

Aus dem Institut für Kardiogenetik
der Universität zu Lübeck
Prof. Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann

**Einfluss von anorganischem Pyrophosphat
auf die Makrophagendifferenzierung bei der
dystrophen kardialen Verkalkung**

**Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin –**

vorgelegt von
Carolin Bauer
aus Waren/Müritz

Lübeck 2018

1. Berichterstatterin/Berichterstatter: Prof. Dr.rer.nat. Jeanette Erdmann
2. Berichterstatterin/Berichterstatter:
Tag der mündlichen Prüfung:
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den
Promotionskommission der Sektion Medizin

I. Inhaltsverzeichnis

I. INHALTSVERZEICHNIS.....	I
II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VI
III. TABELLENVERZEICHNIS.....	VII
IV. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
Allgemein.....	VIII
Einheiten	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 Verkalkungsprozesse beim Menschen.....	1
1.2 Physiologische orthotope Verkalkung im Knochengewebe	2
1.2.1 Osteoblasten.....	2
1.2.2 Osteoklasten.....	3
1.3 Pathologische heterotope Verkalkung	3
1.3.1 Arteriosklerose	4
1.3.2 Dystrophe kardiale Verkalkung (DCC) im Mausmodel.....	5
1.3.3 In vitro Model zur Gefäßverkalkung.....	5
1.4 Pathophysiologie der Gefäßverkalkung	5
1.4.1 Gefäßverkalkung als „response to injury“.....	6
1.4.2 Genetische Faktoren.....	6
1.4.2.1 Das Gen <i>Abcc6</i>	6
1.4.2.2 Pseudoxanthoma elasticum (PXE).....	8
1.4.2.3 <i>General arterial calcification of infancy</i> (GACI)	8
1.5 Verbindung zwischen Verkalkung im Knochen und Gefäßsystem.....	8
1.5.1 Das RANK/RANKL/OPG-Systems bei der Gefäßverkalkung	9
1.6 Die Rolle von Phosphat bei der Gefäßverkalkung.....	11
1.6.1 Anorganisches Phosphat (Pi; <i>engl. inorganic phosphate</i>).....	11
1.6.2 Anorganisches Pyrophosphat (PPi; <i>engl. inorganic pyrophosphate</i>).....	11
1.6.3 Bisphosphonate (BP).....	12
1.7 Zielsetzung und Fragestellung der Doktorarbeit	13

2	MATERIAL UND METHODEN.....	15
2.1	Material.....	15
2.1.1	Chemisches Material.....	15
2.1.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	15
2.1.1.2	Puffer und Lösungen.....	17
2.1.1.3	Reagenzien-Kits.....	18
2.1.2	Technisches Material.....	19
2.1.2.1	Labormaterialien.....	19
2.1.2.2	Geräte.....	20
2.1.2.3	Programme und Datenbanken.....	21
2.1.3	Biologisches Material.....	22
2.1.3.1	Mauslinien.....	22
2.1.3.1.1	C57BL/6NCrlBr (B6-Mausstamm).....	22
2.1.3.1.2	C3H/HeJ (C3H-Mausstamm).....	22
2.1.3.1.3	Kongene B6.C3HDyscalc1 (Cg1-Maus).....	22
2.1.3.2	Zelllinien.....	22
2.1.3.2.1	C3H/10T1/2-Zellen.....	22
2.1.3.2.2	C2C12- Zellen.....	22
2.1.3.2.3	HASMC (engl. <i>human aortic smooth muscle cells</i>).....	23
2.2	Methoden.....	24
2.2.1	Übersicht über den experimentellen Ablauf.....	24
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	25
2.2.2.1	RNA-Isolation aus Herzgewebe.....	25
2.2.2.2	RNA-Isolation aus Zellen.....	25
2.2.2.3	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	26
2.2.2.4	Reverse Transkription.....	26
2.2.2.5	Polymerase-Ketten-Reaktion.....	27
2.2.2.6	Primerdesign.....	27
2.2.2.7	Optimierung der Oligonukleotidprimer.....	27
2.2.2.8	Gelelektrophorese.....	29
2.2.2.9	Quantitative real-time PCR (qPCR).....	29
2.2.2.10	Datenanalyse TaqMan®-qPCR.....	30
2.2.2.11	PPi-Messung in Mausplasma.....	31
2.2.2.12	Messung von Icam-1 in Makrophagenmedium und Mausplasma.....	32
2.2.3	Zellbiologische Methoden.....	32
2.2.3.1	Anzucht und Kultivierung von Zellen.....	32
2.2.3.2	Subkultivierung der C3H/10T1/2- und C2C12-Zellen.....	33
2.2.3.3	Subkultivierung der HASMC.....	33
2.2.3.4	Zellzahlbestimmung.....	33
2.2.3.5	Zellkulturmodell zur Untersuchung von Verkalkungsprozessen.....	34
2.2.3.5.1	Induktion der Zellverkalkung.....	34
2.2.3.5.2	Zusatz von Mausplasma, anorganischem Pyrophosphat (PPi) oder konditioniertem DMEM zum Verkalkungsmedium.....	35
2.2.3.5.3	Einfluss von konditioniertem Makrophagenmedium auf Verkalkung.....	35
2.2.3.5.4	Quantifizierung der Verkalkung.....	35

2.2.3.6	Transfektion von Zellen	37
2.2.3.7	Gewinnung von plättchen-freiem Mausplasma	38
2.2.3.8	Monozytendifferenzierung zu Osteoklasten	38
2.2.3.8.1	Monozytenisolation aus der Milz.....	38
2.2.3.8.2	Monozytenkultivierung und Differenzierung zu Osteoklasten	39
2.2.3.8.3	Zytokinmessung im Makrophagenmedium.....	39
2.2.3.8.4	Bisphosphonatbehandlung der Makrophagen	40
2.2.3.8.5	Behandlung der Makrophagen mit Mausplasma.....	40
2.2.3.8.6	Quantifizierung der Osteoklastendifferenzierung	40
2.2.4	Tierexperimentelle Methoden	41
2.2.4.1	Tierhaltung.....	41
2.2.4.2	Kryopexie des Myokards	41
2.2.4.2.1	Anfertigen der Gewebeschnitte.....	41
2.2.4.2.2	CD68-Färbung	42
2.2.4.2.3	TRAP und ALPL-Färbung der Herzschnitte (Sigma-Aldrich-Kit).....	42
2.2.4.3	Bisphosphonatapplikation.....	42
2.2.4.4	Leberentnahme und Hepatozytenisolation	43
2.2.5	Statistik	44
2.2.5.1	Zellkulturversuche	44
2.2.5.2	Tierversuche	44
3	ERGEBNISSE.....	46
3.1	Analyse des Herzgewebes nach Kälteverletzung bei den Mausstämmen C3H/He und.....	46
	C57BL/6.....	46
3.1.1	Entwicklung der dystrophen kardialen Verkalkung (DCC)	46
3.1.2	Akkumulation Multinukleärer Riesenzellen (MN-Zellen) bei der DCC	46
3.1.3	Alkalische Phosphatase (ALPL)	47
3.1.4	Expression von <i>Enpp1</i> und <i>Alpl</i> in Herzgewebe	49
3.1.5	Expression von Osteogenesemarkern in Herzgewebe.....	49
3.1.6	Expression von Entzündungsmarkern in Herzgewebe	50
3.1.7	Expression von <i>Icam-1</i> in Herzgewebe.....	51
3.2	Optimierung eines Zellkulturmodells für Verkalkung	52
3.2.1	Zeitlicher Verlauf der Zellverkalkung unterschiedlicher Zelllinien	52
3.2.2	Einfluss von anorganischem Pyrophosphat (PPi) auf die Zellverkalkung	54
3.2.3	Einfluss von Mausplasma auf die Zellverkalkung	55
3.2.4	Einfluss von konditioniertem Hepatozytenmedium auf die Verkalkung	57
3.2.5	Konditioniertes Medium transfizierter mesenchymaler Stammzellen	58
3.3	Etablierung eines Assays zur Monozytenisolation und –differenzierung aus der Milz	59
3.3.1	Differenzierung der Monozyten zu Multinukleären Zellen.....	59
3.3.2	Expression von Osteogenesemarkern während der Differenzierung.....	60
3.3.3	Vergleich der Monozytendifferenzierung zwischen DCC-resistenten und prädisponierten Mausstämmen	61
3.3.3.1	Expression von Transkriptionsfaktoren der Osteogenese	62
3.3.4	Expression von M1/M2-Makrophagenmarkern	63

3.3.5	Expression von Komplementfaktoren in Vorläuferzellen	63
3.3.6	Einfluss von Mausplasma auf die Makrophagendifferenzierung	65
3.3.7	<i>Abcc6</i> -Expression in Leber und multinukleären Zellen (MN)	66
3.3.8	<i>Enpp1</i> -Expression in Leber und MN-Zellen	67
3.3.9	Einfluss von konditioniertem Medium multinukleärer Zellen (MN) auf die Zellverkalkung	68
3.3.10	Messung der Zytokinproduktion von Makrophagen und multinukleären Zellen	70
3.3.11	ICAM1/CD54 ELISA	71
3.3.12	PPi-Messung	72
3.3.13	Einfluss von anorganischem Pyrophosphat auf die Makrophagendifferenzierung	73
3.3.14	Einfluss von Bisphosphonaten auf die Monozyten-Differenzierung zu MN-Zellen	75
3.4	PPi-Spiegel im Mausblut.....	77
3.5	In vivo Behandlung der DCC bei Mäusen mit anorganischem Pyrophosphat und..... Bisphosphonaten	78
3.6	Präventive und postoperative Etidronatgabe	79
3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	80
4	DISKUSSION.....	81
4.1	Genetik der Arteriosklerose: seltene Erkrankungen dienen als Grundlage	81
4.2	Dystrophe kardiale Verkalkung (DCC) ist eine metabolische Erkrankung	82
4.2.1	Mögliche Substrate des <i>Abcc6</i> -Transporters	83
4.2.2	Anorganisches Pyrophosphat (PPi) : Der Schlüsselfaktor gegen Verkalkung?	84
4.2.3	Bisphosphonate: Neue Behandlungsoption für pathologische Verkalkung?.....	86
4.3	Wirkungsmechanismus von PPi.....	90
4.3.1	Multinukleäre Zellen im nekrotischen Herzgewebe - dystrophe kardiale Verkalkung (DCC) zeigt Charakteristika der Knochenmineralisierung	90
4.4	Die Plaquebildung bei der DCC ist ein entzündliches Geschehen	92
4.4.1	Die Milz als Reservoir für Monozyten.....	93
4.4.2	Die Rolle von Makrophagen bei der DCC	93
4.4.3	Das Komplementsystem und Gefäßverkalkung	95
4.4.4	Verbindung zwischen Genetik und Ausmaß der Entzündung.....	96
4.4.4.1	Unterschiede zwischen den Mausstämmen C57BL/6J (B6) und C3H/HeJ (C3H)	97
4.5	Weiterführende Experimente.....	98
4.6	Ausblicke	98
5	ZUSAMMENFASSUNG	100
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	102

7	ANHANG.....	111
7.1	Sequenzen der verwendeten Primer	111
7.2	Tierversuchsantrag	112
8	DANKSAGUNG.....	113
9	LEBENS LAUF	114
10	VERÖFFENTLICHUNGEN	116
10.1	Paper	116
10.2	Poster	116
10.3	Abstracts	116

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Klassifikation der Gewebeverkalkung	4
Abbildung 1.2: Funktion des ABCC6-Transporters	7
Abbildung 1.3: Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten	10
Abbildung 1.4: Genetische, inflammatorische und metabolische Einflussfaktoren bei der DCC	13
Abbildung 2.1: cDNA-Verdünnungsreihe einer Test-cDNA	28
Abbildung 2.2: Ausschnitt aus dem qPCR Analyseprogramm S.D.S.	28
Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes bei der Monozytenisolierung aus der Milz	39
Abbildung 2.4: Anatomie des Abdomens der Maus	43
Abbildung 3.1: Herzen 7 Tage nach Kälteverletzung	46
Abbildung 3.2: Aggregation und Fusion TRAP- und CD68-positiver Makrophagen bei C3H-Mäusen 3 Tage nach Kälteverletzung am Herzen	47
Abbildung 3.3: Aktivität der Alkalischen Phosphatase (Alpl) im Herzgewebe an Tag 3 und 5 nach Kälteapplikation	48
Abbildung 3.4: <i>Enpp1</i> - und <i>Alpl</i> -Expression im Herzgewebe	49
Abbildung 3.5: <i>Ctsk</i> -, <i>Trap</i> -, <i>Runx2</i> -, <i>Opn</i> -Expression im Herzgewebe	50
Abbildung 3.6: Expression von Entzündungsmarkern im Herzgewebe.	50
Abbildung 3.7: <i>Icam-1</i> -Genexpression im Herzgewebe.	51
Abbildung 3.8: Alazarin Red S-Färbung zum Nachweis der Verkalkung	53
Abbildung 3.9: Calciummessung nach Verkalkungsinduktion	53
Abbildung 3.10: Anorganisches Pyrophosphat inhibiert die Verkalkung von mesenchymalen Stammzellen (C3H/10T1/2)	54
Abbildung 3.11: Einfluss von Mausplasma auf die Verkalkung von glatten Muskelzellen (HASMC)	55
Abbildung 3.12: Einfluss von Mausplasma auf die Verkalkung von mesenchymalen Stammzellen	56
Abbildung 3.13: Versuchsaufbau- Hepatozytenkultur, Mediumkonditionierung und Zellverkalkung	57
Abbildung 3.14: Einfluss von konditioniertem Hepatozytenmedium auf die Verkalkung	57
Abbildung 3.15: Mediumkonditionierung durch transfizierte Zellen	58
Abbildung 3.16: Darstellung der Monozytendifferenzierung der Mauslinien C3H und B6	59
Abbildung 3.17: Expression der Osteogenesemarker während der Monozytendifferenzierung	60
Abbildung 3.18: Gesteigerte Formation MN-Zellen in DCC prädisponierten Mäusen	61
Abbildung 3.19: Expression der Osteogenesemarker <i>Trap</i> , <i>Ctsk</i> und <i>Runx2</i> in MN-Zellen.	62
Abbildung 3.20: Expression von Makrophagenmarkern in Monozyten und Makrophagen	63
Abbildung 3.21: Expression der Complement Komponenten und Rezeptoren	64
Abbildung 3.22: Einfluss von Mausplasma auf die Makrophagendifferenzierung	65
Abbildung 3.23: Elektrophorese-Gel <i>Abcc6</i>	66
Abbildung 3.24: Elektrophorese-Gel <i>Abcc6</i> -Primertest	66
Abbildung 3.25: <i>Enpp1</i> -, <i>Abcc6</i> - und <i>Alpl</i> -Expression in Hepatozyten	67
Abbildung 3.26: <i>Enpp1</i> und <i>Alpl</i> -Expression in Monozyten und deren Differenzierungsstufen	67
Abbildung 3.27: Versuchsaufbau Mediumkonditionierung	68
Abbildung 3.28: Einfluss von konditioniertem Medium auf die Verkalkung	69
Abbildung 3.29: Messung der Zytokinkonzentration im Makrophagenmedium	70
Abbildung 3.30: Messung der Zytokinkonzentration im Medium multinukleärer Zellen.	71
Abbildung 3.31: Messung der <i>Icam-1</i> -Konzentration im Medium von Makrophagen	72

Abbildung 3.32: PPi-Messung in konditioniertem Makrophagenmedium.....	73
Abbildung 3.33: Einfluss von PPi auf die Bildung MN-Zellen aus C3H-Mäusen.....	73
Abbildung 3.34: Einfluss von PPi auf die Bildung MN-Zellen aus B6-Mäusen	73
Abbildung 3.35: qPCR-Analyse der Osteogenesemarker <i>Trap</i> und <i>Ctsk</i> in MN-Zellen	74
Abbildung 3.36: Einfluss von Bisphosphonaten auf die Osteoklastendifferenzierung	75
Abbildung 3.37: Vergleich der Wirkungsstärke einzelner Bisphosphonate	76
Abbildung 3.38: Konzentration von anorganischem Pyrophosphat (PPi) im Blut	77
Abbildung 3.39: Behandlung der DCC mit PPi und Etidronat	78
Abbildung 3.40: Einfluss einer Etidronatinjektion auf die dystrophe kardiale Verkalkung.	79
Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Entstehung von anorganischem Pyrophosphat (PPi) über den Abcc6-Transporter	85
Abbildung 4.2: Entstehung von MN-Zellen bei der Gewebeverkalkung.....	92
Abbildung 5.1: Theorie zum Pathomechanismus der dystrophen kardialen Verkalkung (DCC)	101

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	17
Tabelle 2.2: Verwendete Puffer und Lösungen	18
Tabelle 2.3: Verwendete Reagenzien-Kits	18
Tabelle 2.4: Verwendete Labormaterialien	20
Tabelle 2.5: Verwendete Geräte	21
Tabelle 2.6: Verwendete Programme und Datenbanken	21
Tabelle 2.7: Ablauf des qPCR-Programms.....	30
Tabelle 2.8: Zusammensetzung der Zellkulturmedien.....	33
Tabelle 2.9: Anzahl der Proben in den Zellkulturversuchen	44
Tabelle 2.10: Anzahl der für die Tierversuche verwendeten Individuen	45
Tabelle 4.1: Übersicht über die Potenz der einzelnen Bisphosphonate	87
Tabelle 7.1: Sequenzen verwendeter Primer	111

IV. Abkürzungsverzeichnis

Allgemein

ABC	engl. <i>ATP- binding cassette</i>
ATPS.....	engl. <i>Adenosine 5" Triphosphate Sulfurylase Yeast Recombinant</i>
APS	engl. <i>Adenosine 5'-phosphosulfate sodium salt</i>
Bzw	beziehungsweise
cDNA	Copy DNA
Cbfa1.....	Core binding factor α 1 (entspricht Runx2)
Ct.....	engl.: <i>cycle threshold</i>
d	engl.: <i>day</i>
DAPI	4'6-Diamino-2-phenylindoldihydrochlorid
DCC	engl.: <i>Dystrophic cardiac calcification</i>
DMEM	engl.: <i>Dulbeccos modified Eagles Medium</i>
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
DNA.....	Desoxyribonuclein-acid
dNTP.....	2'-Desoxynucleotid-5'-Triphosphat
DTT.....	Dithiothreitol
dTTP	Desoxytymidintriphosphat
dUTP.....	Desoxyuridintriphosphat
EDTA.....	Ethylendiamin-Tetraazetat-Säure
et al.....	latein.: et altera (Übersetzung: und andere)
FKS	Fetales Kälber Serum
GACI.....	engl.: <i>general arterial calcification of infancy</i>
GFP	engl.: <i>green fluorescent protein</i>
H ₂ O.....	Wasser
HASMC	engl.: <i>human aortic smooth muscle cell</i>
HCL	Salzsäure
HEPES	engl. <i>4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid</i>
IE.....	Internationale Einheit
KHK.....	Koronare Herzkrankheit
LDL.....	engl.: <i>low density lipoprotein</i>
Ma	Makrophagen

M-CSF	engl.: <i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MGP.....	Matrix Gla Protein
MN	multinukleär
Mo.....	Monozyten
mRNA.....	<i>Messenger-RNA</i>
MRP6.....	engl.: <i>Multidrug-Resistance-Protein 6</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH.....	Natronlauge
PBS	engl.: <i>phosphat buffered saline</i>
PCR.....	engl.: <i>polymerase chain reaction</i>
Pen/Strep.....	Penicillin/Streptomycin
PXE.....	Pseudoxanthoma elasticum
PPi.....	engl. <i>Inorganic Pyrophosphate</i>
RNA	Ribonukleinsäure
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	engl.: <i>tris buffered saline tween</i>
Tris	Tris(hydroxymethyle)-aminomethan
UV.....	Ultra Violett
VSMC	engl.: <i>vascular smooth muscle cell</i>

Einheiten

Bp.....	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cm ²	Quadratcentimeter
g	Gramm oder Erdanziehungskraft
h	Stunde
l	Liter
M.....	Molarität (Einheit mol/l)
Min.....	Minute
Mol.....	Mol (=Stoffmenge, SI-Basiseinheit)
pH.....	Potentium hydrogenii
rpm.....	engl. <i>rotation per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
s.....	Sekunde
V.....	Volt
W.....	Watt (SI-Basiseinheit)

k	Kilo ($=10^3$)
c.....	Zenti ($=10^2$)
m	Milli ($=10^{-3}$)
μ	Micro ($=10^{-6}$)
n	Nano ($=10^{-9}$)
p	Pico ($=10^{-12}$)

1 Einleitung

Chronisch ischämische Herzkrankheit (Koronare Herzkrankheit, KHK) und Myokardinfarkt stellten 2015 die führenden Todesursachen in Deutschland und der westlichen Welt dar (Statistisches Bundesamt). Beide Erkrankungen werden durch eine Verkalkung der arteriellen Gefäße am Herzen und der daraus resultierenden Lumenverengung hervorgerufen. Die mangelnde Sauerstoffversorgung führt zu einem Gewebeuntergang. Je nach Ausmaß der Gefäßverengung kann KHK zunächst symptomlos sein, Brustschmerzen unter Belastung, Herzrhythmusstörungen oder einen Herzinfarkt verursachen (Thygesen et al., 2007). Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, chronische Niereninsuffizienz, Adipositas, Nikotinabusus und zunehmendes Alter begünstigen die Entstehung einer KHK (Hackham et al., 2003). Neben diesen klassischen Risikofaktoren spielt auch die genetische Veranlagung eine wichtige Rolle. Seit 2007 konnten mittels GWAS (genome-wide association studies) 58 Risikoloci identifiziert werden, die zu einem gehäuferten familiären Auftreten von Herzinfarkten führen (Reilly et al., 2011)(Kessler et al., 2014)(Samani et al., 2007)(Wild et al., 2011).

Pseudoxanthoma elasticum (PXE) und *General arterial calcification of infancy* (GACI) sind seltene Erkrankung mit einem ähnlichen, allerdings ausgeprägteren Phänotyp als bei der KHK. Bei Erkrankten führen Mutationen im Gen *ABCC6* zur Verkalkung der elastischen Fasern in Augen, Haut und Gefäßsystem (Uitto et al., 2014)(Nitschke et al., 2012).

Ziel dieser Doktorarbeit war es, *ABCC6* als ein Risikogen für Verkalkung funktionell im Mausmodell zu untersuchen, um dessen Rolle bei der Verkalkungsentstehung besser zu verstehen.

Nur wenn die der Genmutation zugrundeliegenden Pathomechanismen entschlüsselt werden, kann der Entstehung der arteriellen Gefäßverkalkung medikamentös oder präventiv entgegengewirkt werden.

1.1 Verkalkungsprozesse beim Menschen

Calcium-Phosphatablagerungen in Form des Mineralsalzes Hydroxylapatit führen zu Gewebeverkalkung (Yu, 1974)(Stary et al., 1995). Physiologische Verkalkungsprozesse

ohne Krankheitswert finden im menschlichen Körper nur orthotop in Knochen und Zähnen statt. Extraossäre (heterotope) Verkalkungen im kardiovaskulären System, Gehirn, Sehnen, Nieren, Harnblase und Gallenblase sind pathologisch und führen zu Folgeerkrankungen (Murshed et al., 2004).

1.2 Physiologische orthotope Verkalkung im Knochengewebe

Der Knochen ist als mineralisiertes Gewebe der größte Calcium-Phosphatspeicher des Körpers (Bonjour, 2011). Das Knochengewebe setzt sich aus den Zelltypen Osteoklasten, -zyten, -blasten sowie Knochenbelegzellen und der extrazellulären Matrix zusammen. Um sich der wechselnden Beanspruchung anzupassen, findet im Knochen ein ständiger zellvermittelter Umbau statt. Dieses sogenannte *Bone remodeling* spielt eine wichtige Rolle im Calciumstoffwechsel, bei der Frakturheilung und der Anpassung des Knochengewebes an mechanische Belastung (Dallas et al., 2013). Neben dem Abbau alten Knochengewebes durch Osteoklasten, erfolgt die Bildung neuer mineralisierter Knochensubstanz durch Osteoblasten. In Knochenmatrix eingebettete Osteoblasten differenzieren dann zu ruhenden Osteozyten. Inaktive Osteoblasten, die der Knochenoberfläche aufliegen, werden Knochenbelegzellen genannt und üben eine Schutzfunktion aus (Florencio-Silva et al., 2015).

Der Knochenumbau als Interaktion dieser vier Zelltypen untereinander und mit anderen Organsystemen stellt einen komplexen Prozess dar. Wenn das Verhältnis aus Knochenaufbau und -abbau aus dem Gleichgewicht gerät, kann es durch massive Calciumfreisetzung in das Blut zur Entstehung pathologischer Verkalkung kommen (Sims and Gooi, 2008).

1.2.1 Osteoblasten

Osteoblasten machen ca. 5% der Knochenzellen aus. Die von ihnen sezernierten Proteine bilden die extrazelluläre Knochenmatrix (Sims and Gooi, 2008). Osteoblasten durchlaufen während ihrer Reifung mehrere Entwicklungsphasen, die über die Expression spezifischer Gene und die Synthese eines knochenmorphogenischen Proteins (BMP - bone morphogenic protein) reguliert werden. Zunächst wandern mesenchymale Stammzellen als Osteoblastenvorläuferzellen in den Knochen und differenzieren zu Präosteoblasten. Während der Differenzierung werden verschiedene Zellgene hochreguliert. Die Expression des Hauptregulator-Gens *RUNX2* in Osteoblastenvorläuferzellen leitet die weitere Differenzierung zu Präosteoblasten ein (Komori, 2009). Diese sind durch Ex-

pression des Enzyms alkalische Phosphatase charakterisiert. Die reifen Osteoblasten sind in der Lage, Matrixproteine wie Osteocalcin(OC) und Osteopontin(OPN) zu sezernieren und Knochensubstanz aufzubauen (Capulli et al., 2014).

1.2.2 Osteoklasten

Osteoklasten sind vielkernige Riesenzellen, die durch die Fusion von Vorläuferzellen aus hämatopoietischen Stammzellen entstehen (Teitelbaum, 2000). Die hämatopoietischen Stammzellen können unter dem Einfluss verschiedener Zytokine zu Megakaryozyten, Granulozyten, Monozyten/Makrophagen oder Osteoklasten differenzieren (Yavropoulou and Yovos, n.d.).

Osteoblasten und T-Lymphozyten sezernieren das Zytokin *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), das an einen Rezeptor auf der Zelloberfläche der Stammzelle bindet und essentiell für die Entstehung myeloblastischer Vorläuferzellen ist (Felix et al., 1994). Der von Osteoblasten und Stromazellen im Knochenmark produzierte *Receptor Activator of NF- κ B Ligand* (RANKL) bindet anschließend an den RANK-Rezeptor der myeloblastischen Vorläuferzellen und induziert die vollständige Reifung zu aktiven Osteoklasten (Collin-Osdoby, 2004) (siehe Abbildung 1.2).

1.3 Pathologische heterotope Verkalkung

Heterotope Gewebeverkalkung findet extraossär im Gefäßsystem oder in Organen statt. Ätiologisch kann die metastatische von der dystrophen Verkalkung unterschieden werden. Metastatische Verkalkung tritt in vorher gesundem Gewebe auf und kann bei Osteolysen, Hyperparathyreoidismus oder tumorassoziiert durch hohe Calciumspiegel im Blut entstehen. Dystrophe Gewebeverkalkung entsteht hingegen unabhängig vom Calciumstoffwechsel in entzündetem oder nekrotischem Gewebe (Seifert, 1997). Dystrophe Verkalkung bildet die Grundlage der Entstehung von Artherosklerose und KHK beim Menschen und der dystrophen kardialen Verkalkung (DCC) bei der Maus.

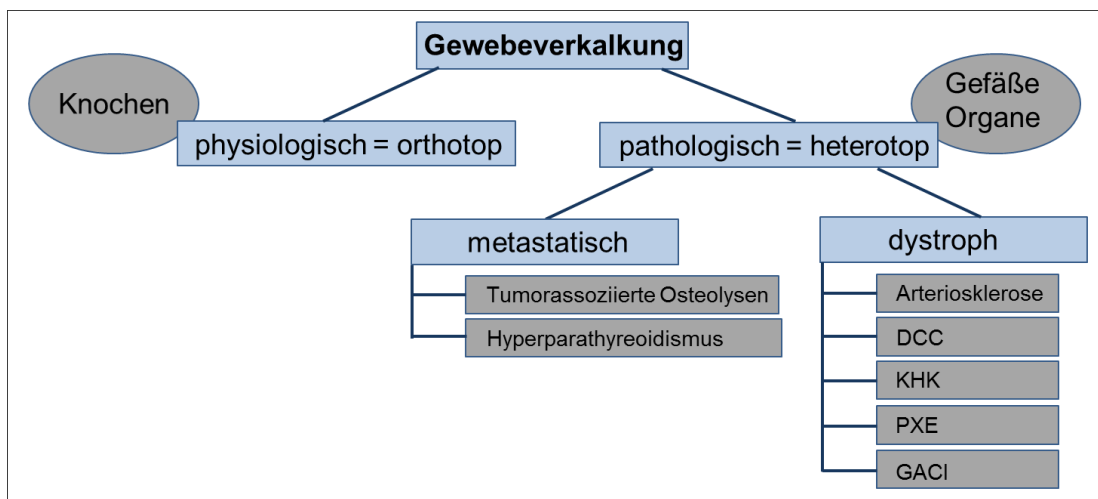


Abbildung 1.1.: Klassifikation der Gewebeverkalkung modifiziert nach Lanzer et al. (2014).

Im Gegensatz zur physiologischen Verkalkungen im Knochen, sind Kalkablagerungen in Organen und Gefäßsystem pathologisch. Pathologische Verkalkungen in gesundem Gewebe werden als metastatisch bezeichnet. In vorgeschädigtem Gewebe kommen Kalkablagerungen in dystropher Form vor.

1.3.1 Arteriosklerose

Der Begriff stammt aus dem Altgriechischen und bedeutet wörtlich übersetzt „Arterienverhärtung“. Arteriosklerose beschreibt die Verdickung der Arterienwand durch Akkumulation von Plasmalipiden, Zellen, thrombotischem Material und Calciumkristallen (Garcia and Khang-Loon, 1996). Der Elastizitätsverlust der Gefäßwand und die Lumen-einengung führen zu kardiovaskulären Erkrankungen. Dazu gehören die Koronare Herzkrankheit (KHK), die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und der Hirninfarkt (Hackam et al., 2003).

Die wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung der Arteriosklerose wurden in der FraminghamHeart-Studie evaluiert. Dazu zählen Alter (über 40 Jahre bei Männern und über 45 Jahre bei Frauen), männliches Geschlecht, positive Familienanamnese, Rauchen, Bluthochdruck, Diabetes, Adipositas, Hypercholesterinämie und Bewegungsmangel (Torpy et al., 2009).

Calciumplaques können sich in der Intima oder Media der Gefäßwand bilden. Pathologisch unterscheidet man die drei Arterioskleroseformen Atherosklerose, Arteriolo-sklerose und Mönckeberg-Mediasklerose (Böcker et al. 2004):

Die Artherosklerose als häufigste Erscheinungsform beschreibt eine Verdickung der Gefäßintima größerer und mittelgroßer Arterien. Intimaverkalkung kleiner Arterien

wird Arteriosklerose genannt. Bei der Mönckeberg-Mediasklerose bilden sich Kalkablagerungen in der Media.

