

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

Histologische und molekulargenetische Untersuchungen
zur Pathogenese
dystropher myokardialer Verkalkungen
bei Mäusen.

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Universität zu Lübeck
-Aus der medizinischen Fakultät-

vorgelegt von
Piotr Maciej Kaczmarek
aus Bromberg (Polen)

Lübeck 2008

1. Berichterstatter: **Prof. Dr. med. Joachim Weil**

2. Berichterstatter: **Priv.-Doz. Dr. med. Jan Kramer**

Tag der mündlichen Prüfung: **06.11.2008**

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den **06.11.2008**

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Stand der Forschung	1
1.2.	Grundlagen der molekularengenetischen Methoden	3
1.3.	Genetische Disposition für Kalziumablagerungen am Herzen	7
1.4.	Darstellung der Kalziumablagerungen mit der optischen Kohärenztomographie	9
1.5.	Zielsetzung der Arbeit	10
1.5.1.	Zielsetzung der molekular-genetischen Untersuchung	10
1.5.2.	Zielsetzung der pathophysiologischen Untersuchung	11
2.	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1.1.	Reagenzien	13
2.1.2.	Labormaterial	14
2.1.3.	Instrumente	14
2.2.	Versuchstiermodelle	15
2.3.	Blut- und Organentnahme	17
2.4.	Phänotyp Charakterisierung	18
2.4.1.	Knochenmarktransplantation	18
2.4.2.	Kälteinduzierte Nekrose am Herzen der Maus	18
2.4.3.	Herstellung von Gefrierschnitten aus Mauserzen	19
2.5.	Durchlichtmikroskopie	20
2.5.1.	Histochemischer Kalziumnachweis mit Alizarinrot S	20
2.5.2.	Fettnachweis mit Oil red O und Hämatoxilin Kernfärbung	21
2.5.3.	Doppelfärbung mit Hämatoxilin und Eosin (HE)	22
2.5.4.	Fluoreszenzmikroskopie	22
2.5.4.1.	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) mit DAPI Gegenfärbung	23

INHALTSVERZEICHNIS

2.6.	Genotypisierung mit Hilfe von Mikrosatellitenprimern	24
2.6.1.	DNA Isolation	24
2.6.2.	Genotypanalyse mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR)	25
2.6.3.	Gelelektrophorese mit MetaPhor Agarose	27
2.6.4.	Chimärenanalyse	28
2.7.	Die optische Kohärenztomographie	28
2.8.	Statistik und Koppelungsanalysen	29
3.	ERGEBNISSE	30
3.1.	Diät-induzierte dystrophe Herzverkalkung der Mäuseinzuchtstämme	30
3.2.	Phänotyp Untersuchungen	31
3.3.	Molekulargenetische Untersuchungen	34
3.4.	Genomweite Koppelungsanalysen	36
3.5.	Auswertung der optischen Kohärenztomographie	37
3.6.	Knochenmarktransplantation	38
4.	DISKUSSION	42
4.1.	Untersuchungen von BXH-RI Mausstämmen	42
4.2.	Genetische Untersuchungen zur Disposition von dystrophen Herzverkalkungen	44
4.3.	Knochenmarktransplantation	45
4.4.	Die optische Kohärenztomographie (OCT)	47
4.	ZUSAMMENFASSUNG	48
6.	LITERATURVERZEICHNIS	49
7.	DANKSAGUNG	55
8.	LEBENS LAUF	56
9.	PUBLIKATIONEN	58

1. EINLEITUNG

1.1. Stand der Forschung

Verkalkungen von Organen werden bei unterschiedlichen Krankheitsbildern beobachtet. Ätiologisch werden metastatische, genetisch-hereditäre und dystrophe Verkalkungen unterschieden (Seifert, 1997).

Bei metastatischen Verkalkungen führt eine Hyperkalzämie im Blutserum bei Überschreitung des Kalzium-Phosphat-Produkts zur Ablagerung des Kalziums in zahlreichen Organen. Dieses geschieht meist in Folge eines malignen Tumors mit osteolytischer Infiltration der Knochen, insbesondere bei Lungen-, Mamma-, Prostatakarzinomen und neoplastischen hämatologischen Erkrankungen. Die erhöhte osteoklastische Aktivität führt zusätzlich über humorale Faktoren zur verstärkten Kalziumresorption der Nieren und des Intestinaltrakts. Als eine weitere Ursache ist der primäre Hyperparathyreoidismus infolge eines Adenoms, einer Hyperplasie oder eines Karzinomes der Nebenschilddrüse beschrieben. Hierbei führt die exzessive Parathormonsekretion über eine vermehrte Bildung des Kalzitriols (Vitamin D₃) zu Hyperkalzämien.

Eine weitere Gruppe der Verkalkungsformen stellen die familiär auftretenden genetisch-hereditären Verkalkungen dar, wie die hereditäre Chondrokalzinose mit Kalzifikation der Gelenke und des Bandapparates oder wie die familiäre hyperphosphatische tumorale Kalzinose, bei der ein Nierentubulusdefekt zur erhöhten Phosphatrückresorption führt.

Dagegen resultieren Kalziumablagerungen im kardiovaskulären System aus entzündlich-degenerativen Veränderungen, die teilweise noch normalen Alterungsprozessen zugerechnet werden können. Solche dystrophen Verkalkungen der Gefäßwand der Herzklappen und des Myokards treten immer gemeinsam mit Zellnekrosen auf und sind in Ausmaß und Häufigkeit vom Spiegel des Serumkalziums und -phosphats unabhängig.

Myokardnekrosen mit intrazellulären Kalziumablagerungen wurden bereits in den 70er Jahren nach einer temporären Ischämie am Herzen von Hunden beobachtet (Shen und Jennings, 1972a; Shen und Jennings, 1972b). Ähnliche Kalziumablagerungen wurden auch im menschlichen Myokard nach Infarkt festgestellt (Nirdlinger und Bramante, 1974; Lockard und Bloom, 1991; Millane et al., 1994). Wrogemann und Pena (1976) postulierten dafür einen generellen Pathomechanismus für die Muskelzellnekrose und -verkalkung. Sie gingen von einem Plasmamembranedefekt aus, der durch Diäteinflüsse, infektiöse oder toxische Agentien, immunologische Vorgänge, genetische Defekte, aber auch durch

EINLEITUNG

Energiemangelzustände verursacht sein kann. Dieser Membrandefekt führt zu einem verstärkten Kalziumeinstrom in die Zelle, der die extrazellulär gerichtete Pumpleistung plasmamembranständiger Kalzium-ATPasen übersteigt. Erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentrationen sind mit der normalen Zellfunktion nicht vereinbar. Kompensatorisch versuchen die Mitochondrien die physiologische Kalziumkonzentration über membranständige Kalziumpumpen aufrecht zu erhalten. Eine deutliche Zunahme der intramitochondrialen Kalziumkonzentration führt allerdings zur Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung. Somit kommt es schließlich zum völligen Zusammenbruch der energieabhängigen Kalziumhomöostase und damit zum Zelltod mit einem weiteren massiven Kalziumeinstrom. Diese Form des Zelltodes wurde auch als koagulative Nekrose bezeichnet (Farber, 1982).

Als Tiermodell zur Erforschung der Vorgänge nach einem Herzinfarkt und bei degenerativen Kalziumablagerungen im kardiovaskulären System stehen verschiedene Mauseinzuchtstämme wie BALB/c (DiPaolo et al., 1964; Frith et al., 1975), C3H/HeJ und DBA/2 (Ball und Williams, 1965; Nabors und Ball, 1969; Rings und Wagner, 1972; Everitt et al., 1988a und 1988b) zur Verfügung. Verkalkungen des Myokards sind bei C3H/HeJ häufiger zu finden als bei anderen Stämmen (Qiao et al., 1994). Dieser Phänotyp wurde als dystrophe Herzverkalkung (dystrophic cardiac calcinosis, DCC) bezeichnet. Dem gegenüber wurden C57BL/6J-Mäuse in Hinsicht auf dystrophe Herzverkalkungen als resistent beschrieben.

Diverse Faktoren wie Virusinfektionen (Gang et al., 1986; Chow et al., 1991; Price et al., 1991), eine Cortisontherapie (Lostroh und Li, 1955; Sparks et al., 1955), das Tieralter, das Geschlecht, sowie fettreiche Ernährungsweise (Eaton et al., 1978) aber auch direkte Myokardschädigung (Brunnert und Altman, 1990) bewirken und verstärken dystrophe Herzverkalkungen. Da der Phänotyp unabhängig von der Ätiologie auftritt, muss eine gemeinsame pathologische Endstrecke bei dieser „response-to-injury“ Reaktion angenommen werden. Die genetischen Grundlagen der dystrophen Verkalkungen sind nur ansatzweise bekannt und sollen in dieser Arbeit durch Untersuchungen von prädisponierten C3H/He- und resistenten C57BL/6-Mäusen, bzw. davon abgeleiteten rekombinanten Inzuchtstämmen (BXH-RI) sowie eigens gezüchteten kongenen Mausstämmen erforscht werden.

1.2. Grundlagen der molekulargenetischen Methoden

Seit vielen Jahren können in der experimentellen Genetik die Grundlagen komplexer Erkrankungen mit Hilfe von Kopplungsanalysen entschlüsselt werden.

Kreuzt man zwei genetisch divergente Mauseinzuchtstämme mit unterschiedlichem Phänotyp, so entstehen in der F₁-Generation heterozygote Tiere, bei denen an jedem Locus Allele von beiden Elternteilen vorliegen. Verpaart man wiederum F₁-Tiere miteinander, kommt es durch symmetrische Bruchereignisse (crossing-over) zum Austausch von Chromosomensegmenten von homologen Chromosomenpaaren. Auf diese Weise entstehen in der F₂-Generation in jedem Tier unterschiedliche Rekombinationen der elterlichen Allele. Entsprechend zeigen die F₂-Tiere auch die gesamte Bandbreite der von den beteiligten Allelen bestimmten Phänotypausprägung.

Die Allelkombination (Genotyp) eines Tieres wird bestimmt, indem man stellvertretend die Allele gekoppelter, das bedeutet auf dem gleichen Chromosom sich in der Nähe befindender polymorpher Marker bestimmt (Genotypisierung). Da die Loci solcher Mikrosatellitenmarker bekannt sind, lassen sich durch ihre Allele nachvollziehen, von welchem Elternteil ein bestimmter chromosomaler Abschnitt vererbt wurde. Die Mikrosatellitenmarker basieren auf Längenpolymorphismen repetitiver Basenfolgen, die in der Regel ohne funktionelle Bedeutung sind. Die Zahl der bekannten Mikrosatellitenmarker wächst ständig. Sie sind mittlerweile in sehr großer Anzahl auf dem gesamten Genom vertreten. Mit Hilfe dieser Marker kann eine individuelle, genomumfassende „Karte“ der Rekombinationen für einen Tierorganismus erstellt werden. Durch Analyse von Markerallelen und Phänotypen können dann in einem Wahrscheinlichkeitsmodell unbekannte Genloci identifiziert werden, die den Phänotyp beeinflussen (Kopplungsanalysen). Die Einflüsse der identifizierten Genloci können einzeln und in ihrer Interaktion qualitativ und semiquantitativ bewertet werden. Die Erkenntnisse über Zustandekommen und Regulation eines komplexen Phänotyps wiegen um so mehr, wenn man bedenkt, dass dieser molekulargenetische Ansatz weder genaues pathogenetisches Wissen, noch die Klonierung beteiligter Gene voraussetzt.

In dieser Arbeit sollen rekombinant ingezüchtete Mausestämme (BXH-RI), die kommerziell erhältlich sind, untersucht werden. Diese RI-Stämme (Recombinant inbred) entsprechen Inzucht-Nachkommen der F₂-Generation einer Kreuzung von prädisponierten C3H/He- und resistenten C57BL/6-Mäusen (Abbildung 1).

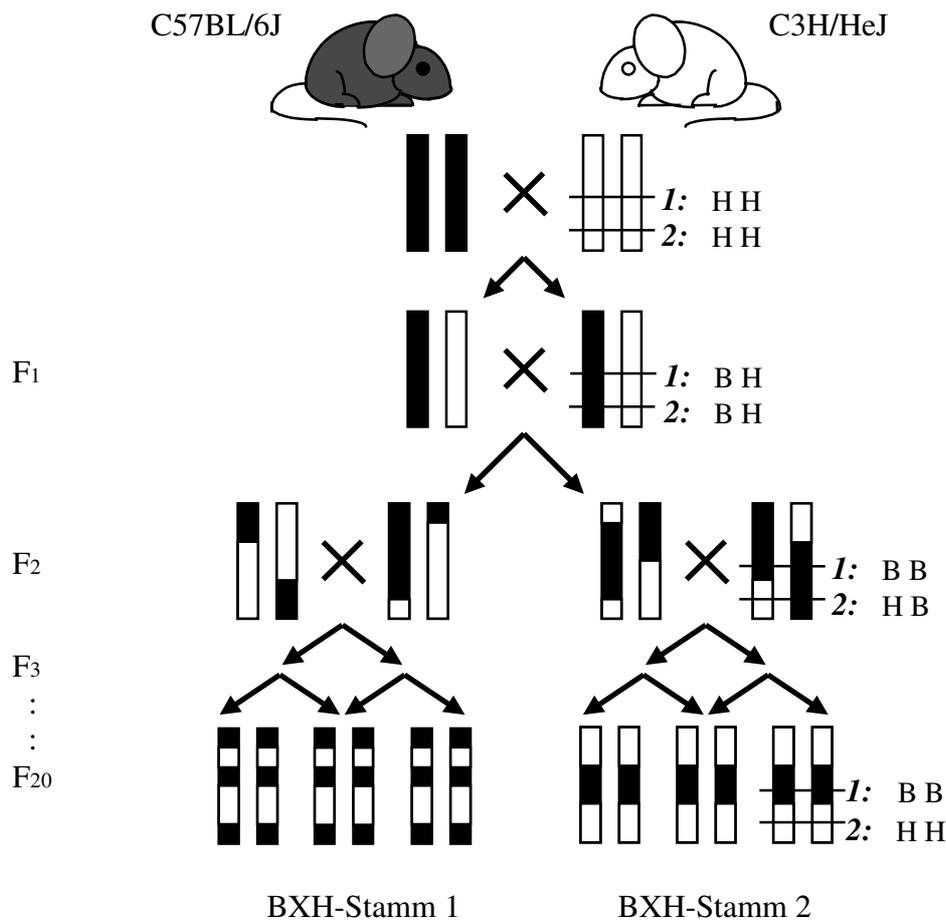


Abbildung 1 Konstruktion des BXH-RI-Stammes: Die beiden Inzuchtstämme C57BL/6J (schwarz) und C3H/HeJ (weiß) sind bezüglich aller Allele des Genoms homozygot (durch schwarze bzw. weiße Balken veranschaulicht). Durch Verpaaren der Inzuchtstämme entstehen heterozygote Tiere in der F₁-Generation. Werden diese nun miteinander verpaart, so werden in der F₂-Generation homologe Chromosomenabschnitte mit der genetischen Information der jeweiligen Elternteile ausgetauscht. Die F₂-Tiere haben daher unterschiedliche Allele an den verschiedenen Loci und weisen folglich auch unterschiedliche Phänotypen auf. Durch Geschwisterpaarung der Nachkommen zweier F₂-Tiere können im Prinzip unendlich viele Tiere mit gleicher genetischer Information erzeugt werden, die sich aus unterschiedlichen, schließlich homozygot vorliegenden Loci beider Elternteile zusammensetzt. Die genetische Zusammensetzung (genauer die Rekombinationsorte bzw. die Allele der Genloci) eines Stammes lässt sich anhand genetischer Marker bestimmen, die Polymorphismen zwischen den beiden Elternstämmen aufweisen. Die Allele solcher Marker sind hier exemplarisch für zwei Loci 1 und 2 dargestellt: mit B werden hier die Allele des C57BL/6J- und mit H die Allele des C3H/HeJ-Stammes bezeichnet.

EINLEITUNG

Die Tiere eines Stammes unterscheiden sich genetisch nicht, wohl aber die einzelnen RI-Stämme (Recombinant inbred) untereinander bezüglich der Rekombinationen ihrer Chromosomen. In jedem Stamm sind jeweils etwa 50% der genetischen Information der ursprünglichen C3H/He- und C57BL/6-Stämme enthalten. Die Phänotypvarianz ist innerhalb eines Stammes gering: für komplexe Untersuchungen stehen genügend genetisch identische Tiere zur Verfügung. Da bei der Konstruktion eines RI-Stammes durch die Inzuchtphase insgesamt mehr Rekombinationsmöglichkeiten als in einem F₂-Kreuzungsexperiment entstehen, können unter Umständen sehr kurze homologe chromosomale Abschnitte ausgetauscht sein. Nur durch Genotypisierung vieler, dichtgesetzter Marker können dann die Rekombinationsorte genau bestimmt werden. Mit der kumulativen genetischen Information und den Phänotypen aller BXH-RI-Stämme lassen sich phänotypbestimmende Genloci durch Koppelungsanalyse rasch identifizieren und eingrenzen.

Unsere Arbeitsgruppe unter der Leitung von Dr. med. B. Ivandic entwickelte noch ein zu den BXH-RI-Stämmen alternatives Mausmodell (Abbildung 2). Durch die Konstruktion eines kongenen Mausstammes gelang es den Zusammenhang zwischen dem *Dyscalc1*-Locus und den dystrophen Herzverkalkungen zu beweisen. Dieser kongene Mausstamm unterscheidet sich von resistenten, reinrassigen C57BL/6J-Mäusen nur durch einen kleinen Abschnitt auf dem proximalen Chromosom 7, der den gesuchten Genlocus (*Dyscalc1*) mit den prädisponierenden Allelen des C3H/He-Stammes enthält. Untersuchungen dieser kongenen Stämme zeigten nach kälteinduzierter Nekrose (Kryopexie) ebenfalls myokardiale Verkalkungen. Aufgrund der großen genetischen Übereinstimmung der kongenen Tiere mit dem C57BL/6J Hintergrundstamm sind diese Stämme histokompatibel. Somit ist es zum ersten mal möglich Transplantationsversuche an diesen Tieren vorzunehmen ohne eine Abstoßungsreaktion hervorzurufen. Diese Eigenschaft wird für die im Weiterem beschriebene Knochenmarktransplantation genutzt werden.

