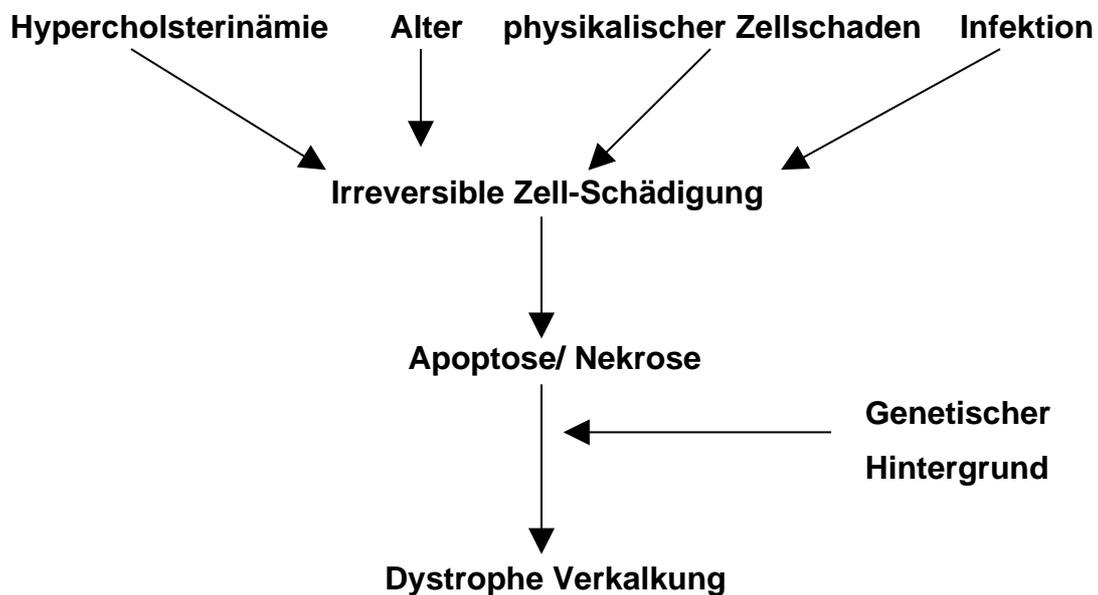
Bei MGP-Knockout Mäusen kommt es spontan zu einer ausgeprägten Verkalkung der Arterien (Luo et al., 1997). Neueste Untersuchungen zeigen, dass MGP Blutserum-Werte invers mit dem Auftreten von fortgeschrittener koronarer Arterien-Verkalkung korreliert sind (Jono et al., 2004). MGP kommt in normalen Arterien entlang der elastischen Fasern der Media und bei Verkalkung ko-lokalisiert an den Grenzzonen der verkalkenden Plaques vor (Spronk et al., 2001). Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass arterielle Gefäßverkalkung als aktiv regulierter Prozess zu verstehen ist, der viele Gemeinsamkeiten mit orthotopem Knochenstoffwechsel aufweist.

#### **1.4. Genetische Grundlagen der dystrophen arteriellen Verkalkung**

Dystrophe arterielle Gefäßverkalkung wird erheblich durch genetische Einflüsse mitbestimmt. Anhand von Koronarangiographien aus Herzinfarkt-Familien konnte gezeigt werden, dass die Vererbung eine wichtige Rolle bei der Entstehung von proximalen und ektatischen koronaren Läsionen sowie dystrophen Verkalkungen der Herzkranzgefäße spielt (Fischer et al., 2005). Untersuchungen an bestimmten Inzucht-Mausstämmen haben zudem den Schluss nahe gelegt, dass genetische Komponenten arterielle Gefäßverkalkung in einem hohen Maße beeinflussen können (Qiao et al., 1994). Verschiedene Mausstämme zeigten in der gleichen Umgebung und unter den gleichen äußeren Voraussetzungen eine signifikant unterschiedliche Ausprägung dystropher arterieller Verkalkung. Aufgrund der komplexen Struktur dieser Erkrankung, die alters- und geschlechtsabhängig ist, liegen bislang nur wenige Berichte zur genetischen Grundlage arterieller Verkalkung beim Menschen vor. Unter einer cholesterin- und fettreichen Diät zeigten C3H/He und C57BL/6 Mäuse eine unterschiedliche Ausprägung von Atherosklerose, aber eine vergleichbare Anfälligkeit für arterielle Verkalkung der Aorta (Qiao et al., 1994). Dystrophe Verkalkung kommt in den Koronarien, der Aorta, innerhalb von

---

atherosklerotischen Läsionen und dem Myokard vor. Histologische und molekularbiologische Studien haben zudem gezeigt, dass verschiedene Gene Verkalkungen innerhalb dieser Strukturen beeinflussen können. So zeigen z.B. C3H/He Mäuse ein vergleichbares Ausmaß von koronarer und aortaler Verkalkung, während DBA/2J Mäuse lediglich eine Anfälligkeit für Aortenverkalkung, nicht jedoch für eine Koronarverkalkung zeigen. Eine Studie aus unserer Arbeitsgruppe konnte den Beweis erbringen, dass ein genetischer Locus auf dem proximalen Maus-Chromosom 7 bei bestimmten Mausstämmen dystrophe Myokardverkalkung induziert (Ivandic et al., 1996). Dieser Locus wurde *Dyscalc1* genannt. Nach Züchtung eines kongenen Tiermodells, das den *Dyscalc1* Locus von für dystrophe Verkalkungen prädisponierten C3H/He Mäusen auf einem resistenten C57BL/6 Hintergrund enthält, konnte bestätigt werden, dass dieser Locus dystrophe Verkalkung des Myokards nach Schädigung des Herzmuskels mittels Myokard-Kryopexie beeinflusst (Aherrahrou et al., 2004).

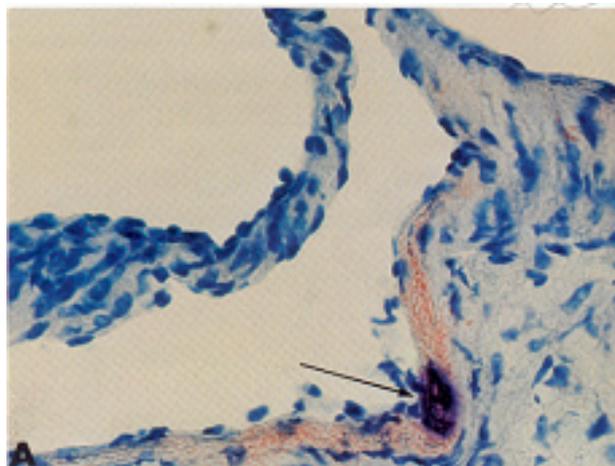


**Abb. 2 Modell zur Entstehung einer dystropher Verkalkung.** Unabhängig von der Ätiologie der Zellschädigung kommt es über den Weg der Apoptose/Nekrose unter Einfluss der verschiedenen genetischen Hintergründe zur dystropen Verkalkung.

---

## 1.5. Aortenverkalkung durch Diätmaßnahmen

Normalerweise kommt es bei Mäusen abhängig von Genotyp erst nach einem mehrmonatigen Zeitraum unter Fütterung einer fett- und cholesterinreichen Diät zur Entstehung einer Atherosklerose und nachfolgend zu einer dystrophen arteriellen Verkalkung dieser atheromatösen Läsion. Diese zeigt sich dann ausschließlich in der Aorta ascendens oberhalb der Aortenklappe. Die weiteren Aortenabschnitte inklusive der infrarenalen Aorta bleiben in der Regel vom Auftreten einer Atherosklerose und dystropher Verkalkung verschont.



**Abb. 3 Dystrophe Verkalkung der Aorta ascendens eines C3H/He Tieres nach 15 Wochen hf-Diät, 100x Hämatoxylin und Oil-red-O Färbung:** in der Abbildung zeigt sich eine flache atheromatöse Läsion mit dystropher Verkalkung (violett) in der Aorta ascendens eines C3H/He Tieres, das für 15 Wochen mit einer hf-Diät gefüttert wurde. Aus: Qiao JH, Xie PZ, Fishbein MC, Kreuzer J, Drake TA, Demer LL, Lusis AJ: Pathology atheromatous lesions in inbred and genetically engineered mice. *Arteriocl Thromb* 1994, 14:1480-1497

## 1.6. Problemstellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, der Frage nachzugehen, ob der *Dyscalc1* Locus auf dem proximalen Maus-Chromosom 7, für den bereits nachgewiesen werden konnte, dass er dystrophe Verkalkung am Myokard nach irreversibler

---

Schädigung der Herzmuskelzellen beeinflusst, auch arterielle Gefäßverkalkung der Mauseorta beeinflussen kann. Hierzu werden *Dyscalc1*-positive kongene Mäuse, die auf einem resistenten genetischen Hintergrund von C57BL/6 Tieren den *Dyscalc1* Locus auf dem proximalen Mauschromosom 7 enthalten, mit anfälligen C3H/He und resistenten C57BL/6 Mäusen verglichen. Eine neue Methode soll etabliert werden, die es erlaubt, Gewebe der infrarenalen Aorta selektiv so zu verletzen, dass Apoptose bzw. Nekrose entsteht und in diesem Milieu dystrophe Verkalkung in der Gefäßwand entstehen zu lassen. Hierdurch soll es zu standardisierten und reproduzierbaren Ergebnissen kommen und langwierige Diätverfahren zur Induktion von Apoptose/Nekrose umgangen werden. Im Weiteren soll mittels immunhistologischer Methoden untersucht werden, in wie weit arterielle Verkalkung als ein aktiv regulierter Prozess aufgefasst werden kann und mögliche Gemeinsamkeiten mit dem Knochenstoffwechsel nachgewiesen werden können.

---

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Reagenzien

Aceton p.a.	Merck
QA-Agarose TM (Standard)	Q.Bio.Gen
Metaphor®Agarose (High resolution)	BMA
Alizarin red S	Fluka
Calcein	Sigma
Chloroform p.a.	Merck
EDTA	Sigma
Eosin	Apotheke
Ethanol p.a.	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Hämatoxylin	Apotheke
Isofluran	Curamed
Isopropanol	Sigma
Kaisers Glyceringelantine	Merck
Phenol:Chloroform:Isoamyl (25:24:1)	Sigma
Proteinase K	Sigma

#### 2.1.2. Antikörper

Primäre Antikörper:

Ziege anti-Osteopontin AK	R&D Systems
Ziege anti-BMP-2/4-AK	Santa Cruz

Sekundäre Antikörper:

Esel anti-Ziege-AK	Santa Cruz
--------------------	------------

---

### **2.1.3. Kits**

ImmunoCruz Staining System

Santa Cruz

### **2.1.4. Puffer**

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCL

1 mM EDTA

Lysis-Puffer:

0,2 %(w/v) SDS

5 mM EDTA, pH 8,3

100 mM Tris-HCL, pH 8,5

200 mM NaCl

100 µg/ml Proteinase K

Phosphate buffer saline (PBS)

Biochrom KG

### **2.1.5. Labormaterial**

Filter: gefaltete Filter (125)

Schleicher & Schuell

Objektträger Mikroskop

Menzel-Gläser

Plastikwaren

Greiner, Sarstedt

Skalpelle (steril)

Feather

Reaktionsröhrchen 0,2; 1,5; 2 ml

Eppendorf

### **2.1.6. Instrumente**

Kryothom

Shandon

Gel-Dokumentations-Kammer

MWG-Biotech

Lichtmikroskop

Zeiss

Fluoreszenzmikroskop

Zeiss

Touch down PCR-Maschine

Hybaid-AGS

---

Mikrowelle

Siemens

pH-Meter

Knick

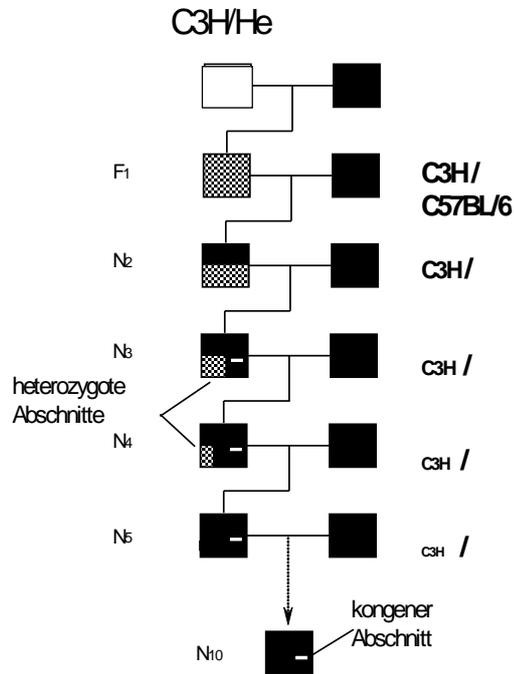
## **2.2. Tierhaltung**

C57BL/6 und C3H/He Mäuse wurden von den Charles River Lab. erworben (Sulzbach-Rosenberg, Deutschland). Alle Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter und einen 12-stündigen Tag/Nacht-Rhythmus. Das Tierfutter bestand aus Standard-Mausdiät (Altromin 1324-pellet, Altromin, Lage, Deutschland) mit 19% Protein, 4% Fett, 6% Ballaststoffen, 7% Asche, 13,5% Feuchtigkeit, 0,9% Kalzium, 0,7% Phosphat, 15.000 IE Vitamin A, 600 IE Vitamin D3, 75 mg Vitamin E und 5mg Kupfer.

## **2.3. Züchtung des kongenen Mausstamms**

*Dyscalc1*-positive kongene Mäuse wurden in unserer eigenen Tierhaltung gezüchtet. Am Anfang wurden (C57BL/6 x C3H/He) F1-Männchen mit weiblichen C57BL/6 rückgekreuzt. Ausgesuchte männliche Nachkommen wurden mit weiblichen C57BL/6 für weitere neun Generationen mit dem Ziel rückgekreuzt, Heterozygotität auf dem proximalen Chromosom 7 zu erhalten. Dieses wurde durch Genotypisierung mit Mikrosatellitenmarkern D7Mit56, D7Mit247, D7Mit229, D7Mit82, D7Mit31, D7Mit40 und D7Mit332 erreicht. Eine weitere Geschwister-Kreuzung dieser Tiere brachte ein Segment auf dem proximalen Chromosom 7 mit homozygoten Allelen der C3H/He-Rasse auf einem >99%igen resistenten genetischen C57BL/6 Hintergrund. Eine genaue histologische und genetische Charakterisierung dieses kongenen Mausstammes ist kürzlich veröffentlicht worden (Aherrahrou et al., 2004). Für diese Arbeit sind die kongenen Mäuse aus der Züchtung von Z. Aherrahrou und B. Ivandic übernommen worden mit dem Ziel, diese mit C57BL/6 und C3H/He Mäusen zu vergleichen. Nach Übernahme der Tiere erfolgte die Untersuchung des proximalen Maus-Chromosoms 7 mittels molekulargenetischer Methoden zum Nachweis der prädisponierenden Allele.

# Züchtung des kongenen Mausstammes



**Abb.4 Züchtung des *Dyscalc1*-positiven kongenen Mausstamms.** Am Anfang wurden C57BL/6 mit C3H/He Mäusen verpaart; die F1-Generation wurde mit C57BL/6 Weibchen rückgekreuzt; im Anschluss daran erfolgte die Rückkreuzung männlicher Nachkommen für weitere neun Generationen mit dem Ziel, Heterozygotie auf dem proximalen Chromosom 7 zu erhalten; eine abschließende Kreuzung der N10-Generation untereinander erbrachte schließlich ein Segment mit homozygoten Allelen des C3H/He Stamms auf dem proximalen Mauschromosom 7 auf einem >99% igen resistenten C57BL/6 Hintergrund.