1.3.2 Dystrophe kardiale Verkalkung (DCC) im Mausmodell

Da die Ausprägung der Gefäßverkalkung in bestimmten Inzucht-Mausstämmen genetisch determiniert ist, dienen Mäuse als bewährtes Modell in der Arterioskleroseforschung. Die Mauslinien DBA/2, BALB/c, 129S1/SvJ und C3H/He entwickeln mit steigendem Alter spontan eine Verkalkung der Arterien und des Herzgewebes, die sogenannte DCC (*engl. dystrophic cardiac calcification*). DCC kann aber auch frühzeitig bei jungen Mäusen durch Hormonbehandlung, fettreiche Diät, Zytomegalie- oder Coxsackie-Virus-Infektionen und durch Kryopexie des Myokards induziert werden (Brunnert, 1997)(Eaton et al., 1978)(Everitt et al., 1988)(Gang et al., 1986).

DCC ist genetisch determiniert und mit den *Dyscalc-loci 1-4* der Chromosomen 7, 4, 12 oder 14 assoziiert (Aherrahrou et al., 2008). Der *Dyscalc-locus 1* auf dem Chromosom 7 stellt den DCC-hervorrufenden Hauptlocus dar, wobei die anderen drei Loci nur das Ausmaß der Erkrankung beeinflussen (Ivandic et al., 2001). *Abcc6* auf dem proximalen Chromosom 7 ist das ursächliche Hauptgen für DCC (Meng et al., 2007).

1.3.3 In vitro Modell zur Gefäßverkalkung

Zellen mit Differenzierungspotenzial, die in vivo an der arteriellen Verkalkung beteiligt sind, können auch in der Zellkultur über externe Stimuli zur Verkalkung gebracht werden. Zu diesen in vitro verwendeten Zelllinien gehören glatte Muskelzellen wie VSMC (*vascular smooth muscle cells*) aus Rindern oder HASMC (*human aortic smooth muscle cells*) und mesenchymale Stammzellen der Linie C3H10/T1/2 (Wada et al., 1999)(Atkinson et al., 1997). Durch Mediumzusätze wie anorganisches Phosphat kann eine osteogenetische Zelldifferenzierung induziert werden, sodass die Zellen in der Lage sind Mineralsubstanz zu synthetisieren (Steitz et al., 2001)(Jian et al., 2015).

1.4 Pathophysiologie der Gefäßverkalkung

Arteriosklerose ist multifaktoriell bedingt und entsteht durch das Zusammenwirken metabolischer, inflammatorischer und genetischer Faktoren (Demer and Tintut 2014). Metabolische Einflüsse überwiegen z.B. bei Patienten mit chronischem Nierenversagen, Diabetes mellitus oder bei Osteolysen. Die Inflammatorische Intimaverkalkung bei der

Arteriosklerose wird durch Risikofaktoren wie Übergewicht, Rauchen und Bluthochdruck gefördert (Hackam et al., 2003). Durch angeborene genetische Mutationen entwickeln Patienten mit den Erkrankungen PXE (Pseudoxanthoma elasticum) und GACI (*engl. General arterial calcification of infancy*) bereits in jugendlichem Alter Gewebe- und Gefäßverkalkungen (Uitto et al., 2014)(Ferreira et al., 1993).

1.4.1 Gefäßverkalkung als „response to injury“

Die Mechanismen der Arterioskleroseentstehung sind komplex und die Verbindungen zwischen den beteiligten Zellsystemen noch nicht vollständig geklärt. Risikofaktoren wie Hyperlipidämie, Bluthochdruck, Rauchen und chronische Entzündung verursachen eine endotheliale Dysfunktion (Munro and Cotran, 1988). Die LDL-Akkumulation in der Gefäßintima initiiert über die Migration von Makrophagen und T-Lymphozyten eine lokale Entzündungsreaktion. Makrophagen phagozytieren das oxidierte LDL und differenzieren zu Schaumzellen. Die Ausschüttung von Zytokinen fördert die Einwanderung glatter Muskelzellen (Gerrity, 1981). Eine Transformation dieser glatten Muskelzellen in einen osteoblastischen Phänotyp führt schließlich zur Mineralisierung der Matrix (Byon et al., 2008).

1.4.2 Genetische Faktoren

1.4.2.1 Das Gen *Abcc6*

Ein bei den unter 1.3.2 aufgeführten Inzucht-Mausstämmen natürlicher Weise vorhandener Polymorphismus des Gens *Abcc6* im Dyscalc-Locus 1 konnte als Auslöser für dystrophe kardiale Verkalkung (DCC) identifiziert werden (Aherrahrou et al., 2008). Durch *in silico* Genotyp-Analysen gelang es Korff et al 2006 und Aherrahrou et al 2007 den Dyscalc 1-Locus weiter einzugrenzen. Rechenanalysen am Computer mit den bekannten Genomsequenzen von DCC-resistenten und DCC-prädisponierten Mausstämmen, sogenanntes *In silico mapping*, ermöglichten es die genetischen Loci zu identifizieren, in denen sich die Mausstämme im Dyscalc 1-Locus unterscheiden. In der eingegrenzten Region konnten Anteile des Gens *Abcc6*, die Gene EMP3 und BC013491 identifiziert werden. Nur kurze Zeit später gelang es Meng et al. (2007) durch QTL-Analysen und positionales Klonen in transgenen Mäusen *Abcc6* als kausales Gen für DCC zu bestätigen.

Das Gen *ABCC6* liegt beim Menschen auf dem Chromosom 16 und kodiert das Protein MRP6 (engl. *multidrug resistance-associated protein*) eines Membrantransporters in Leber und Niere. Ein durch Genmutationen entstandener Funktionsverlust des ABCC6-Transporters führt zu den Erkrankungen Pseudoxanthoma elasticum (PXE) und *general arterial calcification of infancy* (GACI) beim Menschen und der dystrophen kardialen Verkalkung (DCC) bei der Maus (Meng et al. 2007).

Abcc6 gehört zu einer Familie von 49 verschiedenen ABC-Transporter (engl.: *ATP-binding cassette*) (Tarling et al., 2013). Bisher konnte über *in-silico* Methoden die Struktur des Abcc6-Transporters und seine Substrate nur teilweise entschlüsselt werden. Der Transporter ist aus 17 transmembranären Helices aufgebaut, die in drei Domänen angeordnet sind und besitzt zwei Substratbindetaschen (Higgins, 1992)(Hosen et al., 2014).

Das Protein des ABCC6-Transporters ist hauptsächlich in der basolateralen Hepatozytenmembran in der Leber und in den proximalen Nierentubuli lokalisiert, wird in geringem Maße aber auch in anderen Organsystemen wie dem Gastrointestinaltrakt und der Lunge exprimiert (Viola Pomozi, 2013). In Milz, Hoden, Harnblase, Herz, Gehirn und Rachenmandeln konnte bisher keine MRP6-Expression detektiert werden (Kool et al., 1999). Über einen noch unbekannten Mechanismus wird über den ABCC6-Transporter in der Leber ATP freigesetzt, das dann über die hepatische Esterase 1 (ENPP1, engl.: *ectonucleotide pyrophosphatase-phosphodiesterase*) in anorganisches Pyrophosphat (PPi) und AMP gespalten wird (Jansen et al., 2014).

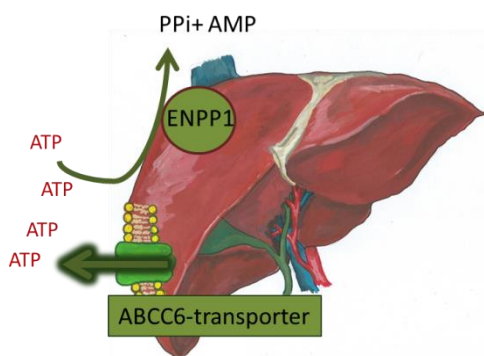


Abbildung 1.1: Funktion des ABCC6-Transporters

Der ABCC6-Transporter setzt in der Leber ATP frei, das durch die ENPP1 zu anorganischem Pyrophosphat (PPi) und Adenosinmonophosphat (AMP) umgesetzt wird.

1.4.2.2 Pseudoxanthoma elasticum (PXE)

Pseudoxanthoma elasticum (PXE) ist eine seltene, autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, bei der es durch Mutationen im *ABCC6*-Gen zur progressiven Verkalkung von elastischen Fasern kommt (Jiang et al., 2009). Patienten zeigen einen komplexen Phänotyp aus Symptomen unterschiedlicher Ausprägung, die Augen, Haut und das kardiovaskuläre System betreffen (Uitto et al., 2014). Bereits ab dem frühen Erwachsenenalter kommt es durch eine Mineralisierung der Bruch'schen Membran zwischen der Choroidea und dem retinalen Pigmentepithel des Auges zunehmend zu einer Einschränkung des Sehvermögens. Die Haut in Nacken, Axilla und Kniekehle zeigt typische gelbliche Papeln. Aneurysmenbildung erhöht das Schlaganfallrisiko und die frühe Arterioskleroseentstehung führt zu Herzinfarkten und pAVK (Lefthériotis et al., 2013). Erst kürzlich wurde ATP als Substrat des *ABCC6*-Transporters identifiziert und ein Zusammenhang zwischen dem Funktionsverlust des *ABCC6*-Transporters bei PXE und niedrigen Spiegeln von anorganischem Pyrophosphat (PPi) im Blutplasma festgestellt (Jansen et al., 2013). Ein Fehlen des Mineralisierungs-Inhibitors PPi führt vermutlich zu der ausgeprägten Gewebeverkalkung bei PXE-Patienten. Der Therapieerfolg durch PPi-Substitution wurde bisher allerdings nur im Mausmodel nachgewiesen (Li et al., 2016).

1.4.2.3 General arterial calcification of infancy (GACI)

GACI ist eine seltene autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung mit verschiedenen Mutationen im *ENPP1*- oder *ABCC6*-Gen. Eine Verkalkung elastischer Fasern im gesamten Körper und fibrotische Intimaproliferation führen zu Gefäßverschlüssen (Nitschke et al., 2012). Bereits Neugeborene leiden unter schweren angeborenen Herzfehlern, Bluthochdruck und ischämischer Herzkrankheit. Nur wenige der Betroffenen erreichen das Kleinkindalter. Behandlungsansätze mit Bisphosphonaten werden zur Zeit in Studien erprobt (siehe Kapitel 4.2.3)(Ferreira, Ziegler, and Gahl 2014).

1.5 Verbindung zwischen Verkalkung im Knochen und Gefäßsystem

Die molekularen Verkalkungsmechanismen bei der Arteriosklerose ähneln denen der Knochenmineralisierung (Kurabayashi, 2016). Knochenumbau ist wie die Gefäßverkalkung ein aktiv durch Zellen und deren Proteine regulierter Prozess aus dem Zusammenspiel von Aktivatoren und Inhibitoren. Bei der vaskulären Verkalkung herrscht jedoch ein Übergewicht an Aktivatoren und Fehlen von Inhibitoren der Mineralisierung (Wu et al., 2013).

Zunächst differenzieren eingewanderte glatte Muskelzellen in einen osteogenetischen Phänotyp. Die arterielle Verkalkung geht mit der Ablagerung von knochentypischen, die Mineralisierung regulierenden Proteinen einher. Diese Schlüsselmoleküle der Knochenzellen wie Matrix GLA Protein (MGP), Osteocalcin (OC), RUNX2, Osteopontin (OPN), *Bone morphogenic protein* (BMP-2) und Alkalische Phosphatase (ALPL) spielen bei der artherosklerotischen Plaqueentstehung eine wichtige Rolle (Collin-Osdoby, 2004) (Schweighofer et al., 2016).

RUNX2 stellt den Schlüsselfaktor für die Knochendifferenzierung dar und initiiert die Entwicklung von mesenchymalen Osteoblasten-Vorläuferzellen (Komori 2009). Die RUNX2-Expression wird bei der Verkalkung von glatten Muskelzellen verstärkt (Steitz et al. 2001). Osteoblastische und osteoklastische Marker wie ALPL, OC, RUNX2 und SOX9 werden im verkalkten Gewebe verstärkt exprimiert. Im Gegensatz dazu wird die Expression von MGP, Osteonectin (SPARC) und Osteoprotegerin (OPG) von verkalkten Muskelzellen herunterreguliert (Tyson et al., 2003a).

1.5.1 Das RANK/RANKL/OPG-Systems bei der Gefäßverkalkung

Sowohl die Mineralisierung von Knochen als auch von der Gefäßintima werden über das OPG/RANK/RANKL-System reguliert (D'Amelio et al., 2009). RANKL (engl. *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*) und fehlende Mineralisierungsinhibitoren wie Osteoprotegerin (OPG) führen zur Gefäßverkalkung (Demer and Tintut, 2014). Gerät das Verhältnis zwischen RANKL und OPG im Knochenumbau aus dem Gleichgewicht, kommt es zu schweren Erkrankungen des Skelettsystems wie Osteoporose oder Morbus Paget.

Im Knochen dient RANKL der Differenzierung, Aktivität und dem Überleben reifer Osteoklasten und wird von Osteoblasten und T-Zellen sezerniert (Collin-Osdoby, 2004). Durch bisher unbekannte Mechanismen beeinflusst RANKL auch die Verkalkung im Gefäßsystem über die Modulation der Immunantwort. RANKL bindet an den RANK-Rezeptor auf T-Zellen, die dann dendritische Zellen zur Zytokinproduktion anregen und folglich die Entzündungsreaktion bei der Gefäßverkalkung verstärken (Walsh et al., 2003). *In vitro* Experimente zeigten, dass RANKL die Verkalkung glatter Muskelzellen über die Stimulation von Makrophagen fördert (Deuell et al. 2012). Über die Bindung an RANK steigt die BMP-4 Produktion über den NF- κ B Signalweg (Panizo et al., 2009).

OPG verhindert durch die Blockierung aller RANKL-vermittelten Effekte die Osteoklastenentwicklung und somit die Knochenresorption. Der Fakt, dass OPG $-/-$ Mäuse schwere Osteoporose zeigen und spontan arterielle Verkalkungen entwickeln, zeigt, dass OPG auch bei der Plaqueentstehung im Gefäßsystem eine wichtige Rolle spielt (Bucay et al. 1998). *In vitro* verhindert OPG die Verkalkung glatter Muskelzellen (Di Bartolo et al., 2011). Im Immunsystem scheint es die B-Zell-Reifung und Antikörperbildung zu vermitteln (Yun et al., 2001).

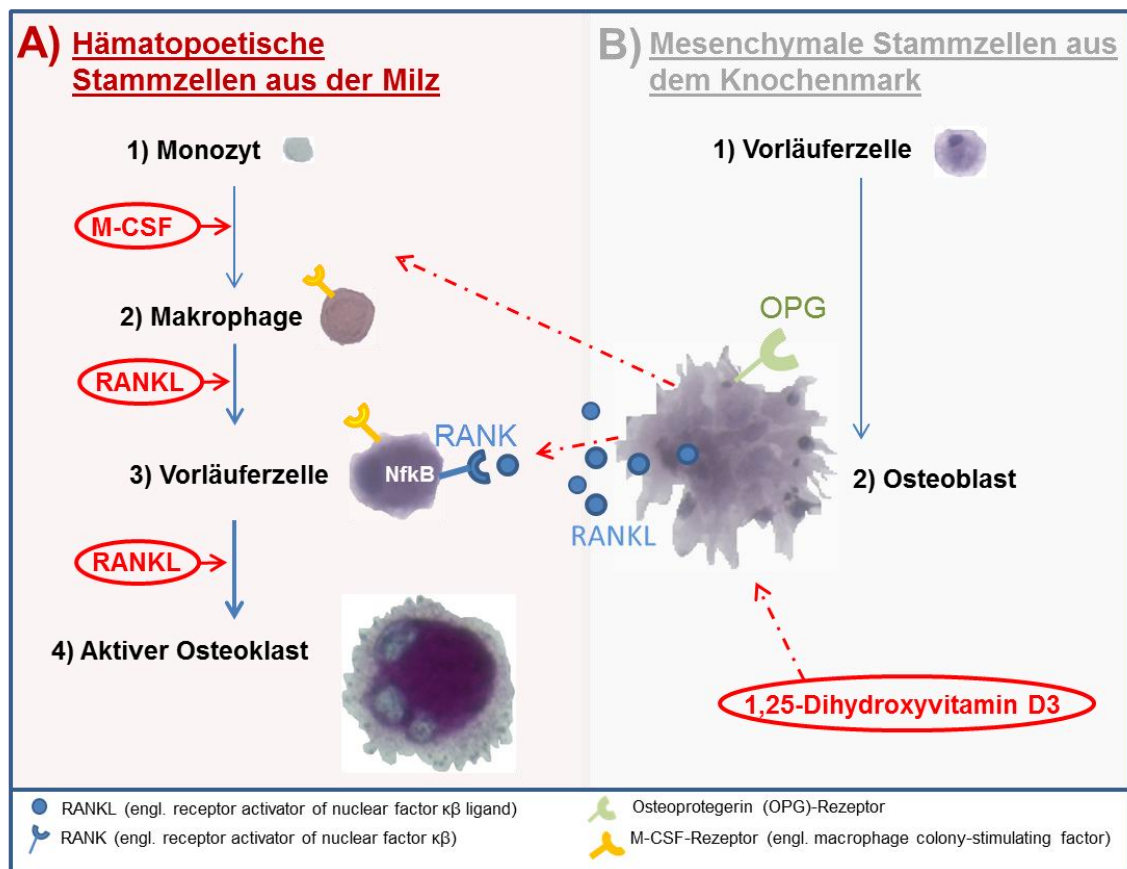


Abbildung 1.2: Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten

Hämatopoetische Vorläuferzellen differenzieren durch von Osteoblasten sezerniertes M-CSF und RANKL zu Osteoklasten. Osteoprotegerin (OPG) kann als Rezeptor auf Osteoblasten RANKL binden und so die Bildung reifer Osteoklasten inhibieren. Die Osteoblastenreifung aus mesenchymalen Stammzellen und der Knochenaufbau werden durch Vitamin D angeregt (Liu et al., 2010).

1.6 Die Rolle von Phosphat bei der Gefäßverkalkung

1.6.1 Anorganisches Phosphat (Pi; *engl. inorganic phosphate*)

Beim Menschen können hohe Serumphosphatspiegel im Blut metastatische arterielle Verkalkung auslösen, da anorganisches Phosphat promineralisierend wirkt (Alfrey and Ibels, 1978). Anhand dessen wurde eine mittlerweile bewährte *in vitro* Methode zur Erforschung der Gefäßverkalkung entwickelt, die auch in dieser Arbeit angewendet wurde. Mit Phosphatkonzentrationen über 1,4 mmol/l kann die Zellverkalkung induziert werden (Acharya et al., 2014). Die dabei am häufigsten verwendeten Phosphate sind Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) und β -Glycerophosphat. Glatte Muskelzellen können das Phosphat über einen Natrium-abhängigen Transporter direkt aufnehmen. Dadurch differenzieren sie zu osteoblasten-ähnlichen Zellen, indem sie genetische Marker wie *OC* und *RUNX2* hochregulieren (Steitz et al., 2001). Auch unter dem Einfluss von β -Glycerophosphat exprimieren glatte Muskelzellen Osteoblastenmarker wie *ALPL* und *OPN* und können mineralisierte Matrix synthetisieren (Shioi et al., 1995).

1.6.2 Anorganisches Pyrophosphat (PPi; *engl. inorganic pyrophosphate*)

PPi ist der natürliche “Wasserenthärter” unseres Körpers, inhibiert Gewebeverkalkung und reguliert die Knochenmineralisierung (Orriss et al., 2016).

Bei PXE-Patienten, *Abcc6* $-/-$ Mäusen und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz können reduzierte PPi-Plasmalevel im Blut gemessen werden (Jansen et al., 2014) (O'Neill et al., 2010). Durch den fehlenden inhibitorischen Effekt von PPi zeigen Patienten unterschiedliche Formen heterotoper Gewebeverkalkung. Grundlage der PPi-Entstehung bildet von Zellen freigesetztes ATP, welches durch die ENPP1 (*ectonucleotide phosphodiesterase*) zu PPi hydrolysiert wird. Eine ENPP1-Insuffizienz, wie bei der infantilen arteriellen Verkalkung (GACI), verursacht eine arterielle Mediaverkalkung, die den ganzen Körper betrifft (Towler, 2005).

PPi kann durch die *tissue nonspecific alkaline phosphatase* (TNAP) zu Pi hydrolysiert werden, das wiederum promineralisierend auf Zellen wirkt (Siehe Abbildung 4.1). *Tnap*-Knock-out-Mäuse zeigen Hypophosphatämie mit erhöhten PPi-Plasmaspiegeln und reduzierter Knochenmineralisierung (Vaingankar et al., 2004). Sowohl TNAP als auch ENPP1 sind in der Plasmamembran verkalkender Zellen wie Osteoblasten, Chondrozyten und glatten Muskelzellen exprimiert (Harmey et al., 2004) (Stefan et al., 2005).

1.6.3 Bisphosphonate (BP)

Bisphosphonate sind stabile PPi-Strukturanaloga, die im Körper keiner Hydrolyse unterliegen und bereits seit über 40 Jahren zur Osteoporosebehandlung eingesetzt werden (Russell, 2011). Die einzelnen Substrate unterscheiden sich in ihren pharmakologischen Eigenschaften. Anhand der Struktur werden Bisphosphonate in 2 Gruppen eingeteilt:

- Bisphosphonate ohne Stickstoff: Etidronat, Clodronat, Tiludronat
- Bisphosphonate mit Stickstoff: Bisphosphonate mit einem basischen Heterocyc-lus (Risedronat, Zoledronat), Aminobisphosphonate (Pamidronat, Alendronat), am Stickstoff substituierte Aminobisphosphonate (Ibandronat)

Stickstoffhaltige BPs inhibieren die Farnesyl-Pyrophosphat-Synthase der Cholesterolsynthese. BPs ohne Stickstoff werden in ATP-Analoga umgewandelt und hemmen ATP-abhängige intrazelluläre Enzyme (Cattalini et al., 2012). Über die Endstrecke der Inhibierung der HMG-CoA Reduktase mindern alle Bisphosphonate die Aktivität von Osteoklasten und verhindern so den Knochenabbau. In Osteoblasten steigern Bisphosphonate die OPG-Expression und senken die M-CSF Sekretion. Auch dieser Mechanismus trägt zur Hemmung der Osteoklastogenese bei (Xu et al., 2013). Experimente zeigten, dass Bisphosphonate auch unabhängig vom Knochenmetabolismus direkt die Verkalkung von glatten Muskelzellen *in vitro* verhindern können (Lomashvili et al., 2009).

Aktuell wird eine Bisphosphonatsubstitution als Therapieoption bei Erkrankungen mit nachweislich niedrigen Serum-PPi-Werten wie PXE und GACI diskutiert. Dem potenziell protektiven Effekt von Bisphosphonaten auf die vaskuläre Verkalkung stehen jedoch die zum Teil schweren Nebenwirkungen entgegen. Bei kurzzeitiger oraler Einnahme von Bisphosphonaten können Reizungen der Ösophagusschleimhaut, Hypokalzämie, entzündliche Augenreaktionen und Hautausschläge auftreten. Unter intravenöser Applikation werden unter anderem Fieber und grippeartige Symptome mit Erhöhung der Entzündungsmarker im Blut, Leberenzymerrhöhung, akute Verschlechterung der Nierenfunktion und Muskelschmerzen beobachtet (Orozco et al., 2012). Langzeitfolgen stellen Kieferosteonekrose oder pathologische Oberschenkelfrakturen dar (Xu et al., 2013).

1.7 Zielsetzung und Fragestellung der Doktorarbeit

Gewebeverkalkung tritt bei verschiedenen Erkrankungen wie Arteriosklerose, Diabetes mellitus und chronische Niereninsuffizienz auf. Ist eine Verkalkung Folge von Gewebezündung oder – nekrose, wird sie als dystrophe Verkalkung bezeichnet.

ABCC6 ist ein Transporter in der Leber, der dystrophe Verkalkung über die Sekretion von PPi verhindert (Jansen et al., 2013). Es ist bekannt, dass Polymorphismen im *ABCC6*-Gen und ein daraus resultierender Funktionsverlust des Transporters zu den pathologischen Verkalkungen bei Patienten mit PXE und GACI sowie zur dystrophon kardialen Verkalkung (DCC) bei der Maus führen. Alle diese Erkrankungen gehen mit einer starken Gewebeverkalkung einher und dienen somit als gute Forschungsgrundlage für die Pathomechanismen der Gefäßverkalkung. Die Auswirkung eines funktionellen *Abcc6*-Verlustes auf den gesamten Organismus wurde in dieser Arbeit im Mausmodell und *in vitro* untersucht.

Der Inzucht-Mausstamm C3H/He (C3H) hat von Natur aus einen fehlerhaften *Abcc6*-Transporter und entwickelt somit DCC und PXE-ähnliche Verkalkungsmuster. Der Mausstamm C57BL/6 (B6) hingegen hat ein intaktes *Abcc6*-Gen und wurde als Kontrollgruppe herangezogen.

Bei der Entstehung der DCC sind wie bei der Arteriosklerose metabolische, inflammatorische und genetische Einflussfaktoren beteiligt. Die Zusammenhänge zwischen diesen drei Systemen bei der DCC soll in dieser Arbeit näher beleuchtet werden:

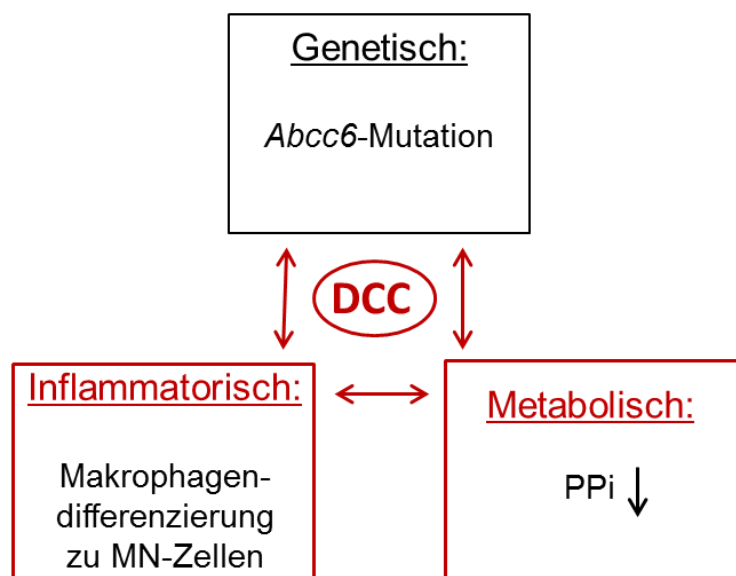


Abbildung 1.3: Genetische, inflammatorische und metabolische Einflussfaktoren bei der DCC

- Genetisch: Eine Mutation im *Abcc6*-Gen führt zu einem fehlerhaften *Abcc6*-Transporter in der Leber.
- Verkalkung ist ein entzündliches Geschehen: Die *in vivo* gewonnenen Ergebnisse zeigten, dass sowohl bei Mäusen mit DCC als auch bei der Kontrollgruppe nach freeze-thaw injury eine Makrophageninfiltration im nekrotischen Herzgewebe zu beobachten ist (Sowa et al., 2013). Bei dem DCC-prädisponierten Mausstamm konnte allerdings im Gegensatz zur Kontrollgruppe eine Erhöhung osteogenetischer Marker wie *Ctsk*, *Runx2*, *Trap*, *Nfkb* und *Opn* gemessen werden. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Rolle der Makrophageninfiltration bei der Entstehung der DCC und die osteogenetische Differenzierung zu Multinukleären-Zellen (MN-Zellen) *in vitro* zu untersuchen. Hierzu wurden aus der Milz Monozyten isoliert und mittels M-CSF und RANKL zu Osteoklasten differenziert.
- Metabolischer Einfluss von inorganischem Pyrophosphat auf DCC: Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass der *Abcc6*-Transporter über die Erhöhung der Pyrophosphatlevel im Blut Gewebeverkalkung verhindert (Jansen et al., 2013). Deshalb wurde der Einfluss von Pyrophosphat und anderen Bisphosphonaten auf die Bildung von MN-Zellen *in vitro* und DCC *in vivo* untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemisches Material

2.1.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Verwendung	Hersteller
Adenosine 5'-phosphosulfate sodium salt (APS)	PPi-Messung	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas)
Anti-Maus CD68 (0,5mg/ml)	Immunfärbung	Biolegend
ATP-Sulfurylase Yeast Recombinant	PPi-Messung	ProSpec-Tany TechnoGene (Nes Ziona, Israel)
Azeton	Fixierung	Merck (Darmstadt, Deutschland)
β -Glycerophosphat-Dinatriumsalz-Pentahydrat	Verkalkungsinduktion Zellkultur	Sigma- Aldrich (St. Louis, USA)
<u>Bisphosphonate</u> Alendronate Sodium Trihydrate, Disodium Etidronate Hydrate Disodium Pamidronate Hydrate Sodium Ibandronate Disodium Tiludronate Zoledronic Acid Monohydrate	Zellkultur	TCI Deutschland GmbH
Calcein	Färbung	Sigma- Aldrich (St. Louis, USA)
DAPI	Färbung	Roche (Basel, Schweiz)
Destilliertes Wasser (Ampuwa Spüllösung)	Färbung, Verdünnung	Fresenius Kabi (Bad Homburg, Germany)
DNA Ladder plus 100bp	DNA-Größenstandard für Gelelektrophorese	Peqlab by VWR (Radnor, Pennsylvania, USA)
DNase I (RNase Free DNase Set)	RNA-Isolation	QIAGEN GmbH (Hilden, Deutschland)
dNTP: 100mM Stocklösung dATP/dCTP/dGTP/dTTP angesetzt zu 4mM Gebrauchslösung	Reverse Transkription	Promega (Madison, Wisconsin, USA)
Esel Anti-Raten IgG (Sekundärer Antikörper Alexa Fluor 488)	Immunfärbung	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

Formaldehyd (37%)	Fixierung von Zellen	Sigma- Aldrich (St. Louis, USA)
Gelantine (Schweinehaut Typ A) Verdünnung in PBS auf 0,1% (w/v)	Kultur HASMC	Sigma- Aldrich (St. Louis, USA)
HCl (Salzsäure) 1N Stocklösung mit destilliertem Wasser zu 0,6N Gebrauchslösung verdünnt	Calciumbestimmung	Carl-Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Hepatocyte Wash Medium	Hepatozytenisolation	Gibco by Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
HEPES (pH 7,4)	PPi-Messung	Sigma- Aldrich (St.Louis, USA)
Hexanukleotid Random-Primer	RT-PCR	Carl-Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Histopaque Gradient-1083	Monozytenisolation	Sigma- Aldrich (St. Luis, USA)
L-Ascorbat-Phosphat	Monozytenkultur	Sigma- Aldrich (St. Luis, USA)
LE Agarose	Gelelektrophorese	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Liver Digest Medium	Hepatozytenisolation	Gibco by Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Liver Perfusion Medium	Hepatozytenisolation	Gibco by Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
2-Mercaptoethanol (50mM-Lösung)	Makrophagen-Zellkulturmedium	Gibco by Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
2-Mercaptoethanol	RNA-Isolation	Merck (Darmstadt, Deutschland)
MgCl ₂	PPi-Messung	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
M-MLV Reverse Transkriptase (200U/μl) mit DTT 100mM Reaction buffer (5x)	RT-PCR	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Verkalkungsinduktor Zellkultur	Sigma- Aldrich (St. Luis, USA)
Paraformaldehyd 4% (v/v) in PBS	Fixierung von Zellen und Gewebe	Merck (Darmstadt, Deutschland)
PBS	Zellkultur	LONZA (Basel, Schweiz)