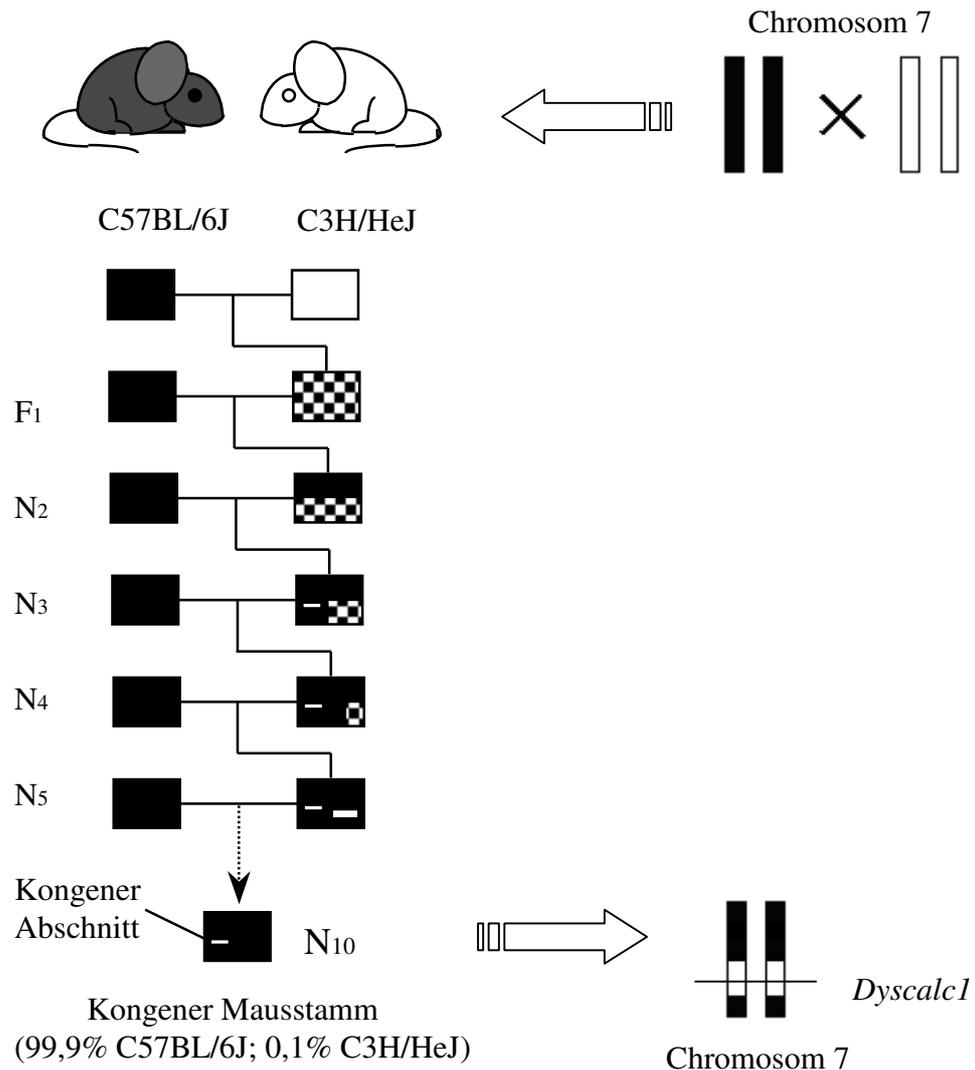


Abbildung 2 Konstruktion eines kongenen Mausstammes: Die beiden Inzuchtstämme C57BL/6J (schwarz) und C3H/HeJ (weiß) werden verpaart. Die heterozygoten Tiere der F₁-Generation werden nun mit C57BL/6J Tieren gekreuzt. Durch Genotypisierung der N₂ Generation werden die Tiere, welche den gesuchten Genlocus enthalten, selektiert und erneut mit C57BL/6J Tieren verpaart. Auf diese Weise wird über 10 Generationen die genetische Information des gesuchten Genlocus der C3H/HeJ Tiere zugunsten eines zunehmenden C57BL/6J Hintergrundes konserviert. Durch Geschwisterpaarung der heterozygoten Tiere der N₁₀ Generation werden die Nachkommen, schließlich homozygot.

1.3. Genetische Disposition für Kalziumablagerungen am Herzen

Von Eaton und Mitarbeitern (1978) wurde in einem Züchtungsexperiment erstmals ein autosomal rezessiver Erbgang für dystrophe Herzverkalkung (dystrophic cardiac calcinosis, DCC) nachgewiesen. Einige Jahre später untersuchte Brownstein (1983) eine Kreuzung zwischen DCC-prädisponierten DBA/2J- und DCC-resistenten C57BL/6J-Tieren. Zusätzlich wurden 25 rekombinant ingezüchtete BXD Mäusestämme analysiert. Brownstein (1983) zeigte, dass für dystrophe Herzverkalkung 3-4 verschiedene Gene verantwortlich sind.

Bei einer anderen experimentellen Kreuzung zwischen für dystrophe Verkalkungen prädisponierten C3H/HeJ- und resistenten C57BL/6J Mäusen wurden 185 Nachkommen der F₂ Generation molekulargenetisch und histologisch untersucht (Ivandic et al., 1996). Dystrophe Herzverkalkungen wurden hier durch eine fett- und cholesterinreiche Diät induziert. Durch genomweite Koppelungsanalysen mit 160 polymorphen Mikrosatellitenmarkern konnte der für die Myokardverkalkungen maßgeblich verantwortliche Genlocus auf dem proximalen Abschnitt von Chromosom 7 identifiziert werden. Dieser Abschnitt weist Homologiebeziehungen zu dem Chromosom 19q13 beim Menschen auf (Stubbes et al., 1996). Der Locus wurde *Dyscalc1* genannt und konnte unmittelbar proximal des Mikrosatelliten-Markers D7Mit229 platziert werden. *Dyscalc1* war für 34 % der gesamten Phänotypvarianz verantwortlich und übte damit einen verhältnismäßig großen Einfluss auf dystrophe Herzverkalkung aus. Die Ergebnisse der Koppelungsanalysen werden allgemein als „Likelihood of Odds“ in log-Einheiten (LOD-Score) ausgedrückt. Der *Dyscalc1*-Locus wurde mit einem hochsignifikanten LOD-Score von maximal 14,6 gekoppelt (Ivandic et al., 1996). Die genaue Allelanalyse des Mikrosatellitenmarkers D7Mit229 wies auf weitere Genloci hin, die einen modifizierenden Einfluss auf die Penetranz bzw. Prädisposition der Herzverkalkungen haben. In Übereinstimmung mit den bei einer monogenetischen Erkrankung mit rezessivem Erbgang zu erwartenden Verhältnissen war etwa ¼ der F₂-Tieren von dystrophen Herzverkalkungen betroffen. Allerdings fanden sich unter den F₂-Tieren mit resistenten C57BL/6J-Allelen einige mit Herzverkalkungen. Bei einigen F₂-Tieren mit DCC prädisponierenden C3H/HeJ-Allelen fehlten dagegen Anzeichen für eine Verkalkung. In weiteren Koppelungsanalysen wurden drei zusätzliche Genloci identifiziert (Ivandic et al., 1996). So handelt es sich bei der dystrophen Herzverkalkung wahrscheinlich um eine polygene Erkrankung, deren Pathogenese von einem Hauptgenlocus und wahrscheinlich drei modifizierenden Loci bestimmt wird. Experimente

von van den Broek et al. (1998) bestätigten den *Dyscalc1*-Locus und konnten weiterhin belegen, dass dieser beim DBA/2-Stamm nicht nur Herzverkalkungen, sondern auch Verkalkungen in der Niere und Zunge verursacht.

Mit einem verbesserten Kopplungsanalyseverfahren wurde auch die polygene Basis der Herzverkalkungen näher charakterisiert (Ivandic et al., 2001). In dieser Arbeit gelang es zusätzliche *Dyscalc*-Loci zu identifizieren und zu charakterisieren: *Dyscalc2* auf Chromosom 4, *Dyscalc3* auf Chromosom 12, *Dyscalc4* auf Chromosom 14. Mit den vier *Dyscalc*-Loci konnte jetzt etwa 50% der Phänotypvarianz genetisch erklärt werden. Zudem zeigte sich eine additive Interaktion (Epistase) zwischen zwei *Dyscalc*-Loci: das Ausmaß der Verkalkungen, die sich auf den prädisponierenden Effekt des Hauptlokus *Dyscalc1* zurückführen ließen, wurde durch den Einfluss von *Dyscalc2* verdoppelt. Für sich alleine betrachtet, verursachte *Dyscalc2* allerdings kaum Herzverkalkungen. Während *Dyscalc1* und *Dyscalc2* im Genom prädisponierter C3H-Mäuse zu finden waren, wurden mit *Dyscalc3* und *Dyscalc4* zwei *Dyscalc*-Loci im Genom des C57BL/6-Stammes entdeckt, ohne dass deren Einfluss für sich genommen ausreicht, um bei dem resistenten C57BL/6-Elternstamm ebenfalls Verkalkungen zu verursachen.

Bereits in der Arbeit von Ivandic et al. (1996) erbrachten Untersuchungen von BXH-RI-Stämmen eine weitere Bestätigung des *Dyscalc1*-Locus auf Chromosom 7. Bei 6 von 10 BXH-RI-Stämmen fanden sich histologisch Myokardverkalkungen und zugleich prädisponierende C3H/HeJ-Allele am D7Mit229-Locus. Hiervon ausgenommen war der BXH-10 Stamm, bei dem trotz prädisponierendem C3H/HeJ-Genotyp bei keinem der untersuchten Tiere dystrophe Herzverkalkungen festgestellt wurden.

Dafür kommen mehrere Erklärungen in Betracht: 1. Es wurden Myokardverkalkungen übersehen. 2. Bei der Züchtung des BXH-10 Stammes ist durch doppelte Rekombination ein sehr kleiner chromosomaler Abschnitt mit resistenten Allelen am *Dyscalc*-Locus entstanden, der bei der Genotypisierung des proximalen Abschnitts auf Chromosom 7 übersehen wurde. 3. Die Fütterung mit einer fett- und cholesterinreichen Diät war kein ausreichender Stimulus, um dystrophe Herzverkalkung zu induzieren. Diese Fragestellungen sollen in der vorliegenden Doktorarbeit aufgegriffen und geklärt werden.

1.4. Darstellung der Kalziumablagerungen mit der optischen Kohärenztomographie

Pathologische Kalziumablagerungen in der Gefäßwand haben als Marker klinische Bedeutung, da sie gut mit dem Schweregrad der Gefäßatherosklerose korrelieren. Die Computertomographie wird zur Zeit mit Hochdruck weiterentwickelt, um Verkalkungen der Koronargefäße mit einem nicht-invasiven Verfahren diagnostizieren zu können. Diskrete Verkalkungen sind allerdings mit den derzeit zur Verfügung stehenden Methoden nicht ausreichend gut zu erkennen. Am ehesten gelingt dies bis jetzt mit invasiven intravaskulären Ultraschallverfahren (IVUS). Neben dem perkutanen Zugang bringen sie als Nachteil einen relativ voluminösen Ultraschallkopf mit und haben nur eine begrenzte Ortsauflösung.

Die optische Kohärenztomographie (OCT) wird seit einiger Zeit als Ergänzung zum Ultraschall in der Ophthalmologie zur Darstellung verschiedener Augenabschnitte verwendet. Bei der optischen Kohärenztomographie wird mit Hilfe von infrarotem Licht das Gewebe durchgemustert und hochauflösend dargestellt. Ein vom Medizinischen Laserzentrum Lübeck modifizierter OCT-Prototyp wird von Frau PD Dr. med. J. Welzel an der Klinik für Dermatologie und Venerologie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck zur morphologischen Untersuchung der Haut erprobt. Bei diesen Experimenten zeigte sich die besondere Stärke der OCT, welche in der hohen Ortsauflösung besteht, bei der selbst die Hautschichten sowie einzelne Schweißdrüsen zur Darstellung kamen. Dieses Auflösungsvermögen wäre zur Darstellung frühester Gefäßverkalkungen nutzbar. Dystrophe Herzverkalkungen sollen daher als Modell für minimale Kalziumablagerungen dienen und mit der optischen Kohärenztomographie untersucht werden. Bei weiterer zu erwartender Miniaturisierung der OCT Geräte bietet sich ein weites Spektrum im Bereich der Diagnose artherosklerotischer Veränderungen der Koronarien sowie anderer Gefäße an.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Die Aufgabenstellung der Experimente knüpft an die Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe an (Ivandic et al. 1996).

Die Arbeit lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen. Während im ersten Teil die molekulargenetischen Untersuchungen mit dem Ziel der genaueren Eingrenzung des *Dyscalc1*-Locus im Vordergrund steht, befasst sich der zweite Teil mit der Pathogenese der dystrophen Verkalkungen.

1.5.1. Zielsetzung der molekular-genetischen Untersuchung

Bisher wurden nur 10 der 12 kommerziell verfügbaren BXH-RI-Stämme histologisch untersucht (Ivandic et al., 1996). Jetzt werden die bislang hinsichtlich dystropher Herzverkalkungen nicht beschriebenen Stämme BXH-2 und BXH-12 untersucht und mit bezüglich dystropher kardialer Verkalkungen prädisponierter C3H/HeJ sowie resistenter C57BL/6J Stämme verglichen werden. Die dystrophen Herzverkalkungen werden in Anlehnung an die Vorarbeiten mit der fett- und cholesterinreichen Diät induziert und histologisch quantifiziert.

Der Stamm BXH-10 zeigte in den Vorarbeiten (Ivandic et al., 1996) bislang trotz prädisponierender Allele keine Herzverkalkungen nach fettreicher Diät. Die Gründe für dieses diskrepante Ergebnis sollen jetzt aufgeklärt werden. Dazu wird der Genotyp am *Dyscalc1*-Locus mit hochauflösender Genotypisierung bestimmt und der bislang als resistent beschriebene Phänotyp an zusätzlichen Tieren bestätigt werden.

Definitionsgemäß sind die dystrophen Herzverkalkungen vom Serumkalzium und -phosphat unabhängig, können aber durch eine cholesterin- und fettreiche Diät induziert werden. Um zu prüfen, ob nicht die cholesterin- und fettreiche Diät zu Veränderungen des Serumkalzium, -phosphat und -magnesium führt, werden diese Parameter im Blut bestimmt.

Als Alternative zur Diätinduktion der dystrophen Verkalkungen wird eine von Brunnert et al. (1990) beschriebene Methode der thermischen Myokardschädigung in der Arbeitsgruppe etabliert und bei den bisher unter Diät für dystrophe Herzverkalkungen als resistent beschriebenen Stämmen BXH-7, -8, -9 und BXH-10 im Vergleich zu den Inzuchtstamm C3H/HeJ sowie C57BL/6J angewendet werden.

Bei allen Tieren werden die Herzen histologisch aufgearbeitet. Zur Übersicht über die Narbenbildung wird eine Hämatoxylin und Eosin (HE) Färbung verwendet. Die Lokalisation und Größe der entstandenen Verkalkungen wird mit Hilfe der Alizarin S Färbung dargestellt. Eventuell entstandene Verfettungen vor allem der proximalen Aorta sowie der Herzklappen sollen mit Oil red O zur Darstellung kommen.

In weiteren molekulargenetischen Untersuchungen aller BXH-RI-Stämme wird der *Dyscalc1*-Locus durch genomweite Koppelungsanalysen mit polymorphen Mikrosatellitenmarkern exakter als bislang in der Literatur geschehen eingegrenzt. Die Korrelation ihrer Allele mit der Prädisposition zur dystrophen Herzverkalkungen soll in allen 12 kommerziell erhältlichen BXH-RI-Stämmen überprüft werden.

Des Weiteren wird am Modell der dystrophen Herzverkalkung nach thermischer Myokardschädigung die Möglichkeit zur bildgebenden Darstellung von Kalziumablagerungen im Gewebe mit der optischen Kohärenztomographie geprüft. Hierbei wird die mögliche Eignung zur Detektion von Mikroverkalkungen im Gewebe im Hinblick auf ein Screening von atherosklerotischen Gefäßverkalkungen untersucht.

1.5.2. Zielsetzung der pathophysiologischen Untersuchung

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Identifikation der Zellpopulation, die für die Kalziumablagerungen in der Myokardnekrose maßgeblich verantwortlich ist. Nach der Myokardkryopexie entwickelt sich innerhalb weniger Tage eine deutliche Nekrose, deren zelluläre Zusammensetzung hauptsächlich von untergehenden Kardiomyozyten und von infiltrierenden phagozytierenden Zellen bestimmt wird. Zeitgleich treten die Kalziumablagerungen in der Nekrose auf, ohne dass zu erkennen ist, welcher dieser beiden Zellpopulationen letztlich die Kalziumablagerungen bewirkt. Die bisherigen genetischen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe identifizierten zwar den hauptverantwortlichen Locus *Dyscalc1*, klären aber nicht seine funktionelle Rolle in der Pathogenese.

Es ist vorstellbar, dass der mit dem *Dyscalc1*-Locus verbundene Gendefekt einen Phagozytosedefekt in den infiltrierenden mononukleären Zellen verursacht. Nicht phagozytierter Debris könnte als Nidus für eine passive Kalziumablagerung dienen.

Experimentelle Hinweise lassen aber auch eine Alternativhypothese bei der Entstehung der Verkalkungen zu. In prädisponierten Mäusen wurden die Verkalkungen stets in Muskelzellen, vorzugsweise Herzmuskelzellen gefunden. Diese zeichnen sich durch eine besonders große Dichte an kalziumspeichernden Granula und Mitochondrienreichtum aus.

EINLEITUNG

Es ist daher ebenso vorstellbar, dass der mit dem *Dyscalc1*-Lokus verbundene Gendefekt eine erhöhte Vulnerabilität der intrazellulären Kalziumhomöostase in Herzmuskelzellen bewirkt.

Zur Aufklärung der für dystrophe Verkalkungen hauptverantwortlichen Zellpopulationen wird eine Knochenmarktransplantation durchgeführt. Dabei entstehen Organismen mit der Erbinformation zweier Individuen, sogenannte Chimären. Da das nach kälteinduzierter Nekrose in die Wunde phagozytierende Infiltrat überwiegend aus monozytären Blutzellen abgeleitet ist, ist denkbar, dass ein Phagozytendefekt nach myeloablativer Bestrahlung durch Transplantation von Knochenmark resistenter Stämme in prädisponierte kongene Stämme behoben und damit die Nekroseverkalkungen verhindert werden könnten. Sollte die Knochenmarktransplantation jedoch keinen Einfluss auf die Ausbildung der Verkalkungen aufzeigen, so ist von einem Gendefekt der ortständigen Zellpopulation auszugehen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1.1. Reagenzien

Alizarin red S	Fluka
Aquatex	Merck
Avertin	Aldrich
Chloroform	Merck
DAPI	Sigma
Destilliertes Wasser	Apotheke
EDTA	Sigma
Eosin	Apotheke
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Eukitt	Kindler
Flüssiger Stickstoff	Apotheke
Hämatoxin nach Mayer	Apotheke
Isofluran	Isofluran-Pharmacia
Isopropanol	Sigma
Kaisers Glyceringelantine	Merck
Metaphor®Agarose (High resolution)	BMA
Oil red O	Apotheke
Paraformaldehyd	Sigma
Phenol:Chloroform:Isoamyl (25:24:1)	Sigma
Proteinase K	Sigma
QA-Agarose TM (Standard)	Q.Bio.Gen
Taq-DNA-Polymerase	Pharmacia Biotech
Tissue Freezing Medium	Jung
Valoron N	Gödecke
Xylol	Apotheke
X-Chromosom Sonde	Vysis
Y-Chromosom Sonde	Vysis

2.1.2. Labormaterial

Deckgläser	Menzel-Gläser
Faltenfilter	Schleicher
Filter: 0,45 µm	Nalgene/ Sartorius AG
Hämatokrit Kapillare	Menzel-Gläser
Naht: Mopylen monofil blau	Resorba
Objektträger (Super Frost Plus)	Menzel-Gläser Serum
Reaktionsröhrchen 0,2 ml; 1,5 ml ; 2 ml	Eppendorf
Separations Gel Tubes	Microtainer
Skalpelle (steril)	Feather

2.1.3. Instrumente

Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Gel-Dokumentations-Kammer	MWG-Biotech
Gene Quant II	Pharmacia Biotech
Kryothom	Shandon
Lichtmikroskop	Zeiss
Mikrowelle	Siemens
Optischer Kohärenztomograph	Prototyp (UKSH)
pH-Meter	Knick
Schüttler Vortex-Genie	Bender & Hobein AG
Touch down PCR-Maschine	Hybaid-AGS
Thermomixer	Eppendorf
Zentrifuge	Biofuge pico, Heraeus

2.2. Versuchstiermodelle

Es wurden für diese Arbeit zwei verschiedene Tiermodelle untersucht. Alle Tiere wurden in Standardkäfigen, sowie unter kontrollierten Klimabedingungen bei konstantem Tag-/Nacht rhythmus gehalten. Die Futter- und Wasserzufuhr war nicht limitiert. Alle nicht selbst gezüchteten Tiere wurden über Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA bezogen. Die Tierversuche wurden vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein (AZ 1/b/97 und AZ 1/n/01) genehmigt. Es wurde im Sinne des „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“, veröffentlicht durch das US National Institute of Health, vorgegangen.