## 2.4. molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 DNA-Isolation von Mausschwänzen

DNA von C57BL/6, C3H/He und *Dyscalc1*-positiven kongenen Mäusen wurde aus 2-3mm langen Schwanzstückchen durch eine Phenol/Chloroform-Extraktionsmethode isoliert. Den Schwanzstückchen wurde 500µl Lysis-Puffer zugefügt und übernacht zur Verdauung stehen gelassen. Am nachfolgenden Tag wurde die Lösung nach Zugabe von 550µl Phenol/Chloroform/Isoamyl (25:24:1) gemixt und bei 11.000 xg für drei Minuten zentrifugiert. Die obere

---

Phase wurde in ein weiteres Röhrchen überführt und mit der gleichen Menge an Chloroform gemischt und erneut zentrifugiert (11.000 xg für drei Minuten). Nach Überführen der oberen Phase in ein neues Röhrchen wurde die DNA durch Zugabe von 60 µl einer 3M Natriumacetat (pH 5.5) und 700 µl einer Ethanol-Lösung präzipitiert. Nach Zentrifugieren dieser Lösung für fünf Minuten bei 11.000 xg wurden die DNA-Proben am Boden des Röhrchens gesammelt. Die DNA wurde anfangs mit 70%igem, dann mit 98%igem Ethanol ausgewaschen. Nach Verflüchtigung des Ethanols bei Raumtemperatur wurde die extrahierte DNA in TE-Puffer gelöst.

#### **2.4.2. DNA-Amplifikation mittels PCR**

Die DNA-Amplifikation mittels PCR wurde mit standardisierten molekularbiologischen Methoden durchgeführt (Sambrook et al., 1989).

#### **2.4.3. Gel-Elektrophorese**

Die DNA-Analyse wurde mit einer standardisierten Agarose-Gel-Elektrophorese durchgeführt, wobei das Agarosegel eine Konzentration zwischen 0,8-2,5% aufwies. Um Mikrosatellitenmarker zu separieren, die polymorphe PCR-Produkte von mindestens 6 Basenpaaren Länge darstellen, wurde 4%iges hochauflösendes Agarosegel benutzt. Die Identifizierung der DNA-Produkte wurde durch den Zusatz von 0,1 µg/ml Ethidiumbromid pro 100 ml warmer Agarosegel-Lösung erreicht. Die Darstellung der DNA-Banden erfolgte unter UV-Licht.

#### **2.4.4. Genotypisierung der polymorphen Mikrosatellitenmarker zur Züchtung der *Dyscalc1*-positiven kongenen Tiere**

Zur Genotypisierung der beteiligten Mausstämme wurde eine Reihe von polymorphen Mikrosatellitenmarkern (Research Genetics, Huntsville, AL, USA) eingesetzt. Diese Marker decken den Bereich auf dem proximalen Chromosom

---

7 zwischen C3H/He und C57BL/6 in einer Region von etwa zwei bis vier Centimorgan ab. Die Amplifizierung der Marker erfolgte mittels 50-100 ng DNA der zu untersuchenden Tiere in einer 10 µl PCR-Reaktionslösung. Diese Lösung enthielt Oligonukleotide Primer-Paare (1,0 µM), dNTP (0,2 mM), 0,5 U Taq-Polymerase und PCR-Puffer. Zur Amplifizierung wurde ein modifiziertes „Touch down“ Programm benutzt. Es bestand aus drei aufeinander folgenden Phasen: in der ersten Phase erfolgte die Denaturierung der DNA bei 94°C für zwei Minuten, im Anschluss folgte eine 45 Zyklen umfassende Phase inklusive 15 Zyklen (94°C-30sec, 58°C-30sec, 72°C-30sec), gefolgt von 15 Zyklen (94°C-30sec, 56°C-30sec, 72°C-30sec) und weiteren 15 Zyklen (94°C-30sec, 54°C-30sec, 72°C-30sec), sowie eine abschließende Phase bei 72°C für 10 Minuten. Die Genotypen der Tiere wurden mittels Analyse der PCR-Produkte durch Gel-Elektrophorese auf 4%igem Metaphor Agarosegel mit Ethidiumbromid bestimmt.

## **2.5. Aorten-Kryopexie**

Die Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Deutschen Tierversuchskommission von Schleswig-Holstein und mit Genehmigung der lokalen Aufsichtsbehörde durchgeführt (Referenznummer 1/7/03). Im Alter von zwölf Wochen wurde die Aorten-Kryopexie an weiblichen C57BL/6, C3H/He und *Dyscalc1*-positiven kongenen Mäusen ausgeführt. Nach einer kurzen Inhalationsnarkose mit Isofluran wurden die Tiere mit intraperitonealer Injektion einer Avertin®-Lösung (250 mg/kg Körpergewicht einer 12,5 mg/ml 2,2,2-Tri-Bromo-Ethanol-Lösung, in frisch hergestelltem 2-Methyl-2-Butanol) anästhesiert. Nach Rasur der Haare am Bauch kam es zu einer Eröffnung des Abdomens mittels einer Inzision in der Linea alba der Rektusscheide. Die abdominalen Organe wurden vorsichtig zur Seite verlagert und die retroperitoneale Aorta dargestellt. Die infrarenale Aorta wurde für etwa 10 Sekunden mit einem in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Metallstempel selektiv mit leichtem Druck berührt. Durch diese Prozedur entstand ein makroskopisch nicht sichtbarer Gewebedefekt in der infrarenalen Aorta und der umgebenden quergestreiften Muskulatur, namentlich M. psoas major und M.

---

quadratus lumborum. Nach Beendigung des chirurgischen Eingriffs erfolgte ein zweischichtiger Verschluss der Bauchwand mittels 7.0 Nahtmaterial. Die Überlebensrate dieses operativen Eingriffs lag bei >95%. Nach 1, 3 und 7 Tagen wurden die Tiere der beteiligten Gruppen mittels Genickbruch unter Betäubung getötet. Die infrarenale Aorta wurde exzidiert und in PBS gewaschen. Die Proben der Aorten wurden in flüssigem Stickstoff tiefgekühlt und anschließend bei -20°C eingefroren. Zur histologischen Untersuchung wurden die Gewebeproben in Jung Tiefkühl-Medium (Leica Instruments) eingebettet und am Kryothom geschnitten.

## **2.6. Histologische Untersuchungen**

Durch eine Bearbeitung der Proben am Kryothom wurden 8-10µm dicke Schnitte durch das verletzte Gewebe der exzidierten und eingefrorenen Aorten hergestellt. Die Schnitte wurden im Anschluss auf Poly-(D-Lysin)-beschichteten Objektträgern gesammelt.

Zur Färbung der Objektträger mit Alizarin red S wurden die Träger in 0,5% Alizarin red S, Tris-Puffer mit pH 9 für 60 Minuten und im Anschluss daran mit Tris-Pufferlösung pH 7 für 5 Minuten inkubiert. Danach erfolgte das Waschen der Objektträger in Tris-Puffer pH 9 sowie pH 7 für jeweils 5 Sekunden. Abschließend wurden die Schnitte für 10 Minuten in Xylol eingebettet und mit Kaisers Glycerol-Gelantine abgeschlossen.

Zur Färbung der Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin wurden die Objektträger für 10 Minuten mit Hämatoxylin nach P. Mayer gefärbt und anschließend 10 Minuten in fließendem Wasser gespült, um die Bläuung zu erhalten. Im Anschluss daran erfolgte die Färbung in Eosin für 3 Minuten und das Auswaschen der Objektträger in fließendem Wasser für 5 Minuten. Nach der Differenzierung in 70%igem, dann 100%igem Ethanol wurden die Objektträger in Xylol eingebettet und abschließend mit Kaisers Glycerol-Gelantine abgeschlossen.

Zur Färbung der Objektträger mit Calcein wurden die Objektträger für 30 Minuten in eine Lösung aus 0,1 mM Calceinpulver in 0,05 M Tris-Puffer (pH 9) gelegt. Im Anschluss daran wurden die Schnitte in Tris-Puffer (pH 9)

---

ausgewaschen und mit DAPI zur Darstellung der Nukleoli gegengefärbt. Anschließend wurden die Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

## 2.7. Immunhistologische Methoden

Zur immunhistologischen Darstellung der Präparate wurden Serienschnitte der verletzten Areale der infrarenalen Aorten von 8-10µm Dicke hergestellt. Um das Vorliegen bestimmter Knochenmatrix assoziierter Proteine zu untersuchen, wurden verschiedene immunhistologische Färbungen eingesetzt. Die Objektträger wurden für 10 Minuten mit Aceton fixiert und die endogene Peroxidase mit 1-3 Tropfen Peroxidase-Block inkubiert. Danach erfolgte ein Auswaschen der Objektträger in PBS für 2 Minuten und die anschließende Inkubation mit Serum-Block. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in einer Konzentration von 5µg/ml für Osteopontin und 5µg/ml BMP 2/4 in einer Feuchtkammer für 120 Minuten. Gebundene Antikörper wurden mittels eines biotynilierten sekundären Antikörpers nachgewiesen, der seinerseits mittels Streptavidin-Peroxidase-Komplex dargestellt wurde. Die Kontrollen wurden ohne den primären Antikörper oder mit nicht-spezifischen IgG1-Antikörpern durchgeführt. Als Gegenfärbung kam Hämatoxylin zur Anwendung. Die gefärbten Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop untersucht.

## 2.8. Statistik

Tabelle: Untersuchungsschema Tag  $x$ :

	keine Verkalkung	dystrophe Verkalkung	Summe
Mausstamm I	$a$	$b$	$a + b$
Mausstamm II	$c$	$d$	$c + d$
Summe	$a + c$	$b + d$	$N$

---

Nullhypothese: Die untersuchten Mausstämme zeigen nach Verletzung (Kryopexie) unterschiedliche Reaktionen bezüglich des Auftretens von dystropher Aortenverkalkung (bzw. der dystrophen Verkalkung der quergestreiften Muskulatur).

Signifikanzniveau:  $\alpha = 0.05$

Testwahl: Aufgrund der kleinen Stichprobe wird der exakte Test nach Fisher gewählt.

Testanwendung:

1. Ermittlung der Punktwahrscheinlichkeit der Verteilung:

$$p = \frac{(a+b)! \cdot (c+d)! \cdot (a+c)! \cdot (b+d)!}{N! \cdot a! \cdot b! \cdot c! \cdot d!}$$

2. Überprüfung der Randverteilungen, Bestimmung von  $\left| \frac{a}{a+b} - \frac{c}{c+d} \right|$  für die Randverteilungen.
3. Der P-Wert ergibt sich aus der Punktwahrscheinlichkeit der Verteilung und den P-Werten der Randverteilungen, bei denen  $\left| \frac{a}{a+b} - \frac{c}{c+d} \right|$  größer oder gleich dem entsprechenden Wert der Punkteverteilung ist.

Beispielberechnung:

Tabelle Aortenverkalkung: Tag 1 nach Verletzung (Kryopexie), C57BL/6 vs. C3H/He Mäuse

	keine Verkalkung	dystrophe Verkalkung	Summe
C57BL/6	5	0	5
C3H/He	2	3	5
Summe	7	3	10

---

1. Punktverteilung:  $p = \frac{5! \cdot 5! \cdot 2! \cdot 3!}{10! \cdot 5! \cdot 0! \cdot 7! \cdot 3!} = 0,0833$  ;  $\left| \frac{a}{a+b} - \frac{c}{c+d} \right| = 0,6$

2.

Aufteilung	$\left  \frac{a}{a+b} - \frac{c}{c+d} \right $	P-Wert
$\begin{array}{ c } \hline 41 \\ \hline 32 \\ \hline \end{array}$	0,2	
$\begin{array}{ c } \hline 32 \\ \hline 41 \\ \hline \end{array}$	0,2	
$\begin{array}{ c } \hline 23 \\ \hline 50 \\ \hline \end{array}$	0,6	0,0833

3. Gesamt-P-Wert:  $p = 2 \cdot 0,0833 = 0,1667$

Interpretation: Bei einem Wert von  $p > 0.05$  kann die Nullhypothese nicht abgelehnt werden. Mit der Untersuchung konnte somit gezeigt werden, dass zwischen den C57BL/6 und C3H/He Mäusen bezüglich der dystrophen Aortenverkalkung am ersten postoperativen Tag nach Verletzung (Krypexie) kein signifikanter Unterschied besteht. Bei einem Wert von  $p \leq 0.05$  wird die Nullhypothese abgelehnt. Mit einer 95%igen Wahrscheinlichkeit besteht somit ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Mausstämmen bezüglich des Auftretens dystropher Kalziumablagerungen nach Verletzung (Krypexie).

---

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Aorten-Kryopexie

Eine Verletzung der infrarenalen Aorta und des umliegenden quergestreiften Muskelgewebes der Mm. quadratus lumborum et psoas major durch die Aorten-Kryopexie führte bei 100% der C3H/He-Mäuse nach 3 und 7 Tagen zu dem Auftreten dystropher Kalziumablagerungen. Bereits am ersten postoperativen Tag nach Aorten-Kryopexie waren punktförmige Verkalkungen bei 3 von 5 C3H/He und 2 von 5 kongenen Tieren in der infrarenalen Aorta sichtbar. Ebenso wurden bei allen kongenen Tieren beginnend mit dem dritten Tag nach Verletzung dystrophe Kalziumablagerungen innerhalb der Aorta beobachtet. Diese dystrophe Kalziumablagerungen waren in der Tunica media der Mauseorten sowie in großen Plaques von Kalziumkristallen im umliegenden Muskelgewebe zu sehen. Die Verkalkung der quergestreiften Muskulatur war bereits vom ersten postoperativen Tag nach Gewebsverletzung an bei 4 von 5 kongenen und allen C3H/He Tieren deutlich zu erkennen. Die dystrophe Verkalkungen der Aorta waren bei den C3H/He Mäusen insgesamt ausgedehnter und großflächiger als bei den kongenen Tieren, die im Vergleich dazu eine subtilere und punktförmigere Ablagerung von Kalziumkristallen zeigten. C57BL/6 Mäuse zeigten weder in der infrarenalen Aorta noch im umliegenden Muskelgewebe während der ersten sieben Tage nach Aorten-Kryopexie eine dystrophe Verkalkung. Bei diesem Mausstamm konnte ausschließlich eine Degeneration der Aorten-Wandstruktur sowie ein beginnender fibrotischer Umbau der Gefäßwand beobachtet werden.

	<u>Tag 1</u>	<u>Tag 3</u>	<u>Tag 7</u>
<u>C57BL/6</u>	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/10 (0%)
<u>C3H/He</u>	3/5 (60%)	5/5 (100%)	10/10 (100%)

<b><u>Dyscalc1-pos.</u></b> <b><u>kongene Mäuse</u></b>	<b>2/5 (40%)</b>	<b>5/5 (100%)</b>	<b>10/10 (100%)</b>
--	------------------	-------------------	---------------------

**Tabelle 1 zeitliches Auftreten der dystrophen Verkalkungen in der infrarenalen Aorta nach Verletzung (Kryopexie).** C57BL/6 Mäuse zeigten innerhalb der ersten sieben Tage nach Aorten-Kryopexie keine dystrophen Verkalkungen in der infrarenalen Aorta; bei C3H/He und *Dyscalc1*-positiven kongenen Mäusen waren bereits ab Tag 1 nach Gewebsverletzung erste punktförmige Verkalkungen der Gefäßwand sichtbar; ab dem dritten postoperativen Tag waren dystrophe Verkalkungen in allen C3H/He und *Dyscalc1*-positiven kongenen Tieren in der Media der infrarenalen Aorta nachweisbar.

	<b><u>Tag 1</u></b>	<b><u>Tag 3</u></b>	<b><u>Tag 7</u></b>
<b><u>C57BL/6</u></b>	<b>0/5 (0%)</b>	<b>0/5 (0%)</b>	<b>0/10 (0%)</b>
<b><u>C3H/He</u></b>	<b>5/5 (100%)</b>	<b>5/5 (100%)</b>	<b>10/10 (100%)</b>
<b><u>Dyscalc1-pos.</u></b> <b><u>kongene Mäuse</u></b>	<b>4/5 (80%)</b>	<b>5/5 (100%)</b>	<b>10/10 (100%)</b>

**Tabelle 2 zeitliches Auftreten der dystrophen Verkalkungen in den Mm. quadratus lumborum et psoas major nach Kryopexie.** C57BL/6 Mäuse zeigten innerhalb der ersten sieben Tage nach Verletzung (Kryopexie) keine dystrophen Kalziumablagerungen im quergestreiften Muskelgewebe der Mm. quadratus lumborum et psoas major; bei allen C3H/He und 80% der kongenen Tiere waren ab dem ersten postoperativen Tag nach Gewebsverletzung Kalziumablagerungen der Mm. quadratus lumborum et psoas major zu erkennen; ab Tag 3 nach Kryopexie waren diese dystrophen Verkalkungen bei allen C3H/He und kongenen Tieren nachweisbar.