Penicillin/Streptomycin (10000 IE)	Zellkultur, Mediumzusatz	Biochrom by Merck (Darmstadt, Deutschland)
Rekombinantes Maus M-CSF	Monozytendifferenzierung	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Germany)
Rekombinantes Maus TRANCE (RANKL)	Makrophagendifferenzierung	Biolegend (San Diego, USA)
RiboLock RNase Inhibitor	RT-PCR	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Sodium pyrophosphate tetrabasic decahydrate/ anorganisches Pyrophosphat (PPi)	Zellkultur	Sigma- Aldrich (St. Luis, USA)
Tissue Freezing Medium	Gewebeschnitte	Leica tems (Wetzlar, Germany)
TritonX-100	Immunfärbung	Sigma- Aldrich (St. Luis, USA)
Trizol	RNA-Isolation	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Trypsin/EDTA 0,5%	Zellkultur	Gibco by Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
UltraCruz® Hard-set Mounting Medium	Eindecken Objektträger	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA)
ViaFect™ Transfection Reagent	Transfektion	Promega (Madison, Wisconsin, USA)

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien**2.1.1.2 Puffer und Lösungen**

Puffer	Verwendung	Zusammensetzung	Hersteller
Gelladepuffer	Gelelektrophorese	<u>Loading Dye:</u> 99% Formamid	Fluka by Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
		1 % Dextran Blau 80µl/ml 5x Sample Loading Buffer mit Bromphenolblau und Xylencyanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
		SYBR Green I (1:200 in DMSO) im Verhältnis 1:2 zum Loading Dye	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

1x TBE	Gelelektrophorese	100mM Tris Base 83mM Borsäure 1mM EDTA	Sigma- Aldrich (St. Louis, USA)
Waschpuffer	CD68- Immunfärbung	10mM TrisBase (Stock 1M pH 7,5) 100mM NaCl 0,05% Tween20 (59g/l)	Sigma- Aldrich (St. Louis, USA) Sigma- Aldrich (St. Louis, USA) Merck (Darmstadt, Deutschland)

Tabelle 2.2: Verwendete Puffer und Lösungen**2.1.1.3 Reagenzien-Kits**

Kit	Verwendung	Hersteller
Alkaline Phosphatase Kit, Leucocytes	Gewebefärbung	Sigma- Aldrich (St. Louis, USA)
BacTiter-Glo Kit	PPi-Messung	Promega (Madison, Wisconsin, USA)
Leukocyte Acid Phosphatase (TRAP)-Kit	Gewebefärbung	Sigma- Aldrich (St. Louis, USA)
Osteogenesis Quantitation Kit	Alazarin Red S Färbung	Chemicon® by Merck (Darmstadt, Deutschland)
PowerUp SybrGreen MasterMix	qPCR	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Proteome Profiler Array -Mouse Cytokine Panel A	Zytokinmessung im Zellmedium	R&D Systems (Minneapolis, USA)
qPCR™Core Kit for SYBR®Green I mit Taq Polymerase Hot Gold Star	qPCR	Eurogentec (Seraing, Belgium)
Randox-Calcium-Kit	Calciumbestimmung	Randox Laboratories LTD (Crumlin, Vereinigtes Königreich)
RNeasy® Plus Mini Kit (250)	RNA-Isolation	QIAGEN GmbH (Hilden, Deutschland)
TRACP & ALP double-stain Kit	Osteoklastenfärbung	Clontech- Takara Bio Company © (USA)

Tabelle 2.3: Verwendete Reagenzien-Kits

2.1.2 Technisches Material

2.1.2.1 Labormaterialien

Material	Verwendung	Hersteller
384-Well Platte Framestar	PCR-Platte	Biolab products (Bebensee, Deutschland)
Zellkulturplatten	6-Well	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
	12-/24-Well	Nunc by Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
	48-/96-Well	Greiner Cellstar by Merck (Darmstadt, Deutschland)
8-Well Chamber-Slide Lab-Tek II	Gewebekulturschale	LAB-TEK by Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Biosphere Filterspitzen	Pipettierung	Sarstedt(Nümbrecht, Deutschland)
Centrisart® I centrifugal ultrafiltration unit 300000 MWCO	Filter zur Blutaufbereitung	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
CRYSTAL optical clear qPCR-Film	qPCR-Plattenabdeckfolie	Biolab products (Bebensee, Deutschland)
Edelstahlkugeln (7mm)	RNA-Isolation aus Gewebe	QIAGEN GmbH (Hilden, Deutschland)
Falcon® 40µm Cell Strainer	Monozytenisolation	Corning GmbH (Corning, USA)
Falcon® 70µm Cell Strainer	Hepatozytenisolation	Corning GmbH (Corning, USA)
Falcon-Tubes (15, 50ml)	Probenaufbewahrung	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Hämatokrit-Kapillaren 75mm/60µl	Blutentnahme Maus	Hirschmann Laborgeräte (Gundelsheim, Deutschland)
Kulturflaschen (T75) mit gelber Kappe	Zellkultur	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Microvetten Tri-Kalium-EDTA	Blutentnahmeröhrchen Maus	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Mikroliter-Pipetten Reference/Research plus	Pipettierung	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Objektträger SuperFrost Plus©	Herzschnitte	Menzel by Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Reaktionsgefäße (0,2ml, 0,5ml, 1,5 ml, 2ml)	Probenaufbewahrung	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Serologische Pipetten (2ml, 5ml, 10ml, 25 ml)	Pipettierung	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Sterilfilter Minisart-plus mit CA-Membran und Glasfaservorfilter (0,2µm)	Filtrierung des Mausplasmas und der Bisphosphonat-Gebrauchslösungen	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Streifenplatte 96-Well, transparent, flacher Boden	Photometrische Messung	Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich)
Spritzen (5ml, 10ml)	Monozyten-/Hepatozytenisolation	BD (Franklin Lakes, USA)
UV-Küvette mikro (70µl)	Messung RNA-Konzentration	Brand (Wertheim, Germany)
Vivaspin 500 centrifugal concentrators 300000MWCO	Filter zur Blutaufbereitung	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Venenverweilkatheter Neoflon 26G	Hepatozytenisolation	BD (Franklin Lakes, USA)

Tabelle 2.4: Verwendete Labormaterialien**2.1.2.2 Geräte**

Gerät	Model	Firma
Feinwaage	SCOUT® PRO	Ohaus® (Nänikon, Schweiz)
Fluoreszenzmikroskop	BZ-9000 (Biorevo)	Keyence (Osaka, Japan)
Gefrierschrank -20°C	Computer Control Freezer	Bosch (Gerlingen, Deutschland)
Gel-Imager	Molecular Imager® Gel Doc™ XR System	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Inkubationsschrank Zellkultur	hera cell	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Invertmikroskop	Wilovert A	Helmut Hund GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Kryotom	CryoStarNX50	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Kühlschrank	Comfort	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Magnetrührer	COMBIMAG RCH	IKA (Staufen im Breisgau, Deutschland)
Mikroplatten Reader	Synergy HT	BioTek (Winooski, VT, USA)
Mikroskop	Stereo 10446318 0,5x	Leica (Wetzlar, Deutschland)
PCR-Cycler	labcycler	Sensoquest Biomedizinische Elektronik (Göttingen, Deutschland)

Photometer	BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Elektronische Pipettierhilfe	Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte (Gundelsheim, Deutschland)
qPCR-Cycler	TaqMan (7900 HT Fast Real-Time PCR)	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Stickstoff-Probenlagerungssystem	Locator PLUS	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Thermoblock	Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Wasserbad	AQUAline AL12	Lauda (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Zählkammer	Neubauer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Sterile Werkbank (Laminar FlowHood)	Sicherheitswerkbank der Klasse II (DIN EN 12469)	Kojair Tech Oy (Vilppula, Finnland)
Zentrifuge	Varifuge 3.0R (r = 19,4)	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge	5415R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge	5702R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Tabelle 2.5: Verwendete Geräte

2.1.2.3 Programme und Datenbanken

Programm	Weblink	Verwendung
Primer3 (Open Source Software)	primer3.ut.ee/	Design von Oligonukleotidprimer
S.D.S. 2.4.		Auswertung der semiquantitativen real-time PCR
GraphPad Prism 6		Statistische Auswertung, Grafiken
Microsoft Office Home		Texte und Tabellenkalkulation

Tabelle 2.6: Verwendete Programme und Datenbanken

2.1.3 Biologisches Material

2.1.3.1 Mauslinien

2.1.3.1.1 C57BL/6NCrlBr (B6-Mausstamm)

Die Mäuse wurden von Charles River (Sulzbach-Rosenberg, Germany) bezogen. Es handelt sich um einen DCC-resistenten Inzucht-Mausstamm.

2.1.3.1.2 C3H/HeJ (C3H-Mausstamm)

Die Mäuse wurden ebenfalls von Charles River (Sulzbach-Rosenberg, Germany) bezogen. Durch eine Mutation des *Dyscalc 1* Locus im *Abcc6*-Gen ist dieser Inzucht-Mausstamm zur Entwicklung einer dystrophen kardialen Verkalkung (DCC) prädisponiert (Aherrahrou et al., 2008).

2.1.3.1.3 Kongene B6.C3HDyscalc1 (Cg1-Maus)

Diese DCC-prädisponierten Mäuse wurden in unserem Labor durch die Kreuzung der beiden zuvor genannten Inzuchtstämme C57BL/6 und C3H/He generiert. F1-männliche Mäuse wurden mit weiblichen C57BL/6-Mäusen über 10 Generationen zurückgekreuzt. Die so entstandene Mauslinie hat den genetischen Hintergrund der DCC-resistenten C57BL/6, enthält allerdings den *Opn*-Locus auf Chromosom 5 und ein Segment der C3H/He-Maus auf dem proximalen Chromosom 7 (Aherrahrou et al., 2004).

2.1.3.2 Zelllinien

2.1.3.2.1 C3H/10T1/2-Zellen

Für die *in vitro* Verkalkungsversuche wurden mesenchymale Stammzellen der Linie C3H/10T1/2 Clone 8 (ATCC®, CCL-226) aus Mausembryonen der C3H-Linie verwendet. Als mesenchymale Stammzellen zeigen sie eine fibroblastenartige Morphologie und haben das Potenzial in Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten und Myoblasten zu differenzieren. Über externe Stimuli kann durch die Differenzierung in einen osteoblastenähnlichen Phänotyp eine Zellverkalkung induziert werden (Jian et al., 2015).

2.1.3.2.2 C2C12- Zellen

Diese ursprünglich von YAFFE und SAXEL (1977) etablierte Myoblasten-Zelllinie wurde aus dem Skelettmuskel von C3H/He-Mäusen gewonnen. Der in dieser Arbeit

verwendete, von Blau et al (1983) produzierte, Subklon C2C12 wurde über die Firma ATCC® (CRL-1772™) bezogen.

2.1.3.2.3 HASMC (engl. *human aortic smooth muscle cells*)

Die humanen Aorten-Glattnuskelzellen wurden aus den plaquefreien Regionen menschlicher Aorten gewonnen und von der Firma Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Übersicht über den experimentellen Ablauf

Um den experimentellen Ablauf der Arbeit zu verdeutlichen, werden im Folgenden die Methoden kurz im Zusammenhang mit dem Thema dargestellt. Zur Erforschung der zugrundeliegenden Pathomechanismen der dystrophen kardialen Verkalkung wurden folgende experimentelle Versuchskomplexe verwendet:

- Optimierung des Zellkultursystems zur Verkalkungsinduktion von C3H/10T1/2-Zellen mit NaH_2PO_4
- Rolle Metabolischer Stoffwechselprodukte bei der dystrophen kardialen Verkalkung (DCC):
 - Einfluss von Mausserum auf die Verkalkung von C3H/10T1/2-Zellen
 - Überexpression von Maus-Abcc6-Varianten in C3H/10T1/2-Zellen und Mediumkonditionierung → Einfluss des konditionierten Abcc6-Mediums auf die Verkalkung von C3H/10T1/2-Zellen *in vitro*
 - Wirkung von anorganischem Pyrophosphat (PPi) auf die Verkalkung von C3H/10T1/2-Zellen
- Kalkbildung bei der DCC in der Maus ist ein entzündliches Geschehen:
 - TRAP- und ALPL-Färbung von Herzgewebe nach Kälteverletzung
 - RNA-Isolation und qPCR von Herzgewebe nach Kälteverletzung
 - Monozytenisolation aus der Milz und Differenzierung zu Osteoklasten
 - Messung der Zytokinsekretion von B6- und C3H-Makrophagen
 - Einfluss von konditioniertem Makrophagenmedium auf Verkalkung
 - Messung von Makrophagen- und Osteoklastenmarkern in der qPCR
 - Einfluss von Mausserum auf die Osteoklastendifferenzierung
 - Einfluss von anorganischem Pyrophosphat und Bisphosphonaten auf die Osteoklastendifferenzierung *in vitro*
 - Überprüfung der Genregulation während der Osteoklastendifferenzierung und Pyrophosphatbehandlung mittels qPCR
 - Bisphosphonatbehandlung nach Kälteverletzung am Herzen im Mausmodell

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Isolation aus Herzgewebe

Die aus der Maus entnommenen Herzen wurden zunächst mit einem Skalpell zerkleinert. Der nekrotische Bereich wurde vom gesunden Gewebe getrennt und pro Herz das gesunde und nekrotische Gewebe separat in je ein 2ml Tube überführt. Die Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C untergebracht.

Die RNA-Isolation wurde mit dem RNeasyPlus Mini Kit durchgeführt. Zusätzlich wurde vorher noch ein Trizol-Extraktionsschritt eingefügt, um die Übertragung von Proteinen, Fetten und anderen Verunreinigungen in die nachfolgenden Isolationschritte zu minimieren. Zum Probenaufschluss wurde zu jeder Probe 1ml Trizol gegeben und das Herzgewebe nach Zugabe von Stahlkugeln im TissueLyserLT für zweimal 30 min gekühlt homogenisiert. Anschließend wurden pro Probe je 200µl Chloroform hinzugegeben, die Proben gut geschüttelt, 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach 20min mit 15000 g bei 10°C zentrifugiert. Nach dieser Zentrifugation ist eine Phasentrennung in eine rote Phenol-Chloroformphase, eine Interphase und eine farblose wässrige Phase zu beobachten. Die wässrige Phase, in der sich die RNA befindet, wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Tube überführt. 70%iges Ethanol wurde im gleichen Volumen mit der Probe gemischt und 700µl davon in eine Spin Column des RNeasy Kits pipettiert. Nach dem Zentrifugieren für 2min bei 9300g wurde dieser Schritt mit dem restlichen Probengemisch wiederholt. Der Durchfluss wurde nach jedem Schritt verworfen. Die RNA blieb in der Membran der Säule gebunden. Anschließend erfolgte ein DNase I -Verdau. Hierzu wurden nach einem Waschschrift mit 350µl RW1-Puffer 10µl DNase I in 70µl RDD-Puffer direkt auf die Säulenmembran pipettiert und diese 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach wiederholtem Waschen mit 350µl RW1-Puffer und zweimaligem Waschen mit 500µl RPE-Puffer mit anschließendem Trocknen der Membran wird im letzten Schritt zum Herauslösen der RNA 100µl RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert und die Proben bei 9300g für 2 min zentrifugiert. Die RNA-Konzentration konnte nun photometrisch gemessen werden.

2.2.2.2 RNA-Isolation aus Zellen

Die RNA-Isolierung kultivierter Zellen erfolgte ebenfalls mit dem RNeasyPlus Mini-Kit. Hierzu wurden die kultivierten Zellen mit PBS gespült und mit RLTplus-Puffer

(10µl 2-Mercaptoethanol/ml Puffer) lysiert. Das Volumen wurde jeweils nach Größe des Kulturgefäßes angepasst (z.B. 600µl pro Well einer 48-Wellplatte).

Die weiteren Schritte erfolgten gemäß RNeasyPlus Mini-Kit-Anweisungen. Zur DNA-Entfernung wurden hier die im Kit enthaltenen gDNA-Eliminator-Säulen verwendet. Im letzten Schritt wurde die aufgereinigte RNA in 30µl RNase-freiem Wasser verdünnt, die RNA-Konzentration photometrisch gemessen und die Proben bei -80°C gelagert.

2.2.2.3 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

2µl der RNA wurden 1:50 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und die Konzentration mit einem Photometer (Absorptionsmaximum bei 260nm) gemessen. Danach wurden die Proben durch weiteres Verdünnen auf eine einheitliche Konzentration von 25ng/µl für Osteoklasten und 100ng/ µl für Gewebe gebracht.

2.2.2.4 Reverse Transkription

Zur späteren Durchführung der qPCR ist ein Umschreiben der mRNA in cDNA durch reverse Transkription notwendig.

Als erstes wurden hierfür je 10 µl RNA (25 bzw 100 ng/µl) 5 min bei 68°C inkubiert und die dadurch aufgefaltete RNA-Struktur durch sofortiges Abkühlen auf Eis erhalten. Dann wurde der Ansatz durch Zugabe des Mastermixes komplettiert:

4 µl 5x Reaction buffer
2 µl DTT 0,1M
1 µl M-MLV Reverse Transkriptase
1 µl dNTP-Mix 4mM
1 µl Hexanucleotid Primer Mix (~ 30pmol/µl)
1 µl Ribolock Transkriptase Inhibitor
10µl RNA

Das Gemisch wurde nun für eine Stunde bei 37°C inkubiert, damit sich die Hexamer-Primer an die Sequenz-komplementären RNA-Positionen anlagern können. Die Reverse Transkriptase nutzt diese Primer als Ansatzpunkt und beginnt die Synthese des entsprechenden cDNA-Stranges. Ein Erhitzen auf 95°C im letzten Schritt inaktivierte dann die Reverse Transkriptase. Die cDNA-Proben wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion

In der PCR werden DNA-Bereiche definierter Länge und Sequenz mit Hilfe des Enzyms Taq-DNA-Polymerase vervielfältigt. Dieser Prozess umfasst 20-40 Zyklen. Jeder Zyklus besteht aus folgenden 3 Schritten:

1. Denaturierung: Durch Erhitzen auf 95°C wird die Doppelstrang-DNA in Einzelstränge aufgetrennt.
2. Primerhybridisierung: Während der Hybridisierung bei 55°C können sich an das 5'- und das 3'-Ende des zu amplifizierenden Bereichs spezifische Oligonukleotide (Primer) anlagern. Diese Verbindung ist nur stabil, wenn Primer und DNA-Abschnitt komplementär sind.
3. DNA-Synthese: Anschließend werden diese Primer von einer DNA-Polymerase in Anwesenheit freier Desoxy-Nukleosid-Tri-Phosphate (dNTP's) bei einer Temperatur von ca. 72°C solange verlängert, bis eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 94°C den Prozess abbricht.

Durch die Wiederholung dieser drei Schritte verdoppelt sich theoretisch jedes Mal die Anzahl der kopierten DNA-Abschnitte. Die Reaktion wird automatisch beendet, wenn die dNTP's aufgebraucht sind oder die Funktion der Taq-Polymerase nachlässt.

2.2.2.6 Primerdesign

Für eine effiziente Amplifikation in der qPCR wurden die Primer so konstruiert, dass die Größe des replizierten DNA-Abschnitts 90-250 Basenpaare betrug. Um die Kontamination durch Amplifikation nichtspezifischer Sequenzen oder genomischer DNA zu vermeiden, wurde die Primersequenz so gewählt, dass sie 2 Exone überspannt. Als Referenz für die Primersequenz wurde die Datenbank von Ensembl verwendet (www.ensembl.org).

Die Primer wurden von der Firma Eurofins Scientific SE (Luxemburg, Luxemburg) synthetisiert und nach Lieferung mit diH₂O auf eine einheitliche Konzentration von 100µM gebracht. Für die Verwendung zur PCR wurde eine Mischung aus gleichen Teilen F- und R-Primern 1:20 mit deionisiertem Wasser verdünnt.

2.2.2.7 Optimierung der Oligonukleotidprimer

Die neu konstruierten Oligonukleotidprimer wurden zunächst über eine DNA-Verdünnungsreihe auf ihre Sensitivität und Spezifität getestet. Beispielhaft ist hier der Primer Kathepsin K (*Ctsk*) gezeigt. Die Dissoziationskurve im qPCR-Lauf mit dem

7900 HT Taqman dient zur Kontrolle der Primerspezifität und zeigt im Idealfall eine einzige Kurve. Werden Primerdimere oder unspezifische PCR-Produkte als weiterer Peak sichtbar, führt dies zur Ergebnisverfälschung, da Sybr Green I sich auch in diese Dimere einlagert und unspezifische Signale erzeugt. Nur Primer mit sauberem Signal und guter Sensitivität wurden nachfolgend für die Probenanalyse verwendet.

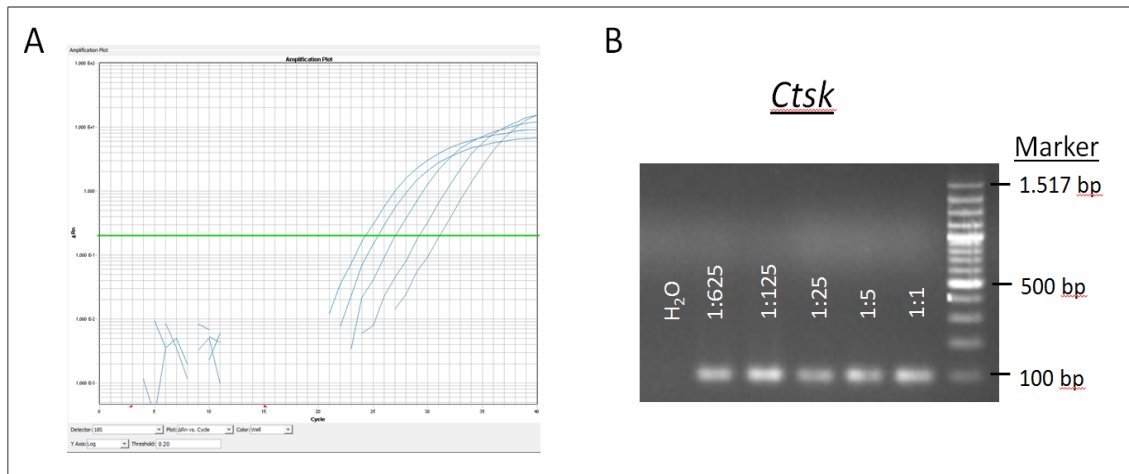


Abbildung 2.1: cDNA-Verdünnungsreihe einer Test-cDNA (Ausgangskonzentration 20 ng/μl) mit dem Primer Kathepsin K (*Ctsk*)

A) Ausschnitt aus dem qPCR-Analyseprogramm S.D.S. Der Ct-Wert steigt mit zunehmender Probenverdünnung an (von links nach rechts 1:1, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625). B) Die sichtbaren Einzelbanden in der Gelelektrophorese zeigen eine spezifische Primerbindung und Primerprodukte mit einer gewünschten Größe von 100bp. Eine Primerkontamination kann durch die fehlende Bande bei der Reaktion mit Wasser ausgeschlossen werden.

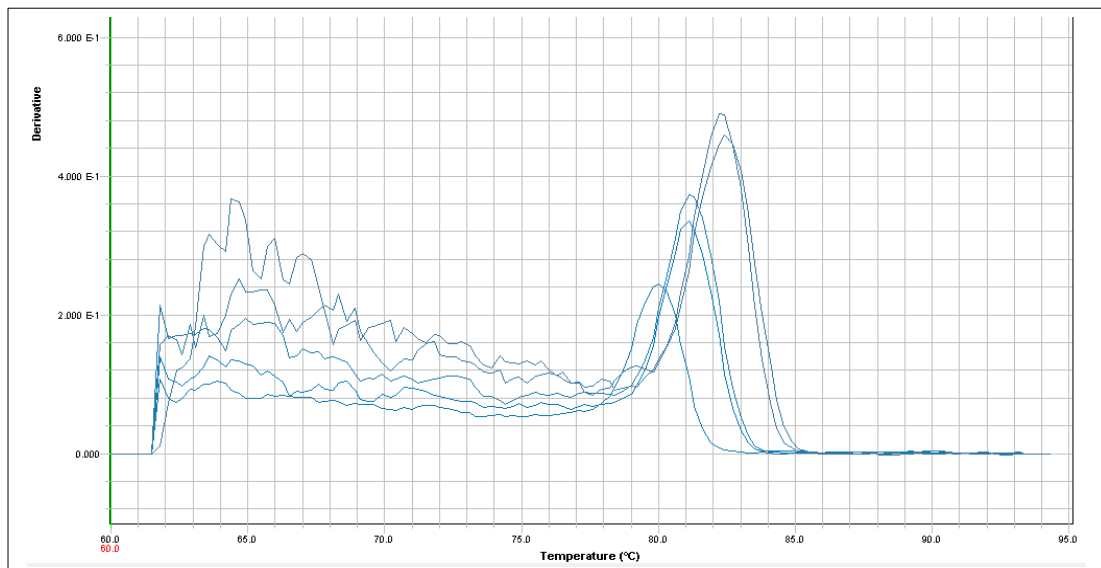


Abbildung 2.2: Ausschnitt aus dem qPCR Analyseprogramm S.D.S.

Gezeigt ist die Dissoziationskurve des Primers Kathepsin K: Der Peak bei einer Temperatur zwischen 80-85°C ist ein Indikator für die Spezifität des generierten PCR-Produktes. Mehrere verschiedene Produktsequenzen würden zu einem oder mehreren Peaks bei höheren oder niedrigeren Temperaturen führen. Die Kurvenmaxima der unterschiedlichen Verdünnungen sollten idealerweise bei derselben Temperatur liegen. Durch sehr niedrige DNA-Konzentrationen kann es wie hier jedoch zu einer Linksverschiebung kommen.

2.2.2.8 Gelelektrophorese

Um die Spezifität der in der qPCR verwendeten Primer zu bestätigen wurde nach der PCR eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Unerwünschte unspezifische Primerbindung und Primerdimere wurden als zusätzliche Banden sichtbar. Die in der PCR vervielfältigten DNA-Fragmente sind negativ geladen. Daher wandern sie in einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Da kleine Moleküle schneller durch das Gel wandern können, werden die DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt und die gleich großen Fragmente lagern sich zu Banden zusammen.

Zunächst wurde ein Elektrophoresegel hergestellt (2% (w/v) Agarose in 1x TBE-Puffer) und in eine mit 1x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Zu jeder DNA-Probe á 10µl wurde je 4µl Loading Dye gegeben und die Proben anschließend in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich zu den DNA-Proben wurde stets ein 100bp-Größenstandard in jede Probenreihe geladen, um vergleichend die Fragmentlänge der jeweiligen Banden abschätzen zu können. Für eine Stunde wurde dann eine Spannung von 110V angelegt. Durch das im Loading Dye enthaltene SYBR Green I wurden die Banden unter UV-Licht sichtbar und konnten mit dem Gel-Imager fotografiert werden.

2.2.2.9 Quantitative real-time PCR (qPCR)

Die qPCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR. Durch Echtzeit-Fluoreszenz Messungen kann das PCR-Produkt während des Laufs quantifiziert werden.

Verwendet wurde das Gerät 7900 HT Fast Real-Time PCR (Taqman) der Firma Applied Biosystems und entweder das qPCR Core Kit für Sybr Green I der Firma Eurobitech oder der PowerUp SybrGreen MasterMix.

Gemäß Herstellerangabe wurden folgende Reaktionsansätze verwendet:

- | | | |
|----|--------|--------------------------------------|
| 1) | 1µl | 10x Real time PCR-Puffer |
| | 0,7µl | MgCl ₂ 10mM |
| | 0,4µl | dNTP (je 5mM dATP, dCTP, dGTP, dUTP) |
| | 0,5µl | Sybr Green I |
| | 0,05µl | Hot GoldStar Taq 5U/ µl |
| | 3,5µl | H ₂ O |
| | 2µl | cDNA (Verdünnung 1:5 – 1:20) |
| | 2µl | Primer (Forward+Reverse 5pmol/ µl) |

- 2) 3,75 µl PowerUp SybrGreen MasterMix
 1,125 µl H₂O
 1,125 µl Primer (Forward+Reverse 5pmol/ µl)
 1,5 µl cDNA (1:5 – 1:20)

Die Reaktionsansätze wurden in 384-Wellplatten pipettiert, mit einer Folie beschichtet und in das Fast Real-Time PCR gestellt. Der Fluoreszenzfarbstoff Sybr Green I bindet während des qPCR-Laufes an doppelsträngige DNA. Je mehr doppelsträngiges PCR-Produkt entsteht, desto höher ist die gemessene Fluoreszenz. Diese ist wiederum proportional zur eingesetzten Template-Menge. Die Fluoreszenzmessung erfolgt nach jedem PCR-Zyklus. Wie zuvor in Kapitel 2.2.2.5 beschrieben, bestand ein qPCR-Zyklus aus folgenden Schritten:

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
1	95°C	10 min	keine
2 + 3	95°C	15s	40x
	60°C	1 min	
Dissoziation	Schrittweise bis 95°C	Je 15 s	

Tabelle 2.7: Ablauf des qPCR-Programmes

Durch die Verwendung einer speziellen Polymerase war es mit dem verwendeten Gerät notwendig die Schritte 2 (Primerhybridisierung) und 3 (DNA-Synthese) zusammen bei 60°C durchzuführen.

2.2.2.10 Datenanalyse TaqMan®-qPCR

In der qPCR wird die Anzahl der Zyklen bestimmt, bei dem das Fluoreszenzsignal den zuvor festgelegten Schwellenwert Ct überschreitet. Am Schwellenwert Ct sollten sich die PCR-Reaktionen noch in der exponentiellen Phase befinden. Bei jedem Zyklus verdoppelt sich das PCR-Produkt. Je niedriger der Ct-Wert ist, desto höher ist die Expression des Zielgens bzw. auch die DNA-Ausgangskonzentration in der Probe.

Die Datenauswertung erfolgte anhand der $\Delta\Delta Ct$ -Methode nach Livak und Schmittgen (2001). Eine konstante Verdoppelung der DNA-Menge in jedem Real-Time-PCR-Zyklus wird vorausgesetzt. Der Ct-Wert eines *House-Keeping*-Gens (verwendet wurden

hier β -Aktin bei Zellen oder GAPDH für Gewebe) wird pro Probe erfasst, um die Expression des Zielgens zu normalisieren und so unterschiedlich eingesetzte cDNA-Ausgangskonzentrationen auszugleichen. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes erfolgte in 3 Schritten:

1. Normalisierung der Expressionsunterschiede: $\Delta Ct = Ct(\text{Zielgen}) - Ct(\beta\text{-Aktin})$
2. Vergleich von Behandlungs- und Kontrollgruppe: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ Behandlung} - \Delta Ct \text{ Kontrolle}$
3. Expressionsunterschied (in dieser Arbeit dargestellt in *fold of induction*) zwischen Behandlung und Kontrolle bzw. zwischen unterschiedlichen Gruppen = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Verwendet wurden in dieser Arbeit je mindestens 3 unabhängig voneinander gewonnene cDNA-Proben pro Variante. Der Ct-Wert jeder der 3 Proben wurde dreimal gemessen und daraus ein Mittelwert errechnet.