Für die Untersuchung der Disposition zu dystropher Herzverkalkung (DCC) wurden in Anlehnung an die Vorarbeiten von Ivandic et al. (1996) eine fett- und cholesterinreiche Diät verwendet. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die untersuchten Inzuchtstämme, die Anzahl der Tiere und die Art der Fütterung. Als Alternative zur Diätinduktion von dystrophen Herzverkalkungen wurde eine von Brunnert et al. (1990) beschriebene Methode der kälteinduzierten Myokardschädigung etabliert und bei den bisher unter Diät als DCC-resistent beschriebenen Stämmen BXH-7, -8, -9 und BXH-10 angewendet. Als positive Kontrolle wurden die für dystrophe Verkalkungen prädisponierten C3H/HeJ Mäuse und als negative Kontrolle die resistenten C57BL/6J Mäuse verwendet.

Mausstamm	Gruppe I Normalfutter	Gruppe II Fettreiche-Diät	Gruppe III Kälteinduzierte Nekrose und OCT
C3H/HeJ	3	6	6
C57BL/6J	7	9	6
BXH2	5	4	--
BXH7	--	--	6
BXH8	--	--	6
BXH9	--	--	6
BXH10	9	8	6
BXH12	7	10	--
Tiere gesamt:	31	37	36

Tabelle 1 Übersicht über die Stämme, die Anzahl der verwendeten Tiere und die Fütterungsart sowie die Anwendung der kälteinduzierten Myokardschädigung. Alle Tiere der Gruppe III wurden mittels der optischen Kohärenztomographie (OCT) untersucht.

MATERIAL UND METHODEN

Bis zu einem Alter von 12 Wochen wurden alle Mäuse mit dem Kontrollfutter (Altromin 1324 Alleinfuttermittel, Altromin GmbH (Zusammensetzung des Futters unter <http://www.altromin.de> [Letzter Zugriff 07/2008] einzusehen)) gefüttert. Während die Kontrolltiere (Gruppe I) in den folgenden 12 Wochen weiterhin das Kontrollfutter erhielten, bekamen die Diättiere (Gruppe II) in dieser Zeit ein fett- und cholesterinreiches Diätfutter (15% (w/w) gesättigtes Fett in Form von Kakaobutter, 1,5% (w/w) Cholesterin, 0,5% (w/w) Gallensäure; (TK 90021, Harland-Tekland, Madison, USA)). Die Tiere, welche für die kälteinduzierte Nekrose vorgesehen waren erhielten stets das Kontrollfutter (Gruppe III).

Es wurden je 6 C3H/HeJ und C57BL/6J Mäuse sowie je 6 Mäuse der als DCC-resistent vorbeschriebenen Stämmen BXH-7, -8, -9 und BXH-10 wie unten beschrieben operativ eine thermischen Myokardschädigung induziert. 14 Tage nach der thermischen Myokardschädigung wurden die Herzen entnommen und nach einer Untersuchung mit dem optische Kohärenztomographie (OCT) für histologische Untersuchungen eingefroren.

In einem zweitem Tierversuch soll die Pathogenese der dystrophen Verkalkungen mit Hilfe einer Knochenmarktransplantation geklärt werden. Hierzu werden insgesamt 48 Mäuse benötigt. Davon sind 24 C57BL/6J- und 24 eigens gezüchtete kongene Tiere (Abbildung 2).

Gruppe	Männliche Spender (N)	Weibliche Empfänger (N)	Gesamtzahl
A	kongene Tiere (2)	C57BL/6J (10)	12
B	C57BL/6J (2)	kongene Tiere (10)	12
C	C57BL/6J (2)	C57BL/6J (10)	12
D	kongene Tiere (2)	kongene Tiere (10)	12

Tabelle 2 *Übersicht über die für eine Knochenmarktransplantation verwendeten Tiere.*

Die Knochenmarkzellen eines von dystrophen Herzverkalkungen betroffenen männlichen Tieres (kongenes Tier) werden in eine resistente weibliche Maus und die Knochenmarkzellen einer resistenten männlichen Maus in ein von dystrophen Herzverkalkungen betroffenes weibliches Tier transplantiert (Gruppen A und B). Als Kontrolle wird das Knochenmark des gleichen Tierstammes untereinander ebenfalls

transplantiert (Gruppen C und D). Es werden je zwei Spendertiere benötigt um genügend Knochenmarkzellen zu erhalten um diese in zehn Mäuse zu transplantieren.

Zehn Wochen nach Knochenmarktransplantation werden bei allen Tieren thermische Myokardschädigungen durch Kryopexie erzeugt (Brunnert, 1997). Zwei Wochen nach Myokard-Kryopexie werden die Tiere getötet und die Herzen entnommen, um das Nekrosegewebe und die Verkalkungen histologisch zu untersuchen.

2.3. Blut- und Organentnahme

Vor Beginn sowie nach Beendigung des Diätversuchs (Tabelle 1) wurde den Tieren Blut entnommen. Zunächst wurde dazu den Mäusen über Nacht das Futter entzogen. Den nüchternen Tieren wurde unter Isofluran Inhalationsnarkose (Isofluran-Pharmacia) mit einer Hämatokritkapillare durch Punktion des retroorbitalen Sinus venosus ca. 0,4 ml Blut entnommen. Nach Zentrifugation (Biofuge pico, Heraeus) wurde im Plasma das Kalzium, Magnesium und Phosphat durch das Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck bestimmt.

Den Mäusen aus dem Knochenmarktransplantationsversuch wurde ebenfalls zur Durchführung einer Chimärenanalyse, wie oben beschrieben, ca. 0,4 ml Blut entnommen.

Nach Beendigung des Diät- sowie des Knochenmarktransplantationsversuches erfolgte die Organentnahme. Unter Inhalationsnarkose mit Isofluran wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet. Unmittelbar nach der Tötung wurden der Thorax und das Abdomen eröffnet, das Herz mitsamt dem proximalen Anteil der Aorta exzidiert, ausgiebig mit PBS gespült, dann in Tissue Freezing Medium (Jung) gebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Weiterhin wurde jedem Tier eine ca. 1 cm lange Biopsie der Schwanzspitze zur DNA Gewinnung entnommen. Nachfolgend wurden alle inneren Organe inspiziert und pathologische Veränderungen dokumentiert. Das entnommene Herz sowie die Biopsie der Schwanzspitze wurden bis zu weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

2.4. Phänotyp Charakterisierung

2.4.1. Knochenmarktransplantation

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. S. Peters (Medizinische Klinik I) und Dr. med. R. Nadrowitz aus der Klinik für Strahlen- und Nuklearmedizin wurde die Knochenmarktransplantation durchgeführt.

Die weiblichen Empfängertiere wurden zunächst in einer Caesiumquelle mit insgesamt 9 Gy (1 Gy [Gray] = 1 J [Joul]/kg) bestrahlt. Es wurde mit einer 10 MV (Megavolt) Bremsstrahlung und einer Feldgröße von 35 cm x 35 cm sowie einem Fokus-Behälterabstand von 147 cm gearbeitet. Die Dosisleistung in 147 cm Fokusabstand betrug 1,75 Gy/min..

Die jeweils zwei männlichen Knochenmark-Spendertiere je Gruppe wurden nach Einleitung einer Inhalationsnarkose mit Isofluran getötet. Aus den Röhrenknochen des Ober- und Unterschenkels wurden unter sterilen Bedingungen mit PBS Knochenmarkzellen ausgespült. Nach Zentrifugation (Biofuge pico, Heraeus) wurden die Zellen in PBS gewaschen und auf eine Konzentration von 2×10^6 in einem Volumen von 0,2 ml konzentriert. Diese wurden dann nach Durchführung der myeloablativen Ganzkörperbestrahlung den Empfängertieren durch Injektion in die Schwanzvene transplantiert. Zehn Wochen nach Transplantation wurden bei allen Tieren Myokardnekrosen durch Kryopexie erzeugt (s. Kapitel: Kälteinduzierte Nekrose an Mausherzen). Zwei Wochen nach Myokard-Kryopexie wurde allen Tieren Blut entnommen und die Tiere getötet. Die Herzen wurden entnommen und für weitere histologische Untersuchungen in Tissue Freezing Medium eingefrorenen.

2.4.2. Kälteinduzierte Nekrose am Herzen der Maus

Das Tierversuchsvorhaben wurde um die von Brunnert und Altmann (1990) beschriebene Methode der kälteinduzierten Nekrose erweitert. Die Anwendung dieser Methode bietet unter Ausschluss des Fettstoffwechsels durch direkte Schädigung des Herzmuskels die Vorteile der maximalen Stimulierung der dystropher Herzverkalkung und die Möglichkeit der optimalen zeitlichen Einordnung der Abläufe bei der Mineralisation.

MATERIAL UND METHODEN

Vor dem Setzen der kälteinduzierten Nekrose erhielten die Mäuse nach Einleitung mit Isofluran Inhalationsnarkose jeweils 0,2 ml Avertin® (125 mg 2,2,2 Tribromoethanol (Aldrich) und 0,25 ml 2-Methyl-2-Butanol (Aldrich) auf 10 ml Aqua bidest. aufgefüllt, steril gefiltert mit 0,45 µm Filtern (Nalgene)) intraperitoneal gespritzt. Nach Fixierung mit Pflasterstreifen in Rückenlage und sorgfältiger Rasur wurde das Abdomen aseptisch mit einem Oberbauchmedianschnitt eröffnet und die Haut stumpf vom Peritoneum abpräpariert. Der Musculus rectus abdominis wurde dargestellt und die Bauchhöhle an der Linea alba eröffnet. Zur Schmerzstillung bekamen die Tiere 100 µl Valoron N (Gödecke) intraperitoneal verabreicht. Mit einer halbrunden Schiene wurde die Bauchorgane geschützt und das schlagende Herz durch das Diaphragma hindurch dargestellt. Ein im flüssigen Stickstoff gekühlter ca. 4 mm² messender metallener Stempel wurde für 10 Sekunden auf das schlagende Herz gelegt und dadurch die Nekrose induziert. Nach Entfernung der Schiene wurde das Peritoneum mit Einzelknopfnähten und der Hautschnitt mit einer fortlaufenden Naht (Mopylen monofil blau, Resorba) verschlossen.

Nach 14 Tagen wurde der Versuch beendet und die Tiere unter Inhalationsnarkose durch Genickbruch getötet. Nach der Organentnahme wurde das Herz mit der optischen Kohärenztomographie untersucht. Ansonsten wurde wie im oben beschriebenen Fütterungsversuch vorgegangen. Alle Tiere dieses Experimentes erhielten das Kontrollfutter und wurden unter den gleichen Bedingungen wie im beschriebenen Vorexperiment gehalten.

2.4.3. Herstellung von Gefrierschnitten aus Mausherzen

Aus den eingefrorenen Herzen wurden Gefrierschnitte (Shandon Cryotom SME) von 10 µm Dicke in Serie angefertigt. Jeder zweite Schnitt wurde auf Super Frost Plus Objektträger (Menzel-Gläser) aufgetragen. Dabei wurden der 1., 3., 5. und 7. Schnitt nacheinander auf vier separate Objektträger aufgebracht. Der 9. Schnitt kam wieder auf den ersten Objektträger zu liegen. So entstanden vier parallele Serienschnitte von jeweils 80 µm Abstand. Von jedem Herzen wurden durchschnittlich 60 Schnitte pro Serie angefertigt (ca. 240 Schnitte pro Herz). Diese wurden über Nacht an der Luft getrocknet und in Aluminiumfolie eingewickelt bei -25°C aufbewahrt.

2.5. Durchlichtmikroskopie

2.5.1. Histochemischer Kalziumnachweis mit Alizarinrot S

Die Färbung mit Alizarinrot S ist eine spezifische und sensitive Methode um Kalziumablagerungen nachzuweisen (Dahl, 1952; McGee-Russell, 1958). Alizarinrot S bildet dabei mit zweiwertigen Kationen, somit auch mit Kalzium, Chelatverbindungen. Amorphe Kalziumablagerungen stellen sich intensiv rötlich-orange auf blass-rosa Untergrund dar. Um Diffusionsartefakte der in saurer Lösung gut löslichen Kalziumionen weitgehend zu verhindern, wurde ein basischer pH-Wert der Färbe- und Pufferlösungen gewählt. Die damit erreichte langsame Freisetzung der Kalziumionen garantiert eine ortstreuere Farbstoffbindung. Es wurde eine komplette Schnittserie mit dieser Methode angefärbt.

Zunächst wurden zwei 0,5% Alizarinrot S Färbelösungen in 50 mM Trispuffer Base hergestellt. Der pH-Wert wurde auf pH 9 beziehungsweise pH 7 (Knick Digital pH Meter) eingestellt und beide Lösungen durch einen Filter mit 0,45 µm Porengröße (Sartorius AG) gefiltert. Weiterhin wurden zwei 50 mM Trispuffer-Basenlösungen ebenfalls mit pH 9 und pH 7 bereitgestellt. Die zu färbenden Präparate wurden für 30 Minuten auf Zimmertemperatur gebracht und anschließend eine Stunde lang in die pH 9 Färbelösung eingetaucht. Daraufhin wurden diese 5 Minuten in die pH 7 Färbelösung gebracht und dann nacheinander kurz in den pH 9 und pH 7 Tris-Pufferlösungen gespült. Rasches entwässern in zwei Portionen vergälltem Ethanol und aufhellen in Xylol schlossen die Färbung ab. Die Objektträger wurden mit Deckgläsern (Menzel-Gläser) in Kaisers Glyceringelatine (Merck) eingebettet.

Bei der mikroskopischen Auswertung (Zeiss Mikroskop) der Lage und Größe der Kalziumablagerungen wurde ein Messgitter zufällig über den Schnitt gelegt. Die Schnittpunkte der Linien des Messgitters, die über die Läsion zu liegen kamen, wurden bei 400facher Vergrößerung ausgezählt. Alle verkalkten Läsionen, die von einem gemeinsamen Kalziumsaum umgeben waren, wurden als eine Einheit angesehen.

2.5.2. Fettnachweis mit Oil red O und Hämatoxilin Kernfärbung

Bei der von Lillie (1944) eingeführten Methode des Fettnachweises mit Oil red O werden Lipide intensiv orangerot angefärbt. Der gut zu handhabende Farbstoff bildet dabei in Isopropanol kaum unerwünschte Niederschläge.

Das zur Kernfärbung verwendete Hämatoxilin nach Mayer wurde aus der Apotheke des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck als fertige Färbelösung bezogen. Diese enthält in wässriger Lösung das durch Natriumjodat zum wirksamen Farbstoff Hämatein oxidierte Hämatoxilin. Das Hämatein bildet mit im Überschuss zugesetztem Aluminiumkaliumsulfat positiv geladene Komplexverbindungen und zeigt damit eine hohe Affinität zu Zellkernen. Chloralhydrat stabilisiert die Färbelösung und Citronensäure senkt den pH-Wert.

Nach Beendigung der Färbung wurden die Präparate in Leitungswasser gespült. Diese pH-Wert Erhöhung führt zu einem Farbumschlag von rotviolett nach blau (Bläuen) und zu einer Senkung der Löslichkeit, somit zur Fixierung des Farbstoffes. Mit den oben beschriebenen Methoden wurde eine komplette Schnittserie angefärbt.

Nach Herstellung einer 0,5% Oil red O Stammlösung (0,5 g Oil red O in 100 ml 100% Isopropanol) wurde diese über Nacht stehen gelassen. Die Gebrauchslösung wurde aus 6 Teilen der Stammlösung und 4 Teilen zweifach destilliertem Wasser (Aqua bidest.) hergestellt und mindestens 24 Stunden ruhen gelassen. Vor jedem weiteren Gebrauch wurde die Gebrauchslösung durch Faltenfilter (Schleicher und Schuell) gefiltert. Nachdem die Objektträger 30 Minuten auf Zimmertemperatur gebracht worden waren, wurden diese weitere 30 Minuten lang in die Oil red O Gebrauchslösung getaucht. Anschließend 12 Minuten in 60% Isopropanollösung differenziert und 3 Minuten in Aqua bidest. gründlich gespült. Dann folgte eine 10 minütige Färbung mit ebenfalls durch Faltenfilter gefiltertem Hämatoxilin. Um Bläuung zu erhalten wurden die Präparate unter fließenden Leitungswasser 10 Minuten gespült und mit Deckgläsern in Aquatex (Merck) eingebettet. Bei der mikroskopischen Auswertung der Lage und Größe der Fettablagerungen wurde analog zu der Auswertung von Kalziumablagerung ein Messgitter zufällig über den Schnitt gelegt. Die Schnittpunkte der Linien des Messgitters, die über die Fetttröpfchen zu liegen kamen, wurden bei 400facher Vergrößerung ausgezählt.

2.5.3. Doppelfärbung mit Hämatoxin und Eosin (HE)

Zur Kontrastfärbung wurde der Farbstoff Eosin Y (Tetrabromfluoreszein-Natrium) ausgewählt. Der leicht zu handhabende Farbstoff wurde in 0,1% wässriger Lösung aus der Apotheke des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck bezogen. Bei dieser Färbung wird das Zytoplasma rosa bis hellrot angefärbt. Die Hämatoxin Kernfärbung wurde bereits unter 2.5.2. beschrieben.

Nach 10 minütiger Färbung der aufgetauten Objektträger mit durch Faltenfilter gefiltertem Hämatoxin und 10 minütiger Bläuung im Leitungswasser wurden diese für 3 Minuten in Eosin belassen. Danach wurden die gefärbten Objektträger für 5 Minuten in Leitungswasser gespült und kurz in 70%, dann in 90% und abschließend in 96% Ethanol differenziert. Nach kurzem Spülen in Xylol wurden die Objektträger mit Deckgläsern in Eukitt (Kindler) eingebettet. Das Ergebnis wurde fotografisch dokumentiert.

2.5.4. Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden die Eigenschaften der Farbstoffe genutzt bei Beleuchtung mit kurzwelligem Licht langwelliges Licht (Fluoreszenzlicht) zu emittieren.

2.5.4.1. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) mit DAPI Gegenfärbung

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) eröffnet die Möglichkeit Nukleinsäuresequenzen (also RNA- als auch DNA-Sequenzen) in Geweben, Zellen, Zellkernen und Chromosomen sichtbar zu machen. Somit lässt sich eine Nukleinsäure direkt im biologischen Präparat = "*in situ*", also vor Ort, lokalisieren. Diese Technik wurde erstmals von Pardue und Gall (1969) sowie von John et al. (1969) unabhängig voneinander beschrieben. In dieser Arbeit werden mit Hilfe einer Gen-Sonde das Y- und das X-Chromosom dargestellt. Es werden somit nach einer Knochenmarktransplantation die eingewanderten männlichen Zellen im weiblichen Gewebe lokalisiert.