### **3.2. Histologische Beobachtungen**

#### **3.2.1. HE und Calcein Färbung**

Durch die Calcein-Färbung werden unlösliche Kalziumphosphat-Kristalle mittels Kalzium-bindenden Fluorochromen sichtbar gemacht. Die verletzten Areale der Aorta und des umliegenden Muskelgewebes können mittels einer Infiltration von

---

polymorphkernigen, einwandernden Zellen differenziert werden, die durch die DAPI Färbung dargestellt werden können, wobei DAPI selektiv die Zellkerne anfärbt. Nicht verletztes Aortengewebe stellte sich mit einer welligen Struktur der elastischen Fasern der Tunica media sowie einer flachen Schicht von Endothelzellen der Intima dar.

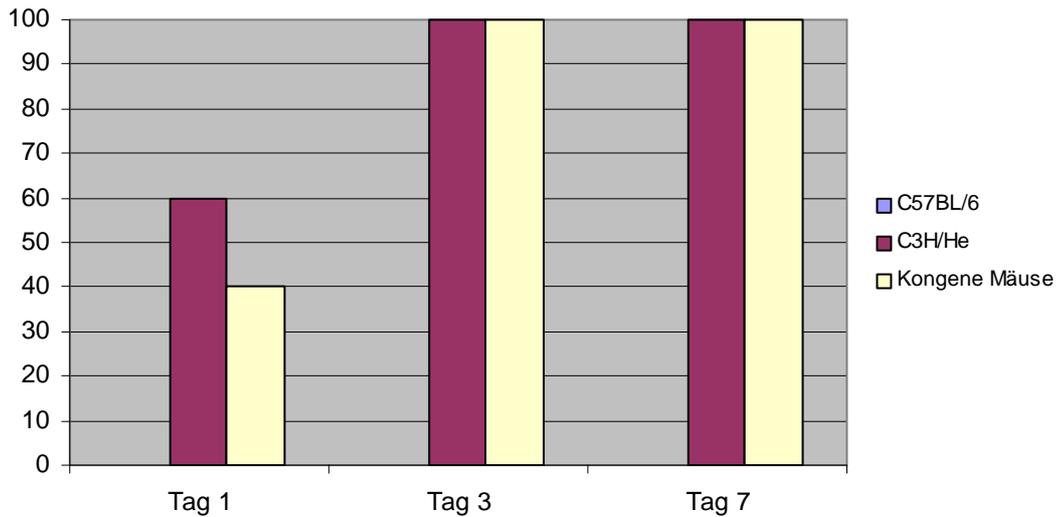
Am ersten postoperativen Tag nach Verletzung (Kryopexie) waren in allen Mausstämmen die typischen Zeichen einer Apoptose/Nekrose sowohl innerhalb der infrarenalen Aorta wie auch im umliegenden Muskelgewebe der *Mm. quadratus lumborum et psoas major* zu sehen. Es zeigte sich eine Auflösung der welligen Struktur der elastischen Fasern sowie bei einem Teil der Tiere ein Hämatom innerhalb der Gefäßwand. Des Weiteren kam es zu einer beginnenden Infiltration mit Entzündungszellen und Makrophagen. Die verletzten Anteile der quergestreiften Muskulatur der *Mm. psoas major et quadratus lumborum* waren von nicht verletzten Arealen klar abgegrenzt und zeigten die typischen Zeichen von Zelluntergang wie Karyolyse, ein blasses Zytoplasma und einen Verlust der normalen Zellintegrität. Bei 3 von 5 C3H/He Tieren konnten erste punktförmige Ablagerungen von Kalziumkristallen in der Tunica media der infrarenalen Aorta beobachtet werden, während das umgebende Muskelgewebe bereits bei allen 5 Tieren deutliche dystrophe Kalziumablagerungen aufwies. Bei 2 von 5 *Dyscalc1*-positiven kongenen Tieren konnten am ersten postoperativen Tag Kalziumkristalle in der Tunica media der Aorta nachgewiesen werden. Ein positiver Kalziumnachweis mittels Calcein-Färbung konnte im quergestreiften Muskelgewebe bei 4 von 5 der kongenen Tiere erbracht werden. C57BL/6 Mäuse zeigten alle typischen Zeichen der Gewebsverletzung in der HE- und Calcein-Färbung, allerdings keinen Nachweis von Kalziumkristallen in der Gefäßwand der infrarenalen Aorta oder des umliegenden Muskelgewebes.

Am dritten postoperativen Tag nach Kryopexie konnten in den beteiligten Mausstämmen große Gebiete nekrotischen Gewebes abgegrenzt werden. Hämatoxylin und Eosin-Färbungen zeigten alle Zeichen einer beginnenden degenerativen Umwandlung des verletzten Gewebes. Bei 5 von 5 C3H/He Tieren konnten ausgedehnte dystrophe Kalziumablagerungen innerhalb der Gefäßwand der infrarenalen Aorta sowie im quergestreiften Muskelgewebe der

---

Mm. psoas major et quadratus lumborum beobachtet werden. 5 von 5 *Dyscalc1*-positive kongene Mäuse zeigten entsprechend den C3H/He Tieren dystrophe Kalziumablagerungen innerhalb der Gefäßwand. Diese Kalziumablagerungen waren wie bei den C3H/He Tieren in der Tunica media der infrarenalen Aorta lokalisiert, allerdings im Vergleich zu den C3H/He Tieren punktförmiger und weniger deutlich ausgeprägt. In der quergestreiften Muskulatur waren dystrophe Kalziumablagerungen bei 5 von 5 kongenen Mäusen analog den C3H/HE Tieren nachweisbar. Bei C57BL/6 Mäusen konnten keine dystrophen Verkalkungen innerhalb der Gefäßwand oder des umgebenden Muskelgewebes beobachtet werden. Diese Tiere zeigten wie oben beschrieben alle Zeichen von Apoptose/Nekrose sowie einen beginnenden fibrotischen Umbau der Gefäßwand.

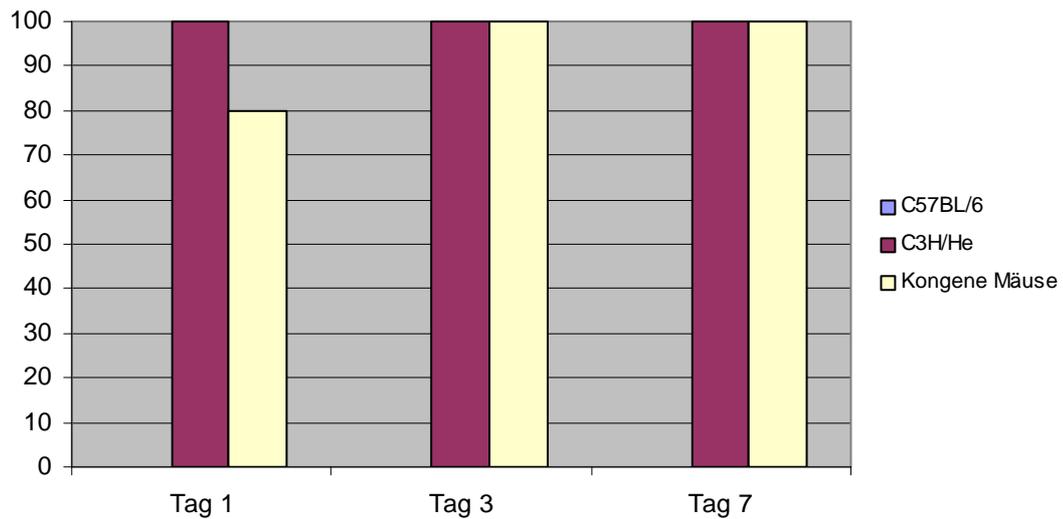
Am siebten postoperativen Tag nach Verletzung (Kryopexie) kam es zu einer maximalen Ausprägung der dystrophen Kalziumablagerungen bei den C3H/He wie *Dyscalc1*-positiven kongenen Tieren. 10 von 10 C3H/He Mäusen zeigten eine ausgedehnte dystrophe Verkalkung großer Teile der infrarenalen Aortenwand. Es konnten sowohl in der umgebenden Muskulatur wie auch innerhalb der Aorta große Plaques von Kalziumkristallen beobachtet werden. 10 von 10 *Dyscalc1*-positiven kongenen Tiere präsentierten wie die C3H/He Tiere dystrophe Verkalkungen innerhalb der infrarenalen Gefäßwand und des umliegenden Muskelgewebes. Diese Verkalkungen waren im Vergleich zu den C3H/He Tieren weniger deutlich ausgeprägt. C57BL/6 Tiere zeigten am siebten Tag nach Verletzung einen fibrotischen Umbau der infrarenalen Gefäßwand ohne dystrophe Kalziumablagerungen in der Aorta oder im umgebenden Muskelgewebe.



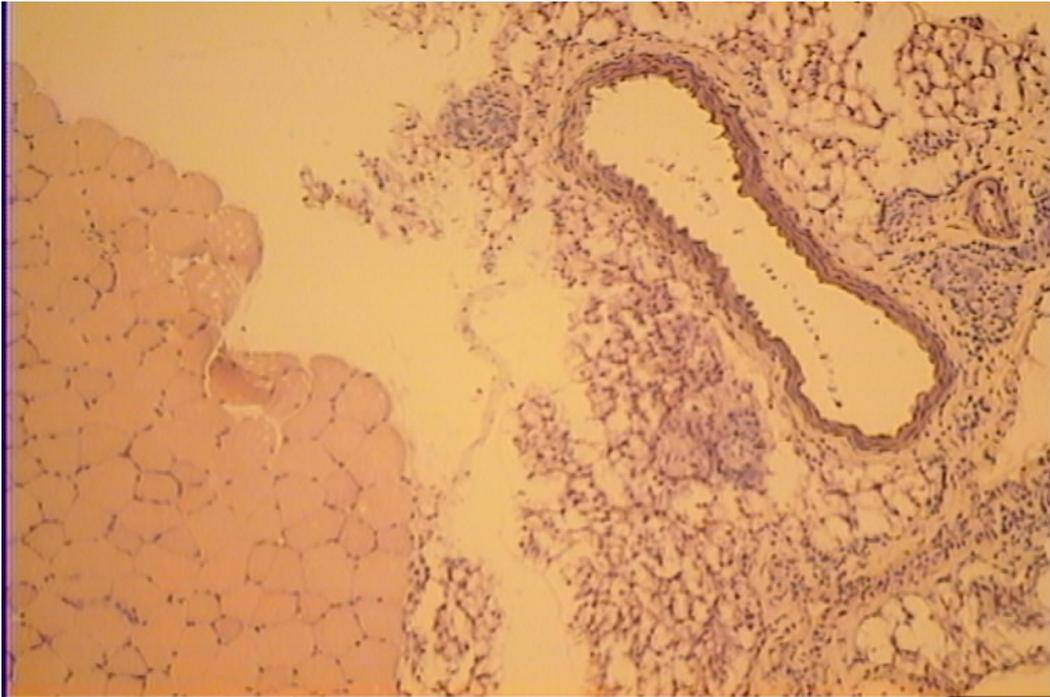
**Abb. 5 zeitliches Auftreten der dystropen Verkalkungen in der infrarenalen Aorta nach Verletzung (Kryopexie) mittels Calcein Färbung:** bei 3 von 5 C3H/He Tieren konnte bereits am ersten Tag nach Verletzung ein positiver Nachweis von Kalziumablagerungen in der infrarenalen Aorta mittels Calcein Färbung erbracht werden, während C57BL/6 Mäuse keine dystropen Verkalkungen aufwiesen; bei 2 von 5 *Dyscalc1*-positiven kongenen Tieren waren dystrophe Verkalkungen ebenfalls am ersten postoperativen Tag nachweisbar. Dystrophe Kalziumablagerungen waren ab dem dritten postoperativen Tag in allen C3H/He und kongenen Tieren in der infrarenalen Aorta nachweisbar, während C57BL/6 Tiere keine dystropen Verkalkungen aufwiesen.

### 3.2.2. Alizarin Red S Färbung

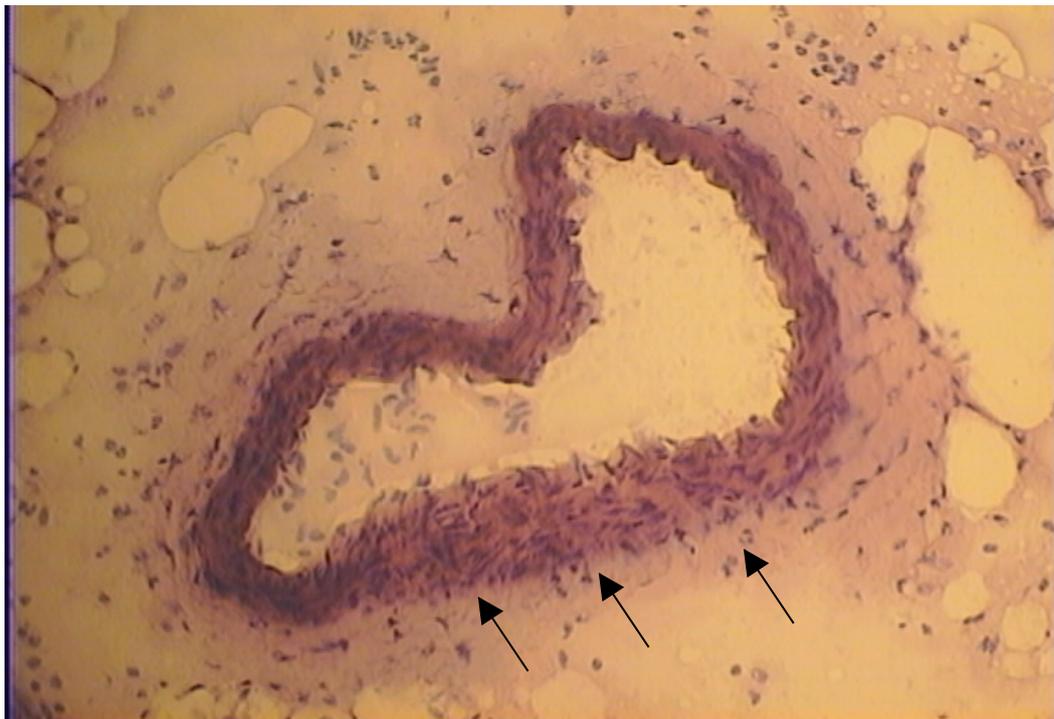
Ein ergänzender lichtmikroskopischer Nachweis der dystropen Kalziumablagerungen wurde mittels der Alizarin red S Färbung erreicht. Dabei waren ab dem dritten postoperativen Tag nach Verletzung (Kryopexie) dystrophe Kalziumablagerungen innerhalb der infrarenalen Aorta sowie des umliegenden Muskelgewebes in C3H/He und *Dyscalc1*-positiven kongenen Tieren zu beobachten. Die maximale Ausprägung dieser dystropen Verkalkungen wurde bei beiden Mausstämmen am siebten postoperativen Tag erreicht. Bei C57BL/6 Mäusen konnten keine dystropen Verkalkungen innerhalb der Gefäßwand oder des umgebenden Muskelgewebes mittels Alizarin red S Färbung beobachtet werden.