2.2.2.11 PPI-Messung in Mausplasma

Als Standard wurden Verdünnungsreihen einer PPI-Stocklösung mit folgenden Konzentrationen angefertigt:

5 / 2.5 / 1.25 / 0.625 / 0.3126 / 0.156 / 0.078 / 0 μM PPI

35 μl Mastermix und 5 μl des Mausplasmas wurden in eine 96-Well Platte gegeben, anschließend 30 Minuten bei 37°C inkubiert und dann 10 Minuten bei 90°C hitzeinaktiviert, um die Reaktion zu beenden.

Im zweiten Schritt wurden dann 30 μl jeder Probe in eine weiße 96-Well Platte übertragen und 15 μl auf Raumtemperatur erwärmtes BacTiter-Glo gegeben. Nach 15 Minuten Inkubation im Dunkeln konnte die Lumineszenz gemessen werden.

Zusammensetzung Master mix:

	Stocklösung	Endkonzentration	Volumen/ Probe
MgCl ₂	800 μM	80 μM	4 μl
ATPS	4 U/ml	32 mU/ml	0.32 μl
APS	640 μM	16 μM	1 μl
Hepes pH 7.4	0.25 M	50 mM	8 μl
Probe			5 μl
Dest. Wasser			21.68 μl

2.2.2.12 Messung von Icam-1 in Makrophagenmedium und Mausplasma

Die Icam-1-Konzentrationen wurden mit dem *mouse* Icam-1/CD54 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems) gemäß Herstellerprotokoll gemessen.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Anzucht und Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung aller verwendeten Zellen erfolgte im Inkubationsschrank bei einer Temperatur von 37°C unter 5%CO₂ und feuchter Luftatmosphäre. Ein Mediumwechsel wurde alle 3 Tage durchgeführt. Je nach Zelltyp wurden folgende Zellkulturmedien und Zusätze verwendet:

Zelltyp	Mediumzusammensetzung	Hersteller
C3H/10T1/2 HASMC (Verkalkungs- versuche)	DMEM (hohe Glukosekonzentration, Natriumpyruvat, GlutaMAX TM , Phenolrot)	Gibco by Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
	10% (v/v) FKS (EU professional)	Pan Biotech (Aidenbach, Deutschland)
	1% (v/v) Penicillin /Streptomycin (10000IE)	Biochrom by Merck (Darmstadt, Deutschland)
HASMC (Proliferation/ Anzucht)	M231	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
	Smooth muscle growth supplement 20x (25 ml /500ml Medium)	
	1% (v/v) Penicillin /Streptomycin (10000IE)	Biochrom by Merck (Darmstadt, Deutschland)
C2C12-Zellen	RPMI-1640-Medium (L-Glutamin, Phenolrot)	Gibco by Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
	10% (v/v) FKS	Pan Biotech (Aidenbach, Deutschland)
	1% (v/v) Penicillin /Streptomycin	Biochrom by Merck (Darmstadt, Deutschland)
Monozyten/ Makrophagen	DMEM (hohe Glukosekonzentration, Natriumpyruvat, GlutaMAX TM , Phenolrot)	Gibco by Thermo Fisher Scientific Germany

1% (v/v) Natrium-Pyruvat (100mM-Stocklösung)	Biochrom by Merck (Darmstadt, Deutschland)
0,1% (v/v) 2-Mercaptoethanol (50mM-Stocklösung)	Gibco by Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
10% (v/v) FKS (30 min bei 56°C hitzeinaktiviert)	Pan Biotech (Aidenbach, Deutsch- land)
1% (v/v) Penicillin /Streptomycin	Biochrom by Merck (Darmstadt, Deutschland)

Tabelle 2.8: Zusammensetzung der Zellkulturmedien

2.2.3.2 Subkultivierung der C3H/10T1/2- und C2C12-Zellen

Zur Subkultivierung wurde das verbrauchte Medium vollständig aus der Kulturflasche abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen maximal 5 Minuten bei 37°C mit 5ml Trypsin/EDTA (1:10 in PBS verdünnt) überschichtet, bis sie sich vom Boden der Kulturflasche lösten. Anschließend wurden 13 ml mit FKS versetztes Kulturmedium (DMEM bzw. RPMI) hinzugegeben, um das Trypsin zu neutralisieren und die Reaktion zu beenden. Die Zellsuspension konnte nun in ein Falcon-Tube überführt werden. Nach dem Zählen mit der Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen 5min bei 212g zentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet wurde je nach gewünschter Zielzellkonzentration in unterschiedlichem Volumen Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden entweder insgesamt ca. 7×10^5 Zellen zur weiteren Expansion in eine T75-Flasche gegeben oder für die Verkalkungsversuche in Wellplatten angesät.

2.2.3.3 Subkultivierung der HASMC

$5,5 \times 10^5$ Zellen wurden für eine schnellere Zellteilung zunächst in M231-Zellkulturmedium bis zur Konfluenz expandiert. Die Subkultivierung erfolgte wie bei den C3H10/T1/2-Zellen. Allerdings wurde zur Neutralisation des Trypsins Trypsin-Neutralizer verwendet. Für die Verkalkungsversuche wurde das Zellpellet am Ende der Subkultivierung in DMEM resuspendiert. Die 48-Wellplatten wurden zuvor mit 0,3ml Gelatine (0,1% w/v in PBS) pro Well für 30 min beschichtet, um eine bessere Haftung der Zellen zu erzielen. Dann wurden $0,25 \times 10^5$ Zellen pro Well angesät.

2.2.3.4 Zellzahlbestimmung

10µl der gut durchmischten Zellsuspension wurden unter das Deckgläschen einer Neubauer Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden alle Zellen pro Quadrant à

16 kleine Felder addiert und anschließend aus der Summe der 4 Quadranten ein Mittelwert gebildet. Dieser Wert wurde mit 10^4 multipliziert und man erhielt die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension.

2.2.3.5 Zellkulturmodell zur Untersuchung von Verkalkungsprozessen

2.2.3.5.1 Induktion der Zellverkalkung

Um den Einfluss verschiedener Faktoren auf den Verkalkungsprozess zu untersuchen, wurde zunächst ein geeignetes *in-vitro*-Verkalkungsmodell ausgewählt. Aorten-Glattmuskelzellen (human aortic smooth muscle cells/ HASMC), C2C12-Zellen und C3H/10T1/2-Zellen wurden hierzu auf ihre Verkalkungstendenz geprüft. Für die Verkalkungsversuche wurden bei allen verwendeten Zelllinien $0,25 \times 10^5$ Zellen pro Well in einer 48-Wellplatte angesät. Bei Erreichen der Konfluenz nach 2-3 Tagen erfolgte ein kompletter Mediumwechsel auf DMEM unter Zugabe der unterschiedlichen Verkalkungszusätze. Die Zellen wurden dann 2-3 Wochen bis zur sichtbaren Verkalkung kultiviert. Alle 3 Tage erfolgte ein halber Mediumwechsel. Folgende Verkalkungsinduktoren wurden auf den drei Zelllinien getestet:

2.2.3.5.1.1 Mouse StemXVivo® mit Osteogenic-Supplement

Dieses speziell zur Differenzierung von Osteoblasten hergestellte Medium wurde von R&D Systems (Minneapolis, USA) bezogen. Es induziert in mesenchymalen Stammzellen (C3H/10T101/2) die Entwicklung zu Osteoblasten und somit eine Mineralisierung. Zur Vorbereitung des Verkalkungsmediums wurde 250ml Mouse-Base-Medium mit 2,5ml Penicillin/Streptomycin versetzt und 12,5ml des dazugehörigen Mouse Osteogenic Supplements hinzugefügt. Die Zellkultur erfolgte hier nicht in DMEM.

2.2.3.5.1.2 β -Glycerophosphat

Zur Induktion der Zellverkalkung wurde dem Zellkulturmedium 10mM β -Glycerophosphat (β -GP) und 170 μ M L-Ascorbat-Phosphat zugesetzt. In verschiedenen Publikationen erwies sich diese GP-Konzentration am besten zur Induktion der Zellverkalkung (Byon et al., 2008)(Atkinson et al., 1997). In der Zelle wird das β -GP über das Enzym alkalische Phosphatase zu anorganischem Phosphat (Pi) verstoffwechselt, das die Verkalkung induziert (Bellows et al., 1992).

2.2.3.5.1.3 Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)

Hier liegt das anorganische Phosphat (Pi) bereits in freier Form vor und führt direkt zur Induktion der Verkalkung. Erst bei Phosphatspiegeln, die über der physiologischen Konzentration von ca. 1,4mM liegen, kann eine Zellverkalkung beobachtet werden. Je höher die Phosphatkonzentration ist, desto stärker ist die Zellverkalkung (Jono et al., 2000). Zu hohe Phosphatkonzentrationen wirken allerdings toxisch auf die Zellen. Deshalb wurden in dieser Arbeit die Verkalkungsversuche vor allem mit einer NaH_2PO_4 -Konzentration von 2,6mM durchgeführt, da hier eine ausreichende Zellverkalkung ohne Zellschädigung erzielt werden kann.

2.2.3.5.2 Zusatz von Mausplasma, anorganischem Pyrophosphat (PPi) oder konditioniertem DMEM zum Verkalkungsmedium

Vor der Verwendung in der Zellkultur wurden Mausplasma und die 1mM PPi-Stammlösung (0,446g PPi gelöst in 1l destilliertem Wasser) steril filtriert. Im Verkalkungsmedium wurde in verschiedenen Versuchen maximal die Hälfte der 10% FKS durch Mausplasma ersetzt, verschiedene Konzentrationen PPi hinzugefügt oder Anteile des DMEM durch konditioniertes Medium ersetzt. Auf die einzelnen Versuchsdurchführungen wird im Ergebnisteil genauer eingegangen.

2.2.3.5.3 Einfluss von konditioniertem Makrophagenmedium auf Verkalkung

Monozyten wurden mit M-CSF zu Makrophagen differenziert. Am Tag 6 wurde das konditionierte Medium abgenommen und es erfolgte ein kompletter Mediumwechsel auf frisches, mit M-CSF und RANKL versetztes DMEM (siehe Kapitel 2.2.3.8.2). Am Tag 13 wurde erneut das konditionierte Medium abgenommen.

Mit 2,6mM Pi wurde die Verkalkung von C3H10/T1/2-Zellen induziert und 50% oder 75% des DMEMs durch das gewonnene konditionierte Medium ersetzt. Die Zellverkalkung unter dem Einfluss des konditionierten Mediums wurde nach 5 und 10 Tagen quantifiziert.

2.2.3.5.4 Quantifizierung der Verkalkung

2.2.3.5.4.1 Calciumbestimmung mittels Randox-Calcium-Kit

Zur quantitativen Bestimmung der Zellverkalkung wurde das verbrauchte Zellmedium abgesaugt und die Wells mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,6N HCL überschichtet (250µl pro Well einer 48-Well-Platte). Eine darauffolgende Inkuba-

tion auf dem Schüttler über Nacht löste das Calcium vollständig in der zugegebenen Salzsäure. Nun konnte der Zelllayer mit der Pipettenspitze aus dem Well abgeschabt und die HCL-Zellsuspension in ein Tube überführt werden. Durch Zentrifugation wurden die Zellen vom Überstand getrennt, sodass dieser abpipettiert werden konnte. Zur Calciumbestimmung im Herzen wurde diese zunächst gewogen, um die gemessenen Calciumwerte pro Menge Herzgewebe errechnen zu können. Das gesamte Gewebe wurde dann mit einem Skalpell zerkleinert und jedes Herz in 200µl HCL gelöst über Nacht wie oben beschrieben inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben gevortext und der HCL-Überstand abzentrifugiert.

Je 12,5µl des Überstandes einer Probe wurden zur Messung nach Anleitung des Randox-Calcium-Kits mit 500µl einer 1:1 Mischung aus R1- und R2-Puffer vermischt. Mit dem Synergy HT-Photometer von BioTek wurde der Calciumgehalt der Proben dann vergleichend zur Verdünnungsreihe eines Standards (5mM- 0,078125mM) bei einer Wellenlänge von 570nm photometrisch gemessen. Wenn die gemessenen Probenwerte über denen des am höchsten konzentrierten Standards lagen, wurden die Proben nochmals verdünnt und erneut gemessen.

2.2.3.5.4.2 Normalisierung des Calciumwertes

Zur Normalisierung des gemessenen Calciumwertes in der Zellkultur kann die Proteinkonzentration pro Well gemessen werden. Die Proteinkonzentration korreliert mit der Zellzahl und der Calciumwert kann so durch Division mit der Proteinkonzentration standardisiert werden. In dieser Arbeit wurde bewusst auf die Normalisierung verzichtet und die Calciumkonzentration nur pro cm² angegeben, da pro Well die gleiche Ausgangszellzahl angesät wurde. Die Mineralisierung durch osteoblastische Differenzierung der Zellen ist ein extrazellulärer Prozess, der mit einer erhöhten Zellnekroserate einhergeht. Durch die unterschiedlich hohe Zellnekroserate und zum Teil sehr niedrige Proteingesamtkonzentrationen entsteht eine hohe Varianz der Proteinmesswerte. Deshalb ist die Proteinbestimmung eine Methode mit hoher Ungenauigkeit und wird in dieser Arbeit zur Normalisierung des Calciumwertes als nicht sinnvoll bewertet.

2.2.3.5.4.3 Alazarin Red S Färbung

Das Reagenz Alazarin Red S ist ein Anthrachinon-Derivat, das zur Färbung von Kalkablagerung verwendet wird. Das Alazarin-Molekül bildet Chelat-Komplexe mit Calcium, sodass sich amorphe Calciumablagerungen rot darstellen (Gregory et al., 2004). Die Färbung wurde nach Herstellerangaben mit dem Osteogenesis Quantitation-

Kit durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 10 Minuten mit 10%igem Formaldehyd fixiert. Anschließend wurde das Formaldehyd abgesaugt und der Zelllayer erneut zweimal mit deionisiertem Wasser gewaschen. Zur Färbung wurden je Well einer 48-Well-Platte 500µl Alazarin Red S Lösung gegeben und der Monolayer 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss wurden die Zellen zweimal mit deionisiertem Wasser gewaschen und blieben zur mikroskopischen Evaluation mit Wasser bedeckt, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern.

2.2.3.5.4.4 Calcein-Färbung

Mit Calcein können ebenfalls Verkalkungen angefärbt werden. Es handelt sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der in die Zelle diffundiert und dort Calcium chelatiert. Die Calcium-Calcein-Komplexe fluoreszieren grün und können so unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Zuerst wurde eine 100 mM Calcein-Stammlösung in 0,05M TBS (pH 9) hergestellt und dann mit TBS zur 0,1mM Gebrauchslösung verdünnt. Die Zellen wurden wie zuvor bei der Alazarin-Färbung beschrieben mit Formaldehyd fixiert.

Zur Färbung wurden die Zellen 30 min mit der Calcein-Gebrauchslösung (125µl pro Well einer 48-Wellplatte) bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend mehrmals mit TBS (pH 9) gewaschen. Danach folgte eine Zellkernfärbung mit DAPI.

2.2.3.5.4.5 DAPI-Färbung

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich an AT-reiche Regionen von DNA anlagert. Somit werden Zellkerne nach DAPI-Färbung unter Anregung mit ultraviolettem Licht blau sichtbar.

Für die Färbung wurde die DAPI-Stammlösung (1g/ml destilliertem Wasser) mit TBS (pH 9) 1:2000 zu einer Gebrauchslösung verdünnt, die Zellen mit der Lösung für 20-30 Minuten beschichtet und anschließend zweimal mit TBS (pH 9) gewaschen.

2.2.3.6 Transfektion von Zellen

Je $2,6 \times 10^5$ C3H/10T1/2-Zellen pro Well wurden auf einer 6-Wellplatte bis zu 80%iger Konfluenz kultiviert. Anschließend erfolgte die Transfektion mit den Varianten pSG5-Abcc6/B6, pSG5-Abcc6/C3H oder pUbiquitin-asRed zur Kontrolle der Transfektionseffizienz. Der Transfektionsansatz (183,3µl serumfreies DMEM, 9,2µl Viafect und 1,8µg Plasmid pro Well) wurde 10 Minuten separat bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium der zu transfizierenden Zellen wurde währenddessen erneuert. Hierzu wurde 3ml

DMEM + 10% FKS auf die Zellen pipettiert und der Transfektionsansatz anschließend hinzugegeben. Nach 48h Inkubation im Brutschrank wurde nach erfolgreicher Transfektion erneut ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt. Die transfizierten Zellen wurden insgesamt bis zu 8 Tage kultiviert. Alle 48h wurde das komplette konditionierte Medium abgenommen und erneut frisches Medium auf die Zellen gegeben. Das konditionierte Medium wurde bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert.

2.2.3.7 Gewinnung von plättchen-freiem Mausplasma

Über eine Punktion des retrobulbären Venenplexus wurde der Maus mit einer Hämato-krit-Kapillare Blut entnommen und in 1,5 ml EDTA-Mikrovetten gesammelt. Durch anschließendes Zentrifugieren (1000g, 10min bei 4°C) setzten sich die Blutzellen am Boden der Mikrovette ab, sodass der klare Plasmaüberstand abpipettiert werden konnte. Mit einem 300000 kD-Centrisart Filter wurden durch Zentrifugation (2500g , 25min bei 4°C) die noch verbliebenen Blutplättchen aus dem Plasma entfernt. Das Blutplasma wurde anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.3.8 Monozytendifferenzierung zu Osteoklasten

2.2.3.8.1 Monozytenisolation aus der Milz

Die aus der Maus entnommene Milz wurde maximal eine Stunde bis zur weiteren Verarbeitung in PBS auf Eis gelagert.

Unter sterilen Arbeitsbedingungen wurde die Milz mit einem Spritzenstempel zerkleinert und durch einen CellStrainer (40µm) in ein Falcon-Tube gepresst. Die sich herauslösenden Zellen wurden mit PBS durch den Filter gespült und die Zellsuspension in einem Tube gesammelt. Nach Zentrifugation der Zellsuspension (8min; 200g) bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgekippt und das Zellpellet erneut in 6ml PBS pro entnommener Milz resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig auf das gleiche Volumen Histopaque pipettiert. Nach 20 min Zentrifugation (478g) bei Raumtemperatur ohne Bremse befanden sich die Monozyten mittig an der Grenzschicht zwischen PBS und Histopaque-Gradient. Die Dichte des Histopaque-Gradienten ist höher als die Dichte von Monozyten, aber niedriger als die von Erythrozyten und Granulozyten, sodass die Zellarten durch den Histopaque-Gradienten gut voneinander getrennt werden können. Die mittig sichtbare Monozyten-Zellschicht wurde gezielt aus der Lösung heraus pipettiert und in PBS gegeben. Die Zellsuspension wurde dann erneut 15 min bei 4°C mit 478g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Zellpellet

in Zellkulturmedium (siehe Kapitel 2.2.3.1) resuspendiert. Dann wurden die Zellen gezählt und mit einer Zelldichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/cm² auf Chamber-Slides oder Well-Platten ausgesät.

2.2.3.8.2 Monozytenkultivierung und Differenzierung zu Osteoklasten

Nach Isolation wurden die Monozyten über Nacht kultiviert, damit sie sich am Boden der Wellplatte absetzen. Nach 24h wurde dem Medium 75ng/μl M-CSF zugesetzt, um die Makrophagendifferenzierung zu initiieren. An Tag 4 erfolgte ein kompletter Mediumwechsel. Nach 6 Tagen wurde das Zellmedium komplett abgesaugt und durch frisches, mit RANKL(75ng/μl) und M-CSF(75ng/μl) angereichertes Medium, ausgetauscht. Ein erneuter Mediumwechsel wurde an Tag 9 vorgenommen. Nach 12 Tagen Kultur hatten sich die Zellen zu Osteoklasten differenziert.

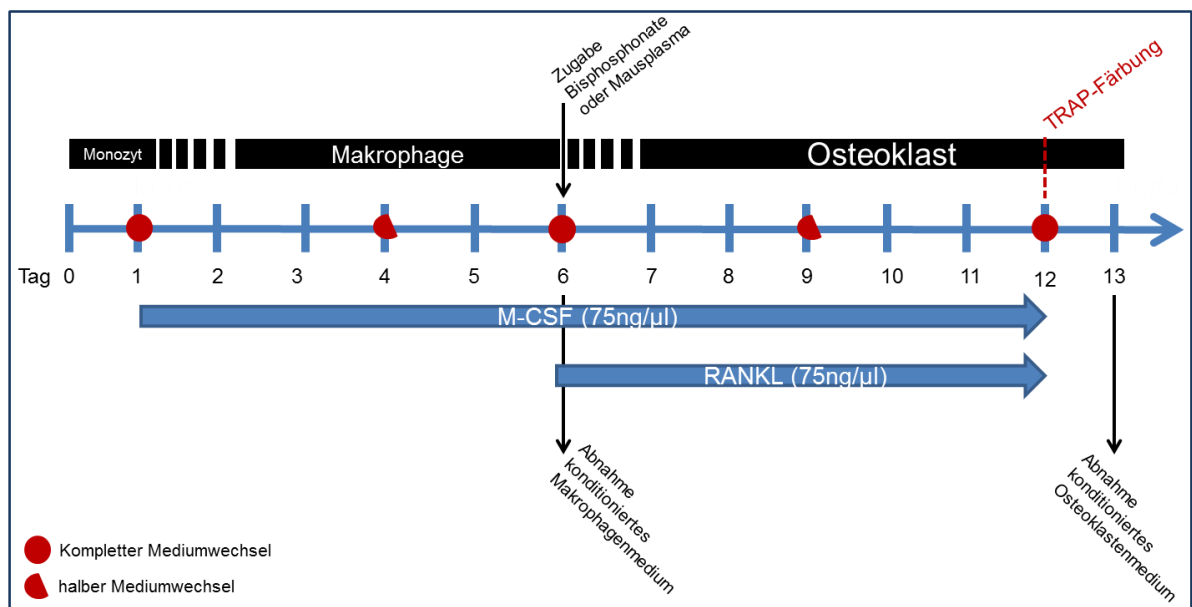


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes bei der Monozytenisolation aus der Milz

2.2.3.8.3 Zytokinmessung im Makrophagenmedium

An Tag 6 der Makrophagendifferenzierung wurde das komplette Medium abgenommen und die im Medium gelösten Zellen abzentrifugiert. Anschließend wurde das konditionierte Medium mit dem Mouse Cytokine Array-Kit (R&D) auf das Vorhandensein verschiedener für die Entzündung relevanter Zytokine geprüft. Hierzu wurde die mit Antikörpern von 40 Zytokinen und Chemokinen beschichtete Kit-Membran über Nacht mit dem Kulturmedium inkubiert. Die Antigen-Antikörper-Komplexe erzeugten bei Vorhandensein eines bestimmten Zytokins ein Lumineszenz-Signal, das mit dem

Molecular Imager ChemiDoc XRS System von Biorad unter 240s und 480s Belichtung sichtbar gemacht wurde.

2.2.3.8.4 Bisphosphonatbehandlung der Makrophagen

Die Monozyten wurden nach oben aufgeführtem Protokoll mit M-CSF zu Makrophagen differenziert. Aus den Bisphosphonat-Pulvern wurde je nach Löslichkeitsgleichgewicht mit destilliertem Wasser Stocklösungen hergestellt (Pyrophosphat, Alendronat, Ibandronat, Tiludronat und Etidronat je 10mg/ml; Pamidronat 5mg/ml; Zolendronat 1mg/ml), die dann mit einem Minisart-plus-Filter steril filtriert wurden. Am Tag 6 wurde Makrophagen-Kulturmedium mit 10nM, 1 μ M, 10 μ M oder 100 μ M der verschiedenen Bisphosphonate sowie mit je 75ng/ μ l RANKL- und M-CSF versetzt. Nach Absaugen des verbrauchten Mediums wurde je 480 μ l des neuen Mediums pro Well der 8-Well-Slides auf die Makrophagen gegeben. Die Zellen wurden für insgesamt 6 Tage in dem bisphosphonat-haltigem DMEM kultiviert. Am dritten Tag erfolgte ein halber Mediumwechsel. Nach insgesamt 12 Tagen wurde die Osteoklastendifferenzierung quantifiziert (siehe Kapitel 2.2.3.8.6)

2.2.3.8.5 Behandlung der Makrophagen mit Mausplasma

Hier wurde am 6. Tag des Differenzierungsassays 4 % der 10% FKS im Kulturmedium durch Mausplasma ersetzt und die Makrophagen unter RANKL- und M-CSF-Zusatz (je 75ng/ μ l) zu Osteoklasten differenziert.

2.2.3.8.6 Quantifizierung der Osteoklastendifferenzierung

2.2.3.8.6.1 TRAP -Färbung

Die auf Chamber-Slides kultivierten Zellen wurden mit Formaldehydlösung des Färbekits (TaKaRa) fixiert und mit der TRACP-Lösung 1,5h im Brutschrank inkubiert. Osteoklasten, die reich an TRAP sind, färben sich in Normallicht rot. Durch die im Kit enthaltene Färbung mit Methylgrün werden Zellkerne grün sichtbar.

2.2.3.8.6.2 Zählung der Osteoklasten

Nach TRAP-Färbung wurden 9 Fotos pro Well an stets gleichen, über das gesamte Well verteilten, Lokalisationen unter dem Mikroskop angefertigt und beurteilt. Anschließend wurden pro fotografierten Ausschnitt alle roten Zellen mit 3 oder mehr Zellkernen als Osteoklast gezählt und über Addition die durchschnittliche Osteoklastenzahl pro cm² errechnet.

2.2.4 Tierexperimentelle Methoden

Die Tierversuche wurden nach aktuellen Tierversuchsrichtlinien von Dr. hum.biol. Zouhair Aherrahrou durchgeführt (Tierversuchsantrag siehe 7.2)

2.2.4.1 Tierhaltung

Weibliche Individuen im Alter zwischen 3 bis 4 Monaten der Inzuchtstämme C57BL/6J (B6) und C3H/HeJ (C3H) wurden über die Firma Charles River (Sulzbach-Rosenberg) erworben und zur Eingewöhnung mindestens 2 Wochen in unserem Tierstall in keim- armer Umgebung gehalten. Die Mäuse hatten stets freien Zugang zu Nahrung und Was- ser und lebten unter einem imitierten 12 Stunden Tag-/Nacht-Rhythmus. Verwendet wurden die Futterpellets (Katalognummer 1320) der Firma Altromin (Lage, Deutsch- land).

2.2.4.2 Kryopexie des Myokards

Bei der Krypexie wurde über Kälteapplikation am Herzen eine dystrophe kardiale Ver- kalkung (DCC) ausgelöst.

Zunächst wurden die Mäuse durch Isofluraninhalation und zusätzliche intraperitoneale Avertinapplikation anästhesiert. Über einen Zugang durch die Rektusscheide entlang der Linia alba wurde das Zwerchfell freipräpariert, bis das schlagende Herz von subdia- phragmal sichtbar war. Anschließend wurde ein mit Stickstoff vorgekühlter Metallstab (5mm Durchmesser) 10s auf das Myokard gehalten. Daraufhin wurde das Abdomen mit geeignetem Nahtmaterial verschlossen und die Anästhesie beendet. Das Vereisen er- zeugte eine Gewebenekrose aus der sich in wenigen Tagen die DCC entwickelte.

Am 7. Tag postoperativ wurden die anästhesierten Mäuse durch eine zervikale Disloka- tion euthanasiert. Die Herzen wurden entnommen und mit PBS gespült. Die Organe wurden dann entweder für die Calciumbestimmung genutzt (siehe Kapitel 2.2.3.5.4.1) oder es wurden Kryoschnitte zur histologischen Färbung angefertigt.

2.2.4.2.1 Anfertigen der Gewebeschnitte

Nach der Entnahme wurden die Herzen direkt für 24h bei Raumtemperatur in 4%igem Paraformaldehyd fixiert. Danach wurden die Organe zum Einbetten über Nacht in Free- zing Medium eingelegt. Am nächsten Tag wurden dann mit dem Kryotom Schnitte mit einer Schichtdicke von 8µm angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Diese wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.2.4.2.2 CD68-Färbung

Die Herzgewebeschnitte auf dem Objektträger wurden zunächst mit 4%igem Formaldehyd 10min fixiert und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. Ein TrisBase-Puffer pH 7 aus 3,03g Trisbase in 500ml H₂O wurde hergestellt und das Gewebe zunächst durch 10 minütige Inkubation in Triton X-100 (0,5% in TB-Puffer) permeabilisiert. Anschließend wurde ein Gemisch aus TB-Puffer mit 10% Eselserum und 1% BSA für eine Stunde auf die Schnitte gegeben, um unspezifische Bindungen des zweiten Antikörpers in den Folgeschritten zu verhindern. Die Herzschnitte wurden dann 1,5h bei 37°C mit dem Maus-CD68-Antikörper inkubiert (0,4µl Antikörper/ 100µl TB-Puffer mit 1% BSA) und dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe des 2. Antikörpers (2,5µl Esel Anti-Raten IgG / 1000µl TB-Puffer mit 1% BSA). Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 45 Minuten wurden die Schnitte dreimal für 15 Minuten mit Waschpuffer gewaschen und nach dem Trocknen mit UltraCruz® Hard-set Mounting Medium eingedeckt.

2.2.4.2.3 TRAP und ALPL -Färbung der Herzschnitte (Sigma-Aldrich-Kit)

Die Kryoschnitte wurden zunächst nach Kitanweisung eine Minute lang in einer Lösung aus Zitrat (im Kit enthalten), Azeton und 37% Formaldehyd fixiert. Jeder Herzschnitt wurde anschließend entweder mit der im Kit enthaltenen TRAP- oder mit der ALP-Färbelösung 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach der DAPI- und Calceinfärbung erfolgte eine fotografische Dokumentation unter dem Mikroskop.

2.2.4.3 Bisphosphonatapplikation

Zunächst wurde eine Stocklösung PPI-Stocklösung (5mg/ml) in 0,9% NaCl vorbereitet. Einen Tag vor geplanter Kryopexie des Myokards wurde den C3H-Mäusen intraperitoneal anorganisches Pyrophosphat (PPI) appliziert (20mg/kg Körpergewicht). Direkt nach der Kryopexie wurde dann eine zweite Dosis in doppelter Menge gegeben. Danach erhielten die Mäuse für 7 Tage einmal täglich weiter die Einfachdosis. Den Kontrollmäusen wurde stets das gleiche Volumen NaCl- oder PBS-Lösung appliziert. *Abcc6* ^{-/-} Mäusen wurden nach demselben Konzept behandelt, allerdings mit einer Dosis von 12 oder 25 mg PPI/kg. Etidronat wurde in der Dosis 2mg/ kg Körpergewicht injiziert (Pomozi et al., 2017).