MATERIAL UND METHODEN

Nach Auftauen der zu färbenden Schnitte wurden diese zunächst mit 2x SSC (pH 7,0) gespült und dann in einer feuchten Kammer bei 37 °C über eine Stunde mit RNase inkubiert. Es folgt eine erneute Spülung mit 2x SSC (pH 7,0) und die Andauung mit 5 µg/ml Proteinase K (Sigma Chemical Company) über 45 Minuten. Nach Spülung mit 2x SSC (pH 7,0) erfolgte über 10 Minuten die Fixierung mit 4% Paraformaldehyd in PBS (pH 7,2) und dann nach erneuter Spülung in 2x SSC (pH 7,0) sowie die Dehydratation in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 70%, 80% und 100% für je drei Minuten).

Die „Ziel“-DNA muss zur Anlagerung der Sonden als Einzelstrang vorliegen. Zur Hitzedenaturierung werden die Schnitte für drei Minuten bei 79 °C auf einer Heizplatte erwärmt. Hierbei werden die FITC (Fluoresceinisothiocyanat) markierte Y-Chromosom Sonde und die Rhodamin markierte X-Chromosom Sonde (Vysis, Wiesbaden-Delkenheim) hinzugefügt. Hiernach erfolgte die Inkubation der Sonden über 12 Stunden in einer feuchten Kammer bei 42°C. Nach Spülung mit 50% Formamid und 2x SSC (pH 7,0 und 42 °C) erfolgte eine Lufttrocknung über drei Stunden.

Zur besseren Orientierung wurden die Zellkerne mit einigen Tropfen des Fluoreszenzfarbstoff DAPI gegengefärbt. DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) bindet selektiv an die DNA, indem es ein fluoreszierenden DNA-DAPI-Komplex bildet. Durch die rasche Aufnahme in die Zelle und die hoher Spezifität der Bindung entstehen stark fluoreszierende Zellkerne, während eine zytoplasmatische Anfärbung nicht nachweisbar ist (Krenik et al., 1989).

Die Ergebnisse wurden mit einem Zeiss-Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und fotografisch dokumentiert.

2.6. Genotypisierung mit Hilfe von Mikrosatellitenprimern

2.6.1. DNA Isolation

Die unter Inhalationsnarkose gewonnenen ca. 1 cm langen Biopsien der Schwanzspitzen der jeweiligen Tierstämme wurden mit 0,5 ml Lyse Puffer für 3 Stunden in den Thermomixer (Eppendorf Thermomixer 5436) bei 55 °C und schneller Schüttelgeschwindigkeit inkubiert und aufgelöst. Zur Herstellung des Lyse Puffers wurden 100 mM Tris-HCl (pH 8,5), 5 mM EDTA (pH 8,3), 0,2% SDS (pH 7,2), 200 mM NaCl und 100 µg Proteinase K (Sigma) verwendet. Anschließend wurde den lysierten Mäuseschwanzspitzen zur Proteindenaturierung und Extraktion 550 µl Phenol, Chloroform, Isoamyl-Alkohol (25:24:1; Sigma) zugesetzt und vorsichtig im Vortex-Genie (Bender & Hobein AG) geschüttelt. Nachdem die Lösung bei 9000 U/min für 5 Minuten in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert worden war, wurde der DNA-haltige Überstand in ein neues Eppendorfgefäß gebracht und ein gleiches Volumen Chloroform (Sigma) zugegeben. Nach erneutem mischen und 5 minütigem zentrifugieren bei 9000 U/min wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2 Volumen 100% Ethanol versehen sowie durch Invertieren gemischt. Die dabei ausgefällte DNA wurde bei 9000 U/min 5 Minuten abgetrennt. Der Überstand wurde verworfen und das DNA Pellet 10 Minuten lang an der Luft getrocknet. Die so isolierte DNA wurde im 100 µl TE-Puffer (10mM Tris-HCl und 0,1 mM EDTA, pH 7,5) gelöst.

Zur DNA Isolation aus dem Blut der Tiere wurde das DNeasy 96 Blood & Tissue Kid (Qiagen) verwendet. Es wurde entsprechend dem von der Firma Qiagen Juli 1996 veröffentlichten Protokoll vorgegangen.

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde eine 1:50 Unterverdünnung hergestellt. Diese wurde im Gene Quant II (Pharmacia Biotech) bei einer Absorption von 260 nm (A 260) gegen TE-Puffer als Leerwert photometrisch gemessen. Für die weitere Verwendung wurde eine 20 µg/ml DNA Verdünnung hergestellt. Weiterhin wurde die Absorption der DNA bei 280 nm (A 280) bestimmt und der Quotient aus A 260 und A 280 gebildet. Ein Quotient zwischen 1,8 bis 2,0 sprach für wenige Verunreinigungen in der DNA.

Die aufgereinigte DNA der nicht zur Verfügung stehenden BXH RI-Stämme -3, -4, -6, -11, -14 und -19 wurde über The Jackson Laboratory (<http://www.informatics.jax.org> [Letzter Zugriff 11/2000]) bezogen.

2.6.2. Genotypanalyse mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (Mullis et al., 1986) ist eine schnelle und effiziente Methode um Nukleotidsequenzen in vitro enzymatisch exponentiell zu vermehren. Als Matrize wurde die Maus-DNA der zu untersuchenden Stämme verwendet. Die Amplifikation beginnt mit der temperaturgesteuerten Denaturierung der DNA Matrize. Dabei wird die gesamte DNA in ihre Einzelstränge gespalten. Beim Abkühlen lagern sich die zum Matrizenstrang komplementären Oligonucleotide (Primer) den DNA-Einzelsträngen an und die thermostabile Taq-DNA-Polymerase (Innis et al., 1988) verlängert diese durch Anbau von komplementären Nukleotiden. Neuerliches Erwärmen leitet den zyklischen Prozess ein.

Um in Erfahrung zu bringen von welchem Elternteil ein bestimmter chromosomaler Abschnitt vererbt wurde, wurden stellvertretend für die elterlichen Allele die Allele sich in der Nähe befindlicher kommerziell erhältlicher Primer (Tabelle 4) verwendet.

Die Anlagerungstemperatur der Primer spielt bei der Amplifikation eine wichtige Rolle. Diese wird durch das Adenin (A) - Thymin (T) und Guanin (G) - Cytosin (C) Verhältnis beeinflusst. Ein AT Basenpaar hat eine niedrigere Schmelztemperatur als ein GC Basenpaar. Die optimale Anlagerungstemperatur wurde mit Hilfe der Gradienten-PCR (Eppendorf Mastercycler gradient) ermittelt. Dabei wurden ein PCR Standardansatz (1 µl 1x PCR Puffer, 1 µl dNTP, 6,3 µl steriles Wasser, 0,3 µl sense Primer, 0,3 µl antisense Primer, 1 µl DNA (20 ng/µl) und 1 µl Taq-DNA-Polymerase (Pharmacia Biotech)) verwendet. Zur DNA Amplifikation wurde das in Tabelle 3a beschriebene Programm benutzt.

a Gradienten PCR Programm

Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
2' 94°C	(30" 94°C, 1' Gradient 50°C bis 60°C, 30" 72°C) x 30	10' 72°C	~ 4°C

b Standard PCR Programm

Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
2' 94°C	(30" 94°C, 1' optimale Temperatur, 30" 72°C) x 30	10' 72°C	~ 4°C

Tabelle 3a und b Gradienten- und Standard PCR Protokoll zur Ermittlung der optimale Anlagerungstemperatur und zur DNA Synthese.

MATERIAL UND METHODEN

Primer	Primersequenzen obere Zeile sense, untere Zeile antisense Primer	C57BL bp	C3H bp
D7Mit56	5'-AATGAAGATACCCACAGAAGCTG-3' 5'-GATGGGAACTGGGAACTTAGC-3'	128	146
D7Mit76	5'-CATGAGCACGTGGAGAAAGA-3' 5'-CGTGGAAACCTGATAAACTGA-3'	228	250
D7Mit154	5'-CTGTAGAAAATTAAGATGTTGGATTTG-3' 5'-CTGGCTCTATCAGAAATATATGGTG-3'	148	132
D7Mit294	5'-TAGTGGGAAAGAGAGAAACAATCC-3' 5'-TAATGTTTAATCTTGTCGTCTTAGTGG-3'	118	126
D7Mit266	5'-TCAGGGATGTCTTAAACTGGG-3' 5'-CGCTGTAAAGCGTATTCGTG-3'	122	116
D7Mit224	5'-CCATGCAGAGGTTTGGAAAGT-3' 5'-CCCAATGTTCTTGATTCCCA-3'	131	143
D7Mit247	5'-TCTTTTACTTTGATTTTGGCG-3' 5'-TGGAGGAGACATATCTTTGCG-3'	122	100
D7Mit309	5'-TGATAAGGACCCTACAAGCACC-3' 5'-CACAGAGATGGACAGATACAGACA-3'	168	128
D7Mit227	5'-GAGTCCTCAGCAGATATTACTCAGC-3' 5'-CTGATGTCTCATCATTTGGGG-3'	92	102
D7Mit25	5'-AGGGGCACATGTTCAACTATG-3' 5'-GGTTGTTTCCAGCTTTGGG-3'	110	96
D7Mit310	5'-GGGCTCGAAAGACACAGAAA-3' 5'-ATGTAGTGTTAACGGAACATAACTGG-3'	164	166
D7Mit270	5'-CCCTCCATCATCCTCCTTC-3' 5'-TCTCAAAAAGTCAATGGTGCC-3'	146	122
D7Mit228	5'-ATTCTTGGCCTTTTCTTGTAACA-3' 5'-AAACCTCCCACTGACTTCCA-3'	148	140
D7Mit158	5'-CTTCATCTGAGCCTGGGAAG-3' 5'-ACTGTAGACCCATGTTCTGATTAGG-3'	151	159
D7Mit229	5'-GGTTCTCTTTCCTTGTTTGCC-3' 5'-TACTGGTTACATCTGGTGGGTG-3'	123	143
D7Mit82	5'-GGACACGGTGTCCATCAAG-3' 5'-CTGAGTAGAAAGCATGTGGGG-3'	206	224
D7Mit31	5'-TTCAAACCATCCAGTAAGTCCA-3' 5'-TTGGTGAAGTCTTCAATGC-3'	246	226
D7Mit40	5'-GTCAACAGTCAGGAAAGCTGG-3' 5'-CAGATGCTTGATTTGCAAAGC-3'	204	228
D7Mit332	5'-TACCATCCCTAACTGGTTCTCTT-3' 5'-CTGCACACTCACATACATACTCATG-3'	116	124

Tabelle 4 Primersequenz und Fragmentlänge der Sonden sind aus Mouse Genome Informatics (<http://www.informatics.jax.org> [Letzter Zugriff 11/2000]) entnommen und über Research Genetics Inc. (<http://www.resgen.com> [Letzter Zugriff 11/2000]) bezogen worden. Die Sonden sind vom proximalen Ende des Chromosoms 7 zum distalen Ende aufgelistet.

Nach Ermittlung der optimalen Anlagerungstemperatur der einzelnen Primer wurden mit Hilfe des oben beschriebenen PCR Standardansatzes und des PCR Programms aus der Tabelle 3b die DNA-Fragmente aller Mausstämmen amplifiziert und auf ein MetaPhor Agarosegel aufgetragen. Eine Negativkontrolle wurde stets mitgeführt.

2.6.3. Gelelektrophorese mit MetaPhor Agarose

Die Elektrophorese ist eine weitverbreitete Methode um geladene Teilchen im elektrischen Feld zu trennen. Bei der MetaPhor Agarose (Biozym) wird zusätzlich durch definierte Porengröße des Gels ein „Siebeffekt“ ausgenutzt. Die mit der PCR Methode vervielfältigten Nucleotidsequenzen wandern aufgrund ihrer Ionisation (Anionen) im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit wird weitgehend von der Moleküllänge bestimmt. Lange Moleküle wandern langsamer als kurze. Um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen wird das MetaPhor Agarosegel mit Ethiniumbromid (EtBr) versetzt. Das EtBr schiebt sich zwischen die Basen der Nucleinsäuren und bildet ein EtBr-Nucleinsäure Komplex (Alwine et al., 1979). Nach Anregung mit UV-Licht erscheinen rot-orange leuchtende Banden im sichtbaren Bereich des Lichtes. Es wurde je nach erwarteter Fragmentlänge ein 1 % - 5 % MetaPhor Agarosegel in 1x TBE Puffer (10x TBE entspricht 1 M Tris Base, 830 mM Boric acid, 10 mM EDTA) hergestellt und mit EtBr (0,75 µl/100 ml) versetzt.

Den mit Hilfe der PCR Methode vervielfältigten Nucleotidsequenzen wurde je 1 µl Loading Dye (0,25% Xylene cyanol FF, 15% Ficoll polymer in Aqua bidest.) zugegeben und auf das Gel aufgetragen. Als Puffersystem diente 1x TBE. Eine Spannung von 110 V wurde für 120-200 Minuten angelegt und das Ergebnis fotografisch dokumentiert.

Durch den direkten Vergleich der Wanderungslänge der amplifizierten DNA-Fragmente der C57BL/6J und C3H/HeJ Tierstämmen mit den zwölf BXH Stämmen konnten die BXH DNA-Fragmente entsprechend ihrer Abstammung zugeordnet werden.

2.6.4. Chimärenanalyse

Um den Erfolg der Knochenmarktransplantation zu dokumentieren wurde neben der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) eine Chimärenanalyse durchgeführt. Hierbei wurde 12 Wochen nach der Knochenmarktransplantation allen Tieren durch Punktion des retroorbitalen Sinus venosus Blut entnommen. Die DNA wurde mit dem DNeasy 96 Blood & Tissue Kit (Qiagen) isoliert. Mit zu Hilfenahme der Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit dem Standard PCR Programm (Tabelle 3b) und Verwendung der Primer D7Mit56, D7Mit247 und D7Mit229 (Tabelle 4) wurde die genetische Zusammensetzung des Blutes geprüft. Es wird erwartet, dass bei einer erfolgreichen Knochenmarktransplantation die Mäusestämme im Blut den genetischen Fingerabdruck des jeweils transplantierten Knochenmarks zeigen.

2.7. Die optische Kohärenztomographie

Bei der optischen Kohärenztomographie (OCT) wird infrarotes Licht gleicher Frequenz und konstanter Phasendifferenz emittiert (Abbildung 3). Das Licht der Superlumineszenzdiode ist somit kohärent. Das ausgesandte Licht kurzer Kohärenzlänge wird in einen Probe- und Referenzstrahl aufgeteilt. Durch den Vergleich des aus dem Gewebe zurück gestreuten Lichts und des Referenzlichtstrahls kommt es zur Addition von Schwingungszuständen bei der Überlagerung von Wellen (Interferenz). Da die zurückgelegte Weglänge des Referenzstrahls bekannt ist, lassen sich somit tiefenabhängig Rückschlüsse über die Eigenschaften des Gewebes wie Streuung und Absorption ziehen. Durch die Veränderung der Weglänge des Referenzstrahles kann das untersuchte Gewebe durchgemustert werden.

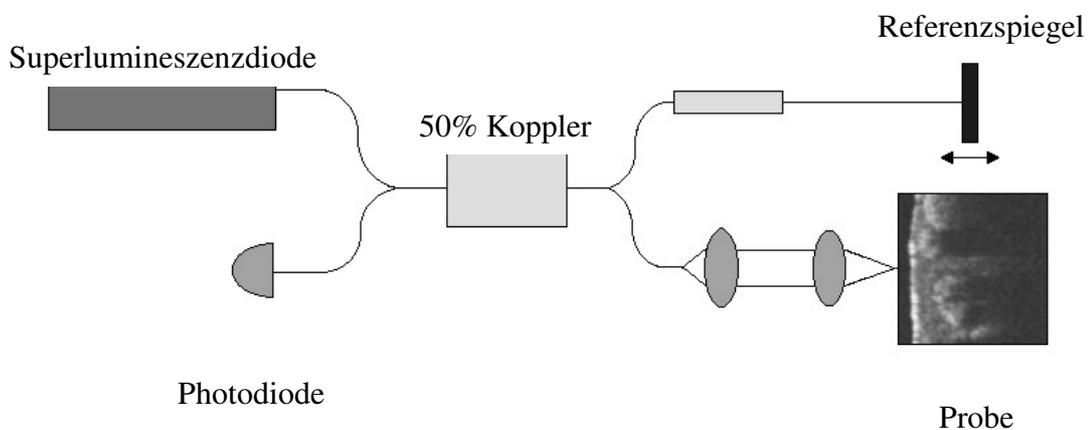


Abbildung 3 Schematische Darstellung der optischen Kohärenztomographie (OCT).

Der OCT-Prototyp verwendet als Lichtquelle infrarote Superlumineszenzdioden der Wellenlänge 1300 nm und Kohärenzlänge von 15 μm . Die Detektionstiefe am Herzen beträgt ca. 1,5 mm. Im Vergleich zur hochfrequenten Sonographie bietet das OCT eine deutlich größere Auflösung bei jedoch kleinerer Eindringtiefe.

Mit der optischen Kohärenztomographie werden je 6 Tiere, der in früheren Publikationen (Ivandic et al., 1996) als DCC-resistent beschriebenen BXH-Stämme 7, 8, 9 und 10 sowie bezüglich dystropher kardialer Verkalkungen prädisponierter C3H/HeJ und resistenter C57BL/6J Stämme, nach Anwendung der kälteinduzierten Nekrose untersucht.

2.8. Statistik und Koppelungsanalysen

Die statistische Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie und Statistik des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck durchgeführt. Bei den Berechnungen wurde das SPSS Programm (Statistical Package for the Social Sciences) und für die Koppelungsanalysen das MAPMAKER Programm verwendet. Die Signifikanzschwelle wurde bei allen Untersuchungen für $p=0,05$ festgelegt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Diät-induzierte dystrophe Herzverkalkung der Mäuseinzuchtstämme

Vor Beginn und nach Beendigung der Fütterung mit fett- und cholesterinreicher Diät über 12 Wochen wurde den nüchternen Tieren Blut entnommen und durch das Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck bestimmt. Es zeigten sich erwartungsgemäß keine signifikanten Veränderungen von Serumkalzium, -phosphat und -magnesium zwischen den Tieren unter Kontroll- und Diätfutter sowie zwischen den BXH2, -10, -12 und den Stämmen C3H/HeJ sowie C57BL/6J. Hierdurch wurde eine metastatische extraossäre Kalziumablagerung ausgeschlossen (Tabelle 5).