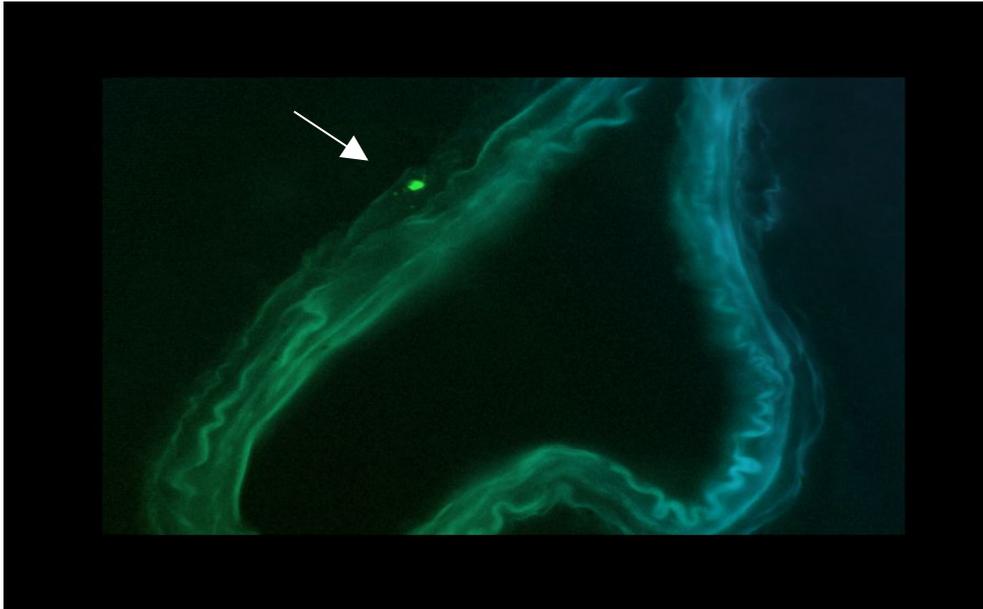
**Abb. 6 zeitliches Auftreten der dystropen Verkalkungen in den Mm. quadratus lumborum et psoas major nach Verletzung (Kryopexie) mittels Calcein Färbung:** bei 4 von 5 Dyscalc1-positiven kongenen und allen C3H/He Tieren konnten dystrophe Kalziumablagerungen in der nekrotischen Muskulatur am ersten Tag nach Kryopexie mittels Calcein Färbung nachgewiesen werden, während C57BL/6 Mäuse keinen Nachweis dystropher Verkalkungen zeigten. Dystrophe Verkalkungen der quergestreiften Muskulatur waren ab dem dritten postoperativen Tag in allen C3H/He und kongenen Tieren nachweisbar, während bei C57BL/6 Mäuse keine Verkalkung beobachtet werden konnte.



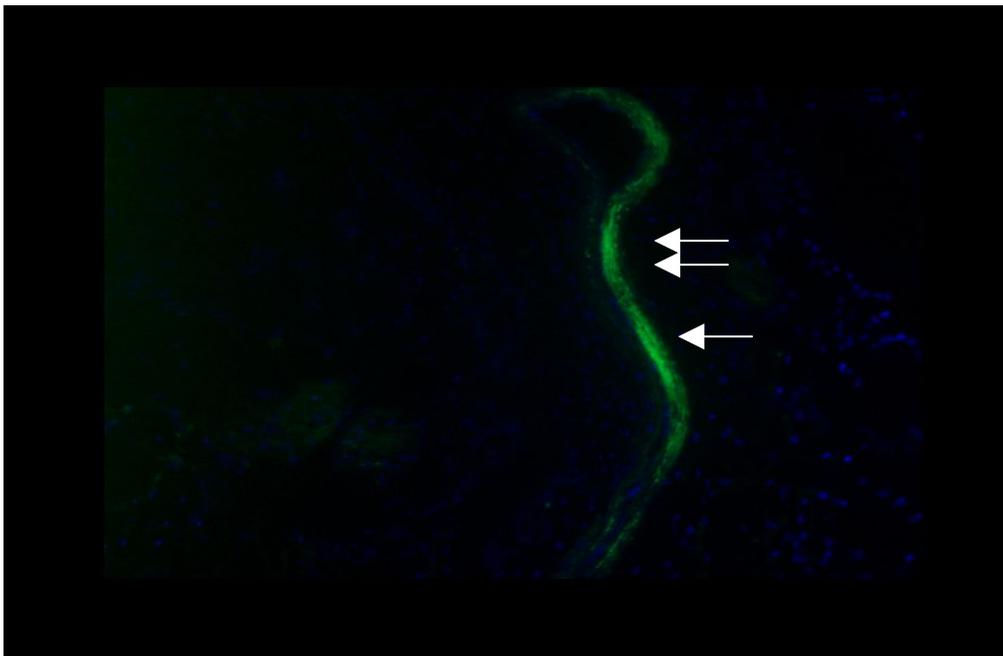
**Abb. 7 nicht verletzte C57BL/6 Aorta, 10x HE:** nicht verletzte infrarenale Aorta eines C57BL/6 Tieres; es findet sich eine wellige Struktur der elastischen Fasern der Tunica media mit flacher Intima-Zellschicht sowie ein regelrechter Aufbau der quergestreiften Muskulatur.



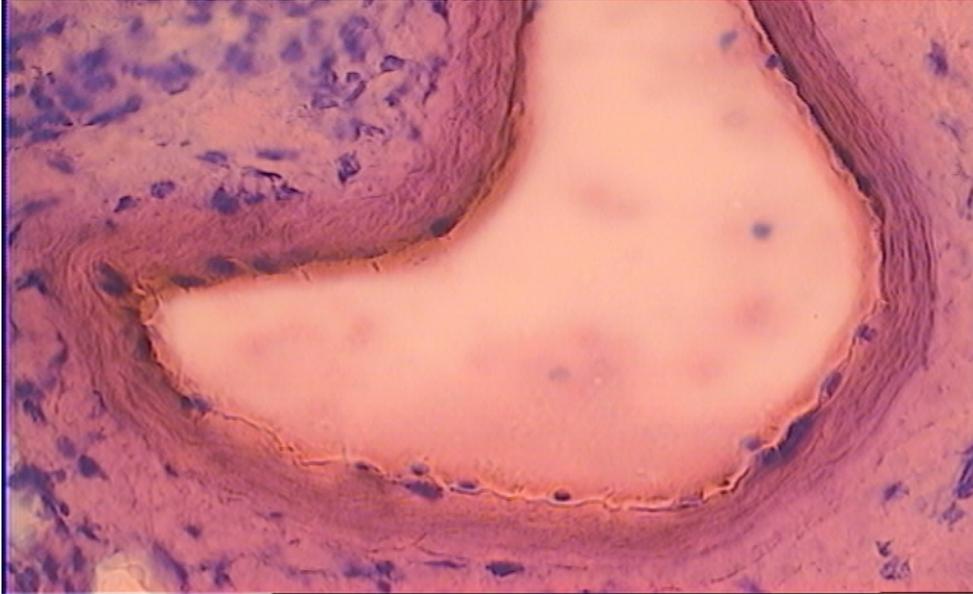
**Abb. 8 Aorta C57BL/6, 3 Tage nach Verletzung (Kryopexie), 10x HE:** typische Zeichen der Gewebsverletzung durch die Aorten-Kryopexie; es zeigt sich eine Auflösung der welligen Struktur der elastischen Fasern und eine Verdickung der Gefäßwand mit Einwanderung von Makrophagen.



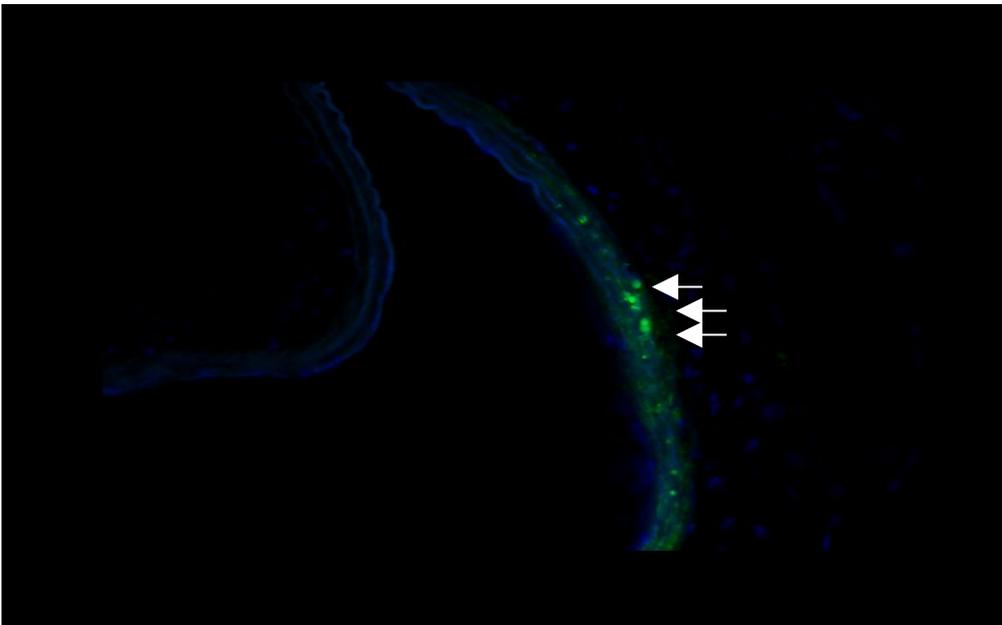
**Abb. 9** Aorta *Dyscalc1*-positives kongenes Tier, 1 Tag nach Kryopexie, 20x Calcein-Färbung: es zeigt sich ein punktförmiger Nachweis einer dystrophen Kalziumablagerung (grün) in der infrarenalen Aorta eines kongenen Tieres am ersten postoperativen Tag nach Verletzung (Kryopexie).



**Abb.10** Aorta C3H/He, 3 Tage nach Kryopexie, 10x Calcein: am dritten Tag nach Gewebsverletzung zeigt sich bei diesem C3H/He Tier eine deutliche Ausprägung der dystrophen Kalziumablagerungen (grün) innerhalb der infrarenalen Gefäßwand; große Anteile der Media der Aorta sind von dystropher Verkalkung betroffen.



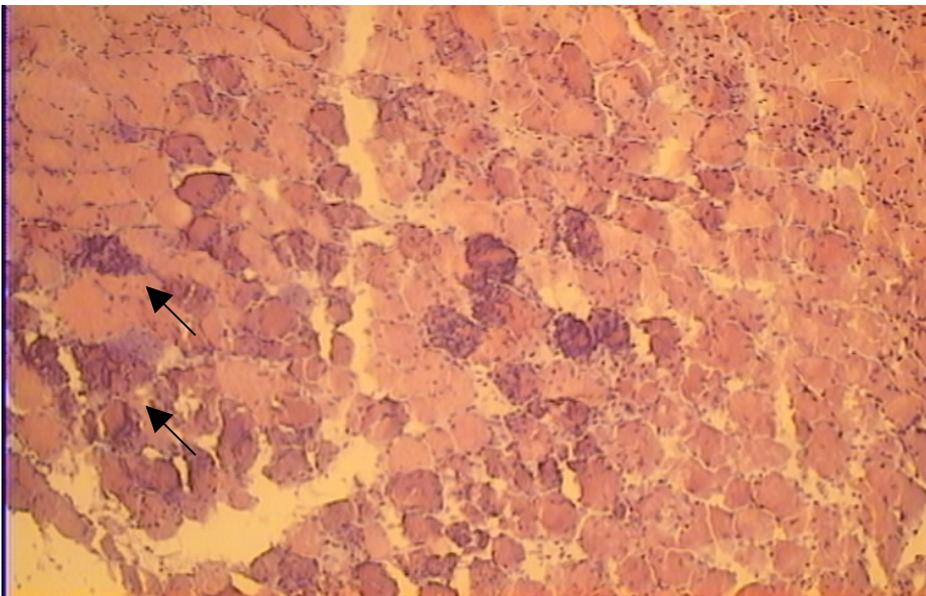
**Abb. 11 Aorta *Dyscalc1*-positives kongenes Tier, 3 Tage nach Kryopexie, 20x HE:** dieses Bild zeigt denselben Ausschnitt der infrarenalen Aorta in der HE Färbung wie in Abb. 12; es finden sich alle Zeichen der Nekrose innerhalb der Gefäßwand drei Tage nach Verletzung (Kryopexie).



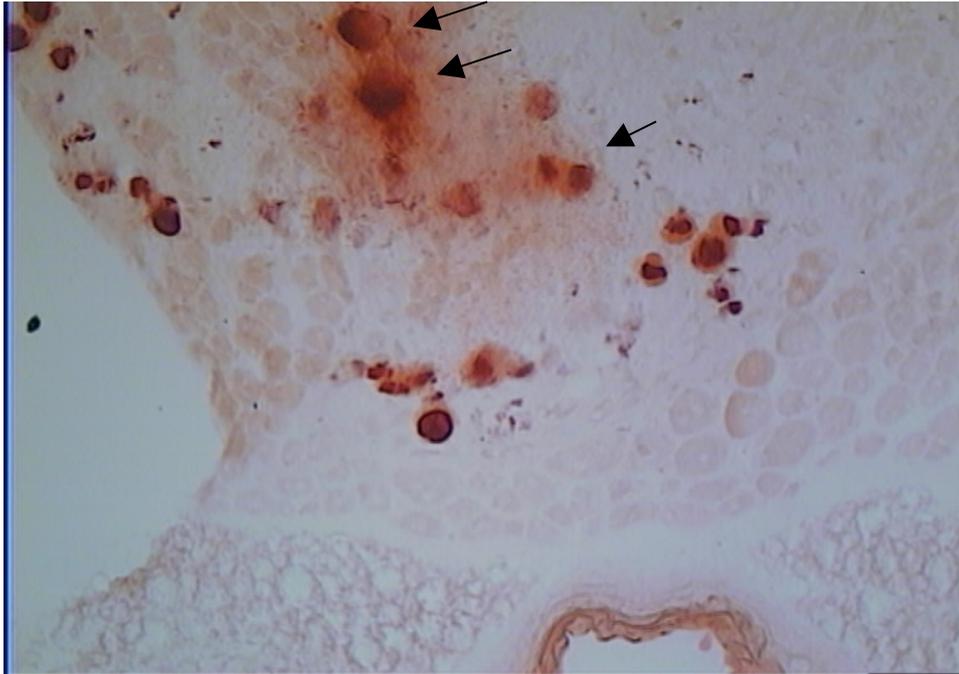
**Abb. 12 Aorta *Dyscalc1*-positives kongenes Tier, 3 Tage nach Kryopexie, 20x Calcein:** in der Gefäßwand dieses kongenen Tieres findet sich im Vergleich zu den C3H/He Tieren eine eher subtilere und punktförmige Ablagerung von Kalziumkristallen (grün) nach Kryopexie.



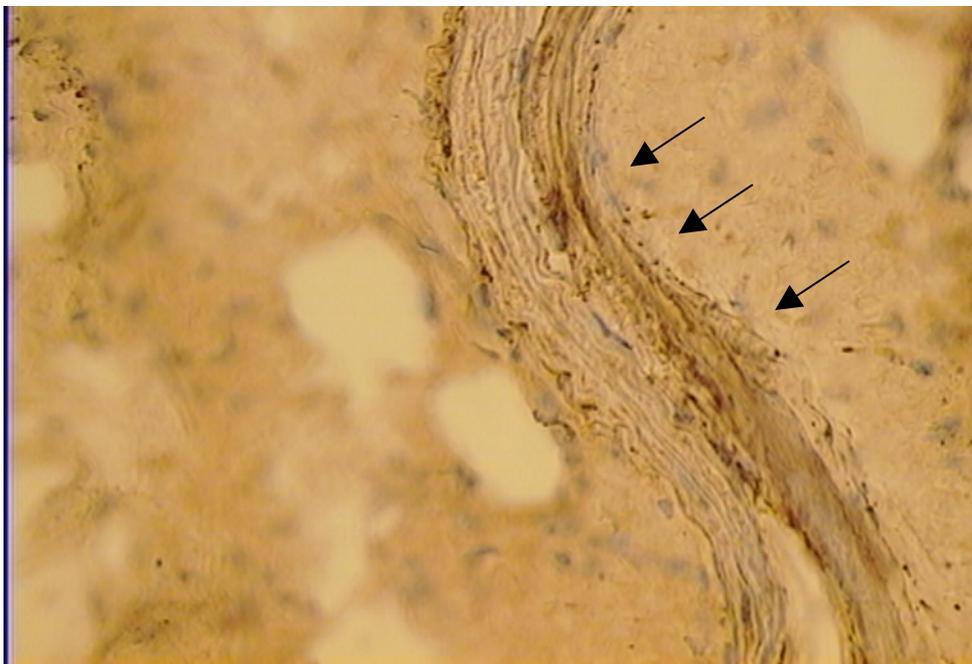
**Abb. 13 Aorta C3H/He, 7 Tage nach Kryopexie, 10x, Alizarin red S:** Alizarin red S Färbung einer C3H/He Aorta am siebten postoperativen Tag nach Kryopexie mit deutlich sichtbarer Verkalkung (rot) der Tunica media der infrarenalen Aorta.