2.2.4.4 Leberentnahme und Hepatozytenisolation

Nachdem die anästhesierten Mäuse durch zervikale Dislokation euthanasiert worden sind, wurde das Abdomen eröffnet und die V. porta über eine proximale und distale Ligatur dargestellt. Anschließend wurde vorsichtig ein Katheter in die V. porta eingeführt und mit einem Faden am Gefäß fixiert. Mit einer Spritze wurde der Blutkreislauf nun manuell bei gleichzeitiger Durchtrennung der V. cava inferior mit insgesamt 40 ml Perfusionspuffer (5ml/min) gespült. Es kam zu einer Entfärbung des Lebergewebes. Danach erfolgte eine Spülung mit 40ml Digestion-Puffer (3ml/min), um die Zellen enzymatisch aus dem Lebergewebe zu lösen. Nach Entnahme der Leber wurde die Gallenblase entfernt und das Organ bis zur Weiterverarbeitung in der Zellkultur möglichst kurz auf Eis in Waschpuffer gelagert.

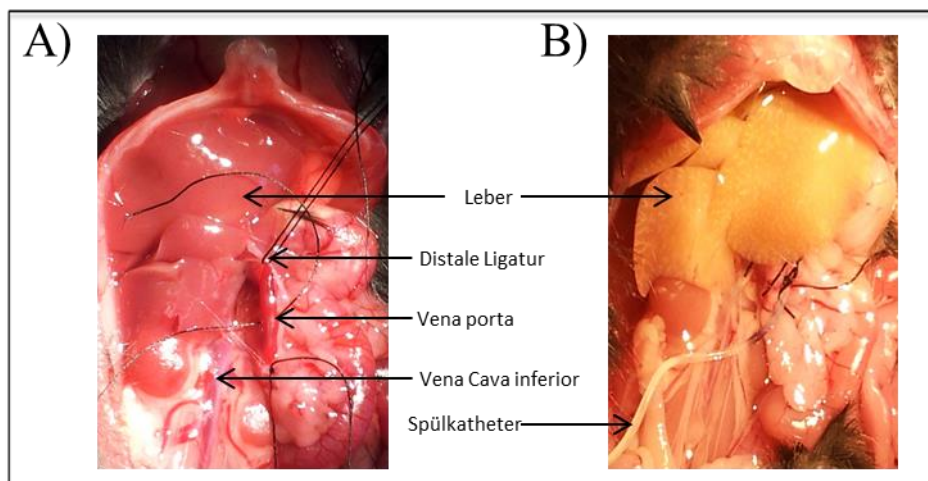


Abbildung 2.4: Anatomie des Abdomens der Maus

A) Darstellung und Ligatur der V. porta. B) Entfärbung des Lebergewebes nach Spülung mit der Pufferlösung.

Zur Hepatozytenisolation wurde die Leberkapsel vorsichtig mit einer Pinzette eröffnet, um die Hepatozyten im Waschmedium freizusetzen. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5min bei 3g zentrifugiert, der Überstand abgekippt und die Zellen erneut in Waschpuffer resuspendiert. Nach Filtern der Zellsuspension durch ein 70µm CellStrainer erfolgten 2 weitere Waschschrte, wobei die Zellen beim letzten Durchlauf in DMEM resuspendiert und mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt wurden. Zuletzt wurden 1×10^6 Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte ein kompletter Mediumwechsel. Das frische Medium wurde dann 24 Stunden für die weiteren Verkalkungsversuche durch die Hepatozyten konditioniert.

2.2.5 Statistik

In den Abbildungen wurden Mittelwerte und deren Standardfehler dargestellt.

$P < 0,05$ wurde in dieser Arbeit als statistisch signifikant definiert. Zum Vergleich zweier Gruppen wurde mit dem Programm GraphPad ein ungepaarter T-Test durchgeführt. Die Angabe der Signifikanz in den Grafiken wurde nach folgender Einteilung vorgenommen: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$.

2.2.5.1 Zellkulturversuche

Zur Quantifizierung der Verkalkungsversuche wurde in je 6 Wells pro Variante die Calciumkonzentration gemessen und aus den Messwerten anschließend der Mittelwert gebildet.

Versuch	Anzahl verwendeter Proben
Verkalkungsversuche mit C3H10T1/2, mindestens n=6 pro Variante C2C12 oder HASMC	
Osteoklastenzählung	mindestens n=4 pro Variante
- bei Bisphosphonatbehandlung	n=8

Tabelle 2.9: Anzahl der Proben in den Zellkulturversuchen

2.2.5.2 Tierversuche

Die Organe einer Maus wurden zum Teil für mehrere Versuche verwendet. Daher sind einige Individuen doppelt gezählt.

Versuch	Mauslinie	Anzahl der Mäuse
Freeze-thaw-Injury und Entnahme von Herzgewebe	B6- Kontrolle	n=5
	B6- gefreezed	n=3
	C3H- Kontrolle	n=5
	C3H- gefreezed	n=3
Milzentnahme zur Monozytenisolation	C3H	n=7
	B6	n=7
	Cg1	n=3

Hepatozytenisolation	C3H	n=4
	B6	n=4
Monozytenisolation und Bisphosphonatbehandlung in <i>vitro</i>	C3H	n=3
Monozytenisolation zur Mediumkonditionierung	B6	n=4
	C3H	n=4

Tabelle 2.10: Anzahl der für die Tierversuche verwendeten Individuen

3 Ergebnisse

3.1 Analyse des Herzgewebes nach Kälteverletzung bei den Mausstämmen C3H/He und C57BL/6

3.1.1 Entwicklung der dystrophen kardialen Verkalkung (DCC)

Die Mauslinie C3H/He wurde als Model für die Gewebeverkalkung *in vivo* verwendet. 5-7 Tage nach Kälteapplikation am Herzen kann die Entwicklung einer DCC bei C3H-Mäusen bereits makroskopisch erkannt werden. Der DCC-resistente Mausstamm C57BL/6 zeigt hingegen keine Kalkablagerungen im verletzten Gewebe.

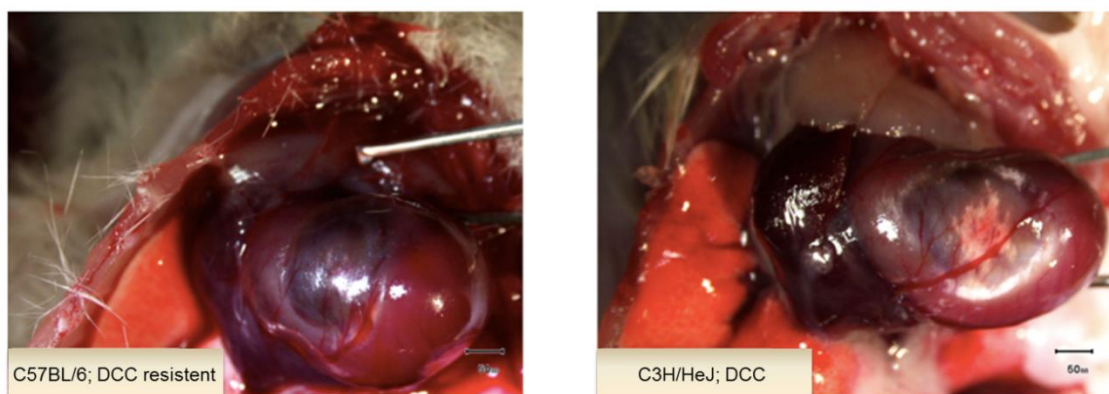


Abbildung 3.1: Herzen 7 Tage nach Kälteverletzung

Bei DCC-prädisponierten C3H-Mäusen sind weißliche Kalkablagerungen erkennbar (rechte Abbildung), während DCC-resistente Mäuse keine Verkalkung im nekrotischen Bereich zeigen (linke Abbildung)

3.1.2 Akkumulation Multinukleärer Riesenzellen (MN-Zellen) bei der DCC

Die zugrundeliegenden Pathomechanismen der DCC sind bisher nicht geklärt. Daher wurden Gewebeschnitte des Herzens mit DAPI und Calcein angefärbt, um die bei der DCC beteiligten Zelltypen zu identifizieren.

Ab dem dritten Tag nach Kälteverletzung am Herzen sind Zellinfiltrate im nekrotischen Bereich sowohl bei B6- als auch bei C3H-Mäusen sichtbar. Diese Zellen lassen sich mittels CD68-Immunfluoreszenzfärbung als Makrophagen identifizieren.

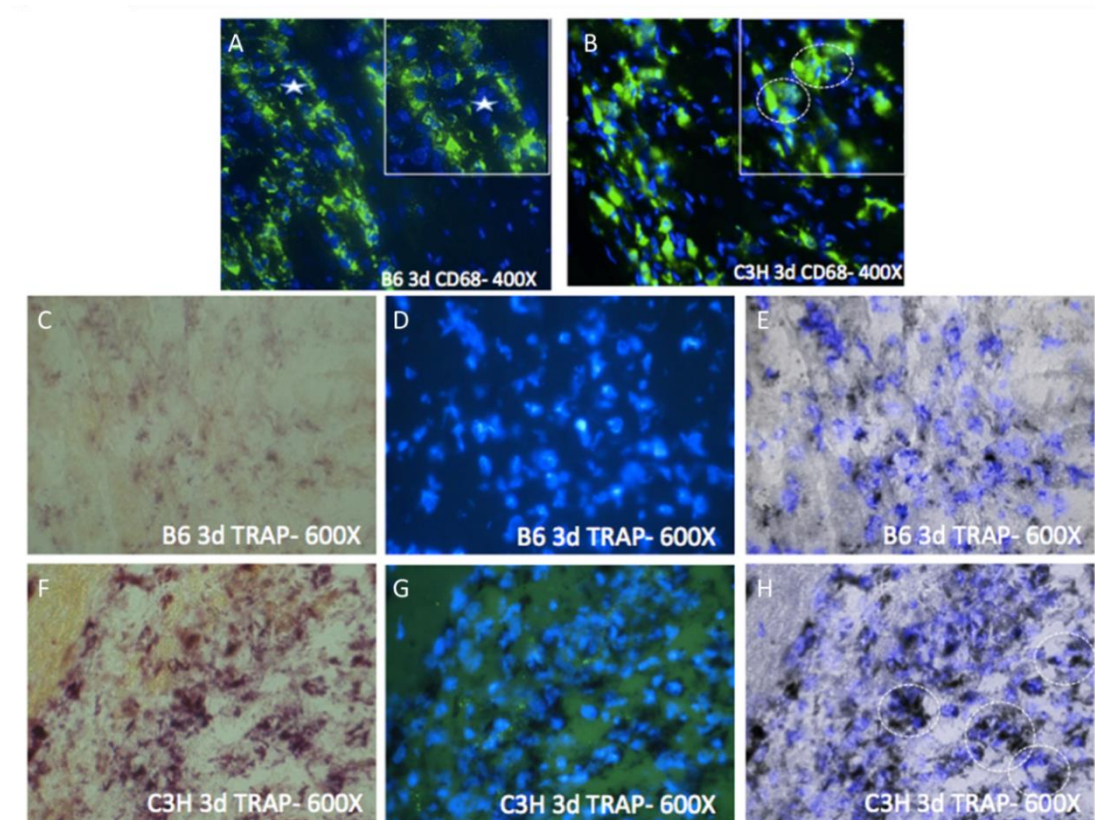


Abbildung 3.2: Aggregation und Fusion TRAP- und CD68-positiver Makrophagen bei C3H-Mäusen 3 Tage nach Kälteverletzung am Herzen

A-B) CD68-positiv Makrophageninfiltrate in der immunhistochemischen Färbung. C-H) Osteoklasten-ähnliche Zellen stellen sich in der TRAP-Färbung rötlich dar. Es zeigen sich mehr TRAP-positiv Zellen im nekrotischen Herzgewebe bei DCC-prädisponierten C3H-Mäusen(F) als bei B6-Mäusen(C). Die Zellkerne wurden mit DAPI blau gefärbt (D und G). E und H stellen die Überlagerung der TRAP- und DAPI-Färbungen dar. Die Kreise weisen auf Aggregate multinukleärer Zellen bei C3H-Mäusen hin.

3.1.3 Alkalische Phosphatase (ALPL)

Auch osteoblastenähnliche Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Gewebeverkalkung, da sie mineralisierte Matrix synthetisieren. Um die zuvor beschriebenen multinukleären Zellen im nekrotischen Bereich näher zu charakterisieren, wurde zusätzlich zur TRAP-Färbung eine ALPL-Färbung an Tag 3 und 5 nach Kälteapplikation durchgeführt. Die alkalische Phosphatase (ALPL)-Aktivität ist typisch für osteoblastenähnliche Zellen. ALPL-positiv Zellen wurden hier rot gefärbt. Bereits an Tag 3 sind im nekrotischen Bereich bei DCC-prädisponierten C3H-Mäusen mehr ALPL-positiv Zellen als bei resistenten B6-Mäusen zu identifizieren, jedoch ist die ALPL-Aktivität nicht mit den Kalkablagerungen kolokalisiert.

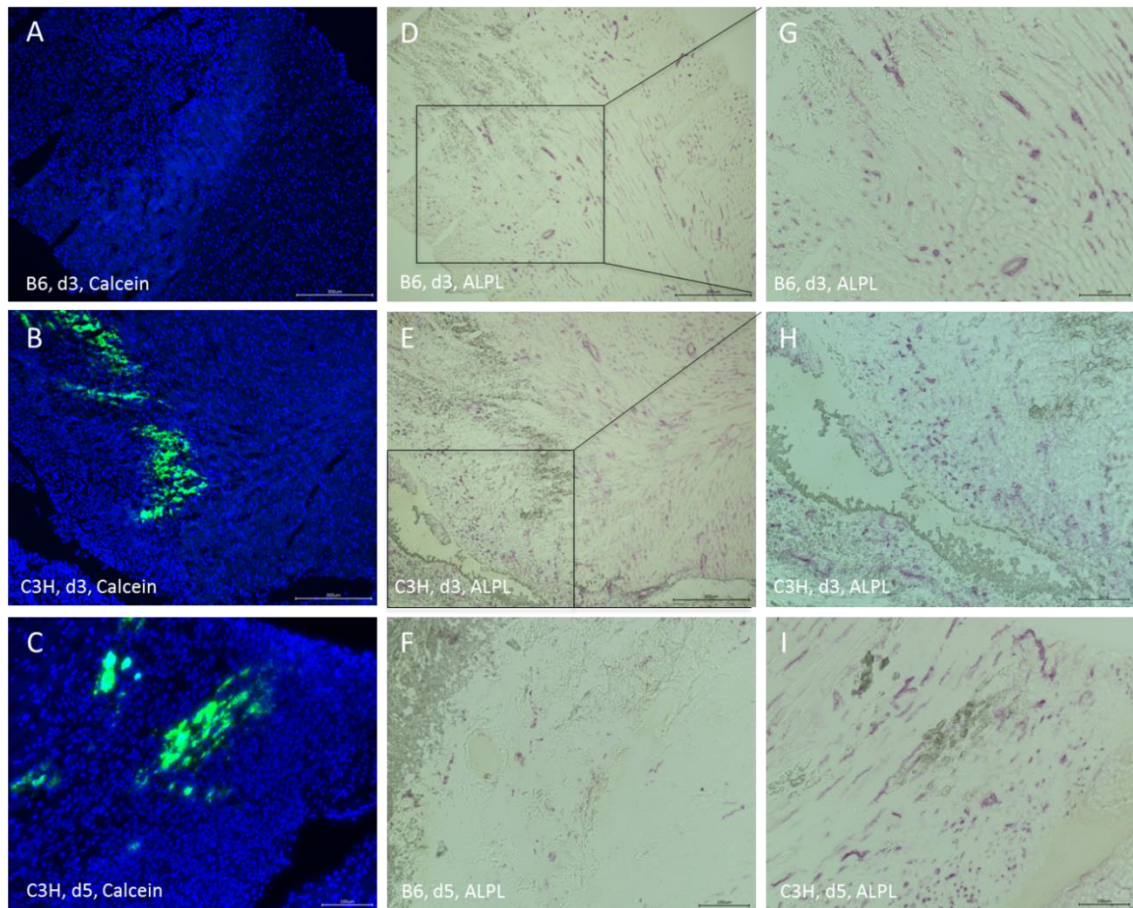


Abbildung 3.3: Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALPL) im Herzgewebe an Tag 3 und 5 nach Kälteapplikation

A-C) DAPI- und Calceinfärbung stellt Zellkerne in blau und Kalkablagerungen in grün dar. D-I) In der ALPL-Färbung stellen sich osteoblastenähnliche Zellen rot dar. Im nekrotischen Bereich von DCC-prädisponierten C3H-Mäusen ist im Vergleich zu B6-Mäusen eine stärkere ALPL-Anfärbung des nekrotischen Gewebes sichtbar. Die angegebenen Größenstandards beziehen sich auf 100µm.

3.1.4 Expression von *Enpp1* und *Alpl* in Herzgewebe

Sowohl die *Enpp1* (engl. *Ecto-Nucleotid Phosphodiesterase*) als auch *Alpl* (engl. *Alkaline Phosphatase*) spielen eine wichtige Rolle in der Pi-/PPi-Homöostase und regulieren die Gewebeverkalkung. Freigesetztes ATP wird über die *Enpp1* zu anorganischem Pyrophosphat (PPi) umgesetzt, das antimineralisierend wirkt. PPi kann jedoch auch über die *Alpl* wieder zu anorganischem Phosphat (Pi) abgebaut werden, welches wiederum Calciumablagerung induziert. Nach Kälteverletzung steigt die *Enpp1*-Genexpression im Herzgewebe bei C3H-Mäusen stärker an als bei DCC-resistenten B6-Mäusen. Die *Alpl*-Genexpression hingegen bleibt unbeeinflusst.

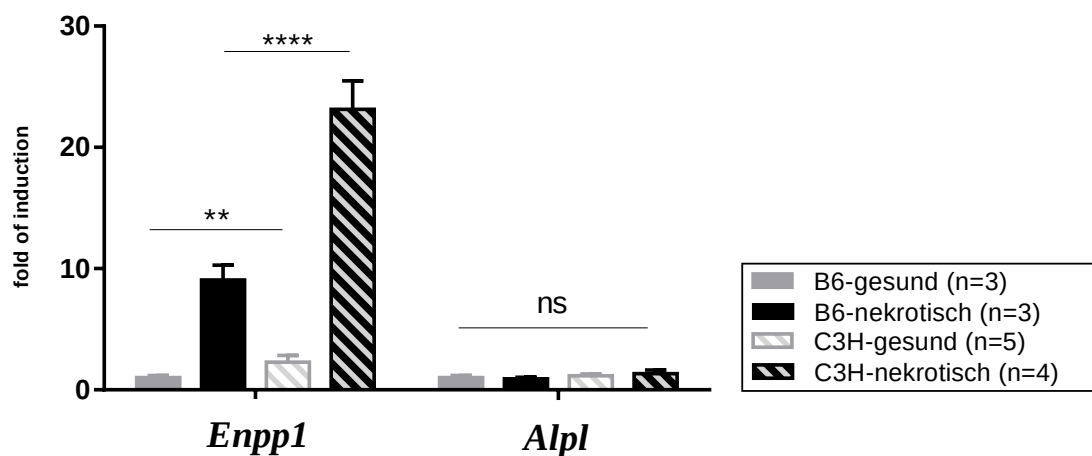


Abbildung 3.4: qPCR Analyse des Herzgewebes von C3H und B6-Mäusen 3 Tage nach Kälteverletzung. Die Genexpression (hier dargestellt als *fold of induction*) wurde auf B6-gesund normalisiert. Der Bereich der Gewebeverletzung wurde vom gesunden Gewebe abgetrennt (hier als nekrotisch bezeichnet) und die Expression in gesundem und nekrotischen Gewebe separat gemessen.

3.1.5 Expression von Osteogenesemarkern in Herzgewebe

Ctsk und *Trap* sind osteoklastenspezifische Enzyme. *Runx2* verstärkt Gewebeverkalkung und fördert sowohl die Makrophageninfiltration als auch die Osteoklastendifferenzierung. Ebenso stellt *Opn* ein Akute-Phase-Protein dar, das Makrophagendifferenzierung fördert. Erwartungsgemäß werden diese Osteogenesemarkern nach Kälteverletzung am Herzen sowohl in B6 als auch in C3H-Mäusen im Herzgewebe hochreguliert. Dys-trophe kardiale Verkalkung entwickelnde Mäuse zeigen einen stärkeren Anstieg der *Ctsk*-, *Trap*- und *Opn*-Expression als DCC-resistente B6-Mäuse.

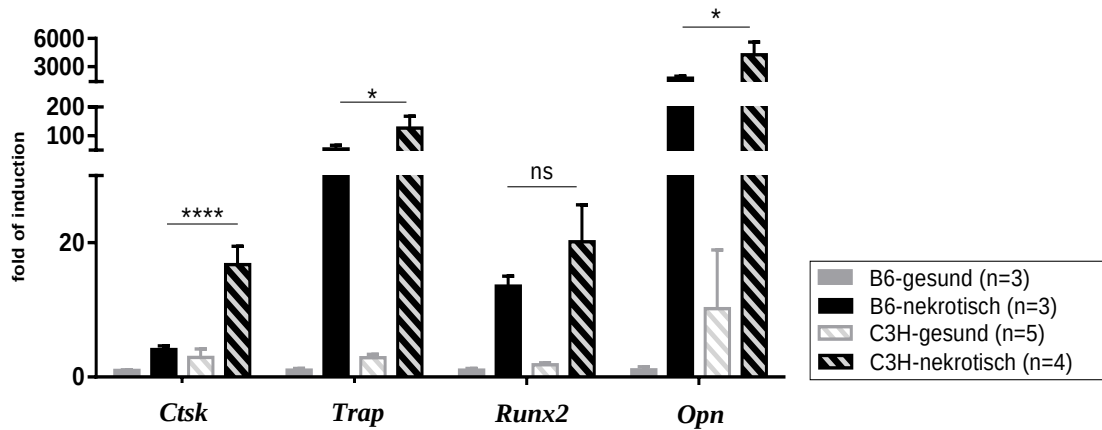


Abbildung 3.5 qPCR Analyse des Herzgewebes von C3H und B6-Mäusen 3 Tage nach Kälteverletzung. Die Genexpression (hier dargestellt als *fold of induction*) wurde auf B6-gesund normalisiert. Der Bereich der Gewebeverletzung wurde vom gesunden Gewebe abgetrennt und wird hier als nekrotisch bezeichnet.

3.1.6 Expression von Entzündungsmarkern in Herzgewebe

Nach Gewebeverletzung führt eine Entzündungsreaktion zur Aktivierung der Komplementkaskade (C5, C3) und zur Makrophageninfiltration, die die Gewebeverkalkung triggert. *CD68*, *iNOS* und *Arg-1* stellen hierbei typische Makrophagenmarker dar. Nach Kälteverletzung ist in beiden getesteten Mausstämmen gleichermaßen ein Anstieg der Genexpression der Entzündungsmarker zu verzeichnen.

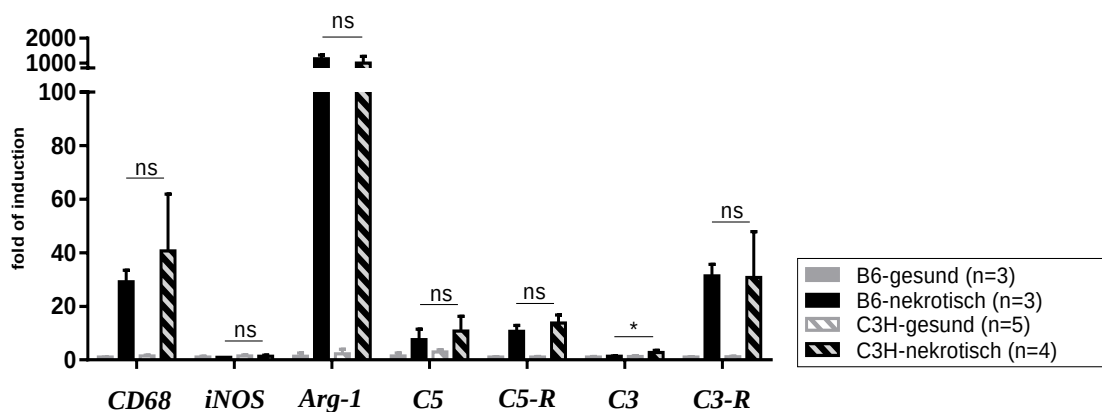


Abbildung 3.6 qPCR Analyse des Herzgewebes von C3H und B6-Mäusen 3 Tage nach Kälteverletzung. Die Genexpression (hier dargestellt als *fold of induction*) wurde auf B6-gesund normalisiert. Der Bereich der Gewebeverletzung wurde vom gesunden Gewebe abgetrennt und wird hier als nekrotisch bezeichnet.

3.1.7 Expression von *Icam-1* in Herzgewebe

Da ICAM-1 als Akute-Phase-Protein und Adhäsionsmolekul eine wichtige Rolle bei der Akkumulation von Makrophagen und Verkalkungsinduktion spielt, wurde ebenfalls die Expression von *Icam-1* in verkalktem Herzgewebe nach Kälteverletzung gemessen. Sowohl B6 als auch C3H-Mäuse zeigen 3 Tage nach Gewebeverletzung einen signifikanten *Icam-1*-Expressionsanstieg im nekrotischen Gewebe. Im Gegensatz zu dem DCC-resistenten B6-Mausstamm ist der Expressionsanstieg bei DCC-prädisponierten C3H-Mäusen jedoch deutlich höher. In gesundem Herzgewebe zeigen sich keine Expressionsunterschiede zwischen den getesteten Mausstämmen.

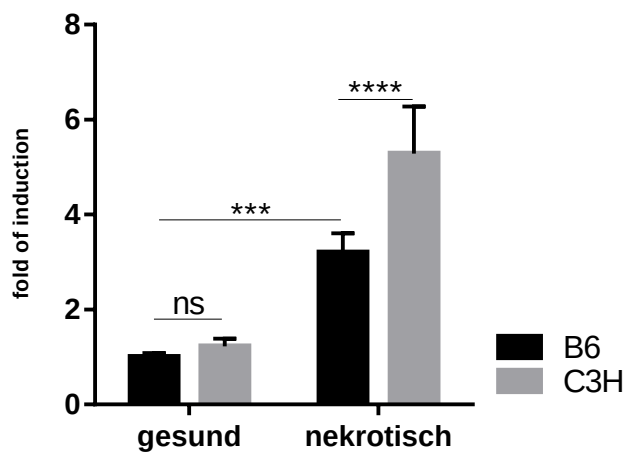


Abbildung 3.7 Messung der *Icam-1*-Genexpression mittels qPCR in gesundem und nekrotischem Herzgewebe der Mauslinien B6 und C3H 3 Tage nach Kryoinjury. Die Daten wurden zum Vergleich auf B6-Gesund normalisiert, n=4.

3.2 Optimierung eines Zellkulturmodells für Verkalkung

3.2.1 Zeitlicher Verlauf der Zellverkalkung unterschiedlicher Zelllinien

In *vitro* können verschiedene Zelllinien mit osteogenem Differenzierungspotenzial wie C2C12-Zellen, C3H/10T1/2-Zellen und HASMC durch externe Stimuli zur Mineralisierung gebracht werden (Zhang et al., 2012)(Jono et al., 2000). Um ein stabiles System zur Untersuchung der Zellverkalkung zu etablieren, wurden zunächst die aufgeführten Zelltypen mit verschiedenen Substanzen auf deren Verkalkungspotenzial getestet. Die optimalen Konzentrationen an Natriumhydrogenphosphat NaH_2PO_4 (Pi) und β -Glycerophosphat wurden bereits in einer vorherigen Doktorarbeit in unserem Institut untersucht (Sowa, Ann-Kathrin; „Funktionelle Untersuchung des Gens *Abcc6* und seines Einflusses auf Verkalkungsprozesse“, 2014). Daher wurden hier direkt die Konzentrationen von 2,6mM und 4mM für NaH_2PO_4 und 10mM für β -Glycerophosphat gewählt.

Zusätzlich zur Alazarin Red-Färbung wurde die Calciumkonzentration mit dem Rand-ox-Calcium-Kit gemessen. C3H/10T1/2-Zellen zeigen ab einer Inkubationszeit von 2Wochen mit NaH_2PO_4 die stärkste Verkalkung während bei den anderen Zelltypen zu diesem Zeitpunkt kaum eine Mineralisierung zu beobachten ist. Die Verkalkungsversuche in dieser Arbeit wurden deshalb vor allem mit C3H/10T1/2-Zellen und 2,6mM NaH_2PO_4 durchgeführt. Eine Inkubationszeit von 10 Tagen zeigte sich optimal, da hier eine ausreichende Verkalkung makroskopisch sichtbar wurde.

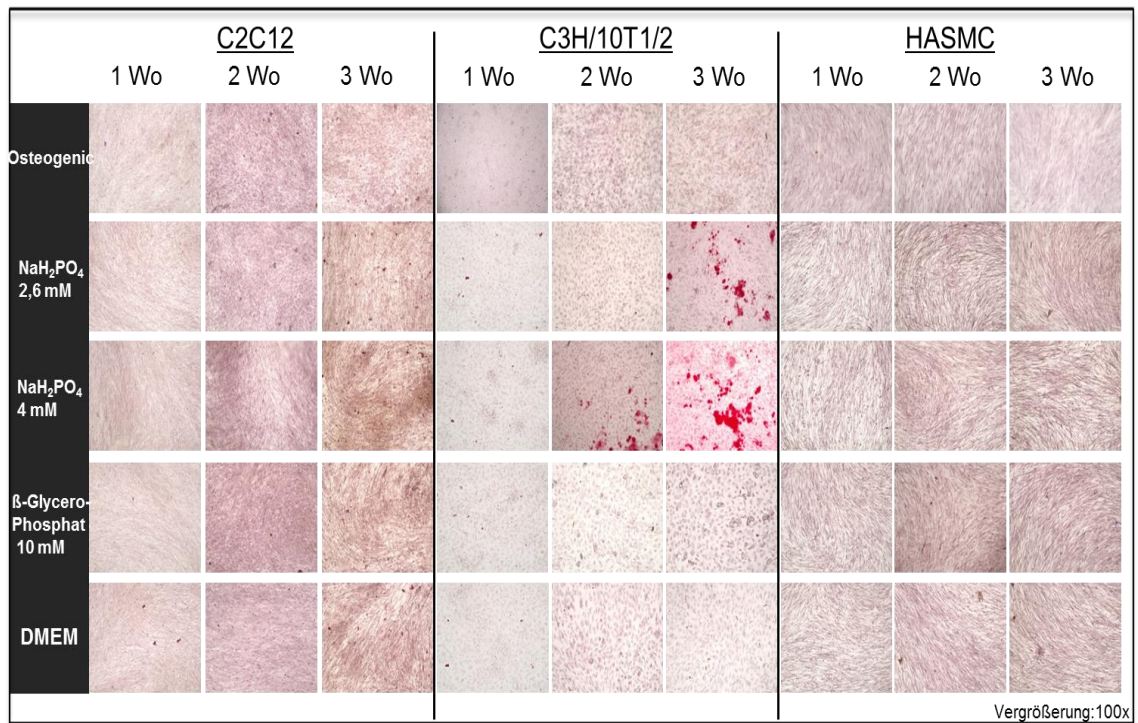


Abbildung 3.8: Alazarin Red S-Färbung zum Nachweis der Verkalkung

Zur Induktion der Verkalkung wurden C2C12, C3H/10T1/2-Zellen und HASMC für 3 Wochen in Osteogenic Medium, Natriumhydrogenphosphat (NaH_2PO_4) oder β -Glycerophosphat kultiviert. Einmal pro Woche wurde zur Darstellung der Verkalkung eine Alazarin Red S-Färbung durchgeführt. Reife Kalkablagerungen stellen sich hier rot dar.