	Mausstämme				
	C3H/HeJ n = 3 ; 6	C57BL/6J n = 7 ; 9	BXH2 n = 5 ; 4	BXH10 n = 9 ; 8	BXH12 n = 7 ; 10
	Kalzium (mmol/l)				
Kontrolldiät	2,35 ± 0,04	2,30 ± 0,04	2,38 ± 0,09	2,40 ± 0,07	2,39 ± 0,14
Fettdiät	2,33 ± 0,03	2,30 ± 0,11	2,34 ± 0,06	2,45 ± 0,07	2,39 ± 0,07
	Magnesium (mmol/l)				
Kontrolldiät	0,84 ± 0,06	0,79 ± 0,14	0,87 ± 0,15	0,91 ± 0,05	0,79 ± 0,04
Fettdiät	0,83 ± 0,06	0,82 ± 0,18	0,83 ± 0,11	0,89 ± 0,06	0,80 ± 0,03
	Phosphat (mmol/l)				
Kontrolldiät	2,51±0,21	2,79 ± 0,11	2,27 ± 0,36	2,25 ± 0,23	2,19 ± 0,23
Fettdiät	2,48±0,29	2,20 ± 0,04	2,26 ± 0,44	2,19 ± 0,09	2,22 ± 0,34

Tabelle 5 *Ergebnisse der Blutuntersuchung nach Beendigung des Fütterungsversuchs. Es sind jeweils in der oberen Zeile die Mittelwerte mit Standardabweichung der Tiere unter Kontrollfutter und in der unteren Zeile die Blutwerte der Tiere unter Diätfutter angegeben. Die Anzahl der untersuchten Mäuse ist jeweils in der oberen Spalte aufgezeichnet. N = Anzahl der untersuchten Tiere unter Kontrolldiät ; Anzahl der untersuchten Tiere unter Fettdiät.*

3.2. Phänotyp Untersuchungen

Aus den eingefrorenen Herzen wurden Gefrierschnitte von 10 µm Dicke in Serie angefertigt. Eine komplette Schnittserie der Herzen aus dem Fütterungsversuch wurde mit Alizarinrot S angefärbt und mikroskopisch die Lage und Größe der Kalziumablagerungen untersucht. Eine weitere komplette Schnittserie wurde mit der Fettfärbung Oil Red O angefärbt und die proximalen Anteile der Aorta und die Herzklappen auf vorhandene Verfettung untersucht. Mit zu Hilfenahme der Hämatoxilin und Eosin (HE) Färbung wurde ebenfalls eine Schnittserie auf Narbenbildung hin untersucht.

Wie erwartet zeigte der DCC-resistente Inzuchtstamm C57BL/6J keine Kalzifikationen, während bei dem DCC-sensiblen Stamm C3H/HeJ 6 von 9 Tieren zum Teil massive myokardiale und epikardiale Verkalkungen aufwiesen (Abbildung 4a). Bei allen untersuchten rekombinant ingezüchteten Stämmen waren dystrophe myokardiale Verkalkungen nachweisbar. Die BXH10 Tiere zeigten jedoch nur eine geringe Ausprägung der Verkalkung (Tabelle 6). Entgegen unserer Hypothese, dass die fett- und cholesterinreiche Diät Verkalkungen induziert, zeigte sich histologisch kein eindeutiger Trend zu ausgeprägteren Verkalkungen nach Durchführung der Diät (Gruppe I und Gruppe II). Aus diesem Grund wurden für die Kopplungsanalysen die beiden Gruppen zusammengefasst (Tabelle 8).

Mausstämme	Gruppe I Normalfutter	Gruppe II Fettreiche-Diät	Tiere gesamt
C3H/HeJ	3 / 3 (100 %)	3 / 6 (50 %)	6 / 9 (67 %)
C57BL/6J	0 / 6* (0 %)	0 / 8* (0 %)	0 / 14 (0 %)
BXH2	4 / 5 (80 %)	3 / 4 (75 %)	7 / 9 (78 %)
BXH10	2 / 9 (22 %)	0 / 8 (0 %)	2 / 17 (12 %)
BXH12	1 / 7 (14 %)	3 / 9* (33 %)	4 / 16 (25 %)

Tabelle 6 *Resultate des Fütterungsversuchs der einzelnen Tierstämme. Angegeben ist die Anzahl der Herzen mit Verkalkungen im direkten Vergleich mit der Gesamtzahl der untersuchten Herzen. Bei den mit * gekennzeichneten Herzen ist jeweils ein Herz durch fehlerhafte Fixierung zerstört worden.*

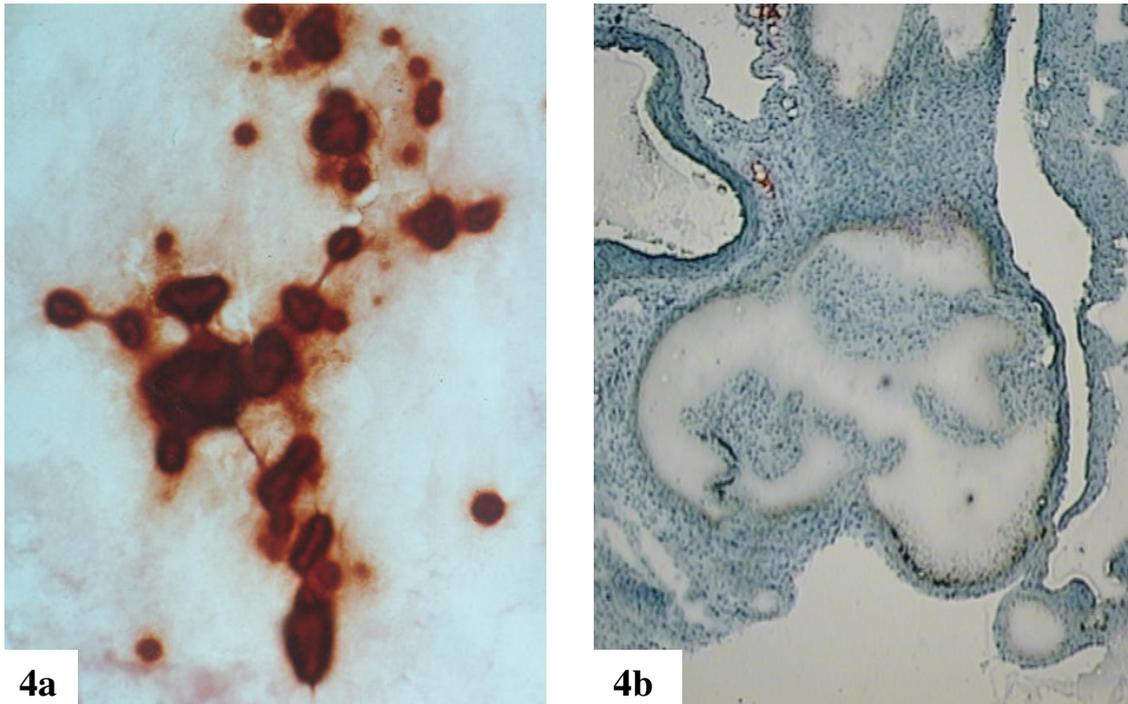


Abbildung 4a und 4b *In der Abbildung 4a sind nach Färbung mit Alizarinrot S deutliche Kalzifikationen (Rot dargestellt) im Myokard von für dystrophe Herzerkalkungen sensiblen Stamm C3H/HeJ zu sehen. Es sind zwischen den Verkalkungen Brücken aus Kalk zu erkennen. Aufgenommen bei 100facher Vergrößerung nach Induktion der Nekrose durch fettreiche Diät. Die Abbildung 4 b zeigt bei dem gleichen Tier die Aorta ascendens in Höhe der Herzklappen mit der Oil Red O Fettfärbung. Es sind keine Fetteinlagerungen in der Aortenwand zu verzeichnen. Vergrößerung 10fach.*

Mit Hilfe der Fettfärbung Oil Red O wurden die proximalen Anteile der Aorta und die Herzklappen auf das Vorhandensein von Verfettung hin untersucht (Gruppe I und Gruppe II wie in Tabelle 6). Es zeigten sich weder bei den Tieren, die das Kontrollfutter erhielten, noch bei den Mäusen mit einer fett- und cholesterinreiche Diät Verfettungen (Abbildung 4b).

Die Durchführung einer Hämatoxilin und Eosin (HE) Färbung erbrachte bei den oben beschriebenen Tieren ebenfalls keinen Nachweis großflächiger Narbenbildung. Wie in der Tabelle 6 beschrieben zeigten sich auch mit der HE-Färbung Verkalkungen in den Herzen.

ERGEBNISSE

Auf Grund der unter Diät nicht unseren Erwartungen entsprechenden Ausbildung der dystrophen Verkalkungen wurde das Tierversuchsvorhaben erweitert. Mit der kälteinduzierten Nekrose am Mausherzen wurden jeweils 6 Tiere der in früheren Publikationen als für dystrophe Herzverkalkung resistent bezeichneten Stämme BXH-7, -8, -9 und BXH-10 sowie die Inzuchtstämme C3H/HeJ und C57BL/6J untersucht. Es konnte 14 Tage nach Setzen der Läsion mit den Färbungen Alizarinrot S und Hämatoxilin / Eosin gezeigt werden, dass die 5 überlebenden Tiere des BXH-10 Stammes großflächige Verkalkungen im Nekrosegebiet hatten, jedoch keines der 4 BXH-9 und der 6 BXH-8 sowie der 5 BXH-7 Tiere Kalzifikationen aufwiesen. Erwartungsgemäß zeigten alle für dystrophe Verkalkungen prädisponierten C3H/HeJ Tiere Verkalkungen, während keines der resistenten C57BL/6J DCC aufwiesen.

Mausstämme	Gruppe III (Kälteinduzierte Nekrose)	
	Histologie	OCT
C3H/HeJ	6 / 6 (100 %)	6 / 6 (100 %)
C57BL/6J	0 / 6 (0 %)	0 / 6 (0 %)
BXH7	0 / 5* (0 %)	0 / 5* (0 %)
BXH8	0 / 6 (0 %)	0 / 6 (0 %)
BXH9	0 / 4* (0 %)	0 / 4* (0 %)
BXH10	5 / 5* (100 %)	5 / 5* (100 %)

Tabelle 7 *Ergebnisse des Versuchs der kälteinduzierten Nekrose am Mausherzen. Angegeben ist die Anzahl der Herzen mit Verkalkungen im direkten Vergleich mit der Gesamtzahl der untersuchten Herzen. Bei den mit * gekennzeichneten Gruppen sind Tiere aufgrund des durchgeführten operativen Eingriffes verschieden. Die Untersuchungen wurden histologisch mittels Alizarinrot S und Hämatoxilin / Eosin (HE) sowie unter Verwendung der optischen Kohärenztomographie durchgeführt (OCT).*

Um eventuelle Verwechslungen der BXH-Tiere auszuschließen, wurde von allen hier untersuchten Mäusen mit Hilfe der Primer aus der Tabelle 4 ein individueller genetischer Fingerabdruck erstellt. Es konnten keine Verwechslungen der Tiere nachgewiesen werden.

3.3. Molekulargenetische Untersuchungen

Um die Rekombination der elterlichen Allele in den BXH rekombinant ingezüchteten Stämmen bestimmen zu können, wurden stellvertretend die Allele gekoppelter polymorpher Mikrosatellitenmarker mit Hilfe der PCR-Technik amplifiziert. Durch den direkten Vergleich der Wanderungslänge der DNA Fragmente der Elterntiere mit den zwölf BXH Stämmen im ethidiumbromidgefärbten Agarosegel konnten die BXH-DNA-Fragmente entsprechend ihrer Abstammung zugeordnet werden (Tabelle 8).

Allein durch die Analyse der Rekombinationsorte auf Chromosom 7 konnte bei sowohl unter Diät (Prävalenzen für dystrophe Verkalkungen wurden aus der Arbeit von Ivandic et al. (1996) entnommen) als auch unter der kälteinduzierten Nekrose DCC-resistenten BXH-8 Tieren und den unter Diät DCC-prädisponierten RI-Stamm BXH-6 (Tabelle 8, grau unterlegt) Dyscalc auf einen 10 cM großen Abschnitt eingegrenzt werden. Dieser Abschnitt wird proximal durch den Mikrosatellitenmarker D7Mit224 (15,0 cM) und distal durch D7Mit82 (25,0 cM) begrenzt. In diesem Bereich sind bei dem BXH-7 Stamm für dystrophe Herzverkalkungen prädisponierende (HH) aber auch resistente (BB) Bereiche zu finden (Tabelle 8, gelb unterlegt). Unter der Berücksichtigung, dass keins der 5 untersuchten Tieren des BXH-7 Stammes Verkalkungen zeigten, verringert sich das für dystrophe Verkalkungen in Frage kommende Intervall auf 9 cM. Proximal durch den Mikrosatellitenmarker D7Mit25 (16,0 cM) und distal durch D7Mit82 (25,0 cM) begrenzt (Tabelle 8, Intervall Rot gekennzeichnet). Dieses Ergebnis wurde durch eine genomweite Koppelungsanalyse bestätigt (s. nächstes Kapitel). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden auszugsweise von Ivandic et al. 2001 veröffentlicht.

ERGEBNISSE

Primer	cM	BXH rekombinant ingezüchtete Stämme											
		2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	14	19
D7Mit56	2,5	BB	HH	HH	BB	BB	BB	BB	BB	HH	HH	BB	BB
D7Mit76	3,4	BB	HH	HH	BB	BB	BB	BB	BB	HH	HH	BB	BB
D7Mit154	4,0	BB	HH	HH	BB	BB	BB	BB	BB	HH	HH	BB	BB
D7Mit294	8,0	HH	HH	HH	BB	BB	BB	BB	BB	HH	HH	BB	BB
D7Mit266	10,0	HH	HH	HH	BB	BB	BB	BB	BB	HH	HH	BB	BB
D7Mit224	15,0	HH	HH	HH	BB	BB	BB	BB	HH	HH	HH	HH	HH
D7Mit247	16,0	HH	HH	HH	HH	HH	BB	BB	HH	HH	HH	HH	HH
D7Mit309	16,0	HH	HH	HH	HH	HH	BB	BB	HH	HH	HH	HH	HH
D7Mit227	16,0	HH	HH	HH	HH	HH	BB	BB	HH	HH	HH	HH	HH
D7Mit25	16,0	HH	HH	HH	HH	HH	BB	BB	HH	HH	HH	HH	HH
D7Mit310	18,0	HH	HH	HH	HH	BB	BB	BB	HH	HH	HH	HH	HH
D7Mit270	18,0	HH	HH	HH	HH	BB	BB	BB	HH	HH	HH	HH	HH
D7Mit228	18,0	HH	HH	HH	HH	BB	BB	BB	HH	HH	HH	HH	HH
D7Mit158	23,0	HH	HH	HH	HH	BB	BB	BB	HH	HH	HH	HH	HH
D7Mit229	23,0	HH	HH	HH	HH	BB	BB	BB	HH	HH	HH	HH	HH
D7Mit82	25,0	HH	HH	HH	HH	BB	HH	BB	HH	HH	HH	HH	HH
D7Mit31	44,0	HH	HH	HH	HH	BB	HH	HH	HH	HH	HH	BB	HH
D7Mit40	53,0	BB	BB	HH	HH	BB	HH	BB	HH	HH	BB	HH	BB
D7Mit332	65,7	BB	BB	BB	HH	BB	HH	BB	HH	HH	HH	BB	BB
DCC		78	50*	75*	25*	0*	0*	0*	12	100*	25	29*	14*
kälteind. Nekrose %						0	0	0	100				

Tabelle 8 Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 7 und dazugehörige Genotypen der BXH-RI-Stämme, von proximal nach distal aufgelistet. B und H bezeichnen die Allele, die am jeweiligen Mikrosatellitenmarkerlocus bestimmt wurden und beziehen sich auf die Allele der Elternstämme C57BL/6J (B, resistent gegen DCC) und C3H/HeJ (H, prädisponiert für DCC). Die mit * gekennzeichnete DCC Prävalenzen wurden aus der Arbeit von Ivandic et al. (1996) entnommen. (kälteind. Nekrose = Kälteinduzierte Nekrose nach Brunnert und Altman (1990)). CentiMorgan = cM.

3.4. Genomweite Koppelungsanalysen

Mit Hilfe der Ergebnisse aus den molekulargenetischen Untersuchungen und weiteren 657 bereits genau untersuchten Mikrosatellitenmarker, die aus Mouse Genome Informatics, The Jackson Laboratory (<http://www.informatics.jax.org> [Letzter Zugriff 06/2001]) und aus The Informatics Center for Mouse Neurogenetics (<http://www.nervenet.org> [Letzter Zugriff 06/2001]) entnommen wurden, konnte kumulativ eine genomumfassende „Karte“ der Rekombinationen der BXH-Tiere erstellt werden. Durch Kopplung von Markerallelen mit dem Phänotyp der Tiere (Tabelle 8) wurde in einem Wahrscheinlichkeitsmodell unter Zuhilfenahme des MAPMAKER Programms der *Dyscalc*-Genlocus näher eingegrenzt. Der *Dyscalc1*-Locus wurde mit einem signifikanten LOD-Score von maximal 5,7 gekoppelt. Die Signifikanzschwelle für $p=0,05$ wurde bei einem LOD-Score von 4,1 für diese Koppelungsanalyse bestimmt. Es wurde kein weiterer signifikanter LOD-Score im Mausgenom gefunden.

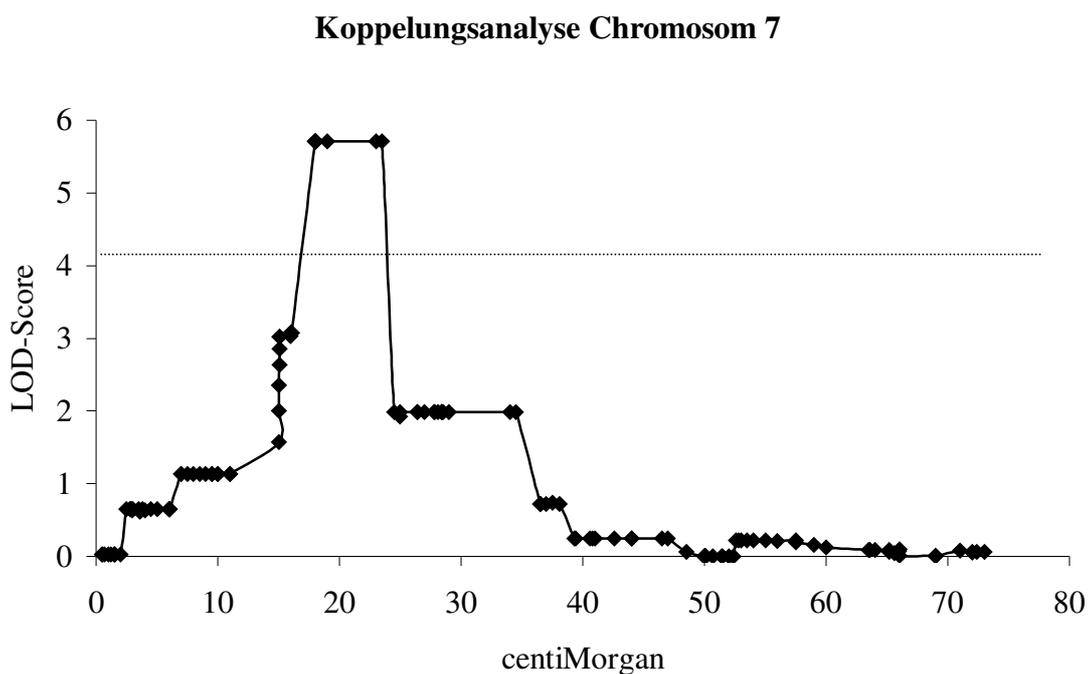
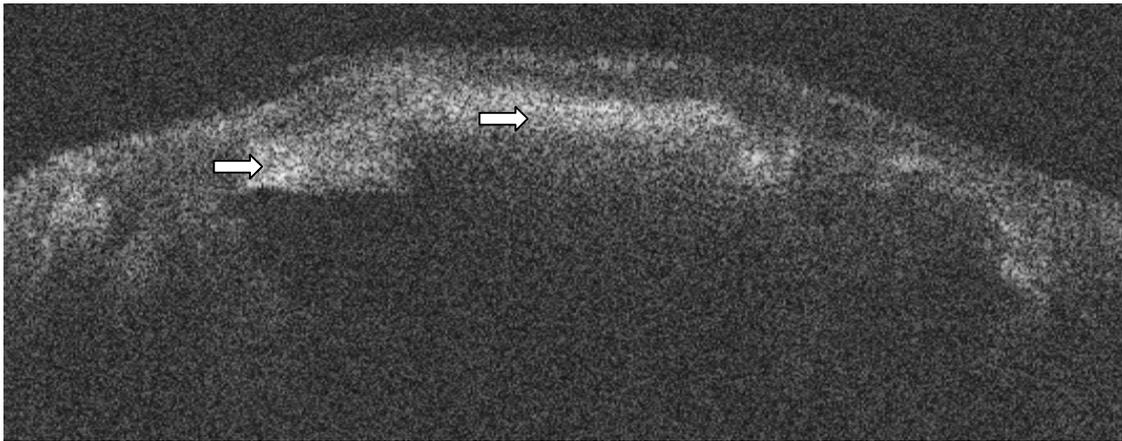