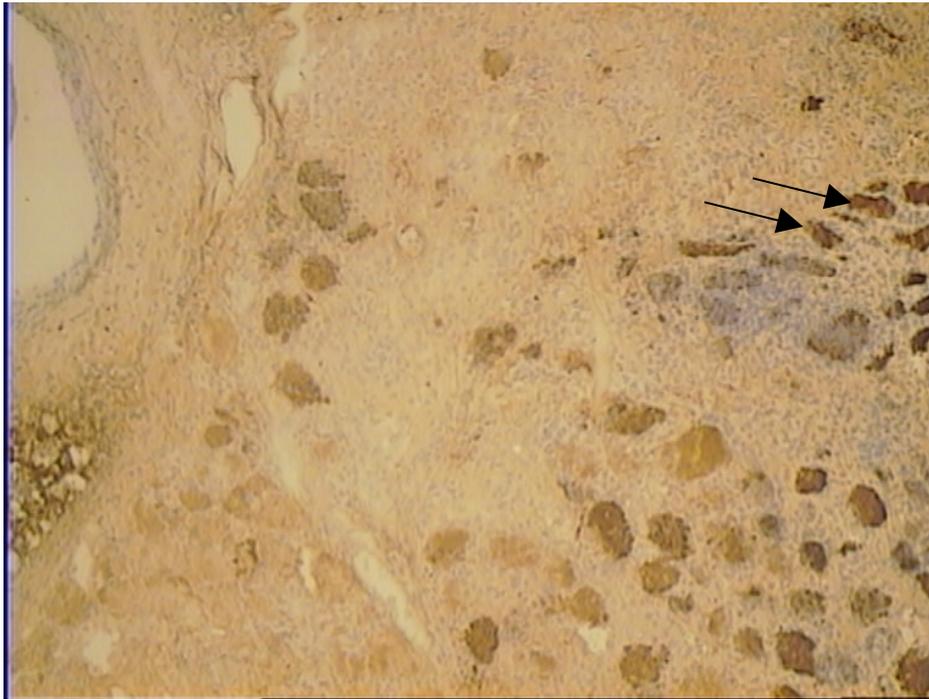
**Abb. 14 Mm. psoas major et quadr. lumb. eines C3H/He Tieres, 3 Tage nach Kryopexie, 10x HE:** es findet sich eine dystrophe Muskelverkalkung der die Aorta umgebenden Mm. psoas major und quadratus lumborum sowie alle Zeichen der Nekrose (Verkalkung hier violett gefärbt).



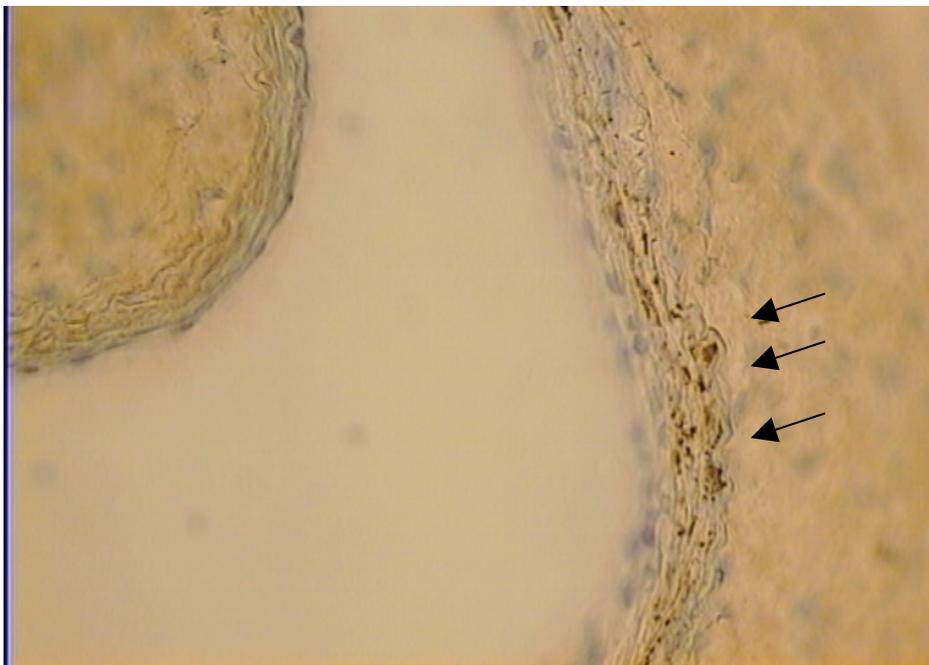
**Abb. 15 Muskulatur eines C3H/He Tieres, 7 Tage nach Kryopexie, 10x Alizarin red S:** in der Abbildung erfolgt der Nachweis dystropher Verkalkung (rot) des umliegenden quergestreiften Muskelgewebes (Mm. psoas et quadratus lumborum) mit der Alizarin red S Färbung; im unteren Teil des Bildes ist die infrarenale Aorta abgebildet.



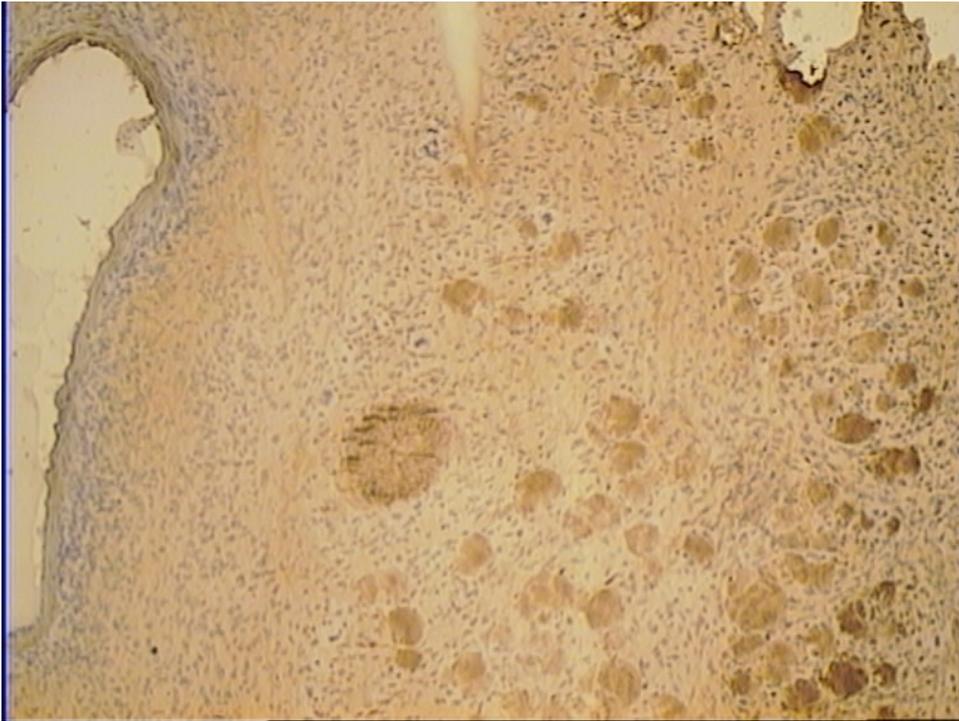
**Abb. 16 Aorta C3H/He, 3 Tage nach Kryopexie, 40x OPN:** in der Abbildung ist die infrarenale Aorta eines C3H/He Tieres am dritten postoperativen Tag nach Kryopexie mit positivem Osteopontin-Nachweis (braun) in der Aortenwand dargestellt.



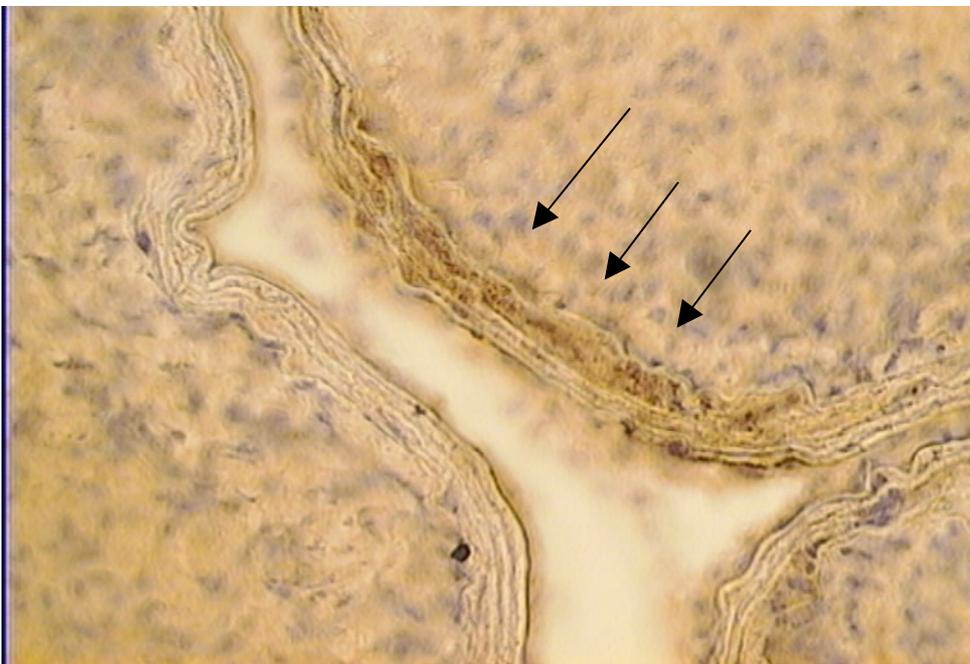
**Abb. 17 Aorta + Muskulatur eines kongenen Tieres, 3 Tage nach Kryopexie, 10x OPN:** drei Tage nach Verletzung findet sich ein positiver OPN-Nachweis im umliegenden quergestreiften Muskelgewebe (braun); die Osteopontin Expression ist mit den dystrophen Kalziumablagerungen ko-lokalisiert.



**Abb. 18 Aorta kongenes Tiere, 3 Tage nach Kryopexie, 20x OPN:** das Bild stellt denselben Ausschnitt der infrarenalen Aorta eines *Dyscalc1*-positiven kongenen Tieres wie in Abb. 11 und 12 dar; es zeigt sich ein positiver Nachweis von Osteopontin innerhalb der Aorta; dieser ist mit den dystrophen Kalziumablagerungen ko-lokalisiert (siehe Abb. 11 und 12).



**Abb. 19 Aorta und Muskulatur eines C3H/He Tieres, 3 Tage nach Kryopexie, 10x BMP:** es findet sich ein positiver Nachweis von BMP 2/4 (braun) in der Muskulatur des quergestreiften Muskelgewebes; dieser ist mit den dystrophen Kalziumablagerungen ko-lokalisiert.



**Abb. 20 Aorta Dyscalc1-positives kongenes Tier, 7 Tage nach Kryopexie, 20x BMP:** in der Abbildung zeigt sich positiver Nachweis von BMP 2/4 (braun) in der infrarenalen Aorta eines kongenen Tieres 7 Tage nach Aorten-Kryopexie.

---

### **3.3. Expression von Knochenmatrix assoziierten Proteinen mittels Immunhistologie**

#### **3.3.1. Osteopontin Expression**

Die Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen für Osteopontin sind in den Abbildungen 16, 17 und 18 dargestellt.

Beginnend mit dem ersten Tag nach Verletzung durch die Kryopexie konnte eine Expression von Osteopontin in allen drei Mausstämmen innerhalb der infrarenalen Aorta nachgewiesen werden. Bei C57BL/6 Mäusen zeigte sich eine geringe Färbung innerhalb der Aortenwand. C3H/He und *Dyscalc1*-positive kongene Tiere wiesen am ersten Tag nach Verletzung der Gefäßwand ebenfalls eine geringe Osteopontin positive Färbung der Aortenwand auf.

Am dritten Tag nach Verletzung zeigten C57BL/6 Tiere weiterhin einen geringfügigen Nachweis von Osteopontin innerhalb der Gefäßwand, während C3H/He und kongene Mäuse eine Zunahme der Ausdehnung der Osteopontin Expression zeigten.

Am siebten postoperativen Tag zeigte sich der OPN Nachweis innerhalb der Gefäßwand wie auch der quergestreiften Muskulatur bei C57BL/6 Tieren unverändert, während sie bei den C3H/He und kongenen Tieren ihre maximale Ausprägung erreichte. Die Expression von Osteopontin bei C3H/He und *Dyscalc1*-positiven kongenen Mäusen war stets mit den dystrophen Kalziumablagerungen innerhalb der Gefäßwand der infrarenalen Aorta wie auch im umliegenden quergestreiften Muskelgewebe ko-lokalisiert.

#### **3.3.2. BMP 2/4 Expression**

Die Abbildungen 19 und 20 zeigen die Ergebnisse des immunhistologischen Nachweises für Bone Morphogenetic Protein 2/4.

Am ersten Tag nach Verletzung durch die Kryopexie konnte in keinem der untersuchten Mausstämme BMP 2/4 innerhalb der Gefäßwand oder im umgebenden Muskelgewebe nachgewiesen werden.

Am dritten postoperativen Tag konnte bei *Dyscalc1*-positiven kongenen und C3H/He-Tieren eine BMP 2/4 Expression nachgewiesen werden. Diese zeigte sich in der innerhalb der Gefäßwand wie auch in der quergestreiften Muskulatur der Mm. quadratus lumborum et psoas major.

Am siebten Tag nach Kryopexie erreichte die BMP 2/4 Expression bei kongenen und C3H/He Tieren ihre maximale Ausprägung sowohl innerhalb der Gefäßwand wie auch im quergestreiften Muskel. Die BMP 2/4-Proteinexpression trat stets ko-lokalisiert mit den Kalziumablagerungen in der infrarenalen Aorta und der quergestreiften Muskulatur auf. C57BL/6-Tiere wiesen während der ersten sieben Tage nach Aorten-Kryopexie keine BMP 2/4-Expression auf.

### 3.4. Statistische Auswertung

	<u>C57BL/6</u> <u>vs.</u> <u>C3H/He</u>	<u>C57BL/6 vs.</u> <u>kongene</u> <u>Mäuse</u>	<u>C3H/He vs.</u> <u>kongene</u> <u>Mäuse</u>
<u>Tag 1 nach</u> <u>Kryopexie</u>	0,167	0,444	1
<u>Tag 3 nach</u> <u>Kryopexie</u>	0,008	0,008	1
<u>Tag 7 nach</u> <u>Kryopexie</u>	<0.001	<0.001	1

**Tabelle 3 P-Werte des zeitlichen Auftretens einer dystrophen Verkalkung in der infrarenalen Aorta nach Kryopexie:** in der Tabelle findet sich eine Berechnung der P-Werte mittels des exakten Tests nach Fisher. Die einzelnen Mausstämme wurden bezüglich des Auftretens dystropher Verkalkung in der infrarenalen Aorta nach Kryopexie verglichen. Das Signifikanzniveau beträgt 0,05. Es konnte gezeigt werden, dass am ersten postoperativen Tag kein signifikanter Unterschied bezüglich des Auftretens dystropher Verkalkung zwischen den beteiligten Mausstämmen besteht. Ein signifikanter Unterschied

zwischen C57BL/6 und C3H/He (bzw. *Dyscalc1*-positiven kongenen Mäusen) besteht am dritten und siebten Tag nach Verletzung bezüglich des Auftretens dystropher Kalziumablagerungen in der infrarenalen Aorta.