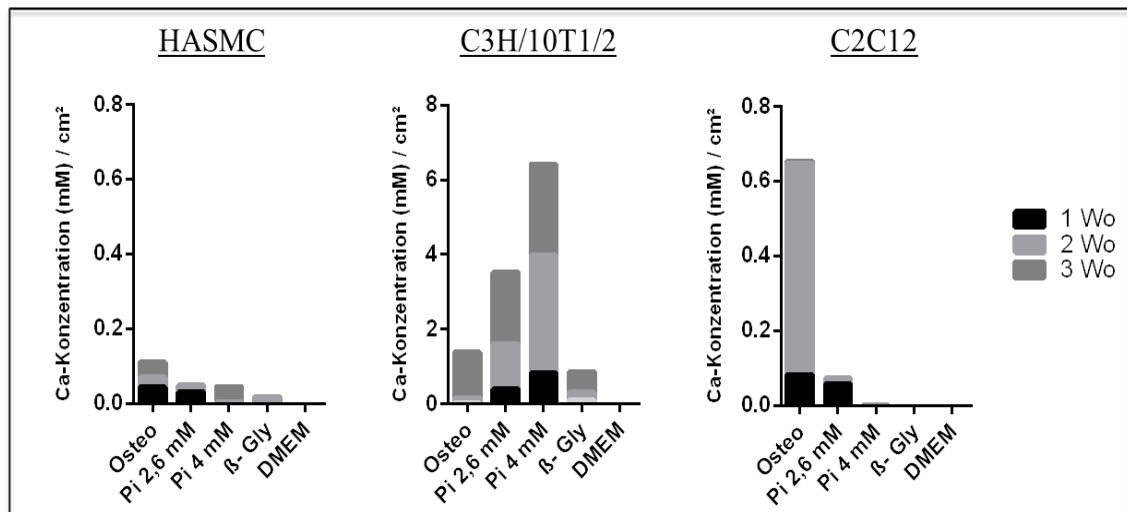


Abbildung 3.9: Calciummessung nach Verkalkungsinduktion

HASMC, C3H/10T1/2-Zellen und C2C12-Zellen wurden in den Verkalkungsmedien Osteogenic, Natriumhydrogenphosphat (Pi) oder β -Glycerophosphat (β -Gly) kultiviert. Nach 1, 2 und 3 Wochen wurde die Verkalkung mit dem Randox-Calcium-Kit gemessen. Die Calciumkonzentration wurde pro Well bestimmt und deshalb hier pro cm² angegeben. Die mesenchymale Stammzelllinie C3H/10T1/2 zeigt konzentrationsabhängig die beste Verkalkungstendenz bei Pi.

3.2.2 Einfluss von anorganischem Pyrophosphat (PPi) auf die Zellverkalkung

PPi wurde als mögliches Substrat des Abcc6-Transporters beschrieben, welches Zellverkalkung verhindert (Jansen et al., 2014). Mit 2,6mM NaH_2PO_4 (Pi) wurde die Verkalkung in C3H/10T1/2-Zellen induziert und PPi-Konzentrationen von 1-100 μM zum Medium hinzugefügt. PPi vermindert die Verkalkung mesenchymaler Stammzellen *in vitro*. Der Effekt ist dosisabhängig.

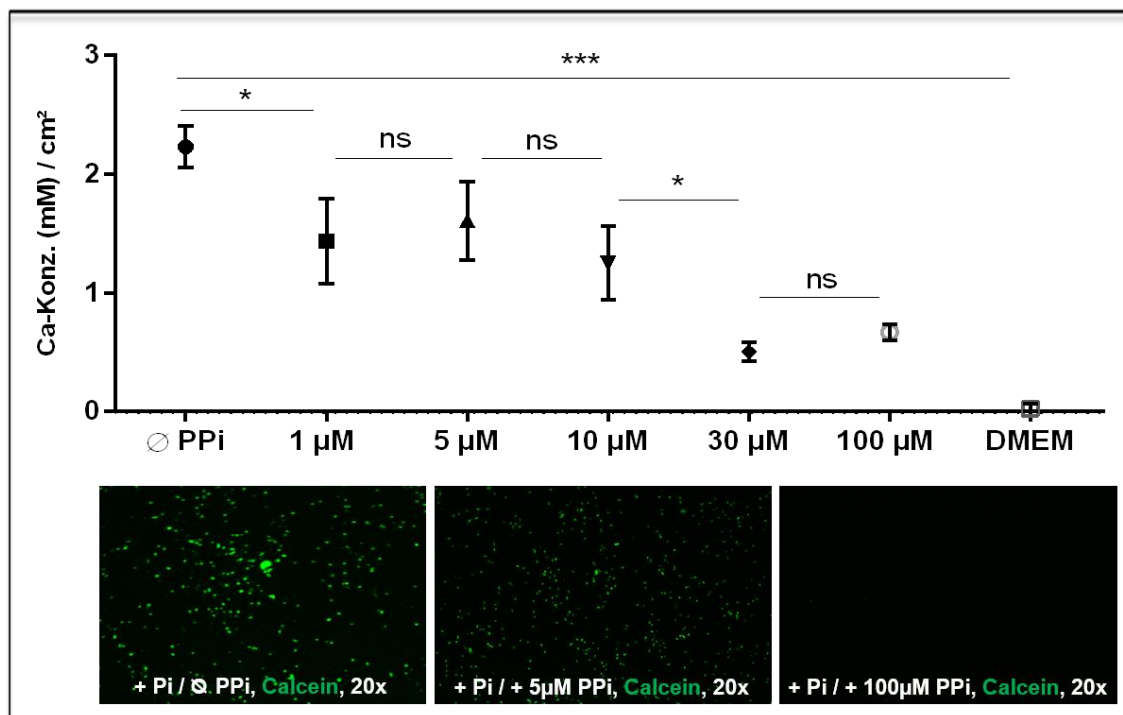


Abbildung 3.10: Anorganisches Pyrophosphat inhibiert die Verkalkung von mesenchymalen Stammzellen (C3H/10T1/2)

C3H/10T1/2-Zellen wurden in Verkalkungsmedium mit 2,6mM anorganischem Pyrophosphat und 10% FKS kultiviert. Dem Medium wurden PPi-Konzentrationen von 1 μM bis 100 μM hinzugefügt. Nach 10 Tagen erfolgte die Quantifizierung der Verkalkung mit dem Randox-Calcium-Kit (n=4 pro Variante) und es wurde eine Calceinfärbung durchgeführt. Die Calciumkonzentration wurde pro Well bestimmt und deshalb hier pro cm^2 angegeben. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein T-Test durchgeführt.

3.2.3 Einfluss von Mausplasma auf die Zellverkalkung

Es wird vermutet, dass bei zur dystrophen kardialen Verkalkung (DCC)-prädisponierten C3H-Mäusen Metabolite im Blut fehlen, die bei B6-Mäusen die Entstehung einer DCC verhindern. Dies wird durch den Funktionsverlust des Abcc6-Transporters in der Leber hervorgerufen. Die Metabolite des Abcc6-Transporters konnten bisher nicht vollständig identifiziert werden. Aufgrund dieser Hypothese wurde in dieser Arbeit der Einfluss von C3H- und B6- Mausplasma auf die Verkalkung von mesenchymalen Stammzellen (C3H/10T1/2-Zellen) und glatten Muskelzellen (HASMC) getestet. Hierzu wurde im Verkalkungsmedium bis zu 5% des FKS durch C3H- oder B6-Mausblutplasma ersetzt. Höhere Plasmakonzentrationen erwiesen sich als toxisch für die Zellen und führten zum Zelltod, bevor eine Verkalkung sichtbar war.

In den Versuchen wurde deutlich, dass Mausplasma von B6-Mäusen sowohl die Verkalkung von HASMC als auch von C3H10/T1/2-Zellen inhibiert. C3H-Mausplasma verstärkt die Verkalkung von C3H/10T1/2-Zellen, aber nicht die von HASMC.

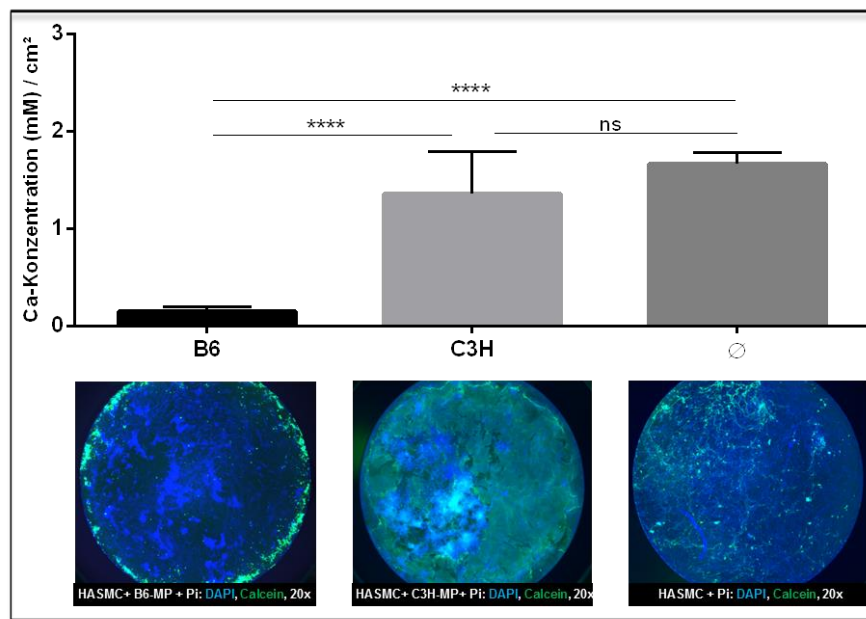


Abbildung 3.11: Einfluss von Mausplasma auf die Verkalkung von glatten Muskelzellen (HASMC)

HASMC wurden in Verkalkungsmedium mit 2,6 mM anorganischem Pyrophosphat (Pi) und 10%FKS kultiviert. 5% des FKS wurde entweder mit B6- oder C3H-Mausplasma ersetzt. Nach 21 Tagen erfolgte die Quantifizierung der Verkalkung mit dem Randox-Calcium-Kit (n pro Variante=3) und es wurde eine Calceinfärbung durchgeführt. Unter dem Einfluss von C3H - Mausplasma kommt es zu einer gelartigen Konsistenz des Mediums, weshalb sich die starke Kalkeinlagerung hier flächendeckend darstellt.

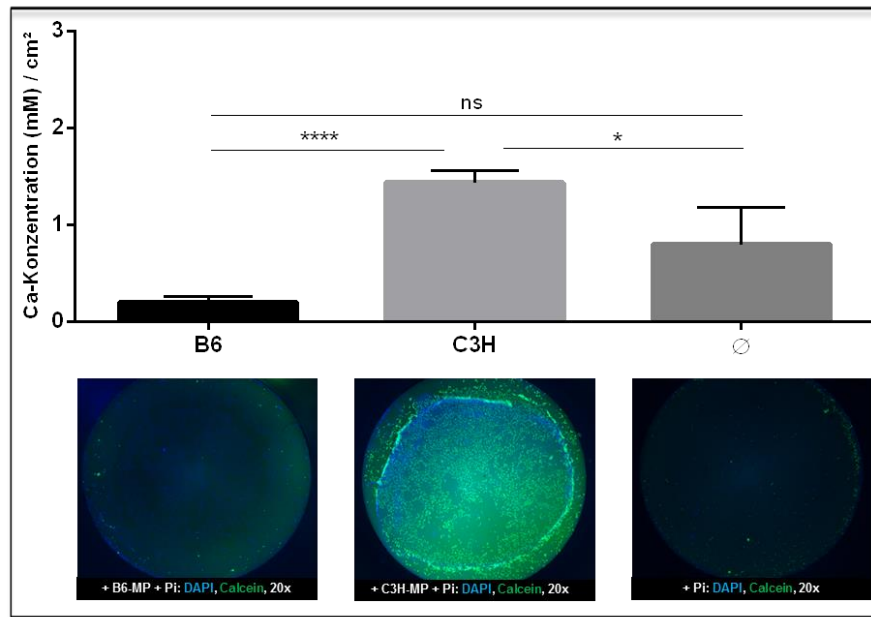


Abbildung 3.12: Einfluss von Mausplasma auf die Verkalkung von mesenchymalen Stammzellen (C3H/10T1/2)

C3H/10T1/2-Zellen wurden in Verkalkungsmedium mit 2,6 mM anorganischem Pyrophosphat und 10% FKS kultiviert. 1% des FKS wurde entweder mit B6- oder C3H-Mausplasma ersetzt. Nach 10 Tagen erfolgte die Quantifizierung der Verkalkung mit dem Randox-Calcium-Kit und es wurde eine Calceinfärbung durchgeführt.

3.2.4 Einfluss von konditioniertem Hepatozytenmedium auf die Verkalkung

Da der Abcc6-Transporter vor allem in der Leber exprimiert wird, wurden aus C3H- und B6-Mäusen Hepatozyten isoliert. Es sollte untersucht werden, ob Hepatozyten Metabolite in das Kulturmedium abgeben, welche die Verkalkung beeinflussen.

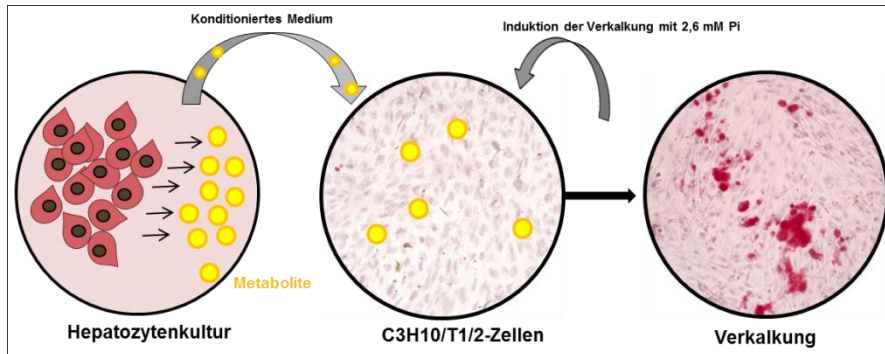


Abbildung 3.13: Versuchsaufbau- Hepatozytenkultur, Mediumkonditionierung und Zellverkalkung
Aus C3H- und B6-Mäusen isolierte Hepatozyten wurden für 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurde das konditionierte Medium auf mesenchymale Stammzellen (C3H/10T1/2) übertragen und 2,6mM anorganisches Pyrophosphat (Pi) hinzugesetzt. Nach 10 Tagen erfolgte die Quantifizierung der Verkalkung mit dem Randox-Calcium Kit.

Wurden 30% des Verkalkungsmediums durch konditioniertes Medium ersetzt, so war kein Unterschied zwischen B6 und C3H-Mäusen erkennbar. Ein Anteil von 50% C3H-Mausplasma verstärkte hingegen die Verkalkung (Abbildung 3.14)

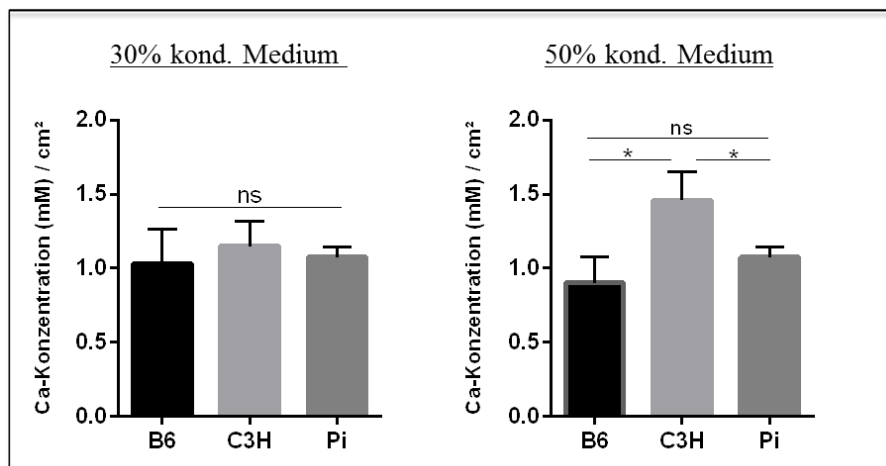


Abbildung 3.14: Einfluss von konditioniertem Hepatozytenmedium auf die Verkalkung von C3H/10T1/2-Zellen

Verwendet wurde Verkalkungsmedium bestehend aus 30% oder 50% konditioniertem Hepatozytenmedium, DMEM, 10% FKS und 2,6mM Pi.

3.2.5 Konditioniertes Medium transfizierter mesenchymaler Stammzellen

Dass *Abcc6*-Gen von B6- und C3H-Mäusen wurde in C3H/10T1/2-Zellen transfiziert und somit überexprimiert. Die mit der B6-*Abcc6*-Variante transfizierten Zellen geben Stoffe ins Medium ab, die die Verkalkung reduzieren. Ein intakter *Abcc6*-Transporter scheint folglich eine protektive Wirkung auf Mineralisierung zu haben.

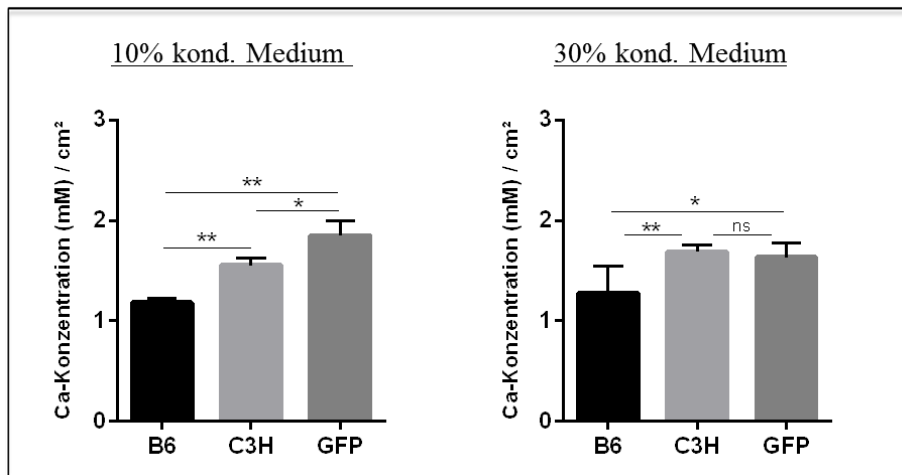


Abbildung 3.15: Durch transfizierte C3H/10T1/2 Zellen konditioniertes Medium und dessen Einfluss auf die Verkalkung von C3H/10T1/2-Zellen

Je 10% bzw 30% des DMEM wurden durch konditioniertes Medium ersetzt und die Verkalkung mit 2,6mM Pi induziert. GFP diente als Kontrollvektor.

3.3 Etablierung eines Assays zur Monozytenisolierung und – differenzierung aus der Milz

Bei zur dystrophen kardialen Verkalkung (DCC) prädisponierten C3H-Mäusen konnte im Gegensatz zu resistenten B6-Mäusen eine starke Ansammlung TRAP-positiver multinukleärer (MN) Zellen im verkalkten Herzgewebe beobachtet werden (siehe Abbildung 3.2.) Unter der Hypothese, dass Monozyten über die Milz an den Ort der Entzündung am Herzen wandern und dort zu MN-Zellen fusionieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *in vitro* Assay zur Monozytenisolierung und -differenzierung etabliert. Aus beiden Mausstämmen wurden hierfür Monozyten aus der Milz isoliert, mittels M-CSF zu Makrophagen und durch RANKL weiter zu MN-Zellen differenziert.

3.3.1 Differenzierung der Monozyten zu Multinukleären Zellen

Zur Erfolgskontrolle wurde die Zelldifferenzierung zu MN-Zellen von aus der Milz isolierten Monozyten mikroskopisch mit Hilfe einer TRAP-Färbung sichtbar gemacht.

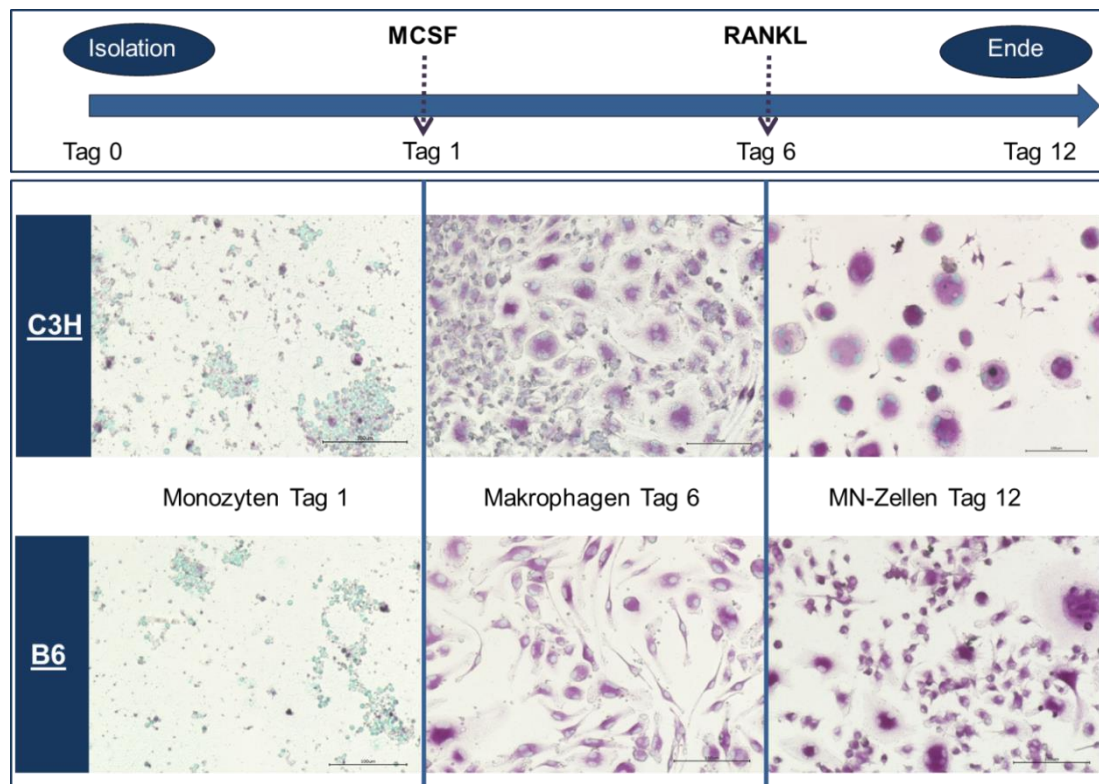


Abbildung 3.16: Darstellung der Monozytendifferenzierung der Mauslinien C3H und B6

Durch die TRAP-Färbung (TaKaRa-Staining-Kit) konnten multinukleäre Zellen lila dargestellt werden. Die Zellkerne wurden grün angefärbt. An Tag 1 sind nur rundliche Monozyten sichtbar (da Monozyten nur unzureichend auf Oberflächen haften, stellt die ungleichmäßige Zellverteilung hier ein Färbeartefakt dar). Nach Stimulation mit M-CSF an Tag 1, können an Tag 6 TRAP-positive einkernige Makrophagen beobachtet werden. An Tag 12 sind die Makrophagen nach Zugabe von RANKL vollständig zu multinukleären (MN) osteoklastenähnlichen Zellen fusioniert. Bei B6-Mäusen ist die Bildung MN-Zellen ineffizient. Es zeigen sich mehr TRAP-positive multinukleäre Riesenzellen bei C3H-Mäusen.

3.3.2 Expression von Osteogenesemarkern während der Differenzierung

Neben der histologischen TRAP-Färbung wurde die Expression der typischen Osteogenesemarkern *Trap*, *Runx2* und *Ctsk* in Monozyten (Tag1), Makrophagen (Tag 6) und Osteoklasten (Tag 12) gemessen. Bei aus C3H-Mäusen isolierten Monozyten ist ein deutlicher Anstieg von *Trap*, *Runx2* und *Ctsk* im Laufe der Differenzierung zu Osteoklasten zu verzeichnen. Bei B6 zeigt sich die höchste *Ctsk*-Expression in Makrophagen und fällt danach stark ab. Da die Osteoklastenähnlichen Zellen sowohl Osteoblastenmarker wie *RunX2* als auch die Osteoklastenmarker *Ctsk* und *Trap* exprimieren, wurden die aus Monozyten differenzierten Zellen in dieser Arbeit als MN (multinukleäre) - Zellen bezeichnet.

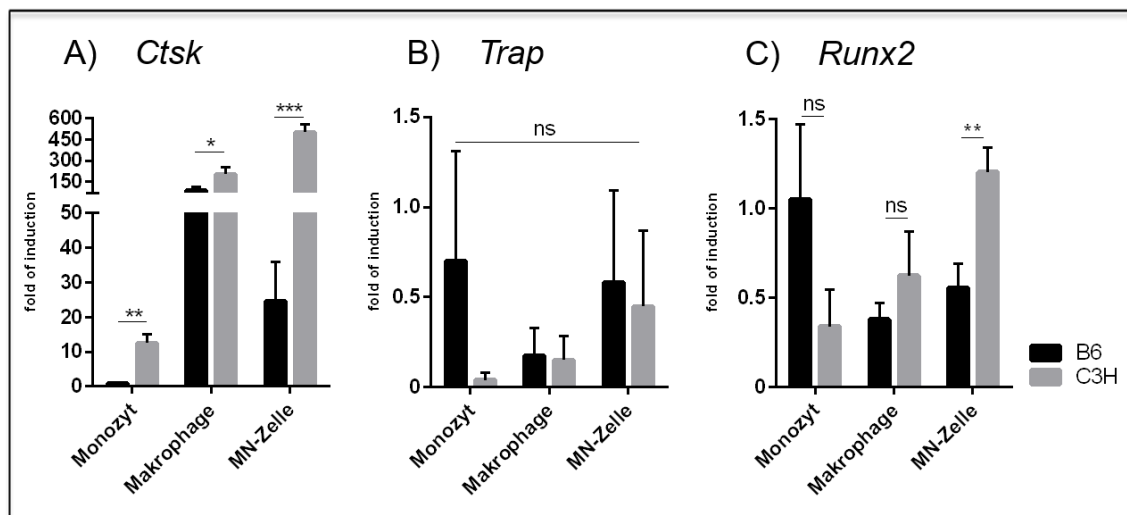


Abbildung 3.17: Expression der Osteogenesemarkers *Trap*, *RunX2* und *Ctsk* während der Monozytendifferenzierung zu MN-Zellen. Die Genexpression in Makrophagen und MN-Zellen (*fold of induction*) wurde jeweils gegenüber der Expression in B6-Monozyten normalisiert.

3.3.3 Vergleich der Monozytendifferenzierung zwischen DCC-resistenten und prädisponierten Mausstämmen

In vivo konnte bei DCC-prädisponierten C3H-Mäusen im Gegensatz zu B6-Mäusen eine starke Akkumulation multinukleärer (MN) Zellen im verkalkten Herzgewebe festgestellt werden. Um diese Beobachtung *in vitro* genauer zu untersuchen, wurden von C3H- und B6-Mäusen Monozyten aus der Milz isoliert und mittels M-CSF und RANKL zu MN-Zellen differenziert. Zur Quantifizierung wurden TRAP-positive Zellen mit 3 oder mehr Zellkernen als multinukleär definiert und unter dem Mikroskop gezählt.

In *vitro* zeigte sich eine erhöhte MN-Zellformation in DCC-prädisponierten C3H-Mäusen. Bei B6 sind hingegen nur wenige MN-Zellen zu identifizieren.

Ursächlich für DCC bei der Maus ist ein Polymorphismus im *Abcc6*-Gen, der zu reduzierter Expression von Mrp6 Protein in zu Verkalkung neigenden Mäusen führt (Aherrahrou et al., 2008). Um zu entscheiden, ob die beobachteten Unterschiede in der Differenzierungskapazität von Monozyten abhängig von *Abcc6* sind, wurden zusätzlich Cg1-Mäuse untersucht. Dieser kongene Mausstamm enthält den *Abcc6*-Lokus von C3H-Mäusen auf einem fast kompletten genetischen B6 Hintergrund (99,9%). Die Cg1-Mäuse zeigen ebenso wie C3H-Mäuse eine höhere Formation von MN-Zellen als B6-Mäuse.

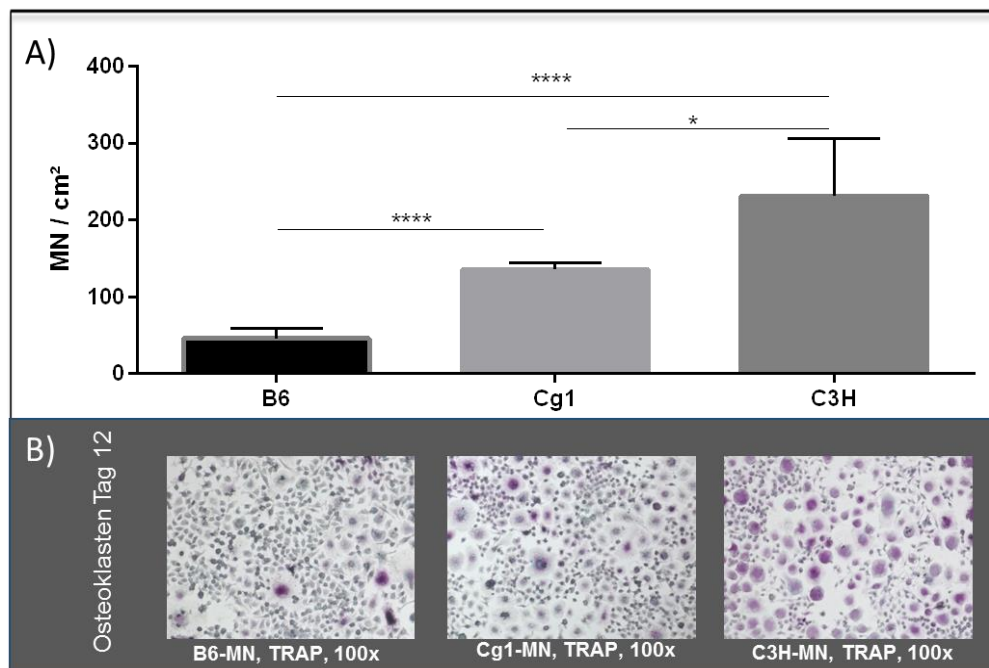


Abbildung 3.18: Gesteigerte Formation MN-Zellen in DCC prädisponierten Mäusen

Monozyten von DCC-resistenten B6-Mäusen und DCC-prädisponierten C3H und Cg1-Mäusen wurden isoliert und mit M-CSF und RANKL zu MN-Zellen differenziert. TRAP-positive Zellen (B) mit mehr als 3 Zellkernen wurden zur Quantifizierung als MN-Zellen gezählt (A).

3.3.3.1 Expression von Transkriptionsfaktoren der Osteogenese

Um die Differenzierung von MN-Zellen auch auf molekularer Ebene zu quantifizieren, wurde die Expression der Osteogenesemarker *Trap*, *Ctsk*, *RunX2* gemessen. Alle 3 Marker waren in MN-Zellen DCC-prädisponierter C3H-Mäuse höher exprimiert als im DCC-resistenten Mausstamm B6.