Abbildung 5 *Kopplungsanalyse des *Dyscalc*-Locus auf Chromosom 7. Signifikanter LOD-Score mit 5,7 Likelihood of Odds als log-Einheit (LOD), die unterbrochene Linie markiert die Signifikanzschwelle von 4,1 LOD ($p<0,05$). Es wurden 136 Marker auf diesem Chromosom untersucht (Gekennzeichnet durch Rauten).*

3.5. Auswertung der optischen Kohärenztomographie

Basierend auf den Erfahrungen bei der Diagnostik morphologischer Veränderung der Haut wurde in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. med. J. Welzel aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie die Darstellungsmöglichkeiten der Kalziumablagerungen am Herzen im Vergleich zu dem histologischen Befund untersucht.

a



b

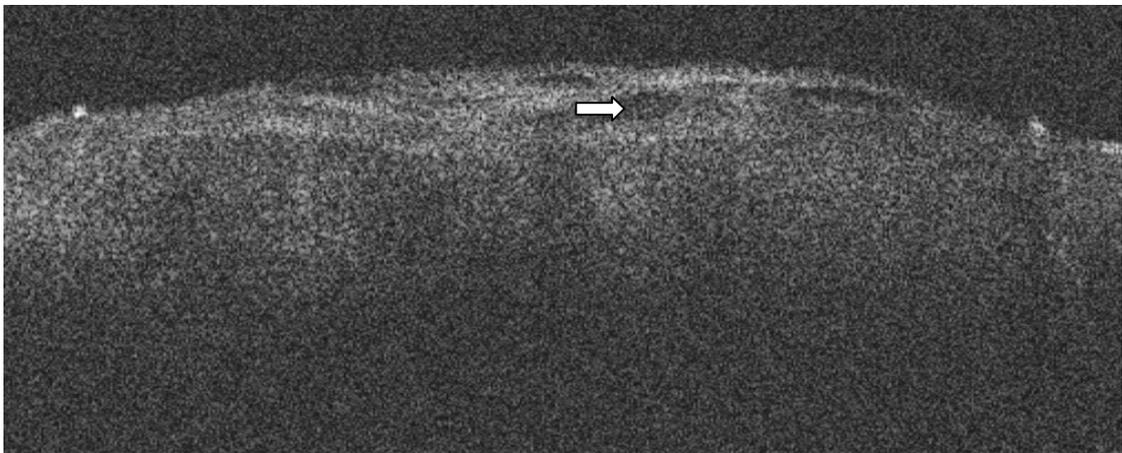


Abbildung 6a und b Dargestellt sind zwei optische Kohärenztomographie Abbildungen von Herzen der Stämme BXH10 (Abbildung 6a) und BXH7 (Abbildung 6b). Die Wellenlänge beträgt 1300 nm bei einer Kohärenzlänge von 15 μm und einer Bildgröße von 6 mm x 1,6 mm. In der Abbildung 6a sind dystrophe Herzverkalkung (Pfeile) mit deutlicher Signalauslöschung hinter der Läsion zu sehen. Abbildung 6b zeigt Einblutungen (Pfeil) im Bereich der kälteinduzierten Nekrose, jedoch keine Verkalkungen.

Es wurde bei je 6 Mäuse der DCC-resistenten Stämme BXH-7, -8, -9 und BXH-10 sowie der Inzuchtstämme C3H/HeJ und C57BL/6J eine Nekrose nach der von Brunnert und Altman (1990) beschriebenen Methode gesetzt. Nach 14 Tagen wurde der Versuch beendet und die Herzen der Tiere mit der optische Kohärenztomographie (OCT) sowie der Durchlichtmikroskopie auf Verkalkungen hin untersucht.

Es konnte eine Übereinstimmung zwischen den im OCT dargestellten reflektionsreichen Gebieten mit dahinterliegender Signalauslöschung und den mit Alizarinrot S angefärbten Verkalkungen dargestellt werden (Tabelle 7). Somit konnte gezeigt werden, dass sich die optische Kohärenztomographie (OCT) als schnelles und zuverlässiges Screening-Verfahren zur Darstellung von Verkalkungen im Gewebe eignet.

3.6. Knochenmarkstransplantation

Nach Durchführung der Knochenmarkstransplantation entstanden Organismen mit Erbinformationen zweier verschiedener Individuen. Diese werden als Chimäre bezeichnet.

Um den Erfolg der Knochenmarkstransplantation zu überprüfen, wurde die genetische Zusammensetzung des Blutes mit zu Hilfenahme der Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung der Primer D7Mit56, D7Mit247 und D7Mit229 (Tabelle 4) geprüft sowie bei ausgewählten Schnitten eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) durchgeführt.

Auszugsweise zeigt das Abbildung 7 die Chimärenanalyse kongener- sowie C57BL/6J-Mäuse nach Transplantation von C57BL/6J- beziehungsweise kongenem Knochenmark. Deutlich sind bei den entstanden Chimären zwei Banden zu sehen, wobei die ausgeprägtere Bande genetisch dem transplantierten Knochenmark zugeordnet werden kann. Als Kontrolle ist die einzelne Bande der kongenen Mäuse sowie des Mausstammes C57BL/6J dargestellt. In einem zweiten Schritt wurde die Stärke der entstandenen Banden der einzelnen Tiere verglichen. Es zeigte sich, dass bei allen untersuchten Tieren durchschnittlich mehr als 80 % der genetischen Signatur dem transplantiertem Knochenmark entstammt (Tabelle 9).

ERGEBNISSE

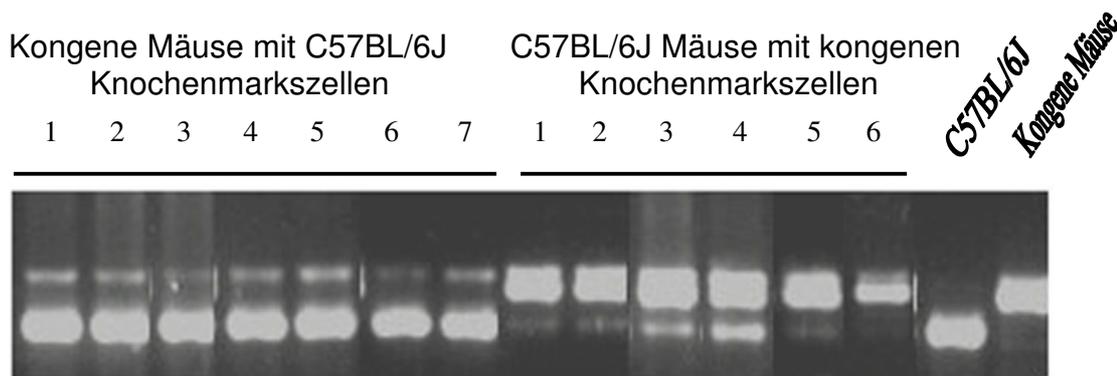


Abbildung 7: Chimärenanalyse kongener- sowie C57BL/6J-Mäuse (auszugsweise) zwölf Wochen nach Knochenmarktransplantation im Vergleich zu reinrassigen C57BL/6J und kongenen Tieren. Darstellung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Anwendung des Markers D7Mit229. Die Gewinnung der DNA erfolgte aus dem Blut.

C: ♂ C57BL/6 Knochenmark → ♀ Kongene Mäuse								A*	B*
Primer	1	2	3	4	5	6	7	1	1
D7Mit567	81,2 %	77,3 %	80,0 %	81,5 %	91,9 %	78,9 %	77,4 %	100 %	97,5 %
D7Mit247	87,8 %	84,6 %	88,8 %	87,6 %	94,7 %	86,2 %	83,4 %	100 %	100 %
D7Mit229	84,7 %	79,8 %	85,7 %	86,4 %	95,3 %	85,2 %	80,2 %	100 %	96,5 %
DCC	--	+	+	--	+	--	+	+	--

A*: ♂ Kongenes Knochenmark → ♀ Kongene Mäuse

B*: ♂ C57BL/6 Knochenmark → ♀ C57BL/6 Mäuse

D: ♂ Kongenes Knochenmark → ♀ C57BL/6 Mäuse								
Primer	1	2	3	4	5	6	7	8
D7Mit567	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	*	*
D7Mit247	93,9 %	94,4 %	94,6 %	93,4 %	94,8 %	100 %	87,6 %	92,3 %
D7Mit229	90,1 %	93,5 %	95,4 %	92,9 %	93,2 %	97,9 %	88,4 %	94,5 %
DCC	--	--	--	--	--	--	--	--

Tabelle 9: Ergebnisse der Chimärenanalyse zwölf Wochen nach Knochenmarktransplantation. Es wurden die Marker D7Mit567, D7Mit247 und D7Mit229 angewendet. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der umgewandelten Blutzellen sowie die histologischen Resultate bezüglich der dystrophen Herzverkalkungen. * = Daten nicht vorhanden aufgrund fehlerhafter PCR-Untersuchung.

ERGEBNISSE

Abbildung 8 zeigt einen Ausschnitt einer durch Kryopexie erzeugten Myokardnekrose bei einer kongenen weiblichen Maus nach Knochenmarktransplantation. Deutlich sind Zellkerne (blau) mit Nachweis von Y-Chromosomen (grün) zu sehen, wie es bei männlichen Individuen zu erwarten wäre. Die Zellen wurden im Bereich der durch Kryopexie erzeugten Myokardnekrosen bei allen transplantierten Mäusen nachgewiesen. Diese männlichen Zellen müssen somit aus dem Knochenmark über das Blut in die Nekrose eingewandert sein.

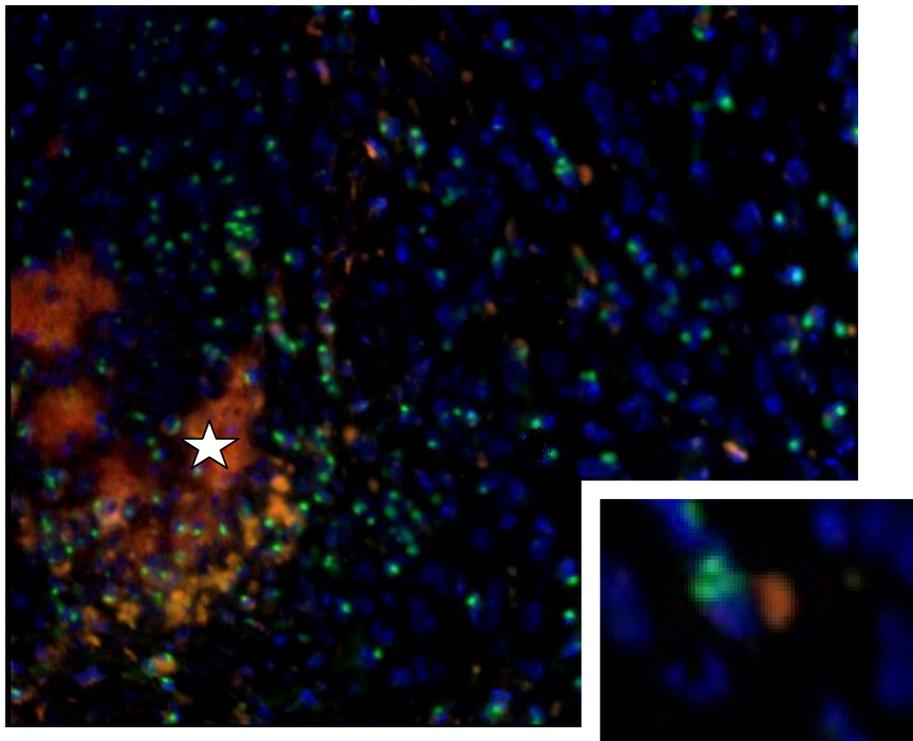


Abbildung 8: *Ausschnitt einer durch Kryopexie erzeugten Myokardnekrose im Bereich des linken Ventrikels bei einer weiblichen kongenen Maus nach Knochenmarktransplantation. FISH-Färbung: Y-Chromosom (grün) sowie X-Chromosom (rot) mit einer fluoreszenzmarkierten Sonde dargestellt. Deutliche Ansammlung der transplantierten männlichen Zellen um die Verkalkung (Stern). Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blau) gegengefärbt. Vergrößerung 400fach. Rechts in der unteren Ecke Darstellung einer Ausschnittsvergrößerung mit Darstellung eines männlichen Genotypen (XY).*

ERGEBNISSE

Zwei Wochen nach Durchführung einer Myokard-Kryopexie wurden die Tiere der einzelnen Gruppen histologisch auf Verkalkungen hin untersucht (Tabelle 10). Erwartungsgemäß zeigten alle kongenen Mäuse, welche kongenes Knochenmark transplantiert bekommen haben (Positivkontrolle), deutliche dystrophe Verkalkungen des Myokards (Gruppe D), während die C57BL/6 Mäuse mit transplantiertem C57BL/6 Knochenmark (Negativkontrolle) keine Verkalkungen aufwiesen (Gruppe C).

Bei den C57BL/6 Mäusen mit kongenem Knochenmark konnte bei den 8 überlebenden Tieren keine Verkalkung festgestellt werden (Gruppe A). Bei den kongenen Mäusen mit transplantiertem C57BL/6 Knochenmark verkalkten 4 von 7 Tieren, die den operativen Eingriff überstanden (Gruppe B).

	Gruppen	DCC	DCC/Tieranzahl
A	♂ Kongenes Knochenmark → ♀ C57BL/6 Mäuse	-	0 / 8* (0 %)
B	♂ C57BL/6 Knochenmark → ♀ Kongene Mäuse	+	4 / 7* (57 %)
C	♂ C57BL/6 Knochenmark → ♀ C57BL/6 Mäuse	-	0 / 10 (0 %)
D	♂ Kongenes Knochenmark → ♀ Kongene Mäuse	+	10 / 10 (100 %)

Tabelle 10: Zusammenstellung der Ergebnisse nach Durchführung der Knochenmarktransplantation. Dargestellt sind in den einzelnen Gruppen die Anzahl der Herzen mit Verkalkungen im direkten Vergleich mit der Gesamtzahl der untersuchten Herzen. Bei den mit * gekennzeichneten Gruppen sind Tiere aufgrund des durchgeführten operativen Eingriffes verschieden. Gruppe C zeigt im Vergleich zu Gruppe einen signifikanten Unterschied von Ausprägung der entstandenen Verkalkungen ($p=0,02$).

4. DISKUSSION

Kardiovaskuläre Kalziumablagerungen sind in der Gefäßwand, den Herzklappen und im Myokard als Folge entzündlich-degenerativer Prozesse zu finden. In der Regel sind diese Verkalkungen mit Zellnekrosen assoziiert und von Serumkalzium- und Phosphatspiegeln unabhängig. Diese dystrophen Verkalkungen müssen daher von extraossären, metastatischen Verkalkungen bei Störungen des Calcitonin- und Parathormonstoffwechsels unterschieden werden (Seifert, 1997). Kalziumablagerungen sind seit langem bei Mausinzuchtstämmen wie BALB/c, DBA/2, und C3H/He bekannt (DiPaolo et al., 1964; Eaton et al., 1978). Myokardnekrosen, die unter anderem durch eine fettreiche Diät (Eaton et al., 1978) oder durch Kryopexie (Brunnert und Altman, 1990; Brunnert, 1997) verursacht sein können, weisen bei diesen prädisponierten Mäusen dystrophe Verkalkungen auf. Die Pathogenese der oben beschriebenen „response-to-injury“-Reaktion ist noch nicht vollständig aufgeklärt und sollte in dieser Arbeit näher untersucht werden.

4.1. Untersuchungen von BXH-RI Mausstämmen

Basierend auf den Experimenten von Ivandic und Mitarbeitern (1996) sollen die Untersuchungen der BXH-Stämme vervollständigt und diskrepante Befunde aufgeklärt werden.

In dieser Arbeit wurden unter vergleichbaren Bedingungen wie bei der Publikation von Ivandic und Mitarbeitern (1996) die noch nicht im Zusammenhang mit dystrophen Verkalkungen beschriebenen Stämme BXH-2 und BXH-12 sowie der BXH Stamm 10 untersucht. Diese BXH-Stämme setzen sich genetisch aus den für dystrophe Verkalkung prädisponierten C3H/HeJ- und resistenten C57BL/6J Mäusen zusammen.

Die BXH-2 Tiere zeigten unter Diät zu 78% (7/9) und die BXH-12 Mäuse zu 25% (4/16) myokardiale Verkalkungen. Die BXH-10 Tiere wiesen in der Publikation von Ivandic und Mitarbeitern (1996) trotz eines prädisponierenden C3H/HeJ-Genotyp bei keinem der untersuchten Tiere dystrophe Herzverkalkungen auf. Im Gegensatz hierzu zeigten in dieser Arbeit 12% (2/17) der BXH-10 Tiere myokardiale Verkalkungen.

Als Negativkontrolle wurden C57BL/6J untersucht, die wie erwartet keine Kalzifikationen aufwiesen. Diskrepanz zu den oben beschriebenen Voruntersuchungen von Ivandic und Mitarbeitern (1996) bei denen 100% der prädisponierenden C3H/HeJ dystrophe

DISKUSSION

Herzverkalkungen zeigten, wurde bei den hier untersuchten Tieren (Positivkontrolle) nur bei 67% (6/9) der Mäuse dystrophe Verkalkungen vorgefunden. An diesem Beispiel kann die Theorie von Crabbe und Mitarbeitern (1999) bestätigt werden, nach der das Verhalten von Testmäusen nicht allein durch die Gene, sondern auch durch äußere Umgebungsbedingungen beeinflusst wird, wobei die Ursache der diskrepanten Ergebnisse nicht verifiziert werden konnte.

Da bei den oben beschriebenen Mäusen eventuell vorhandene Genotypisierungsfehler durch Wiederholung der Versuche ausgeschlossen wurden, musste aufgrund der nicht zu 100% auftretenden Verkalkungen unter der ausgewählten Diät die Existenz starker, penetranzmindernder Loci angenommen werden. Um diese Loci zu umgehen, wurde ein von der Diät unabhängiger Ansatz zur Erzeugung von Myokardnekrosen gewählt. Nach einer von der Arbeitsgruppe um Brunnert eingeführten Methode (Brunnert und Altman, 1990) wurde über einen abdominalen Zugang eine transdiaphragmale Kryopexie des Herzens durchgeführt. Es konnte eine ausgedehnte, umschriebene Nekrose am apikalen Anteil des Herzens erzeugt werden. 14 Tage nach Kryopexie zeigten 5/5 (100%) der untersuchten BXH 10-Stämme eine Myokardverkalkung, wodurch der prädisponierende Genotyp des *Dyscalc1* in diesem Stamm erstmals auch phänotypisch bestätigt werden konnte. Die unter fettreicher Diät resistenten Stämme BXH-7, -8 und -9 zeigten nach der kälteinduzierten Nekrose keine Verkalkungen des Myokards. Unter Einbeziehung der Daten von Ivandic und Mitarbeitern von 1996 konnte mit dieser Untersuchung erstmals der Phänotyp aller 12 kommerziell erhältlichen BXH-Stämme bezüglich myokardialer Verkalkungen bestimmt werden.