	<u>C57BL/6</u> <u>vs.</u> <u>C3H/He</u>	<u>C57BL/6 vs.</u> <u>kongene</u> <u>Mäuse</u>	<u>C3H/He vs.</u> <u>kongene</u> <u>Mäuse</u>
<u>Tag 1 nach</u> <u>Kryopexie</u>	0,008	0,048	1
<u>Tag 3 nach</u> <u>Kryopexie</u>	0,008	0,008	1
<u>Tag 7 nach</u> <u>Kryopexie</u>	<0.001	<0.001	1

**Tabelle 4 P-Werte des zeitlichen Auftretens einer dystrophen Verkalkung in den Mm. quadratus lumborum et psoas major nach Kryopexie:** in der Tabelle findet sich eine Berechnung der P-Werte mittels des exakten Tests nach Fisher. Die einzelnen Mausstämme wurden bezüglich des Auftretens dystropher Verkalkung in der quergestreiften Muskulatur nach Kryopexie verglichen. Das Signifikanzniveau beträgt 0,05. Es konnte gezeigt werden, dass bereits am ersten postoperativen Tag ein signifikanter Unterschied bezüglich des Auftretens dystropher Verkalkung zwischen C57BL/6 und C3H/He Mäusen besteht (P=0,008), allerdings kein deutlich signifikantes Ergebnis zwischen C57BL/6 und kongenen Mäusen (P=0,048). Ein signifikanter Unterschied zwischen C57BL/6 und C3H/He (bzw. *Dyscalc1*-positiven kongenen Mäusen) besteht am dritten und siebten Tag nach Verletzung bezüglich des Auftretens dystropher Kalziumablagerungen in den Mm. quadratus lumborum et psoas major (P=0,008 bzw. P<0,001 nach 7 Tagen).

Die beteiligten Mausstämme wurden bezüglich des Auftretens dystropher Verkalkung in der infrarenalen Aorta und des umliegenden quergestreiften Muskelgewebes untersucht. Mittels des exakten Tests nach Fisher wurden die P-Werte der Gruppen berechnet und die Mausstämme 1, 3 und 7 Tage nach Kryopexie bezüglich des Auftretens dystropher Verkalkungen verglichen.

Am ersten postoperativen Tag konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich des Auftretens dystropher Verkalkung in der infrarenalen Aorta zwischen den beteiligten Mausstämmen festgestellt werden. Beginnend mit dem dritten Tag nach Verletzung (Kryopexie) konnte ein signifikanter Unterschied zwischen

---

C57BL/6 Mäusen und C3H/He Tieren festgestellt werden ( $P=0,008$ ). Ebenfalls konnte ein signifikanter Unterschied zwischen C57BL/6 und *Dyscalc1*-positiven kongenen Tieren nach drei postoperativen Tagen nachgewiesen werden ( $P=0,008$ ). Am siebten Tag nach Kryopexie zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied bezüglich des Auftretens dystropher Verkalkung in der infrarenalen Aorta zwischen den beteiligten Mausstämmen, allerdings mit veränderten P-Werten aufgrund der höheren Anzahl der beteiligten Tiere ( $P<0,001$ ). Zwischen C3H/He und kongenen Tieren konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $P=1$ ).

Am ersten postoperativen Tag konnte bezüglich des Auftretens dystropher Verkalkung in der quergestreiften Muskulatur ein signifikanter Unterschied zwischen C57BL/6 und C3H/He Mäusen festgestellt werden ( $P=0,008$ ), allerdings zeigte sich kein deutlich signifikantes Ergebnis zwischen C57BL/6 und kongenen Mäusen ( $P=0,048$ ). Beginnend mit dem dritten Tag nach Verletzung (Kryopexie) konnte ein signifikanter Unterschied zwischen C57BL/6 Mäusen und C3H/He Tieren festgestellt werden ( $P=0,008$ ). Ebenfalls konnte ein signifikanter Unterschied zwischen C57BL/6 und *Dyscalc1*-positiven kongenen Tieren nach drei postoperativen Tagen nachgewiesen werden ( $P=0,008$ ). Am siebten Tag nach Kryopexie zeigte sich ebenso ein signifikanter Unterschied bezüglich dystropher Verkalkung der quergestreiften Muskulatur zwischen den beteiligten Mausstämmen, allerdings mit veränderten P-Werten aufgrund der höheren Anzahl der beteiligten Tiere ( $P<0,001$ ). Zwischen C3H/He und kongenen Tieren konnte kein Unterschied festgestellt werden ( $P=1$ ).

---

## 4. Diskussion

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand darin, durch Etablierung der Aorten-Kryopexie die Beschränkungen der durch Diätversuche induzierten Apoptose bzw. Nekrose zu umgehen und im Vergleich von für dystrophe Verkalkungen resistenten C57BL/6, prädisponierten C3H/He und *Dyscalc1*-positiven kongenen Mäusen den Nachweis zu liefern, dass der *Dyscalc1* Locus auf dem proximalen Maus-Chromosom 7 neben der dystrophen Herzverkalkung auch an der dystrophen arteriellen Verkalkung bei Mäusen beteiligt ist. Mit den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der *Dyscalc1* Locus dystrophe Verkalkung der infrarenalen Aorta in C3H/He und *Dyscalc1*-positiven kongenen Mäusen nach Verletzung (Kryopexie) induziert und diese Form der arteriellen Verkalkung ein von Knochenmatrix-Proteinen begleiteter und somit als ein aktiv regulierter Prozess aufzufassen ist.

### 4.1. Pathologie

Die dystrophe Verkalkung bei physiologischen Plasma-Elektrolyt-Spiegeln wird von der pathologischen, metastatischen Verkalkung von Geweben unterschieden (Black und Kanat, 1985; Seifert, 1997). Sie tritt als Ablagerung von Kalziumapatitkristallen nach Zellschädigung mit nachfolgender Apoptose und/oder Nekrose im Gewebe auf, ungeachtet der Ursache der Gewebeverletzung. Zellen in der Intima oder Media von arteriellen Gefäßen können durch eine Vielzahl von Noxen irreversibel geschädigt werden. Im Kontext eines atherosklerotischen Umbaus der Gefäßwand spielen enzymatisch veränderte LDL-Moleküle eine wichtige Rolle. Es kommt über die Aktivierung des Komplementsystems zur Auslösung einer Entzündungsreaktion, über die es schließlich zu einer irreversiblen Schädigung der Arterienwandzellen kommt (Bhakdi S, 2002). Gadeau et al. konnten zeigen, dass arterielle Verkalkung in durch einen Ballon verletzten Kaninchen-Aorten an Stellen der Media auftrat, in denen Zellen durch Apoptose oder Nekrose irreversibel geschädigt worden waren (Gadeau et al., 2001). Diese dystrophen Verkalkungen traten auf, bevor Knochenmatrix assoziierte Proteine wie

---

Osteopontin und Osteocalcin nachweisbar waren. Dies deutet darauf hin, dass diese Form der dystrophen Verkalkung eher an das Auftreten von Nekrose und Apoptose als an die Expression von Knochenmatrix assoziierten Proteinen gebunden war. Bei der dystrophen kardialen Verkalkung (DCC) konnten amorphe Kalziumphosphat-Ablagerungen in den Kardiomyozyten zuerst in den degenerierten Mitochondrien nachgewiesen werden (Aherrahrou et al., 2004). In Mäusen mit einer Prädisposition für DCC breitet sich die Verkalkung ab dem zweiten Tag postoperativen Tag nach Kryopexie über die Mitochondrien hinaus aus, um schließlich auf die umgebende Zelldebris überzugreifen. Dass Mitochondrien für Apoptose und Zelltod eine entscheidende Rolle spielen, ist ausreichend dokumentiert (Halestrap et al., 2000; Raha und Robinson, 2001).

#### **4.2. *Dyscalc1* Locus**

Studien an Mäusen haben gezeigt, dass der *Dyscalc1* Locus auf dem proximalen Mauschromosom 7 an der Entstehung von dystrophen Herzmuskel-Verkalkungen (DCC) beteiligt ist (Ivandic et al, 1996; Aherrahrou et al, 2004). Diese Form der dystrophen Verkalkungen wird rezessiv vererbt und konnte in C3H/He, DBA/2 und *Dyscalc1*-positiven kongenen B6.C3-(D7Mit56-Mit230) Mäusen nachgewiesen werden. Dystrophe Verkalkung des Myokards tritt entweder spontan in alternden Geweben oder nach einer Gewebsverletzung wie bei der Herzmuskel-Kryopexie auf. Im Rahmen dieser Verletzung muss es nachfolgend zu einer irreversiblen Verletzung des Muskelgewebes kommen, um den Phänotyp rasch und reproduzierbar zu induzieren (Brunnert und Altmann, 1990, Brunnert, 1997). Eine dystrophe Verkalkung tritt demnach infolge einer „response-to-injury“ Reaktion auf und ist die Folge der irreversiblen Verletzung eines Gewebes mit nachfolgender Apoptose/Nekrose. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass dystrophe Verkalkung mittels einer Verletzung des Gewebes auch in Gefäßzellen der infrarenalen Aorta und im umliegenden quergestreiften Muskelgewebe induziert werden kann. Aufgrund dieser Tatsache und der Beobachtung, dass die Verkalkung eher fokaler Natur war, liegt der Schluss nahe, dass es sich bei dieser Form der dystrophen Verkalkung um einen Prozess handelt, der von den Kardiomyozyten, glatten Muskelzellen der Aorta und den quergestreiften

---

Muskelzellen ausgeht. Dies erscheint schlüssiger, als dass der kausale Gendefekt des *Dyscalc1* Locus etwas mit der Induktion von Knochenmark-Prozessen im Sinne eines Phagozytosedefekts phagozytischer Zellen oder mesenchymaler Zelldifferenzierung zu tun hat.

#### **4.3. dystrophe Verkalkung von *Dyscalc1*-positiven kongenen Tieren**

Die dystrophe Verkalkung der infrarenalen Aorta und des umgebenden quergestreiften Muskelgewebes von *Dyscalc1*-positiven kongenen Tieren zeigte ein ähnliches Muster wie bei dem zu Verkalkungen neigenden Ausgangsstamm von C3H/He Tieren, obwohl mehr als 99% des Genoms von resistenten C57BL/6 Tieren stammt. Damit konnte gezeigt werden, dass der *Dyscalc1* Locus für sich alleine genommen das genetische Potenzial zur dystropen Verkalkung trägt. Die dystropen Kalziumablagerungen bei den C3H/He Mäusen erschienen deutlich ausgedehnter als die Kalziumablagerungen bei den kongenen Mäusen. Dieses deutet darauf hin, dass mehr als ein genetischer Locus zur Verstärkung der dystropen arteriellen Verkalkung in Mäusen beitragen könnte. Die Ergebnisse stimmen damit mit denen früherer Untersuchungen zur Myokard-Kryopexie überein. Vermutlich sind einige weitere modifizierende Loci an dem Ausmaß und der Ausprägung dieser dystropen Verkalkung beteiligt (Qiao et al., 1994; Colinayo et al., 2002). Arbeiten unserer eigenen Arbeitsgruppe konnten den Nachweis für drei zusätzliche modifizierende Loci erbringen, genannt *Dyscalc2* bis *4*, die auf den Maus-Chromosomen 4, 12 und 14 lokalisiert sind (Ivancic et al., 2001). *Dyscalc2* auf dem Mausechromosom 4 verstärkte die Ausprägung von DCC bei der dystropen Myokardverkalkung beträchtlich.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass der *Dyscalc1* Locus nicht nur für DCC, sondern auch für dystrophe arterielle Verkalkung in Mäusen determiniert. Damit stellt sich die Frage, welche Gene aus diesem Locus für den Phänotyp verantwortlich sind. Mehrere Kandidatengene für die dystrophe Verkalkung innerhalb des *Dyscalc* Intervalls auf dem proximalen Abschnitt des Chromosoms 7 sind in der Literatur erwähnt worden (Colinayo et al., 2002; Aherrahrou et al., 2004). Bax ist ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2-

---

Familie. Es wurde zwischen D7Mit26 und D7Mit81 in der Region lokalisiert, die den *Dyscalc1* Locus enthält. Das Protein ist Teil des Permeability Transition Pore Complex, der Poren in Mitochondrienmembranen formt (Jurgenmeier et al., 1998). Ein zweites Kandidatengen ist mit Hrc ein luminales, sarkoplasmatisches, Kalzium-bindendes Protein mit unbekannter Funktion (Lee et al., 2001). Drittes Kandidaten-Gen ist Etf-b, ein Flavoprotein, das als Elektronen-Überträger zwischen der Acyl-CoA-Dehydrogenase und der Atmungskette der inneren Mitochondrienmembran fungiert (Stubbs et al., 1996). Allerdings gibt es im Moment keinen objektiven Beweis dafür, dass eines der oben genannten Kandidatengene tatsächlich an der Entstehung dieser Form der dystrophen Verkalkung beteiligt ist.

#### **4.4. Verkalkung als regulierter Prozess**

Die Regulation der dystrophen Verkalkung irreversibel geschädigten Gewebes zeigt viele Gemeinsamkeiten mit dem normalen Knochenstoffwechsel. Die wichtigsten Mediatoren der arteriellen dystrophen Verkalkung sind Bone Morphogenetic Protein 2 und 4 (BMP 2/4), Osteopontin (OPN) und Matrix Gla-Protein (MGP). Studien unserer eigenen Gruppe konnten im Myokard eine starke Osteopontin Expression nach transdiaphragmaler Myokard-Kryopexie nachweisen. Diese Osteopontin Expression zeigte sich ko-lokalisiert mit der dystrophen Verkalkung des Herzmuskels und zwar sowohl in C3H/He wie auch in *Dyscalc1*-positiven kongenen Mäusen (Aherrahrou et al., 2004). Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit bezüglich des Auftretens dystropher arterieller Verkalkung in der infrarenalen Aorta nach Kryopexie überein. Es konnte gezeigt werden, dass die Osteopontin Expression in den infrarenalen Aorten und der quergestreiften umgebenden Muskulatur von C3H/He, C57BL/6 und kongenen B6.C3-(D7Mit56-Mit230) Mäusen vom ersten Tag an nach Aorten-Kryopexie nachweisbar war. In den C3H/He und kongenen Tieren nahm das Ausmaß der Expression vom dritten bis zum siebten postoperativen Tag hin zu, während es bei C57BL/6-Mäusen auf einem niedrigen Level blieb. Die Expression von OPN war stets mit den dystrophen Kalziumablagerungen in der Aorta wie auch im umliegenden Muskelgewebe ko-lokalisiert.

---

Eine BMP 2/4 Expression war in keinem Tier vor dem dritten postoperativen Tag nach Aorten-Kryopexie nachweisbar. Während es in für Verkalkung resistenten C57BL/6 Tieren keinen Nachweis einer BMP 2/4 Expression während der ersten sieben Tage nach Gewebsverletzung gab, zeigte sich bei zu dystropher Verkalkung prädisponierten C3H/He und *Dyscalc1*-positiven kongenen Tieren ab dem dritten postoperativen Tag eine bis zum siebten Tag nach Kryopexie zunehmende Expression des Proteins sowohl in der infrarenalen Aorta als auch im umgebenden Muskelgewebe. Während beide Proteine stets ko-lokalisiert mit den dystrophen Kalziumablagerungen auftraten, unterschied sich der Zeitpunkt des Auftretens beider Proteine voneinander. Osteopontin war vom ersten postoperativen Tag in der Aorta wie in der quergestreiften Muskulatur nachweisbar, während BMP 2/4 erst ab dem dritten Tag nach Verletzung nachzuweisen war. Diese Ergebnisse stimmen mit der Vermutung überein, dass Knochenmatrix assoziierte Proteine an der Regulation dystropher Verkalkungen, nicht aber an der Initiierung dieses pathologischen Prozesses beteiligt sind.

#### **4.5. Intima vs. Media-Verkalkung**

Eine dystrophe arterielle Verkalkung wird ohne exogene Verletzung im spontanen Alterungsprozess oder durch eine fett- und cholesterinreiche Diät in zwei verschiedenen Strukturen der Gefäßwand induziert und zwar der Intima und der Tunica media. Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren, dass die dystrophen Kalziumablagerungen nach Aorten-Kryopexie vornehmlich in der Media der infrarenalen Aorta lokalisiert sind. Dieses deutet darauf hin, dass der *Dyscalc1* Locus eher an der arteriellen Verkalkung der Media beteiligt ist als an der Entstehung einer dystrophen Intima-Verkalkung. Eine Intima-Verkalkung tritt demgegenüber im Zusammenhang mit einem atherosklerotischen Umbau der Gefäßwand auf und zeigt sich innerhalb der atherosklerotischen Läsionen. Intima-Verkalkung zeigt eine diffuse und punktförmige Morphologie und erscheint als Ansammlung von Kalziumkristallen (Proudfoot und Shanahan, 2001).