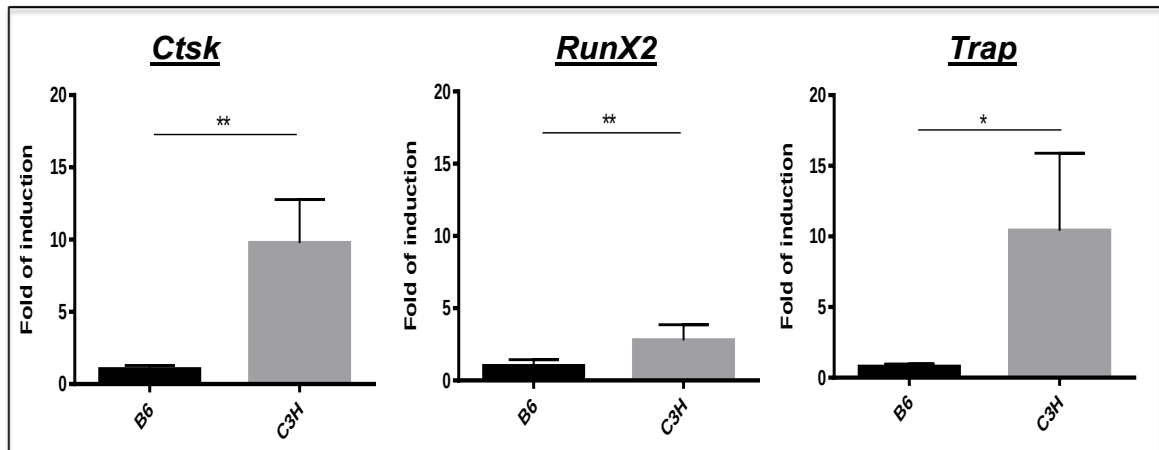


Abbildung 3.19: Relative Quantifizierung der Osteogenesemarker *Trap*, *Ctsk* und *RunX2* in MN-Zellen von B6- und C3H-Mäusen durch qPCR. Alle Daten wurden auf B6 normalisiert.

3.3.4 Expression von M1/M2-Makrophagenmarkern

Der Zellphänotyp wurde über den Makrophagenmarker *CD68* in beiden Mausstämmen bestätigt. Es besteht kein Unterschied im *CD68*-Expressionsniveau zwischen B6 und C3H (Abbildung 3.20A). Zusätzlich wurde die Nitrit Oxid Synthase (*iNOS*)- und Arginase-1(*Arg-1*)-Expression als Marker für M1 und M2-Makrophagen gemessen (Abbildung 3.20B). DCC-prädisponierte C3H-Mäusen zeigen eine starke Makrophagenpolarisierung und exprimieren *iNOS* und *Arg-1* höher als B6-Makrophagen. Die Genexpression des M2-Markers *Arg-1* ist nur in C3H-Monozyten und -Makrophagen exprimiert und kann bei B6 nicht detektiert werden (Abbildung 3.20C).

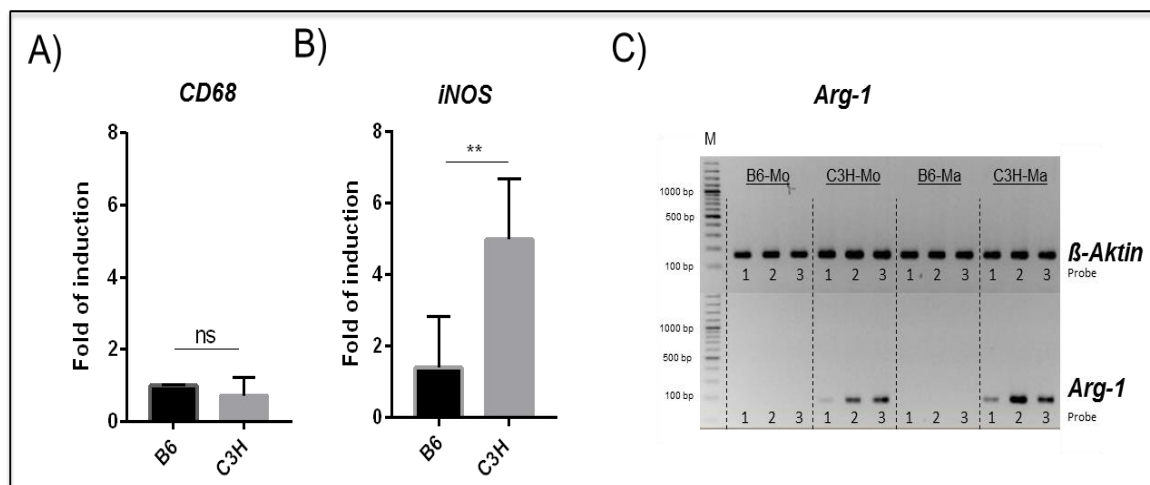


Abbildung 3.20: Genexpression in Monozyten (Mo) und Makrophagen (Ma) aus B6- bzw C3H-Mäusen

A) qPCR-Analyse der Makrophagenmarker *CD68*. Aus Monozyten differenzierte Makrophagen beider Mauslinien exprimieren gleiche Level an *CD68* als Zeichen einer erfolgreichen Differenzierung *in vitro*. B) qPCR-Analyse der Makrophagenmarker *iNOS*. C) Gelelektrophorese der *Arg-1* und β -Aktin-Expression. Um besser darzustellen, dass B6-Makrophagen keine *Arg-1* Expression zeigen, wurde hierzu PCR und Gelelektrophorese statt qPCR verwendet (C).

3.3.5 Expression von Komplementfaktoren in Vorläuferzellen

Die aktivierten Complement Komponenten 5 (C5a) und 3 (C3a) spielen eine wichtige Rolle bei der Interaktion und Entwicklung von Osteoblasten und Osteoklasten (Ignatius, Schoengraf et al., 2011). Deshalb wurde sowohl die Expression von *C3a* und *C5a* als auch von den zugehörigen Rezeptoren *C3ar* und *C5ar* während der Differenzierung von MN-Zellen in B6 und C3H gemessen. Monozyten und Makrophagen von C3H-Mäusen zeigen im Gegensatz zu B6-Monozyten eine hohe Expression von *C3ar* und *C3a* (Abbildung 3.21A). In der *C3a* und *C3ar*-Expression in MN-Zellen bestanden keine Unterschiede zwischen B6 und C3H (Abbildung 3.21B). In beiden Mausstämmen konnte

keine Expression von *C5a* detektiert werden (Abbildung 3.21C). MN-Zellen von B6 zeigen allerdings eine hohe *C5ar*-Expression.

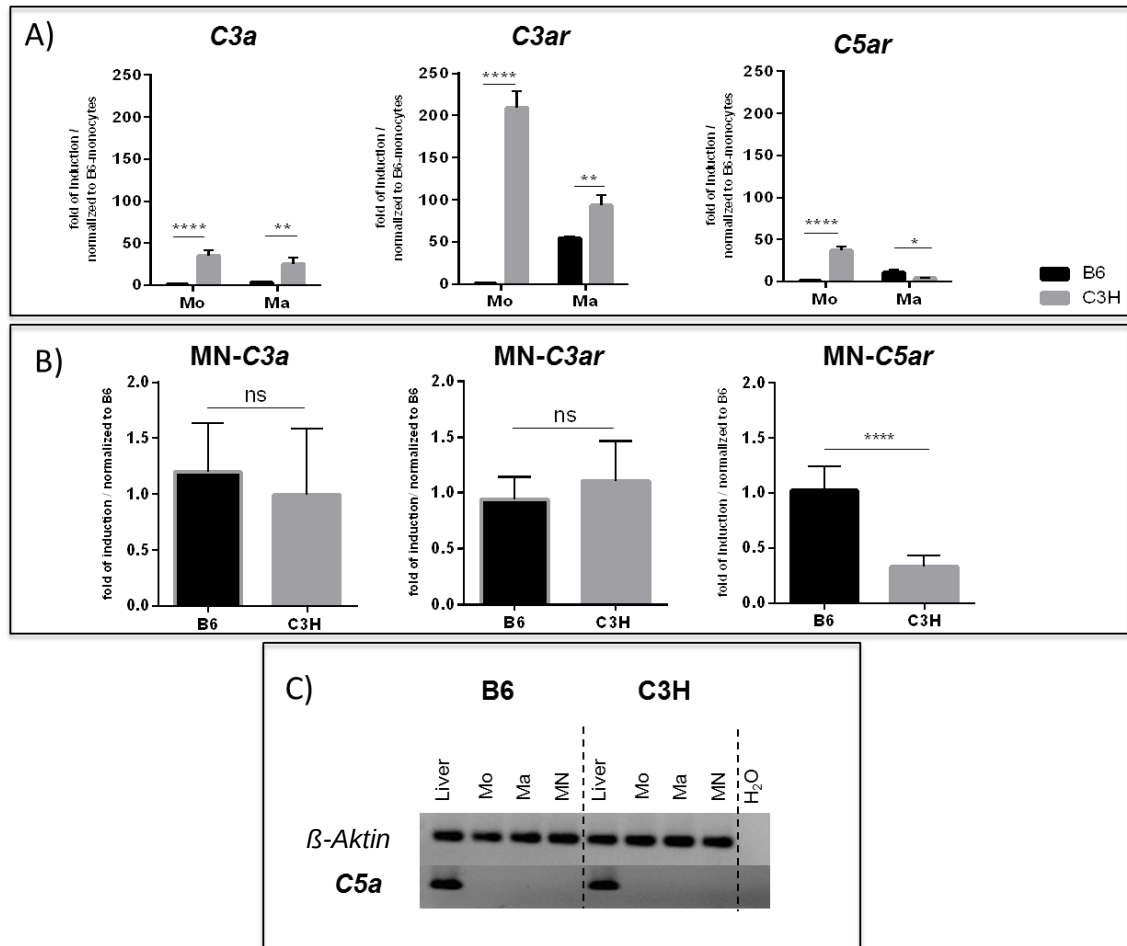


Abbildung 3.21: Expression der Complement Komponenten und Rezeptoren

Zur Normalisierung wurde das Expressionsniveau von B6-Monozyten verwendet.

A) *C3a*, *C3ar* und *C5ar*- Expression in Monozyten (Mo) und Makrophagen (Ma). B) Analyse der Genexpression in multinukleären Zellen (MN). C) In Monozyten und deren Differenzierungsstufen ist keine *C5a*-Expression detektierbar. DCC-prädisponierte C3H-Mäuse zeigen hohe Expressionslevel von *C3a* und *C3ar* in frühen Stadien der Zelldifferenzierung in Mo und Ma. Im Gegensatz dazu steigt die *C3a*-Expression in B6-Monozyten während der Differenzierung kaum an. In der *C3a* und *C3ar*-Expression MN-Zellen bestehen keine Unterschiede zwischen beiden Mausstämmen. Eine *C5a*-Expression konnte in beiden Gruppen nicht detektiert werden, allerdings zeigen MN-Zellen von B6 eine höhere Expression von *C5ar* als C3H.

3.3.6 Einfluss von Mausplasma auf die Makrophagendifferenzierung

Nach aktuellem Forschungsstand ist die Entstehung der dystrophen kardialen Verkalkung (DCC) eine metabolische Störung. Der intakte Abcc6-Transporter in der Leber setzt Metabolite (wie z.B. PPi) in das Blut frei, die am Herzen die Kalkablagerung verhindern. Auf C3H/10T1/2-Zellen und HASMC zeigte B6-Mausplasma einen verkalkungsinhibierenden Effekt (siehe 3.2.3). Deshalb wurde auch der Einfluss von Mausplasma auf die Differenzierung von aus der Milz isolierten Monozyten untersucht. Blutplasma von B6-Mäusen hemmt die Formation Multinukleärer-Zellen (MN) aus C3H-Monozyten (Abbildung 3.22A). Auf B6-Monozyten hat Mausplasma kein Einfluss auf die Differenzierung (Abbildung 3.22B).

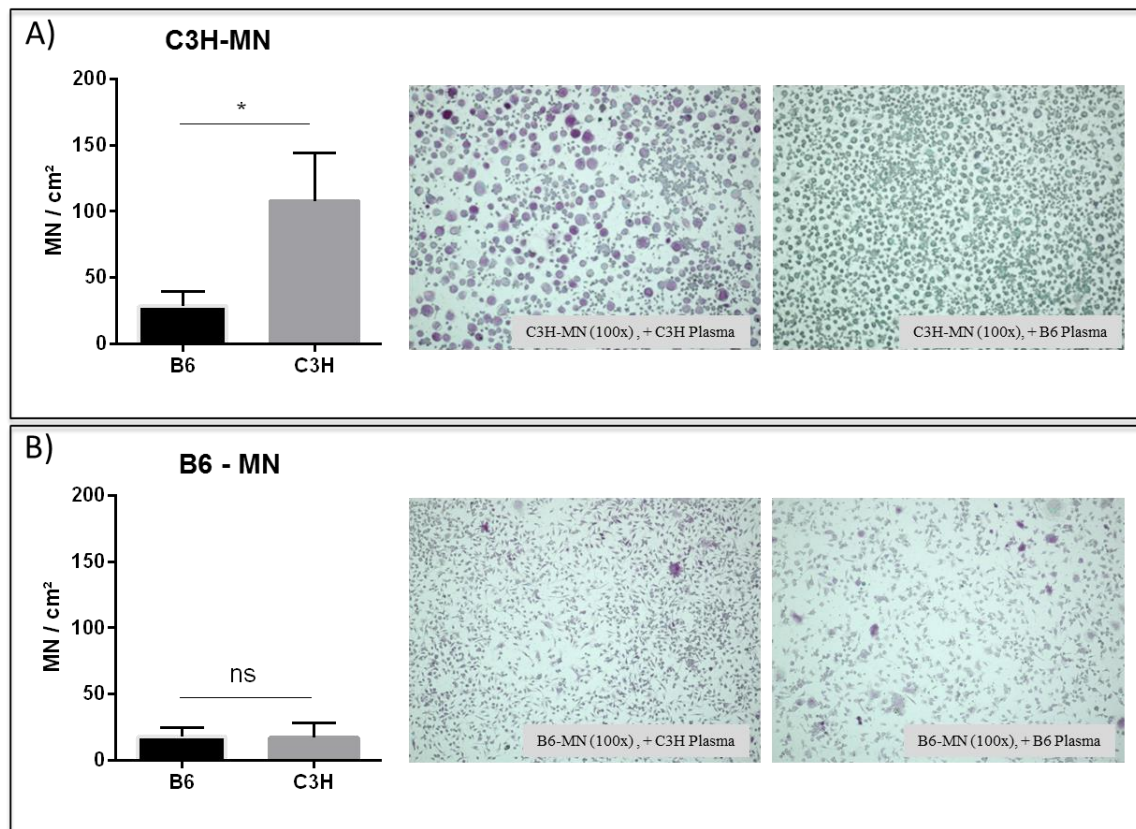


Abbildung 3.22: Faktoren im Blutplasma von DCC-resistenten B6-Mäusen verhindern die Formation MN-Zellen in verkalkenden C3H-Mäusen

Von den beiden Mausstämmen B6 und C3H wurde Blutplasma gewonnen. A) Milzmonozyten von C3H-Mäusen wurden durch M-CSF und RANKL zu MN-Zellen differenziert. Hierbei wurde im Zellmedium 4% FKS durch C3H oder B6-Mausplasma ersetzt. Die Bildung MN-Zellen wurde über eine TRAP-Färbung mikroskopisch quantifiziert. TRAP-positive Zellen mit mehr als 3 Zellkernen wurden gezählt. B) Nach gleichem Prinzip wurden auch Monozyten aus der Milz von B6-Mäusen isoliert. Auch hier wurde der Einfluss von Mausplasma auf die Differenzierung von Monozyten analysiert.

3.3.7 *Abcc6*-Expression in Leber und multinukleären Zellen (MN)

C3H-Mäuse weisen einen Funktionsverlust im *Abcc6*-Transporter der Leber auf und entwickeln deshalb eine dystrophe kardiale Verkalkung (DCC). DCC wird bisher als metabolische Erkrankung eingeordnet, bei der verkalkungsinhibierende Metabolite im Blut fehlen. Da in den *in vitro* Experimenten bereits deutliche Unterschiede in der Differenzierungskapazität von C3H- und B6-Milzmonozyten ohne den Einfluss von Stoffwechselprodukten im Blut deutlich waren, wurde die *Abcc6*-Expression in Monozyten, Makrophagen und MN-Zellen getestet. Es sollte überprüft werden, ob der *Abcc6*-Transporter auch in Entzündungszellen exprimiert ist und somit direkten Einfluss auf die Entzündungsreaktion haben kann. Weder in B6, noch in C3H Mäusen ist *Abcc6* in Monozyten und deren Differenzierungsstufen exprimiert.

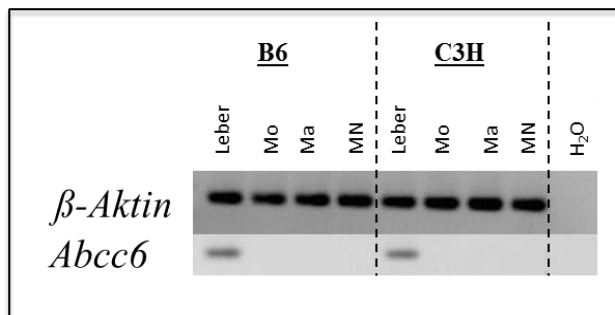


Abbildung 3.23: Elektrophorese-Gel *Abcc6*

Es wurde eine PCR mit Monozyten (Mo), Makrophagen (Ma) und MN-Zellen durchgeführt. Verwendet wurden die Primer für β -Aktin als Housekeeping-Gen und *Abcc6*. Zur Positivkontrolle diente die Leber des jeweiligen Mausstammes und als Negativkontrolle H_2O .

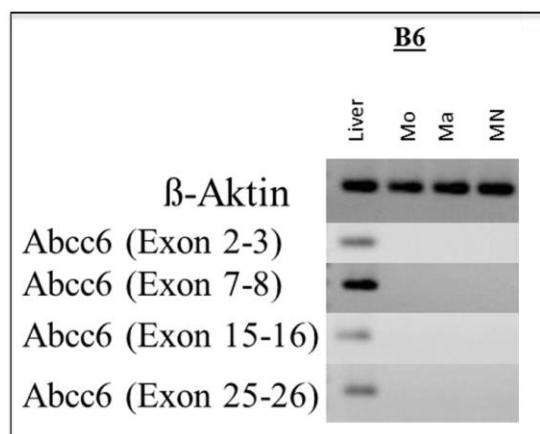


Abbildung 3.24: Elektrophorese-Gel *Abcc6*-Primertest

Es wurde eine PCR mit Proben der Leber, Monozyten (Mo), Makrophagen (Ma) und MN-Zellen von B6-Mäusen durchgeführt. Verwendet wurden *Abcc6*-Primer, die verschiedene Exone des *Abcc6*-Gens umfassen.

3.3.8 *Enpp1*-Expression in Leber und MN-Zellen

Da das *Abcc6*-Gen nicht in Monozyten, Makrophagen oder MN-Zellen exprimiert ist, wurde zusätzlich die Expression von *Enpp1* als Enzym des Phosphatstoffwechsels gemessen. Die *Enpp1* spaltet ATP in PPi und AMP.

In der Leber von C3H-Mäusen konnte sowohl eine geringe *Abcc6*- als auch *Enpp1*-Expression als bei B6 detektiert werden (Abbildung 3.25)

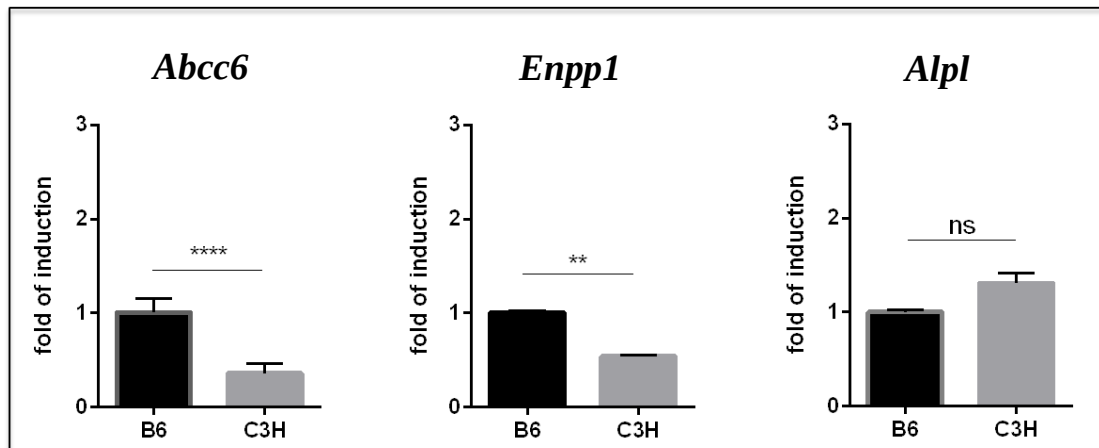


Abbildung 3.25: qPCR der Primer *Abcc6*, *Enpp1* und *Alpl* mit cDNA aus der Leber von B6- und C3H-Mäusen. Die Genexpression in B6 wurde auf eins normalisiert und die C3H-Genexpression hierzu ins Verhältnis gesetzt.

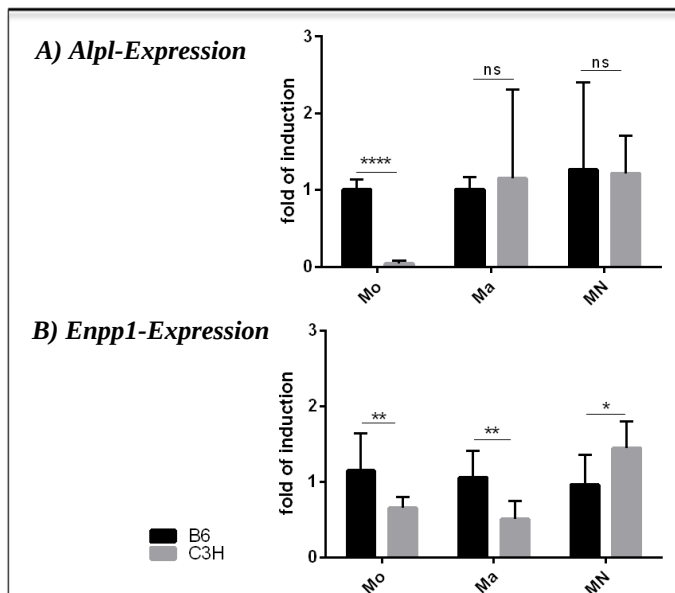


Abbildung 3.26: *Enpp1* und *Alpl*-Expression in Monozyten und deren Differenzierungsstufen Monozyten aus der Milz von B6- und C3H-Mäusen wurden isoliert und zu MN-Zellen differenziert. In den verschiedenen Entwicklungsstadien wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die *Enpp1*- und *Alpl*-Expression mittels qPCR gemessen. Die Genexpression in B6 wurde auf eins normalisiert und die C3H-Genexpression hierzu ins Verhältnis gesetzt.

Betrachtet man die *Enpp1*-Expression in Monozyten und Makrophagen, so zeigen Monozyten und Makrophagen von B6-Mäusen eine höhere *Enpp1*-Expression als C3H-Monozyten und -Makrophagen. Differenzierte multinukleäre Zellen (MN) aus C3H-Mäusen zeigen hingegen eine höhere *Enpp1*-Expression im Vergleich zu MN-Zellen der B6-Linie (Abbildung 3.26)

3.3.9 Einfluss von konditioniertem Medium multinukleärer Zellen (MN) auf die Zellverkalkung

Da in Monozyten und deren Differenzierungsstufen kein *Abcc6* exprimiert wird, können die Unterschiede in der MN-Zell-Formation nicht direkt auf genetische Unterschiede zwischen den Mauslinien B6 und C3H bezogen werden. Um den Einfluss der MN-Zellen bei DCC-prädisponierten C3H-Mäusen auf Gewebeverkalkung zu untersuchen, wurde Zellmedium während der Differenzierung von Monozyten zu MN-Zellen gesammelt. Nach der vollständigen Entwicklung zu MN-Zellen an Tag 12 wurde das Medium nochmals komplett abgesaugt und das frische Medium (Tag 1+2) für je 24h durch die MN-Zellen konditioniert.

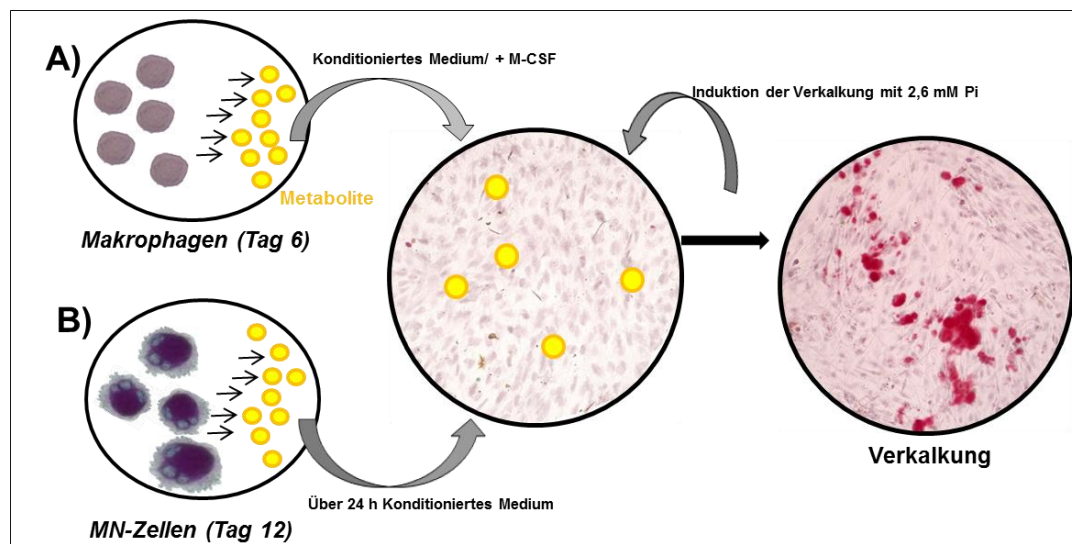


Abbildung 3.27: Versuchsaufbau Mediumkonditionierung Makrophagen/MN-Zellen

A) Monozyten wurden aus der Milz isoliert und mittels M-CSF zu Makrophagen differenziert. An Tag 6 wurde das konditionierte Makrophagenmedium auf C3H10T1/2-Zellen übertragen und mit 2,6mM anorganische Pyrophosphat die Verkalkung induziert. B) Aus der Milz isolierte Monozyten wurden über 12 Tage mit M-CSF und RANKL zu MN-Zellen differenziert. Das Medium wurde an Tag 12 komplett erneuert, für 24h von den MN-Zellen konditioniert und anschließend für den Verkalkungsversuch verwendet.

Das von C3H-MN-Zellen konditionierte Medium steigert die Verkalkung in C3H/10T1/2 Zellen im Vergleich zum konditionierten B6-MN-Medium. Der Effekt ist dosisabhängig und kann erst ab einem Anteil von 75% des konditionierten Mediums beobachtet werden (Abbildung 3.28A). Derselbe verkalkungsinhibierende Effekt ist auch bei von Makrophagen konditioniertem Medium unter M-CSF-Einfluss zu verzeichnen, die Unterschiede sind deutlich ausgeprägter als bei MN-Medium (Abbildung 3.28B).

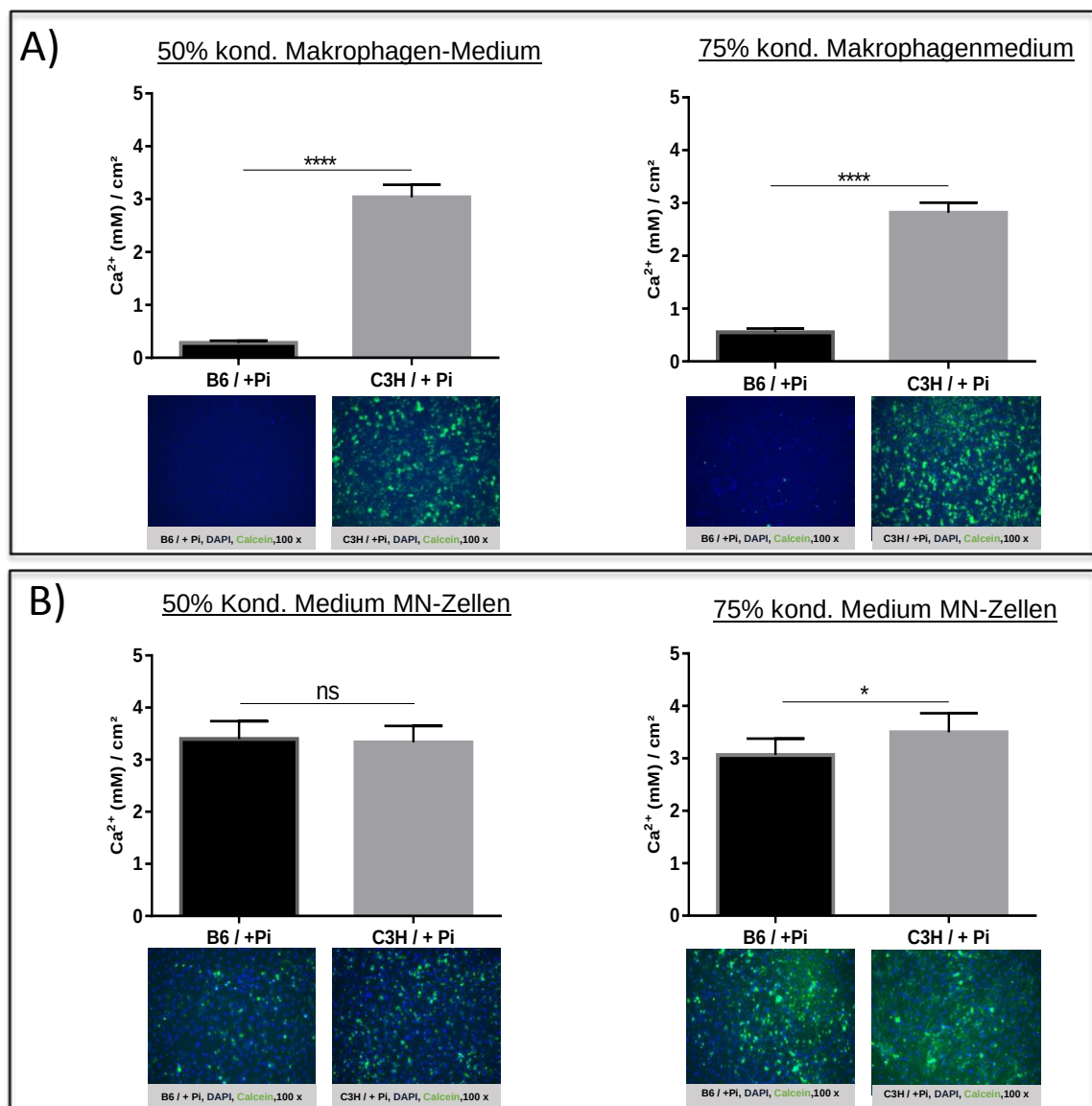


Abbildung 3.28: Einfluss von durch Makrophagen und MN-Zellen konditionierten Mediums auf die Verkalkung mesenchymaler Stammzellen (C3H10T1/2)

Aus der Milz isolierte Monozyten wurden durch M-CSF und RANKL zu Makrophagen bzw MN-Zellen differenziert. An Tag 12 wurden die Zellen mit PBS gewaschen und frisches Medium zur Konditionierung für 24h auf dem Zelllayer inkubiert. In mesenchymalen Stammzellen wurde anschließend die Verkalkung mit 2,6mM Pi induziert und je 50% oder 75% konditioniertes Medium verwendet. Nach 10 Tagen Stimulation wurde die Calciumkonzentration mit dem Randox-Calcium-Kit gemessen. Der Verkalkungsansatz mit konditioniertem Makrophagenmedium wurde bereits nach 5 Tagen beendet, da das enthaltene M-CSF die Zellverkalkung beschleunigt.