Um die dystrophen Verkalkungen von extraossären, metastatischen Verkalkungen bei Störungen des Calcitonin- und Parathormonstoffwechsels (Seifert, 1997) zu unterscheiden, wurde bei den oben beschriebenen Mäusen Blut abgenommen. Hier konnte gezeigt werden, dass wie erwartet dystrophe Herzverkalkungen von Serumkalzium- und Phosphatspiegeln unabhängig sind.

4.2. Genetische Untersuchungen zur Disposition von dystrophen Herzverkalkungen

Genetische Einflüsse bestimmen in einem hohen Maße die Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung und die Entstehung eines Myokardinfarktes (Schunkert et al., 2008). Bereits in den ersten Publikationen zu dystrophen Herzverkalkungen wurde eine genetische Ursache dieser Erkrankung bei verschiedenen Mausstämmen bestätigt (Brownstein 1983 und Ivandic et al., 1996). Ausgehend von genomweiten Kopplungsanalysen mit polymorphen Mikrosatellitenmarkern (Ivandic et al., 1996) konnte der für die dystrophen Verkalkungen hauptverantwortliche Genlocus (*Dyscalc1*) auf dem Chromosom 7 in der Nähe des Markers D7Mit229 identifiziert werden.

Das Ziel dieses Abschnitts der Arbeit ist die exakte Eingrenzung des *Dyscalc1* Genlocus. Anhand der durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen und Daten weiterer 657 bereits genau untersuchter Mikrosatellitenmarker konnte erstmals kumulativ für die 12 kommerziell erhältlichen BXH-Stämme eine genomumfassende „Karte“ der Rekombinationen der BXH-Tiere erstellt werden. Durch Kopplung von Markerallelen mit dem Phänotyp der Tiere (Tabelle 8 und Abbildung 5) wurde in einem Wahrscheinlichkeitsmodell der *Dyscalc1*-Genlocus auf einen 9 cM großen Abschnitt eingegrenzt. Im Vergleich hierzu beschrieben Brunnert und Mitarbeitern 1999 eine Eingrenzung des *Dyscalc1*-Genlocus auf einen 19 cM großen Abschnitt. Somit gelang nahezu eine Halbierung der für den *Dyscalc1*-Genlocus in Frage kommender Gene.

Basierend auf den beschriebenen Daten dieser Arbeit konnte durch weiterführende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe der für dystrophe Verkalkungen verantwortliche „Genort“ auf 80 Kb (Kilo-Basenpaare) eingegrenzt werden (Aherrahrou et al., 2007). Im gleichen Jahr wurde das für dystrophe Herzverkalkungen hauptverantwortliche Gen identifiziert (Meng et. al., 2007). Bei *Dyscalc1* handelt es sich um das als *Abcc6* beschriebene Gen. Dieses Gen gehört zu einer Untergruppe von Genen, welche für den Energiehaushalt der Zelle verantwortlich sind. Die genaue Funktion ist aktuell noch nicht geklärt und steht im Focus der Forschung. Erst kürzlich ist es gelungen eine Splice-Variante des *Abcc6* zu identifizieren (Aherrahrou et al., 2008). Beim Menschen scheint das *Abcc6* Gen bei der Pseudoxanthoma elasticum Erkrankung (Grönblad-Strandberg-Syndrom) eine wichtige Rolle zu spielen (Garcia-Fernandez et al., 2008).

Mit dem hier gewählten Ansatz konnten im Gegensatz zur Publikation von Ivandic und Mitarbeiter (2001) keine weiteren Genloci bezüglich dystropher Herzverkalkungen im Mausgenom nachgewiesen werden. Die Anzahl von nur 12 verfügbaren BXH-Stämmen macht das Auffinden weiterer sich an der Grenze zur Signifikanz befindende Genloci unwahrscheinlich.

4.3. Knochenmarktransplantation

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten bereits wenige Stunden nach Setzen einer Nekrose in den untersuchten Mausstämmen eine Mitochondrienschwellung mit Auflösung der Cristae und Veränderung der Matrixdichte. Zusätzlich konnte eine Desorganisation der kontraktilen Myofilamente nachgewiesen werden. Nach 24 Stunden fielen in den Mitochondrien multiple elektronendichte Einschlüsse auf (Brunnert, 1997 und Korff et al., 2005). Diese mineralisierten Einschlüsse dehnten sich in für dystrophe Herzverkalkungen prädisponierten C3H/HeJ Mäusen auf das ganze Mitochondrium und nach 48 Stunden auf das umgebene nekrotische Sarkoplasma aus. Bei dem für dystrophe Verkalkungen resistenten Mausstamm C57BL/6J waren die anfänglich nachweisbaren multiplen elektronendichten Einschlüsse jedoch nach 48 Stunden nicht mehr nachweisbar. Der den dystrophen Verkalkungen zugrunde liegende Gendefekt kann jedoch aufgrund der vorliegenden Vererbung nicht in den nur von den Muttertieren weitergegebenen mitochondrialen Genen lokalisiert sein. Wie zuerst von Eaton und Mitarbeiter (1978) gezeigt, handelt es sich bei den dystrophen Verkalkungen um einen autosomal rezessiven Erbgang. Somit ist ein primärer Defekt der Mitochondrien unwahrscheinlich.

Ob der den dystrophen Herzverkalkungen zugrunde liegende Gendefekt ein Defekt der ortständigen Zellpopulation ist oder einen Phagozytosedefekt in den infiltrierenden mononukleären Zellen verursacht, sollte mit der Knochenmarktransplantation geklärt werden.

Der Erfolg der Knochenmarktransplantation wurde anhand der genetischen Zusammensetzung des Blutes mit Zuhilfenahme der Polymerase Kettenreaktion sowie bei ausgewählten Schnitten durch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass über 80 % der Blutzellen nach der Transplantation aus dem transplantierten Knochenmark stammen und diese Blutzellen auch in die durch

DISKUSSION

transdiaphragmale Kryopexie verursachte Narbe einwandern. Der ursprüngliche genetische „Fingerabdruck“ konnte jedoch nicht vollständig unterdrückt werden. Somit ist davon auszugehen, dass nach der Bestrahlung noch Zellen überlebt haben bzw. sich aus dem noch vorhandenen Knochenmark neu gebildet haben ohne jedoch über die Funktionalität dieser Zellen eine Aussage treffen zu können.

Bei allen kongenen Tieren, welche das für dystrophe Herzverkalkungen prädisponierende Gen auf dem Chromosom 7 tragen, zeigten sich unabhängig von der Knochenmarkstransplantation Verkalkungen im Nekrosegebiet nach transdiaphragmaler Kryopexie. Demgegenüber zeigten die resistenten C57BL/6 Mäuse, ebenfalls unabhängig von der Transplantation, keinerlei Verkalkungen. Somit konnte gezeigt werden, dass der den dystrophen Herzverkalkungen zugrunde liegende Gendefekt nicht ein Defekt der infiltrierenden Zellen, sondern der ortständigen Zellpopulation ist. Dieses Ergebnis deckt sich mit den 2007 von Meng und Mitarbeitern publizierten Daten, wonach es sich bei *Dyscalc1* um das als *Abcc6* beschriebene Gen handelt. Dieses Gen gehört zu einer Untergruppe von Genen, welche für den Energiehaushalt der Zelle verantwortlich sind. Dieser Defekt könnte, wie von Wrogemann und Pena (1976) postuliert, nach Induktion einer Nekrose/Apoptose zu einem verstärkten Kalziumeinstrom in die Zelle führen, der die extrazellulär gerichtete Pumpleistung plasmamembranständiger Kalzium-ATPasen übersteigt. Erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentrationen sind mit der normalen Zellfunktion nicht vereinbar. Kompensatorisch versuchen die Mitochondrien die physiologische Kalziumkonzentration über membranständige Kalziumpumpen aufrecht zu erhalten. Die deutliche Zunahme der intramitochondrialen Kalziumkonzentration könnte dann der Auslöser für dystrophe Herzverkalkungen sein.

Auffällig war, dass bei den kongenen Mäusen, welche das bezüglich dystropher Herzverkalkungen resistente C57BL/6 Knochenmark erhielten sich eine signifikante Reduktion der Verkalkungen zeigte. Dieses weist auf die Existenz weiterer Genloci hin, die Penetranz und Expression der Herzverkalkungen beeinflussten (Ivandic et al., 2001).

4.4. Die optische Kohärenztomographie (OCT)

In den letzten Jahren rückte ein neues bildgebendes Verfahren zunehmend in den Mittelpunkt des Interesses, die optische Kohärenztomographie (OCT). OCT wurde zunächst für die Diagnostik am Auge und an der Haut entwickelt, jedoch werden zunehmend mehr Organe mit dieser Methode untersucht. Der Vorteil der OCT ist, dass diese bei einer Eindringtiefe ins Gewebe von etwa 3-4 mm ein Auflösungsvermögen zwischen 5 μm und 20 μm zeigt. Dies wäre bis um den Faktor 20 höher als bei Untersuchungen mit dem hochfrequentem Ultraschall, der Magnetresonanztomographie (MRT) oder der Computertomographie (CT).

Neuste Untersuchungen mit der intravaskulären optischen Kohärenztomografie (Meissner et al., 2006) zeigten einen deutlichen Vorteil der OCT gegenüber dem intravaskulären Ultraschall (IVUS), welcher als derzeitiger Referenzstandard in vivo dient und lediglich eine räumliche Auflösung von maximal von 100 μm hat.

Die optische Kohärenztomographie wurde in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. med. J. Welzel aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie durchgeführt. 14 Tage nach Setzen der von Brunnert und Altman (1990) beschriebenen Methode der kälteinduzierten Nekrose wurden die Herzen der in Voruntersuchungen als DCC-resistent beschriebenen Stämme BXH-7, -8, -9 und BXH-10 sowie die Inzuchtstämme C3H/HeJ und C57BL/6J untersucht. Die Ergebnisse der OCT-Untersuchung wurden mit den in der Durchlichtmikroskopie zur Darstellung kommenden Verkalkungen verglichen.

Es konnte eine Übereinstimmung zwischen den im OCT dargestellten reflektionsreichen Gebieten mit dahinterliegender Signalauslöschung und den mit Alizarinrot S angefärbten Verkalkungen gezeigt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass sich die optische Kohärenztomographie (OCT) als schnelles und sicheres Screening-Verfahren zur Darstellung von Verkalkungen im Gewebe eignet. Es bietet eine sehr hohe Ortsauflösung mit dem Nachteil einer komplette Signalauslöschung hinter einer licht-/schalldichten Struktur wie einer Verkalkung. Aufgrund dieser Tatsache kann die genaue Größenausdehnung einer Verkalkung nicht bestimmt werden. Ein weiterer Nachteil ist die geringe Eindringtiefe, welche die Notwendigkeit mit sich bringt das Untersuchungsgerät in unmittelbare Nähe zum zu untersuchenden Gewebe zu bringen.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Die Zielsetzung dieser Arbeit lässt sich in zwei Hauptteile gliedern. Während im ersten Teil die molekulargenetischen Untersuchungen mit dem Ziel der genaueren Eingrenzung des für dystrophe Herzverkalkungen hauptverantwortlichen *Dyscalc1*-Locus im Vordergrund stehen, befasst sich der zweite Teil mit der Pathogenese der dystrophen Verkalkungen.

Es wurden hochauflösende Genotypisierungen von BXH-Stämmen, welche sich aus den für dystrophe Verkalkungen resistenten Inzuchtstämmen C57BL/6J sowie prädisponierten C3H/HeJ genetisch ableiten, nach Induktion der Verkalkungen durch fett- und cholesterinreichen Diät sowie transdiaphragmaler Kryopexie durchgeführt. Das für dystrophe Verkalkungen in Frage kommende Gen-Intervall konnte auf 9 cM eingegrenzt werden. Innerhalb dieses Intervalls wurde 2007 von Meng et. al. das für dystrophe Herzverkalkungen verantwortlich zeichnende Gen identifiziert. Bei *Dyscalc1* handelt es sich um das als *Abcc6* beschriebene Gen. Dieses Gen gehört zu einer Untergruppe von Genen, welche für den Energiehaushalt der Zelle verantwortlich sind. Die genaue Funktion ist aktuell noch nicht geklärt und steht im Focus der aktuellen Forschung.

Der zweite Teil befasst sich mit der Klärung, ob sich die für dystrophe Herzverkalkungen hauptverantwortlichen Zellpopulationen aus den nach Nekrosebildung eingewanderten inflammatorischen Zellen rekrutieren oder es sich um die ortständige Zellenpopulationen handelt. Hierzu wurde mit Zuhilfenahme eines durch unsere Arbeitsgruppe eigens gezüchteten kongenen Mausstammes eine Knochenmarktransplantation durchgeführt. Dieser kongene Mausstamm unterscheidet sich von resistenten, reinrassigen C57BL/6J-Mäusen nur durch einen kleinen Abschnitt auf dem proximalen Chromosom 7, der den gesuchten *Dyscalc1*-Genlocus mit den prädisponierenden Allelen des C3H/He-Stammes enthält. Es konnte gezeigt werden, dass sich die dystrophe Herzverkalkung unabhängig von den einwandernden Zellen entwickelt, jedoch die Ausprägung der Herzverkalkung durch die Knochenmarktransplantation moduliert wird. Dieses weist auf die Existenz weiterer Genloci hin, die Penetranz und Expression der Herzverkalkungen beeinflussen.

Ergänzend zu den histologischen Untersuchungen wurde die optische Kohärenztomographie als neue Methode zur Beurteilung von Herzverkalkungen geprüft. Es konnte gezeigt werden, dass sich diese Methode zur qualitativen Beurteilung der Verkalkungen eignet, jedoch aufgrund der kompletten Signalauslöschung hinter einer lichtdichten Struktur wie Kalk eine quantitative Größenbestimmung nicht möglich ist.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Aherrahrou Z, Doehring LC, Kaczmarek PM, Liptau H, Ehlers EM, Pomarino A, Wrobel S, Götz A, Mayer B, Erdmann J, Schunkert H: Ultrafine mapping of Dyscalc1 to an 80-kb chromosomal segment on chromosome 7 in mice susceptible for dystrophic calcification. *Physiol Genomics* 17: 203-212 (2007)
- Aherrahrou Z, Doehring LC, Ehlers EM, Liptau H, Depping R, Linsel-Nitschke P, Kaczmarek PM, Erdmann J, Schunkert H: An alternative splice variant in Abcc6, the gene causing dystrophic calcification, leads to protein deficiency in C3H/He mice: *J Biol Chem* 21: 7608-7615 (2008)
- Alwine JC, Kemp DJ, Parker BA, Reiser J, Renart J, Starh GR, Wahl GM: Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzyloxymethyl paper. *Methods in Enzymology* 68: 220-242 (1979)
- Ball CR, Williams WL: Spontaneous and dietary-induced cardiovascular lesions in DBA mice. *Anatomical Record* 152: 199-210 (1965)
- Brownstein DG: Genetics of dystrophic epicardial mineralization in DBA/2 mice. *Lab Anim Sci* 33: 247-248 (1983)
- Brunnert SR: Morphologic response of myocardium to freeze-thaw injury in mouse strains with dystrophic cardiac calcification. *Lab Anim Sci* 47: 11-18 (1997)
- Brunnert SR, Altman NH: Dystrophic cardiac calcinosis in mice: abnormal myocardial response to freeze-thaw injury. *Lab Anim Sci* 40: 616-619 (1990)
- Brunnert SR, Shi S, Chang B: Chromosomal localization of the loci responsible for dystrophic cardiac calcinosis in DBA/2 mice. *Genomics* 59:105-107 (1999)
- Chow LH, Ganntt CJ, McManus B: Differential effects of myocarditic variants of Coxsachievirus B3 in inbred mice. A pathologic characterization of heart and tissue damage. *Lab Invest* 64: 55-64 (1991)

LITERATURVERZEICHNIS

- Crabbe JC, Wahlsten D, Dudek BC: Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science* 284: 1670-1672 (1999)
- Dahl LK: A simple and sensitive histochemical method for calcium. *Proc Soc Exp Biol Med* 80: 474-479 (1952)
- DiPaolo JA, Strong LC, Moore GE: Calcareous pericarditis in mice of general genetically related strains. *Proc Soc Exp Biol Med* 115: 496-497 (1964)
- Eaton GJ, Custer RP, Johnson FN, Stabenow KT: Dystrophic cardiac calcinosis in mice. Genetic, hormonal, and dietary influences. *Am J Pathol* 90: 173-186 (1978)
- Everitt JI, Ross PW, Neptun DA, Mangum JB: Effect of a purified diet on dystrophic cardiac calcinosis in mice. *Lab Anim Sci* 38: 426-429 (1988a)
- Everitt JI, Olson LM, Mangum JB, Visek WJ: High mortality with severe dystrophic cardiac calcinosis in C3H/ONJ mice fed high fat purified diets. *Vet Pathol* 25: 113-118 (1988b)
- Farber JL: Biology of disease: Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. *Lab Invest* 47 (2): 114-123 (1982)
- Frith CH, Haley TJ, Seymore BW: Spontaneous epicardial mineralization in BALB/cStCrl mice. *Lab Anim Sci* 25: 787 (1975)
- Gang DL, Barrett LV, Wilson EJ, Rubin RH, Medearis DN: Myopericarditis and enhanced dystrophic cardiac calcification in murine cytomegalovirus infection. *Am J Pathol* 124: 207-215 (1986)
- Garcia-Fernandez MI, Gheduzzi D, Boraldi F, Paolinelli CD, Sanchez P, Valdivielso P, Morilla MJ, Quaglino D, Guerra D, Casolari S, Bercovitch L, Pasquali-Ronchetti I: Parameters of oxidative stress are present in the circulation of PXE patients. *Biochim Biophys Acta* 1782: 474-481 (2008)

LITERATURVERZEICHNIS

- Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MAD: DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9436-9440 (1988)
- Ivandic BT, Qiao J-H, Machleder D, Liao F, Drake TA, Lusic AJ: A locus on chromosome 7 determines myocardial cell necrosis and calcification (dystrophic cardiac calcinosis) in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5483-5488 (1996)
- Ivandic BT, Utz HF, Kaczmarek PM, Aherrahrou Z, Axtner SB, Klepsch C, Lusic A, Katus HA: New Dyscalc loci for myocardial cell necrosis and calcification (dystrophic cardiac calcinosis) in mice. *Physiol Genomics* 28: 137-144 (2001)
- John H, Birnstiel M, Jones K: RNA-DNA hybrids at the cytogenetical level. *Nature* 223: 582-587 (1969)
- Korff S, Riechert N, Schoensiegel F, Weichenhan D, Autschbach F, Katus HA, Ivandic BT: Calcification of myocardial necrosis is common in mice. *Virchows Arch* 5: 630-638 (2005)
- Krenik KD, Kephart GM, Offord KP, Dunnette SL, Gleich GJ: Comparison of antifading agents used in immunofluorescence. *J Immunol Methods* 117: 91-97 (1989)
- Lillie RD: Various oil soluble dyes as fat stains in the supersaturated isopropanol technic. *Stain Technology* 19: 55-58 (1944)
- Lockard VG, Bloom S: Morphologic features and nuclide composition of infarction-associated cardiac myocyte mineralization in humans. *Am J Pathol* 139: 565-572 (1991)
- Lostroh A, Li CH: Deposition induced hydrocortisone of calcium in heart tissue of female C3H mice. *Nature* 176: 504 (1955)
- Mc Gee-Russell SM: Histochemical methods for calcium: *J Histochem Cytochem* 6: 22-42 (1958)