#### **4.6. Pathophysiologie der Gefäßverkalkung**

---

Matrixvesikel spielen eine bedeutende Rolle im Zusammenhang mit der Intima-Verkalkung. Normalerweise werden sie in Knorpel- und Knochengewebe gefunden. Es sind membrangebundene Strukturen, die von Osteoblasten oder Chondrozyten ausgestoßen werden und als Nidus für Kalziumapatit-Kristallbildung dienen (Stary, 1999; Kim 1976). Es gibt zunehmend Hinweise, dass der apoptotische Zelltod und die Generierung von Matrixvesikeln miteinander in Zusammenhang stehen (Kim, 1995). In vitro konnte gezeigt werden, dass apoptotische Überreste von humanen verkalkenden glatten Muskelzellen ebenfalls verkalken können (Proudfoot et al., 2000). Apoptose könnte der wichtigste Baustein der Initiierung atherosklerotischer Verkalkung sein und Matrixvesikel von apoptotischen Zellen, insbesondere von apoptotischen glatten Muskelzellen der Gefäßwand, stammen. Humane glatte Gefäßmuskelzellen können in vivo und in vitro Knochenmatrix assoziierte Proteine wie OPN, BMP und MGP exprimieren (Shanahan et al., 1998; Proudfoot et al., 2000). Durch Expression dieser Gene scheinen die glatten Muskelzellen einen osteogenetischen Phänotyp anzunehmen. Die dystrophe arterielle Intima-Verkalkung war in humaner Atherosklerose mit Cholesterin-Kristallen ko-lokalisiert (Hirsch et al., 1993). In Zellkulturen humaner glatter Gefäßmuskelzellen konnte gezeigt werden, dass vor der Verkalkung eine spontane Lipidakkumulation auftritt und dass die Zugabe von modifizierten Lipoproteinen die Verkalkung ebenso stimuliert wie die Expression Knochenmatrix assoziierter Proteine (Shanahan et al., 2000). Lipide scheinen die Verkalkung entweder durch die Stimulation der osteogenetischen Differenzierung oder durch Behinderung des Abräumens apoptotischer Zellreste zu beeinflussen (Skric und Eanes, 1992). Chronische Entzündung und/oder Zelltod sind Mechanismen für die Freisetzung von Kalzium- und Phosphat-Ionen aus der Zelle. In inflammatorischen Geweben sind die extrazellulären Kalziumkonzentrationen deutlich erhöht (Kaslick et al., 1970). Die Verkalkung der Intima im Kontext mit Atherosklerose scheint ein Resultat des Zusammenspiels und der Balance von Faktoren zu sein, welche die Verkalkung inhibieren und fördern. Der „Calcium-Score“, mittels Ultraschall gemessen, korreliert eng mit dem Ausmaß atherosklerotischer Gefäßveränderung und dient somit der Vorhersage zukünftiger kardiovaskulärer

---

Ereignisse (Agatston et al., 1996).

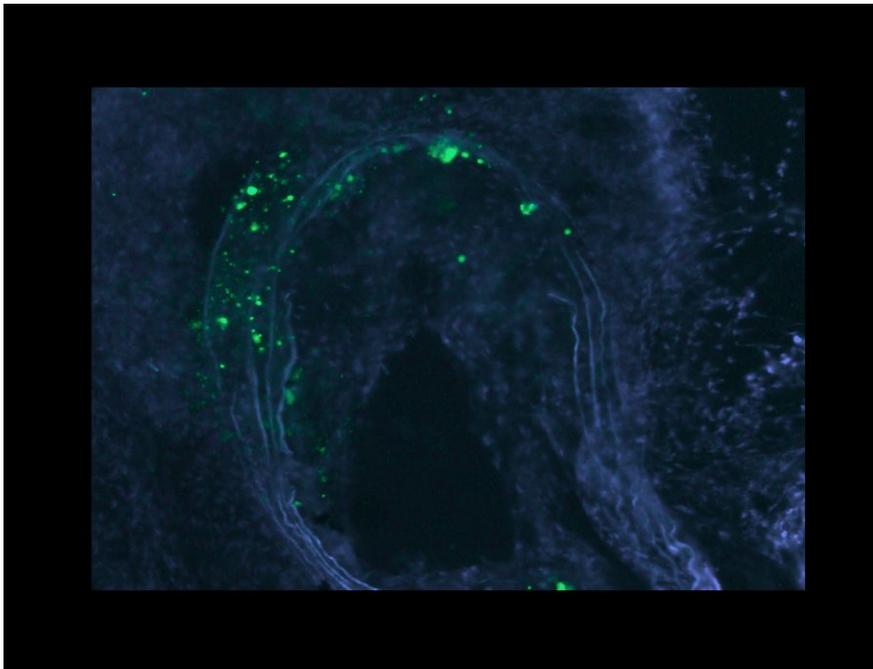
Die dystrophe Verkalkung der Tunica media scheint unabhängig von der Intima-Verkalkung und Atherosklerose aufzutreten. Sie zeigt eine unterschiedliche Morphologie im Vergleich zur Intima-Verkalkung und erscheint entlang der elastischen Fasern und glatten Muskelzellen der Media, häufig begleitet von einem Bruch der elastischen Fasern (Henrion et al., 1991). Im Unterschied zur Intima-Verkalkung tritt die Media-Verkalkung in Abwesenheit von Lipiden oder inflammatorischen Zellen auf. Elastin scheint als Nidus für die Verkalkung zu dienen. Elektronenmikroskopische Studien wiesen Matrixvesikel in Assoziation mit Elastinfasern nach (Tanimura et al., 1986). Es ist möglich, dass glatte Gefäßmuskelzellen der Media apoptotische Zellkörper freisetzen können, die nicht effizient weggeräumt werden und somit als Nidus für die Verkalkung dienen (Proudfoot und Shanahan, 2001). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich die Genexpression bestimmter Knochenmatrix assoziierter Proteine ändert, wenn die Media verkalkt (Shanahan et al., 1999). Die dystrophe Verkalkung der Tunica media tritt im Zusammenhang mit der Mönckebergschen Media-Sklerose bei älteren Patienten oder jüngeren Patienten mit Urämie, chronischem Nierenversagen oder Diabetes auf (Shioi A et al., 2001; Moe et al., 2002; Mohr und Gorz, 2002; Chen und Moe, 2003; London et al., 2003).

Zusammenfassend tritt eine dystrophe arterielle Verkalkung dann auf, wenn entweder ein physiologischer oder pathologischer Zelltod im Sinne von Apoptose oder Nekrose vorliegt oder es zu einer Störung des Wegräumens resultierender apoptotischer Körper kommt. Ein relativer Mangel an die Verkalkung inhibierenden Proteinen wie MGP oder OPN sowie der Übergang von glatten Gefäßmuskelzellen zu einem osteogenetischen Phänotypen könnten darüber hinaus zu einer Zunahme der Kalziumapatitkristalle führen (Proudfoot und Shanahan, 2001).

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass der *Dyscalc1* Locus auf dem proximalen Chromosom 7 an der Entstehung einer dystrophen Verkalkung innerhalb der Tunica media der infrarenalen Aorten von C3H/He und *Dyscalc1*-positiven kongenen Mäusen beteiligt ist. Es ist nun wichtig zu klären, ob der Locus ausschließlich dystrophe Verkalkungen der Media beeinflusst oder auch eine Rolle bei der atherosklerotischen Intima-Verkalkung spielt. Um diese Frage

---

zu klären bieten sich weitergehende Experimente in Tieren an, die einerseits den *Dyscalc1* Locus tragen und somit für dystrophe Verkalkungen prädisponiert sind und andererseits spontan oder diätetisch eine Atherosklerose entwickeln. Diesbezüglich zeigen vorläufige Experimente unserer Gruppe, dass das Einkreuzen eines LDL-Rezeptor Knockouts in *Dyscalc1*-positive kongene Mäuse zu einem Tiermodell führen kann, das unter einer fett- und cholesterinreichen Diät sowohl Atherosklerose wie auch eine dystrophe Verkalkung der Intima aufweist.



**Abb. 21 Aorta *Dyscalc1*-positives kongenes Tier mit eingekreuztem LDLr<sup>-/-</sup>, hf-Diät + Kryopexie, 6 Wochen nach Verletzung, 10x Calcein:** auf dem Bild sieht man ein *Dyscalc1*-positives kongenes Tier mit eingekreuztem LDL-Rezeptor-Knockout, das für insgesamt 12 Wochen mit einer fett- und cholesterinreichen Diät gefüttert wurde und nach der Hälfte der Zeit (6 Wochen) der Aorten-Kryopexie unterzogen wurde. Es zeigt sich eine deutlich ausgeprägte Atherosklerose der infrarenalen Aorta mit starker Einengung des Lumens sowie eine dystrophe Verkalkung der Gefäßwand (grün).

---

## 5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob der *Dyscalc1* Locus auf dem proximalen Maus-Chromosom 7 dystrophe arterielle Gefäßverkalkung nach Verletzung (Kryopexie) beeinflusst. Voruntersuchungen an für dystrophe Verkalkung prädisponierten C3H/He Mäusen haben gezeigt, dass *Dyscalc1* an der Verkalkung nekrotischen Myokards nach Gewebsverletzung beteiligt ist. Zur Umgehung langwieriger Diätverfahren und um standardisierte und reproduzierbare apoptotische/nekrotische Gefäßzellschäden zu erreichen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Aorten-Kryopexie etabliert, eine operative Methode zur selektiven Verletzung der infrarenalen Aortenwand. Durch histologische Methoden sollte nachgewiesen werden, dass es nach Gewebsverletzung zum Auftreten dystropher arterieller Verkalkungen bei speziellen Mausstämmen kommt. Schwerpunkt der immunhistologischen Untersuchungen war die Frage, inwieweit die arterielle Verkalkung als aktiv regulierter Prozess aufzufassen ist, an welchem Proteine des orthotopen Knochenstoffwechsels beteiligt sind.

Drei Mausstämme wurden der Aorten-Kryopexie unterzogen und hinsichtlich des Auftretens dystropher arterieller Verkalkungen innerhalb der infrarenalen Aortenwand untersucht. C57BL/6 Mäuse zeigten 1, 3 und 7 Tage nach selektiver Gewebsverletzung eine Einwanderung von Entzündungszellen sowie einen beginnenden fibrotischen Umbau der Gefäßwand, ohne dass Kalziumablagerungen nachweisbar gewesen wären (resistente Kontrolltiere). Bei C3H/He Mäusen konnten vom ersten postoperativen Tag nach Verletzung (Kryopexie) dystrophe Kalziumablagerungen sowohl in der Media der infrarenalen Gefäßwand wie auch im umliegenden quergestreiften Muskelgewebe der Mm. psoas major et quadratus lumborum nachgewiesen werden. Nach Züchtung eines kongenen Mausstamms, der den *Dyscalc1* Locus von für dystrophe Verkalkungen prädisponierten C3H/He Tieren auf einem >99 %igen resistenten genetischen Hintergrund von C57BL/6 Mäusen enthält, konnte auch an diesen Tieren nach Kryopexie ein vergleichbares Muster dystropher arterieller Verkalkung der infrarenalen Gefäßwand wie bei den

---

C3H/He Mäusen beobachtet werden. Somit konnte der Nachweis erbracht werden, dass *Dyscalc1* eine entscheidende Rolle bei der Induktion dystropher arterieller Gefäßverkalkung bei bestimmten Mausstämmen spielt.

Durch immunhistologische Untersuchungen konnte zudem gezeigt werden, dass die dystrophen Kalziumablagerungen sowohl bei den C3H/He wie auch bei den *Dyscalc1*-positiven kongenen Mäusen von einer Expression bestimmter Knochenmatrix assoziierter Proteine begleitet wurden. Osteopontin, ein Phosphoprotein, das in Zellkultur die Verkalkung glatter Gefäßmuskelzellen inhibiert, konnte bereits ab dem ersten postoperativen Tag bei kongenen wie C3H/He Mäusen nachgewiesen werden. Es war dabei stets mit den dystrophen Verkalkungen innerhalb der Gefäßwand ko-lokalisiert. Darüber hinaus konnte BMP 2/4, ein Protein des orthotopen Knochenstoffwechsels mit vollem Potenzial zur osteoinduktiven Differenzierung und somit ein Promoter von Verkalkungsprozessen, ab dem dritten postoperativen Tag nach Gewebsverletzung bei C3H/He und *Dyscalc1*-positiven kongenen Mäusen nachgewiesen werden. Wie Osteopontin zeigte es sich stets mit den dystrophen Kalziumablagerungen ko-lokalisiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Form dystropher arterieller Gefäßverkalkung eher im Rahmen eines aktiv regulierten Prozesses aufzufassen ist denn als Folge passiver Vorgänge.

---

## 6. Literaturverzeichnis

Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M, Detrano R: Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 1990, 15:827-835

Agatston AS, Janowitz WR, Kaplan G, et al: Electron beam computed coronary calcium predicts future coronary events. *Circulation* 1996, 94:354-360

Aherrahrou Z, Axtner S, Kaczmarek PM, Jurat A, Korff S, Doehring LC, Weichenhahn D, Katus H, Ivandic BT: a locus on chromosome 7 determines dramatic up-regulation of osteopontin in dystrophic cardiac calcification in mice. *Am J Pathology* 2004, Vol 164, No. 4:1379-1387

Bhakdi S: Immunpathogenese der Atherosklerose. *Deutsche Wochenschrift* 2002; 127:390-94

Black AS, Kanat IO: A review of soft tissue calcification. *J Foot Surg* 1985; 24:243-50

Boström K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL: Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1993, 91:1800-1809

Boström K, Demer LL: Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Crit Rev Eukariot Gene Expr* 2000, 12:151-158

Boström K: Insights into the mechanism of vascular calcification. *Am J Cardiol* 2001; 88(suppl):20E-22E

Brunnert SR, Altmann NH: Dystrophic cardiac calcinosis in mice – abnormal myocardial response to freeze-thaw injury. *Lab Anim Sci* 1990, 40:616-619

Brunnert SR: Morphological response of myocardium of freeze-thaw injury in mouse strains with dystrophic cardiac calcification. *Lab Anim Sci* 1997, 47:11-18

Chen NX, Moe SM: Arterial calcification in diabetes. *Curr Diab Rep.* 2003 Feb, 3(1):28-32

Colinayo VV, Qiao JH, Demant P, Krass K, Lusic AJ, Drake TA: Genetic characterisation of the Dsycalc locus. *Mammalian Genome* 2002, 13:283-288

---

Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS: Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodelling and cell survival. *J Clin Invest* 2001; Vol. 107(9):1055-61

Detrano RC, Wong ND, Doherty TM: Prognostic significance of coronary calcific deposits in asymptomatic high-risk subjects. *Am J Med* 1997:344-49

Dhore CR, Cleutjens JPM, Lutgens E, Cleutjens KBJM, Geusens PM, Kitslaar PJEHM, Tordoir JHM, Spronk HMH, Vermeer C, Daemen MJAP: Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Art Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1998

Doherty TM, Uzui H, Fitzpatrick LA, Tripathi PV, Dunstan CR, Asotra K, Rajavashisth TB: rationale for the role of osteoclast-like cells in arterial calcification. *FASEB J* 2002; Vol. 16:577-82

Doherty TM, Asotra K, Fitzpatrick LA, Qiao JH, Wilkin DJ, Detrano RC, Dunstan CR, Shah PK, Rajavashisth TB: Calcification in atherosclerosis-bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(20):11201-206

Doherty TM, Fitzpatrick LA, Shaheen A, Rajavashisth TB, Detrano RC: Genetic determinants of arterial calcification associated with atherosclerosis. *Mayo Clin Proc* 2004; 79:197-210

Eggen DA, Strong JP, McGill HC: Coronary calcification: relationship to clinically significant coronary lesions and race, sex and topographic distribution. *Circulation* 1965; 32:948-55

Farb A, Burke AP, Tang AL, Liang Y, Mannan P, Smialek J, Virmani R: Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation* 1996, 93:1354-1363

Fischer M, Broeckel U, Holmer U, Baessler A, Hengstenberg C, Mayer B, Erdmann J, Klein G, Riegger G, Jacob HJ, Schunkert H: Distinct heritable patterns of angiographic coronary artery disease in families with myocardial infarction. *Circulation* 111:855-862, 2005

Fitzgerald PJ, Ports TA, Yock PG: Contribution of localized calcium deposits to dissection after angioplasty. An observational study using intravascular ultrasound. *Circulation* 1992, 86:64-70

Gadeau AP, Chaulet H, Daret D, Kockx M, Daniel-Lamaziere JM, Desgranges C: Time course of osteopontin, osteocalcin and osteonectin; accumulation and calcification after acute vessel wall injury. *J Histochem & Cytochem* 2001, 49(1):79-86

Giachelli CM, Bae N, Almeida M, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM:

---

Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1993; 92:1686-96

Giachelli CM: Ectopic calcification. Gathering hard facts about soft tissue mineralization. *Am J Path* 1999, 154:671-675

Giachelli CM, Steitz S: Osteopontin – a versatile regulator of inflammation and biomineralisation. *Matrix Biology* 2000, 19:615-622

Goodman WG, London G, Amann K, Block GA, Giachelli C, Hruska KA, Ketteler M, Levin A, Massy Z, McCarron DA, Raggi P, Shanahan CM, Yorioka N: Vascular calcification in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2004; Vol 43, No.3

Halestrap AP, Doran E, Gillespie JP, O'Toole A: Mitochondria and cell death. *Biochem Soc Trans* 2000; 28:170-77

Hayden H, Virmani R, Younis H, Burke AP, Kamm RD, Lee RT: The impact of calcification on the biomechanical stability of atherosclerotic plaques. *Circulation* 2001; 103:1051-56

Henrion D, Chillon Jm, Gadeau G, Muller F, Capdeville-Atkinson C, Hoffman M, Atkinson J: The consequences of aortic calcium overload following vitamin D3 plus nicotine treatment in young rats. *J Hypertens* 1991; 9:919-26

Hirsch D, Azoury R, Sarig S, Kruth HS: Co-localisation of cholesterol and hydroxyapatite in human atherosclerotic lesions. *Calcif Tissue Int* 1993, 52:94-98

Isoda K, Nishikawa K, Kamezawa Y, Yoshida M, Kusuhaara M, Moroi M, Tada N, Ohsuzu F: Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation. *Circ Res* 2002; 91:77

Ivandic BT, Qiao JH, Machleder D, Liao F, Drake TA, Lusis AJ: A locus on chromosome 7 determines myocardial cell necrosis and calcification (dystrophic cardiac calcinosis) in mice. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1996, 93:5483-5488

Ivandic BT, Utz HF, Kaczmarek PM, Aherrahrou Z, Axtner S, Klepsch C, Lusis AJ, Katus HA: New Dyscalc loci for myocardial cell necrosis and calcification (dystrophic cardiac calcinosis) in mice. *Physiol Genomics* 2001, 6:137-144

Jacoby DS, Mohler III ER, Rader DJ: Noninvasive atherosclerosis imaging for predicting cardiovascular events and assessing therapeutic interventions. *Curr Atheroscler Rep* 2004; 6(1):20-26

---

Jeziorska M, McCollum C, Wooley DE: Calcification in atherosclerotic plaque of human carotid arteries: association with mast cells and macrophages. *J Pathol* 1998; 185:10-17

Jono S, Ikari Y, Vermeer C, Dissel P, Hasegawa K, Shioi A, Taniwaki H, Kizu A, Nishizawa Y, Saito S: Matrix Gla-protein is associated with coronary artery calcification as assessed by electron-beam computed tomography. *Thromb Haemost* 2004; 91(4):790-94

Jurgenmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bedesen D, Reed JC: Bax directly induces releases of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:4997-5002

Kaslick RS, Chasens AI, Mandel ID: Quantitative analysis of sodium, potassium and calcium in gingival fluid from gingival in varying degrees of inflammation. *J Periodontol* 1970; 41:93-97

Kim KM: Calcification of matrix vesicles in human aortic valve and aortic media. *Fed Proc* 1976, 35:156-162

Kim KM: Apoptosis and calcification. *Scanning Microsc* 1995, 9:1137-1175

Lazem F, Barbir M, Banner N et al: Coronary calcification detected by ultrafast computed tomography is a predictor of cardiac events in heart transplant recipients. *Transplant Proc* 1997, 29:572-575

Lee HG, Kand H, Kim DH, Park WJ: Interaction of hrc (histidine-rich calcium Binding protein) and triadin in the lumen of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2001; 276:395-98

London GM, Guerin AP, Marchais SJ, Metivier F, Pannier B, Adda H: Arterial medial calcification in end-stage renal disease-impact on all cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18(9):1731-40

Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyerm E, Behringer RR, Karsenty G: Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix Gla-protein. *Nature* 1997; 386:78-81

Moe SM, O'Neill KD, Duan D, Ahmed S, Chen NX, Leapman SB, Fienberg N, Kopecky K: Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. *Kidney Int* 2002; 61(2):638-47

Mohler ER, Gannon F, Reynolds C, Zimmermann R, Keane MG, Kaplan FS: Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation* 2001;103:1522-1528

Mohr W, Gorz E: Morphogenesis of media calcinosis in Mönckeberg disease. Light microscopy, scanning electron microscopy and roentgen microanalysis findings. *Z Kardiol* 2002; 91(7):557-67

---

Murray GI, Ewen SWB: A new fluorescence method for alkaline phosphatase histochemistry. *J Histochemistry and Cytochemistry* 1992, Vol. 40. No.12 1971-74

O'Brien ER, Garvin MR, Steward DK: Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle and endothelial cells in primary and restenotic human atherosclerotic plaques. *Art Thromb Vasc Biol* 1994; 14:1648-56

O'Regan AW, Nau GJ, Chupp GL, Berman JS: Osteopontin in cell-mediated immunity: teaching an old dog new tricks. *Immunology today* 2000; Vol. 21(10):475-78

Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, et al: Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro : evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res* 2000, 87:1055-1062

Proudfoot D, Shanahan CM: Biology of calcification in vascular cells – intima versus media. *Herz* 2001, 26:245-251

Qiao JH, Xie PZ, Fishbein MC, Kreuzer J, Drake TA, Demer LL, Lusis AJ: Pathology of atheromatous lesions in inbred and genetically engineered mice. *Arteriocl Thromb* 1994, 14:1480-1497

Raha S, Robinson BH: Mitochondria, oxygen free radicals and apoptosis. *Am J Med Genetics* 2001; 106:62-70

Riley EH, Lane JM, Urist MR, Lyons KM, Liebmann JR: Bone morphogenetic protein-2. *Clin Orthop* 1996; 324:39-46

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring harbour laboratory press, Cold spring harbour, N.Y. 2<sup>nd</sup> ed.1989

Seifert G: heterotope (extraossäre) Verkalkung (Kalzinose). *Pathologe* 1997;18:430-38

Shanahan CM, Cary NRB, Metcalfe JC, Weissberg PL: High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994; 93:2393-2402

Shanahan CM, Proudfoot D, Farzaneh-Far A, et al: The role of Gla-proteins in vascular calcification. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1998, 8:357-375

Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, et al: Medial localisation of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence from smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* 1999, 100:2168-2176

Shanahan CM, Proudfoot D, Tyson K, Weissberg PL: Osteoblastic/osteoclastic gene expression profiles in lipid-filled vascular smooth muscle cells and macrophages. *Circulation* 2000; 102:Suppl II:922

---

Shin V, Zebboudj AF, Boström K: Endothel cells modulate osteogenesis in calcifying vascular cells. *J Vasc Res* 2004; 41:193-201

Shioi A, Taniwaki H, Jono S, Okuno Y, Koyama H, Mori K, Nishizawa Y: 38. Monckeberg's medial sclerosis and inorganic phosphate in uremia. *Am J Kidney Dis*. 2001 Oct, 38(4 Suppl 1):S47-49

Skrtic D, Eanes ED: Membrane mediated precipitation of calcium phosphate in model liposomes with matrix vesicle-like lipid composition. *Bone Miner* 1992; 16:109-19

Spronk HM, Soute BA, Schurgers LJ, Cleutjens JP, Thijssen HH, De Mey JG, Vermeer C: Matrix Gla-protein accumulates at the border of regions of calcification and normal tissue in the media of the arterial vessel wall. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289(2):485-90

Stary HC: Phase of advanced atherosclerotic disease. In: Stary HC, ed. *Atlas of atherosclerosis: progression and regression*. New York: Parthenon, 1999:27-28

Stein GS, Lian JB: Molecular mechanisms mediating developmental and hormone-regulated expression of genes in osteoblasts: an integrated relationship of cell growth and differentiation. *Cell Molec Biol Bone* 1993:48-95

Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, Giachelli CM: Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Path* 2002, 161:2035-2046

Stubbs L, Carver EA, Shannon ME, Kim J, Geistler J, Generoso EE, Stanford BG, Dunn WC, Mohrenweiser H, Zimmermann W, Watt SM, Ashworth LK: Detailed comparative map of human chromosome 19q and related regions in the mouse genome. *Genomics* 1996; 35:499-508

Sweatt A, Sane DC, Hutson Sm, Wallin R: Matrix Gla protein (MGP) and bone morphogenetic protein-2 in aortic calcified lesions of aging rats. *J Thromb Haemost* 2003; 1(1):178-85

Tanimura A, McGregor DH, Anderson HC: Calcification in atherosclerosis. I. Human studies. *J Exp Pathol* 1986, 2:261-273

Taylor AJ, Burke AP, O'Malley PG, Farb A, Malcolm GT, Smialek J, Virmani R: A comparison of the Framingham risk index, coronary artery calcification and culprit plaque morphology in sudden cardiac death. *Circulation* 2000; 101:1243-48

Thompson GR, Partridge J: Coronary calcification score-the coronary risk impact factor. *Lancet* 2004; 363(9408):557-9

---

Tomson C: Vascular calcification in chronic renal failure. *Nephron Clin Practice* 2003; 93:c124-30

Wada T, McKee MD, Steitz S, Giachelli CM: Calcification of vascular smooth muscle cell cultures-inhibition by Osteopontin. *Circ Res* 1999;84:166-78

Wallin R, Cain D, Sane DC: Matrix Gla-protein synthesis and gamma-carboxylation in the aortic vessel wall and proliferating vascular smooth muscle cells. A cell system which resembles the system in bone cells. *Thromb Haemost* 1999; 82:1764-67

Wallin R, Wajih N, Greenwood GT, Sane DC: Arterial calcification: a review of mechanisms, animal models and the prospects for therapy. *Med Res Reviews* 2001, Vol 21, No.4:274-301

Watanabe Y, Suzuki M, Oyama Y, Kusano E, Tamba K, Imura O, Ito C, Imai M, Asano Y: Cellular component of vascular calcification. *Nephron* 2002; 92:840-45

Wilson PWF, Kauppila LI, O'Donnell CJ, Kiel DP, Hannan M, Polak JM, Cupples LA: Abdominal aortic calcific deposits are an important predictor of vascular morbidity and mortality. *Circulation* 2001, 103:1529-1534

Zebboudj AF, Shin V, Bostrom K: Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells. *J Cell Biochem.* 2003 Nov.1, 90(4):756-65

---

## Glossar

BMP 2/4	Bone morphogenetic protein 2/4
C3H/He	eingezüchteter Mausstamm C3H/HeNCrIBr
C57BL/6	Mausstamm C57BL/6NCrIBr
DAPI	4', 6-diamidino-2-Phenylindol Dihydrochlorid
DCC	dystrophe kardiale Verkalkung
D7Mit	DNA-Segment, Chr. 7, Massachusetts Inst. Tech.
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2-Desoxynukleosid-5-Triphosphat
Dyscalc	Locus für dystrophe kardiale Verkalkung
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
Kongene Mäuse	kongener Mausstamm B6.C3-(D7Mit56-D7Mit230)
MGP	Matrix Gla Protein
µl, ml	Mikroliter, Milliliter
OPN	Osteopontin
PBS	Phosphat-buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TE	Tris/EDTA
U	Einheiten
U/min	Umdrehungen pro Minute

---

## **Danksagungen**

Diese Doktorarbeit wurde in der Medizinischen Klinik II der Universität zu Lübeck angefertigt. Ich möchte mich bei den folgenden Personen bedanken, die durch ihre Unterstützung sehr zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen. Zuallererst gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. med. H. Schunkert für seine Hilfe bei der Realisierung dieser Arbeit. Des Weiteren drücke ich Herrn Dr. med. B. Mayer sowie Frau PD Dr. rer. nat. J. Erdmann meine Dankbarkeit aus, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Ein besonders wichtiger Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit wurde von meiner Arbeitsgruppe geleistet, bei der ich mich im Besonderen bedanken möchte, namentlich bei Herrn Piotr M. Kaczmarek sowie Dr. hum. biol. Zouhair Aherrahrou.

Eine weitere wichtige Rolle bei der Entstehung dieser Arbeit nahmen Dr. med. Boris T. Ivandic und Frau Susanne B. Axtner ein.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich während der ganzen Zeit immer vorbildlich unterstützt und mir bei der Realisierung all meiner Pläne und Hoffnungen mit so viel Verständnis und Hilfe zur Seite gestanden hat.

---

## Lebenslauf

**Name** Lars Christian Doehring

**Geburtsdatum** 17.02.1973

**Geburtsort** Bremen

**Anschrift** Bäckerstr. 1A, 23564 Lübeck

**Familienstand** ledig

**Eltern** Reiner Doehring – Ingenieur, 60 Jahre  
Doris Klose-Doehring – Sekretärin, 56 Jahre

**Schulbildung** 07/79–06/83 Grundschule Ritterhude  
07/83–06/85 Orientierungsstufe Ritterhude  
07/85–06/89 Sekundarstufe I Ritterhude  
07/89–06/92 Sekundarstufe II in Osterholz-Scharmbeck  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

**Zivildienst** 10/92–12/93 Zivildienst beim DRK OHZ  
Ausbildung zum Rettungssanitäter

**im Anschluss** 01/94–08/94 Auslandsaufenthalt in den USA  
09/94–12/95 Schwerstbehinderten-Betreuung bei der  
Shad in London / England  
01/96–10/97 Tätigkeit als Croupier im Bremer Spielcasino

**Akademische  
Ausbildung** 10/96–04/00 Studium der Humanmedizin an der  
MH Hannover  
04/00–07/03 Studium der Humanmedizin an der  
Universität Lübeck  
08/03-08/04 Praktisches Jahr am UK-SH Lübeck  
seit 01/05 Arbeit als Assistenzarzt in der Med. Klinik II  
des UK-SH, Campus Lübeck



---

## Publikationen

### Poster

- § **Doehring LC**, Kaczmarek PM, Ehlers EM, Mayer B, Erdmann J, Schunkert H, Aherrahrou Z: Arterial calcification in mice after freeze-thaw injury. *Ann Anatomy*. Publication accepted
  
- § Aherrahrou Z, Axtner SB, Kaczmarek PM, Jurat A, Korff A, **Doehring LC**, Weichenhahn D, Katus HA, Ivandic BT: A locus on Chr. 7 determines dramatic up-regulation of Osteopontin in dystrophic cardiac calcification in mice. *Am J Pathology*, Vol.164, No. 4, April 2004
  
- § Rudolf M, Winkler B, Aherrahrou Z, **Doehring LC**, Kaczmarek PM, Schmidt-Erfurth U: Increased expression of vascular endothelial growth factor associated with accumulation of lipids in Bruch's membrane of LDL receptor knockout mice. *Br J Ophthalmol*. 2005 Dec, 89(12):1627-30
  
- § **Doehring LC**, Kaczmarek PM, Ehlers EM, Erdmann J, Mayer B, Schunkert H, Aherrahrou Z, Ivandic BT: The chromosomal *Dyscalc1* locus determines arterial calcification in mice. Oral presentation, NGFN Meeting, Bonn, Germany (November 18-20, 2005)
  
- § **Doehring LC**, Kaczmarek PM, Ehlers EM, Erdmann J, Mayer B, Schunkert H, Aherrahrou Z, Ivandic BT: The chromosomal *Dyscalc1* locus determines arterial calcification in mice. Poster, ESC Congress, Stockholm, Sweden (September 03-07, 2005)
  
- § Z. Aherrahrou, PM Kaczmarek, **LC Doehring**, M Klinger, SO Peters, GH Richardt, BT Ivandic: Dystrophic cardiac calcification is associated with early up-regulation of Osteopontin in mice with genetic predisposition. Symposium on Phenotyping Mouse Cardiovascular Function and Development, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA (October 10–11, 2002)