LITERATURVERZEICHNIS

- Meissner OA, Rieber J, Babaryka G, Oswald M, Reim S, Siebert U, Redel T, Eibel R, Mueller-Lisse U, Reiser M, Mueller-Lisse UG: Intravascular optical coherence tomography: differentiation of atherosclerotic plaques and quantification of vessel dimensions in crural arterial specimens. *Rofo* 178: 214-220 (2006)
- Meng H, Vera I, Che N, Wang X, Wang SS, Ingram-Drake L, Schadt EE, Drake TA, Lusis AJ: Identification of *Abcc6* as the major causal gene for dystrophic cardiac calcification in mice through integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 13: 4530-4535 (2007)
- Millane T, Wilson A, Patel MK, Jennison SH, Holt DW, Murday AJ, Camm AJ: Mitochondrial calcium deposition in association with cyclosporine therapy and myocardial magnesium depletion: a serial histologic study in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 13: 473-480 (1994)
- Mullis KB, Faloona FA, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51: 263-273 (1986)
- Murray GI, Ewen SWB: A new fluorescence method for alkaline phosphatase histochemistry. *J Histochem Cytochem* 40: 1971-1974 (1992)
- Nabors CE, Ball CR: Spontaneous calcification in hearts of DBA mice. *Anat Rec*. 164: 153-161 (1969)
- Nirdlinger EL, Bramante PO: Subcellular myocardial ionic shifts and mitochondrial alterations in the course of isoproterenol-induced cardiopathy of the rat. *J Mol Cell Cardiol* 6: 49-60 (1974)
- Price P, Eddy KS, Papadimitrion JM, Faulkner DL, Shellam GR: Genetic determination of cytomegalovirus- induced and age-related cardiopathy in inbred mice. Characterization of infiltrating cells. *Am J Pathol* 138: 59-67 (1991)

LITERATURVERZEICHNIS

- Pardue ML and Gall JG: Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 64: 600 – 604 (1969)
- Qiao J-H, Xie P-Z, Fishbein MC, Kreuzer J, Drake TA, Demer LL, Lusis AJ: Pathology of atheromatous lesions in inbred and genetically engineered mice. Genetic determination of arterial calcification. *Arterioscler Thromb* 14: 1480-1497 (1994)
- Rings RW, Wagner JE: Incidence of cardiac and other soft tissue mineralized lesions in DNA-2 mice. *Lab Anim Sci* 22: 344-352 (1972)
- Schunkert H, Götz A, Braund P, McGinnis R, Tregouet DA, Mangino M, Linsel-Nitschke P, Cambien F, Hengstenberg C, Stark K, Blankenberg S, Tiret L, Ducimetiere P, Keniry A, Ghorri MJ, Schreiber S, El Mokhtari NE, Hall AS, Dixon RJ, Goodall AH, Liptau H, Pollard H, Schwarz DF, Hothorn LA, Wichmann HE, König IR, Fischer M, Meisinger C, Ouwehand W, Deloukas P, Thompson JR, Erdmann J, Ziegler A, Samani NJ; Cardiogenics Consortium: Repeated replication and a prospective meta-analysis of the association between chromosome 9p21.3 and coronary artery disease. *Circulation* 117: 1675-1684 (2008)
- Seifert G: Heterotope (extraossäre) Verkalkungen (Kalzinose). Ätiologie, Pathogenese und klinische Bedeutung. *Pathologie* 18: 430-438 (1997)
- Shanahan CM, Cary NRB, Metcalfe JC, Weissberg PL: High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 93: 2393–2402 (1994)
- Shen AC, Jennings RB: Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury. *Am J Pathol* 67: 417-440 (1972a)
- Shen AC., Jennings RB: Kinetics of calcium accumulation in acute myocardial ischemic injury. *Am J Pathol* 67: 441-452 (1972b)
- Sparks LL, Rosenau W, MacAlpin RN, Daane TA, Li CH: Production of dystrophic calcification of cardiac muscle in mice by hydrocortisone. *Nature* 176: 503-504 (1955)

LITERATURVERZEICHNIS

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

Van den Broek FAR, Bakker R, Den Bieman M, Fielmich-Bouwman AXM, Lemmens AG, Van Lith HA, Nissen I, Ritskes-Hoitinga JM, Van Tintelen G, Van Zutphen LFM: Genetic analysis of dystrophic cardiac calcification in DBA/2 mice. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 204-208 (1998)

Wrogemann K, Pena SDJ: Mitochondrial calcium overload: A general mechanism for cell-necrosis in muscle diseases. *Lancet* 1: 672-674 (1976)

7. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt den Direktoren der Inneren Klinik II Prof. Dr. med. H.A. Katus, Prof. Dr. med. G. Richard und Prof. Dr. med. H. Schunkert für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz, das Überlassen von Geräten und Materialien und vor allem für Ihre Ratschläge bei der Bearbeitung des Themas. Weiterhin möchte ich mich bei den Leitern des Molekulargenetischen Labors I Dr. med. B.T. Ivandic und PD Dr. J. Erdmann bedanken für die exzellente Betreuung der Dissertation sowie bei Prof. Dr. med. J. Weil für die aufgebrachte Geduld bei zahlreich gestellten Fragen sowie Diskussionen.

Den Mitarbeitern des Molekulargenetischen Labors I, insbesondere Dr. hum. biol. Z. Aherrahrou und Dr. med. L.C. Doehring sowie den MTA´s Frau C. Klepsch und Frau S.B. Axtner danke ich für die angenehme und fruchtbare Zusammenarbeit.

Bei der Einarbeitung in die Histologie standen mir Prof. Dr. med. A.C. Feller, Direktor des Institutes für Pathologie und seine Mitarbeiter aus dem „Ecklabor“ zu Verfügung, wofür ich mich hiermit herzlich bedanken möchte.

Frau PD Dr. med. J. Welzel aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie danke ich für das zur Verfügung stellen des Gerätes und das Einarbeiten in die optische Kohärenztomographie.

Für die Durchführung der Bestrahlung der Tiere danke ich Dr. med. R. Nadrowitz aus der Klinik für Strahlen- und Nuklearmedizin. Prof. Dr. S. Peters und Frau Dr. med. K. Bauermeister (Medizinische Klinik I) danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Knochenmarkstransplantation.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Seifert aus dem Institut für Klinische Chemie bedanken, der mich bei der Untersuchung des Blutes der Mäuse unterstützt hat.

Mein Dank gilt auch Herrn H-J. Berkentien aus dem Institut für Medizinische Biometrie und Statistik, der mich mit großem Eifer zielsicher durch die Untiefen der statistischen Auswertung meiner Daten geführt hat.

Für die Haltung und Betreuung der Tiere möchte ich mich bei Dr. Noel und seinen Mitarbeitern bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und insbesondere meiner Ehefrau Sabine, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Diese Dissertation wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt und gefördert (Iv10/3-1).

8. LEBENS LAUF

Name	Piotr Maciej Kaczmarek
Geburtsdatum	11.08.1972
Geburtsort	Bromberg (Polen)
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet mit Sabine Kaczmarek, geb. Viglahn, Ärztin, zwei Söhne (Jan Arik und Christoph Lenno)
Wohnort	Alter Postweg 28 c, 23627 Groß Grönau
Eltern	Danuta Kaczmarek, geb. Przecherko. Kinderärztin Lech Kaczmarek. Maschinenbauingenieur
Bildungsweg	
1979 – 1982	Grund- und Hauptschule Nr. 37 in Bromberg / Polen
18.05.1982	Einwanderung in die Bundesrepublik Deutschland
24.03.1983	Einbürgerung
1982 – 1985	Gorch-Fock-Schule in Kappeln (Grundschule)
1985	St. Jürgen-Schule in Schleswig (Grundschule)
1985 – 1986	Bruno-Lorenzen-Schule in Schleswig (Realschule)
1986 – 1987	Lüne-Schule in Lüneburg (Orientierungsstufe)
1987 – 1994	Wilhelm-Raabe-Schule in Lüneburg (Gymnasium) Erlangen der Hochschulreife
01.10.1994	Studiengang der Humanmedizin an der Humboldt-Universität zu Berlin
02.10.1996	Wechsel an das Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck (UKSH)
01.06.2001	Anstellung als Arzt im Praktikum am UKSH
Seit 01.12.2002	Assistenzarzt am UKSH
Promotionsarbeit	seit 2000

LEBENS LAUF

Betreuung von klinischen Studien

- 2005-2006 APEX AMI Studie (Assessment of PEXelizumab in Acute Myocardial Infarction)
- 2007-2008 Certify Studie (Vergleich der Wirksamkeit und Sicherheit von Certoparin mit unfraktioniertem Heparin in der Prophylaxe thromboembolischer Ereignisse bei akut kranken, internistischen Patientin)
(CCUS training during Investigator Meeting, Dresden, Germany 2007)
- seit 2008 PRIMO Studie (Paricalcitol capsules benefits in Renal failure Induced cardiac Morbidity in subjects with Chronic Kidney Disease Stage 3B/4)
(Echocardiogram training during Investigator Meeting, Barcelona, Spain 2008)
- seit 2008 EPOS Studie (EPidemiologic evaluation Of PatientS with HFPSF)
- seit 2008 WALK Studie (Safety and Efficacy Study of Ad2/Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 α /VP16 Gene Transfer in Patients with Intermittent Claudication)

Lehre

- seit 2004 Klinische Betreuung von Studenten bei der Durchführung der körperlichen Untersuchung („Klopfkurs“)
- seit 2008 Betreuung der klinischen Ausbildung von Assistenzärzten („Mittwochskurse“)

Nebentätigkeit

- 2008 Nebentätigkeit als Berater der Firma Sanofi-Aventis Deutschland GmbH

9. PUBLIKATIONEN

Aherrahrou Z, Doehring LC, Ehlers EM, Liptau H, Depping R, Linsel-Nitschke P, Kaczmarek PM, Erdmann J, Schunkert H: An alternative splice variant in Abcc6, the gene causing dystrophic calcification, leads to protein deficiency in C3H/He mice. *J Biol Chem* 283: 7608-7615 (2008)

Aherrahrou Z, Doehring LC, Kaczmarek PM, Liptau H, Ehlers EM, Pomarino A, Wrobel S, Gotz A, Mayer B, Erdmann J, Schunkert H: Ultrafine mapping of Dyscalc1 to an 80 Kb chromosomal segment on chromosome 7 in mice susceptible for dystrophic calcification. *Physiol Genomics* 28: 203-212 (2007)

Doehring LC, Kaczmarek PM, Ehlers EM, Mayer B, Erdmann J, Schunkert H, Aherrahrou Z: Arterial calcification in mice after freeze-thaw injury. *Ann Anat* 188: 235-242 (2006)

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* 89: 1627-1630 (2005)

Bauermeister KT, Stölting S, Kaczmarek PM, Nadrowitz R, Wagner T, Peters SO: Hematopoietic progenitor cells residing in muscle engraft into bone marrow following transplantation. *Int J Hematol* 79: 488-494 (2004)

Aherrahrou Z, Axtner SB, Kaczmarek PM, Jurat A, Korff S, Doehring LC, Weichenhan D, Katus HA, Ivandic BT: A locus on chromosome 7 determines dramatic up-regulation of osteopontin in dystrophic cardiac calcification in mice. *Am J Pathol* 164: 1379-1387 (2004)

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

Abstracts:

Muthorst S, Mirau W, Kaczmarek PM, Schunkert H, Schaefer U: Die linksventrikuläre Dysfunktion ist unabhängig vom Koronarstatus mit einer Fehlfunktion des rechten Ventrikels assoziiert. 74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Herz- und Kreislaufforschung, 27. März – 29. März 2008, Mannheim. (abstract, Poster)

Doehring LC, Aherrahrou Z, Kaczmarek PM, Erdmann J, Schunkert H, Ehlers EM: Arterielle Mediaverkalkung: Abcc6 als Kandidatengen für den Dyscalc1 Lokus. 73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Herz- und Kreislaufforschung, 12. April – 14. April 2008, Mannheim. (Vortrag)

PUBLIKATIONEN

Aherrahrou Z, Doehring LC, Kaczmarek PM, Liptau H, Ehlers EM, Lieb W, Mayer B, Erdmann J, Schunkert H: Sequenzierung einer 80Kb Region innerhalb des *Dyscalc1* Locus: Identifizierung neuer missense-Mutationen. 73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Herz- und Kreislaufforschung, 12. April – 14. April 2008, Mannheim. (abstract, Poster)

Doehring LC, Aherrahrou Z, Kaczmarek PM, Mayer B, Erdmann J, Schunkert H, Ehlers EM: Medial artery calcification: The role of *Dyscalc1*. NGFN Meeting, November 25th – 26th, 2006, Heidelberg. (abstract, Poster)

Ehlers EM, Aherrahrou Z, Kaczmarek PM, Erdmann J, Schunkert H, Doehring LC: Arterial calcification and the *Dyscalc1* locus. NGFN Meeting, November 25th – 26th, 2006, Heidelberg. (abstract, Poster)

Aherrahrou Z, Kaczmarek PM, Doehring LC, Götz A, Mayer B, Lieb W, Liptau H, Erdmann J, Schunkert H: Untersuchung der Expressionsprofile innerhalb der *Dyscalc1* Region - Identifikation von Kandidatengen für kardiovaskuläre Verkalkung. 72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Herz- und Kreislaufforschung, 20. April - 22. April 2006, Mannheim. (abstract, Poster)

Kaczmarek PM, Doehring LC, Erdmann J, Pomarino A, Nadrowitz R, Heinze GS, Peters SO, Schunkert H, Aherrahrou Z: Reduced cardiac calcinosis in DCC-susceptible congenic mice reconstituted with DCC-resistant bone marrow cells. NGFN Meeting, 19th – 20th November 2005, Bonn. (abstract, Poster)

Pomarino A, Aherrahrou Z, Kaczmarek PM, Doehring LC, Götz A, Mayer B, Fischer M, Nürnberg P, Borzym K, Reinhardt R, Lieb W, Schunkert H, Erdmann J: Comparative and sequence analyses approach: Cardiovascular Calcification in mouse and human. NGFN Meeting, 19th – 20th November 2005, Bonn. (abstract, Poster)

Kaczmarek PM, Doehring LC, Erdmann J, Nadrowitz R, Heinze GS, Peters SO, Schunkert H, Aherrahrou Z: Reduced cardiac calcinosis in susceptible congenic mice reconstituted with resistant bone marrow cells. European Society of Cardiology Congress Sep. 2005 in Stockholm / Sweden. (abstract, Poster)

Doehring LC, Kaczmarek PM, Erdmann J, Schunkert H, Aherrahrou Z, Ivandic BT: *Dyscalc 1* locus determines massive arterial calcification in mice. European Society of Cardiology Congress Sep. 2005 in Stockholm / Sweden. (abstract, Poster)

Kaczmarek PM, Doehring LC, Erdmann J, Nadrowitz R, Heinze GS, Peters SO, Schunkert H, Aherrahrou Z: Eine Knochenmarkstransplantation bei Mäusen mit hereditären Kalzifikation verringert dystrophe kardiale Verkalkungen. 71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Herz- und Kreislaufforschung, 31. März - 2. April 2005, Mannheim. (abstract, Poster)

Aherrahrou Z, Kaczmarek PM, Doehring LC, Ivandic BT, Mayer B, Lieb W, Erdmann J, Schunkert H: Fine Mapping of *Dyscalc1* to a 1 Mb Interval on Chromosome 7 Using Genetic Recombination in Laboratory Mice. 3rd Dutch-German Meeting of Molecular Cardiology Groups 2005, Münster, Germany, Feb. 24-26. (abstract, Poster)

PUBLIKATIONEN

Rudolf M, Schlötzer-Schrehardt U, Aherrahrou Z, Kaczmarek PM, Schmidt-Erfurth U: Ultrastructural degenerative changes in Bruch's membrane (BM), Retinal Pigment Epithelium (RPE) and Photoreceptors of LDL-receptor-knock-out mice. ARVO Summary Book Apr. 27, 2004, Seite 94, Nr. 2287. (abstract, Poster)

Korff S, Aherrahrou Z, Kaczmarek PM, Döhring LC, Axtner S, Weichenhan D, Ivandic BT: Osteopontin wird durch einen Locus auf Chromosom 7 transkriptionell reguliert. 110. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 17. – 21. April 2004, Wiesbaden. (abstract, Poster)

Korff S, Aherrahrou Z, Kaczmarek PM, Axtner, Jurat A, Doehring LC, Weichenhan D, Katus HA, Ivandic BT: A Locus on Chromosome 7 Determines marked upregulation of Osteopontin in Mice with Dystrophic Cardiac Calcification. 17th International Mouse Genome Conference 9-12 November 2003, Braunschweig, Germany. (abstract, Poster)

Korff S, Aherrahrou Z, Kaczmarek PM, Doehring LC, Weichenhan D, Ivandic BT: Neue genetische Mausmodelle für kardiovaskuläre Verkalkungen. 27. Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Herz- und Kreislaufforschung, 16.-18. Oktober 2003, Münster (abstract, Poster)

Aherrahrou Z, Kaczmarek PM, Doehring LC, Axtner SB, Klinger M, Ivandic BT: Deutliche Osteopontininduktion in Myokardinfarktnekrosen mit dystrophen Verkalkungen. 27. Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie-, Herz- und Kreislaufforschung, 16.-18. Oktober 2003, Münster (abstract, Poster)

Aherrahrou Z, Kaczmarek PM, Doehring LC, Klinger M, Peters SO, Richardt GH, Ivandic BT: Dystrophic cardiac calcification is associated with early upregulation of osteopontin in mice with genetic predisposition. Symposium on Phenotyping Mouse Cardiovascular Function and Development, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA (abstract, October 10-11, 2002).

Heinze GS, Bauermeister KT, Kaczmarek PM, Stölting S, Nadrowitz R, Aherrahrou Z, Wagner T, Peters SO: Endothelial Cells in Solid Growing Wehi 164 and JC Tumors Derive from Bone Marrow Progenitor Cells. Blood 100, 2002, (abstract, Poster ASH 2002).

Bauermeister KT, Kaczmarek PM, Ivandic BT, Branke B, Wiedemann G, Wagner T, Peters SO: Localisation of Bone Marrow-Derived Cells in Cardiac Tissue in Anthracycline-Induced Cardiomyopathy and Myocardial Infarction. Blood 98, 2001, (abstract, Poster ASH 2001).

Bauermeister KT, Simon P, Kaczmarek PM, Ivandic BT, Branke B, Wagner T, Peters SO: Influence of Culture Conditions on the Hematopoietic Potential of Muscle Derived Progenitor Cells.. Blood 98, 2001, (abstract, ASH 2001).

Ivandic BT, Kaczmarek PM, Aherrahrou Z, Utz HF: Genetische Basis der Myokardzellnekrose und -verkalkung, einer "response-to-injury"-Reaktion bei Mäusen. 67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie-, Herz- und Kreislaufforschung, 19.-21. April 2001, Mannheim (abstract, Poster)