3.3.10 Messung der Zytokinproduktion von Makrophagen und multinukleären Zellen

Aus C3H-Mäusen isolierte Makrophagen sezernieren Metabolite, die Zellverkalkung fördern. Um diese Metabolite genauer einzugrenzen, wurden für entzündliche Prozesse relevante Zytokine, Chemokine und Akute-Phase-Proteine mit dem Proteome Profiler Cytokine Array Kit gemessen. C3H-Makrophagen zeigen eine höhere Sekretion entzündungsfördernder Mediatoren als B6-Makrophagen. Insbesondere die Icam-1/CD54-Konzentration im C3H-Medium ist im Gegensatz zu B6 deutlich erhöht (Abbildung 3.29). Nach der Differenzierung zu MN-Zellen sinkt die Zytokinproduktion bei beiden Mausstämmen ab (Abbildung 3.30).

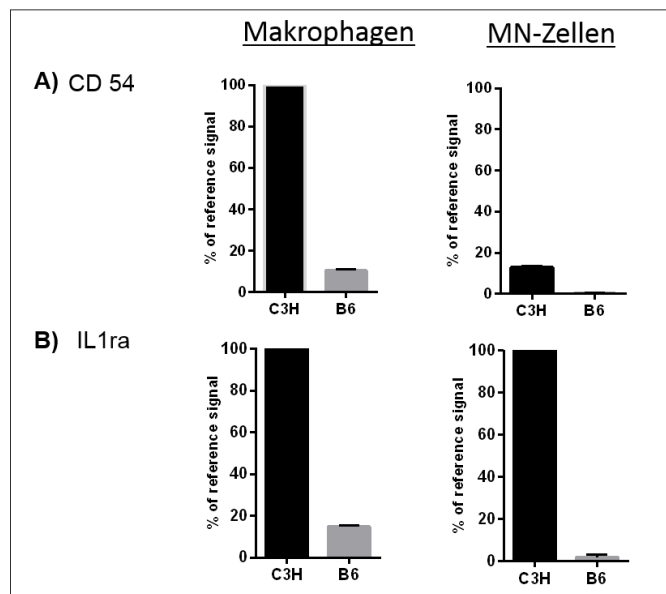


Abbildung 3.29: Messung der Zytokinkonzentration im Makrophagen- und MN-Medium (n=4). A-B) Die Sekretion von Icam1/CD54 und IL1ra ist bei C3H-Makrophagen deutlich erhöht und könnte somit den verkalkungsfördernden Effekt des C3H-Makrophagenmediums erklären.

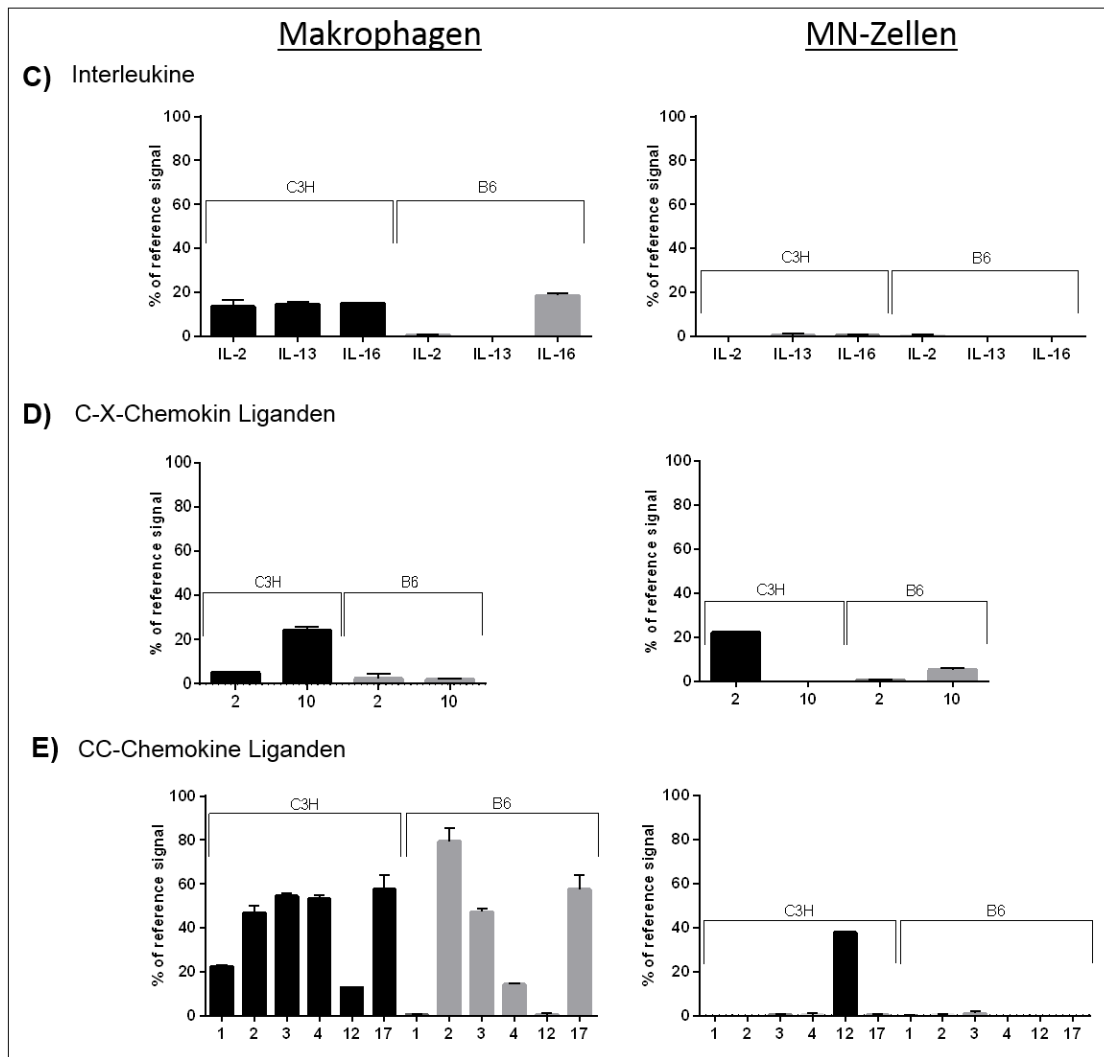


Abbildung 3.30: Messung der Zytokinkonzentration im Medium von Makrophagen und multinukleären Zellen (MN).

3.3.11 Icam-1/CD54 ELISA

Da ein deutlicher Unterschied in der Icam1-Sekretion zwischen B6- und C3H-Makrophagen in den vorausgegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, wurde zur besseren Quantifizierung ein ELISA durchgeführt. Aus der Milz von B6 und C3H-Mäusen wurden Monozyten isoliert und zu Makrophagen differenziert. Nach 6 Tagen wurde die Icam-1 Konzentration im Medium gemessen. Makrophagen aus dem DCC-prädisponiertem C3H-Mausstamm sezernierten mehr Icam-1 als Makrophagen aus verkalkungsresistenten B6-Mäusen.

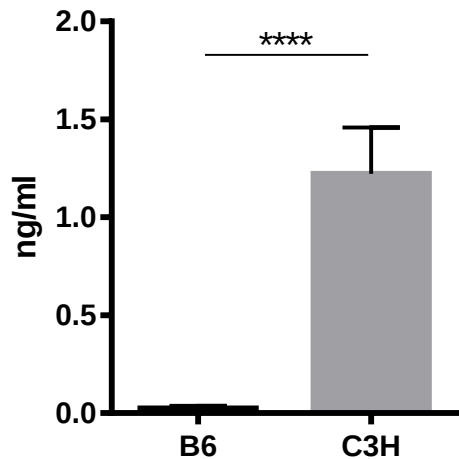


Abbildung 3.31 Messung der Icam-1-Konzentration im Medium von Makrophagen. Diese wurden zuvor aus der Milz von B6- und C3H-Mäusen isoliert und differenziert.

3.3.12 PPi-Messung

Um zu überprüfen, ob anorganisches Pyrophosphat (PPi) eine Rolle bei der verkalkungsinhibierende Wirkung des konditionierten B6-Makrophagenmediums spielt, wurde die PPi-Konzentration im Medium gemessen. B6-Makrophagenmedium enthält höhere PPi-Konzentrationen als C3H-Medium.

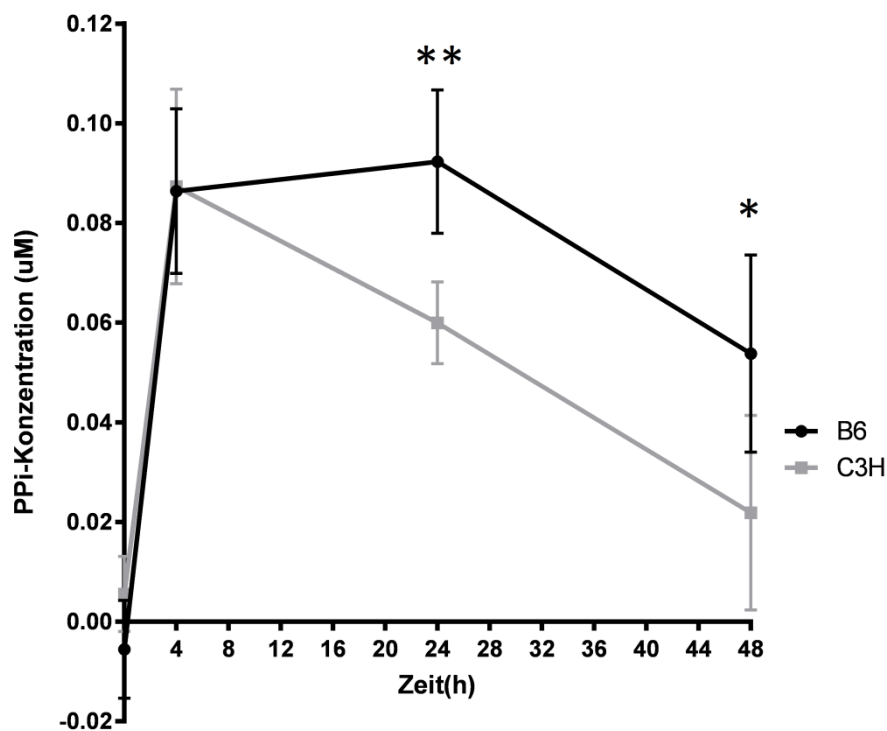


Abbildung 3.32: PPi-Messung in konditioniertem Makrophagenmedium. Nach 4 Stunden sind im Medium von B6- und C3H-Makrophagen ähnliche PPi-Ausgangskonzentrationen messbar. Nach 24h weist B6-Medium eine höhere Konzentration auf, die nach 48h wieder abnimmt.

3.3.13 Einfluss von anorganischem Pyrophosphat auf die Makrophagendifferenzierung

Anorganisches Pyrophosphat (PPi) wird als mögliches Schlüsselsubstrat des Abcc6-Transporters diskutiert. In DCC-resistenten B6-Mäusen können im Blut höhere PPi-Level gemessen werden als bei C3H-Mäusen. Daher wurde hier getestet, ob PPi in dem hier etablierten Versuchsaufbau die Bildung MN-Zellen aus Milzmonozyten inhibiert. Es wurden PPi-Konzentrationen zwischen 3 μM und 100 μM ausgewählt, da dies am ehesten den physiologisch im Mausblut gemessenen PPi-Werten entspricht. PPi inhibiert die Differenzierung von MN-Zellen in B6 und C3H-Mäusen. Der Effekt ist dosisabhängig. Bei C3H-MN-Zellen ist zusätzlich eine Herunterregulierung der Osteogenesemarker *Trap* und *Ctsk* unter PPi-Einfluss zu verzeichnen (Abbildung 3.35).

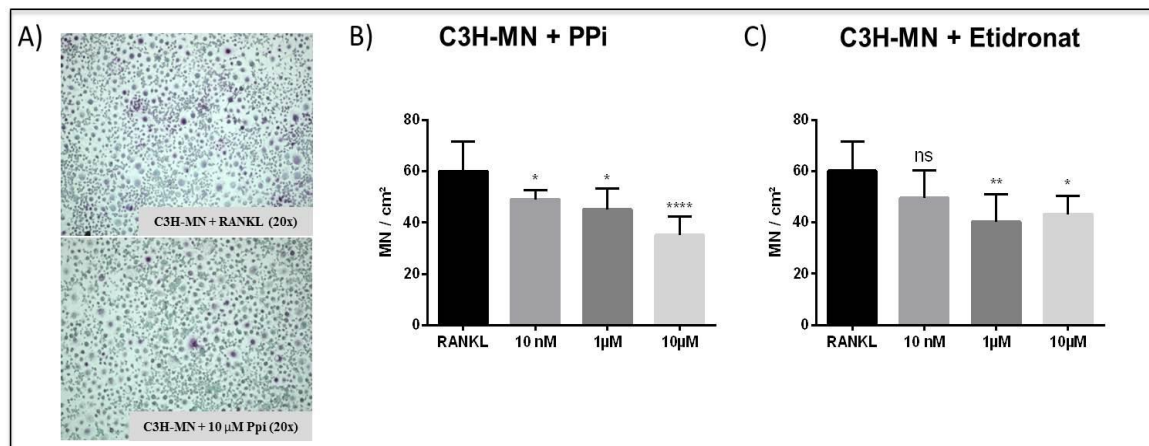


Abbildung 3.33: Einfluss von PPi auf die Bildung MN-Zellen aus C3H-Mäusen

Aus C3H-Mäusen wurden Monozyten isoliert und mit M-CSF und RANKL zu MN-Zellen differenziert. An Tag 6 der Differenzierung wurden verschiedene PPi- und Etidronat-Konzentrationen hinzugefügt. Die MN-Zellen wurden anschließend TRAP gefärbt (A) und gezählt (B und C).

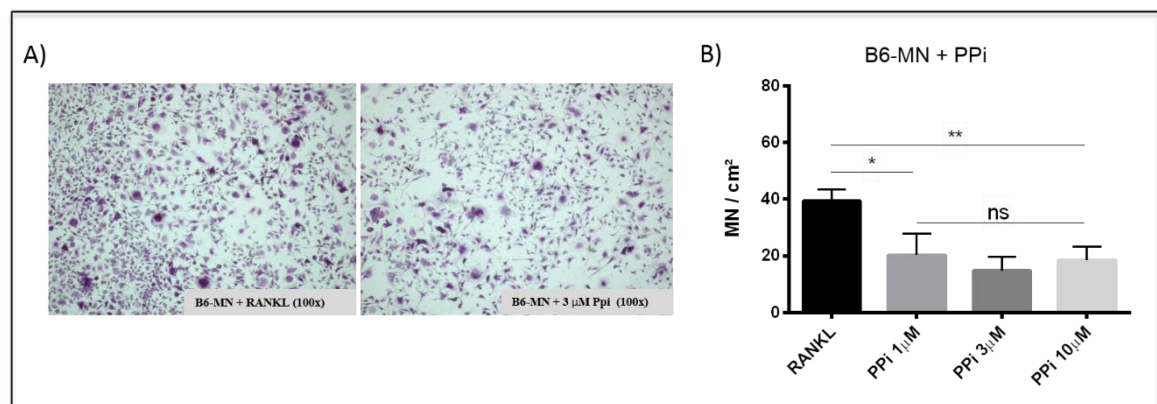


Abbildung 3.34: Einfluss von PPi auf die Bildung MN-Zellen aus B6-Mäusen

Aus B6-Mäusen wurden Monozyten isoliert und mit M-CSF und RANKL zu MN-Zellen differenziert. An Tag 6 der Differenzierung wurden verschiedene PPi-Konzentrationen hinzugefügt. Die MN-Zellen wurden anschließend TRAP gefärbt (A) und gezählt (B).

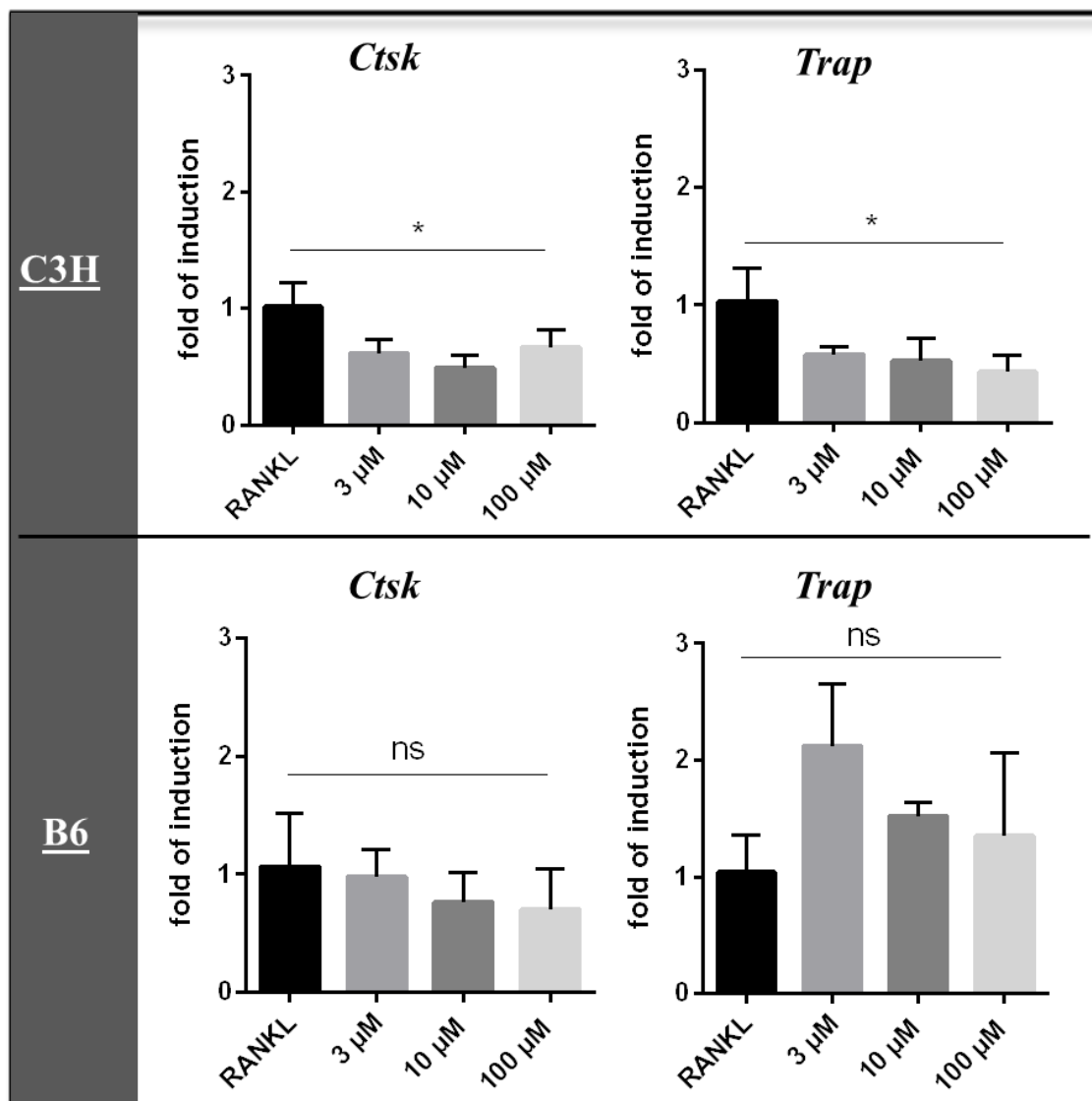


Abbildung 3.35: qPCR-Analyse der Osteogenesemarker *Trap* und *Ctsk* in MN-Zellen

Dargestellt ist die Genexpression von C3H-MN-Zellen und B6-MN-Zellen unter Einfluss verschiedener PPI-Konzentrationen. PPI inhibiert die Expression der Osteoklastenmarker *Ctsk* und *Trap* in MN-Zellen. In MN-Zellen von B6 konnte keine Beeinflussung der Expression von Osteogenesemarkern unter PPI-Einfluss festgestellt werden.

3.3.14 Einfluss von Bisphosphonaten auf die Monozyten-Differenzierung zu MN-Zellen

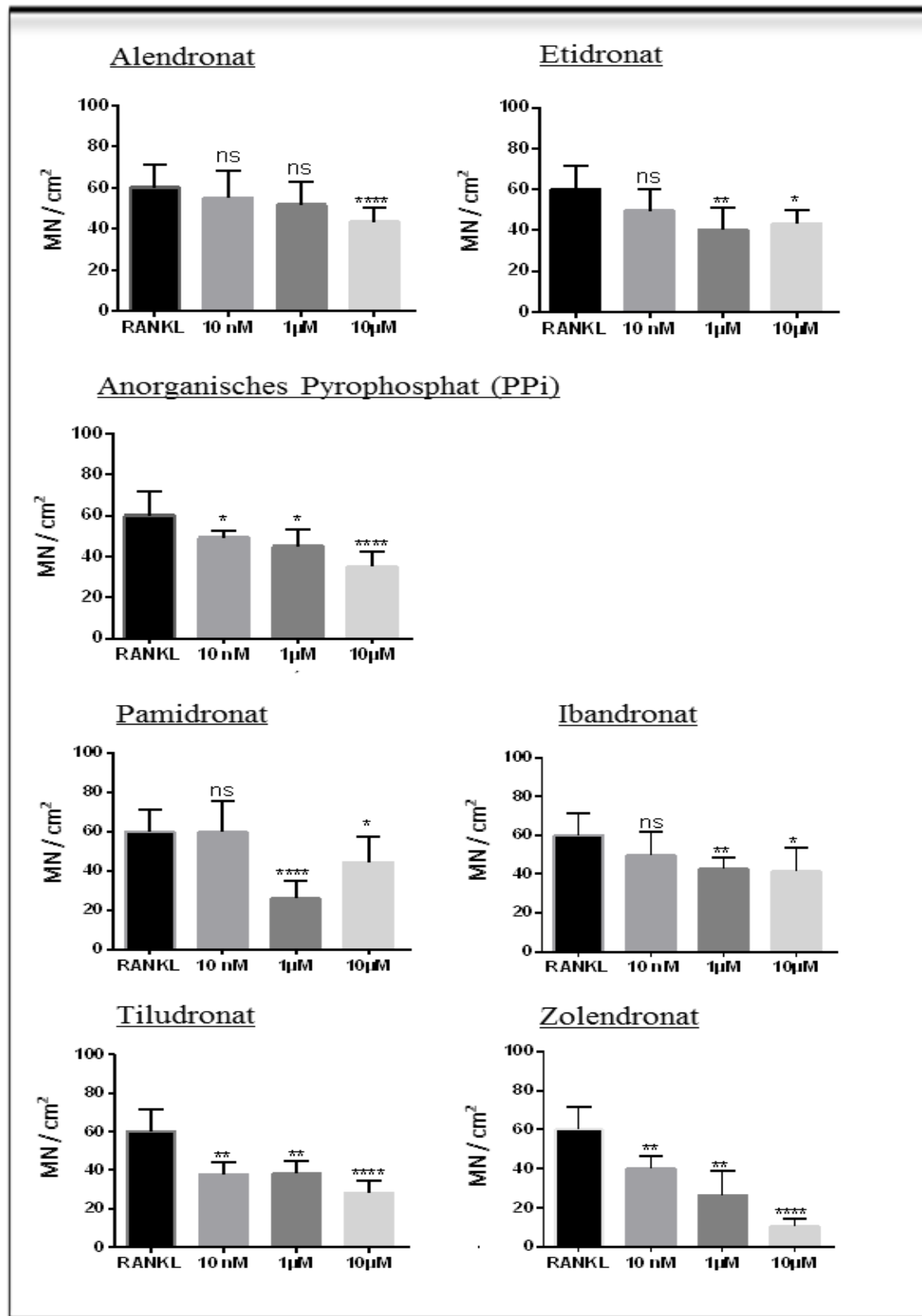


Abbildung 3.36: Einfluss von Bisphosphonaten auf die Osteoklastendifferenzierung

Verwendet wurde stets dieselbe Kontrollgruppe, die nur mit RANKL ohne Zusatz von Bisphosphonaten durchgeführt wurde. Für das über den Balken angegebene Signifikanzniveau wurde jeweils jede Bisphosphonatkonzentration über einen T-Test mit der Kontrollgruppe verglichen. n=8

Alle getesteten Bisphosphonate zeigen einen dosisabhängigen inhibitorischen Effekt auf die Differenzierung zu MN-Zellen. PPI, Tiludronat und Zolendronat reduzieren die Bildung reifer Osteoklasten bereits ab einer Konzentration von 10nM. Bei Etidronat, Pamidronat und Ibandronat ist eine Konzentration von 1µM erforderlich, um einen signifikanten inhibitorischen Effekt zu erreichen. Alendronat inhibiert erst ab Konzentrationen von 10µM die Entwicklung von MN-Zellen. Vor allem im niedrigen Konzentrationsbereich ist die Wirkstärke der einzelnen Substanzklassen unterschiedlich. PPI, Tiludronat und Zolendronat zeigen in diesem Versuch die höchste Inhibierungspotenz, Alendronat die niedrigste. Die Bisphosphonate Alendronat, Ibandronat, Pamidronat und Zolendronat wirken in Konzentrationen von 100µM toxisch auf die Zellen und führen zum Zelluntergang (Daten hier deshalb nicht aufgeführt). Da Etidronat und PPI einen signifikanten inhibitorischen Effekt auf die Entwicklung MN-Zellen zeigten ohne die Zellen zu schädigen, wurden diese beiden Wirkstoffe im darauffolgenden Tierversuch zur Behandlung der DCC eingesetzt.

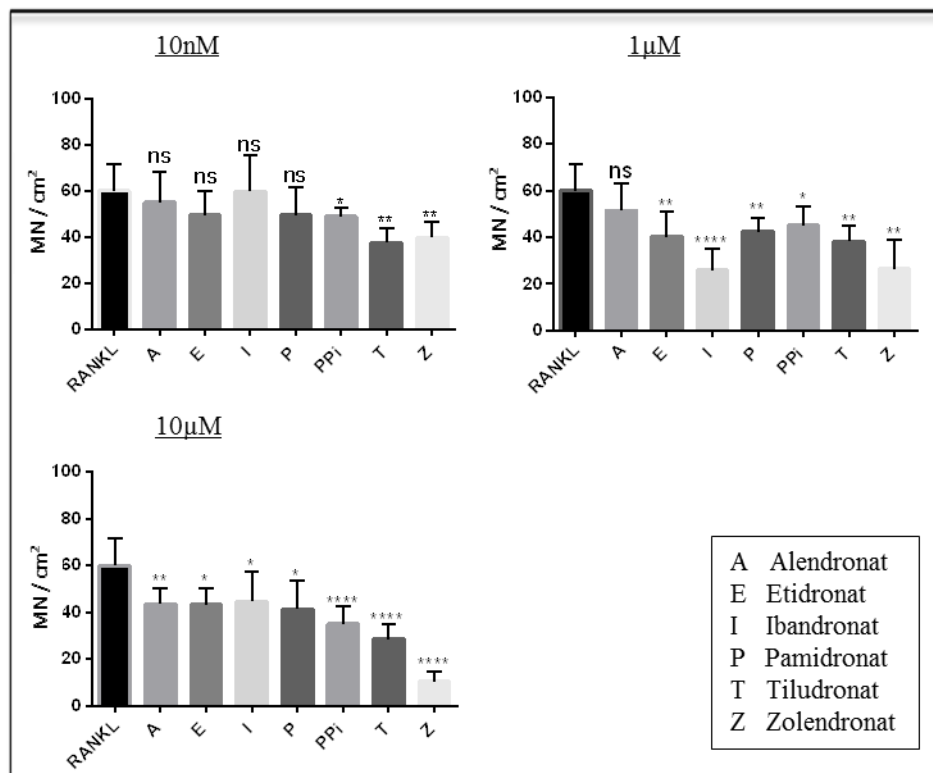


Abbildung 3.37: Vergleich der Wirkungsstärke einzelner Bisphosphonate

Die Daten aus Abbildung 3.36 wurden hier zur besseren Veranschaulichung in anderem Zusammenhang dargestellt, um die Substanzgruppen der Bisphosphonate besser vergleichen zu können.

3.4 P_{Pi}-Spiegel im Mausblut

Die P_{Pi}- Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Olivier le Saux und Viola Pomozi (Department of Cell and Molecular Biology, John A. Burns School of Medicine, University of Hawaii, Honolulu, HI, USA) durchgeführt.

Jansen et al. (2014) zeigten, dass der Abcc6-Transporter der Umsetzung von ATP zu P_{Pi}, einem potenten Verkalkungsinhibitor dient. Zudem konnten reduzierte P_{Pi}-Plasmalevel bei PXE-Patienten und Abcc ^{-/-} Mäusen gemessen werden. In dieser Arbeit wurden vergleichend die P_{Pi}-Spiegel im Blut von C3H und B6-Mäusen gemessen. Die zur Verkalkung prädisponierten C3H-Mäuse wiesen im Vergleich zu der Kontrollgruppe B6 niedrigere P_{Pi}-Plasmaspiegel auf.

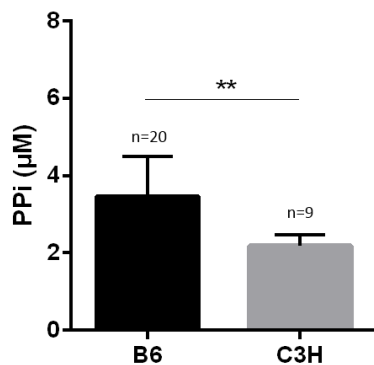


Abbildung 3.38 Konzentration von anorganischem Pyrophosphat (P_{Pi}) im Blut

DCC resistente B6-Mäusen haben höhere Plasma-P_{Pi}-Werte als DCC-prädisponierte C3H-Mäuse.

3.5 In vivo Behandlung der DCC bei Mäusen mit anorganischem Pyrophosphat und Bisphosphonaten

Die *in vitro* Ergebnisse zeigten, dass PPI und seine Strukturanaloga Bisphosphonate die Bildung MN-Zellen inhibieren. Deshalb wurde auch *in vivo* der Effekt dieser Substanzen auf die DCC untersucht. Hierzu erhielten C3H-Mäuse einen Tag vor Kälteapplikation am Herzen eine Dosis der Substanzen intraperitoneal, sowie eine tägliche Einmaldosis in den darauffolgenden 7 Tagen. Nach einer Woche wurden die Mäuse euthanasiert und die Herzen zur Calciummessung verwendet. Eine Behandlung mit PPI inhibiert die Kalkablagerung im nekrotischen Herzgewebe. In den mit Etidronat behandelten Mäusen kann sogar ein noch stärkerer Effekt beobachtet werden.

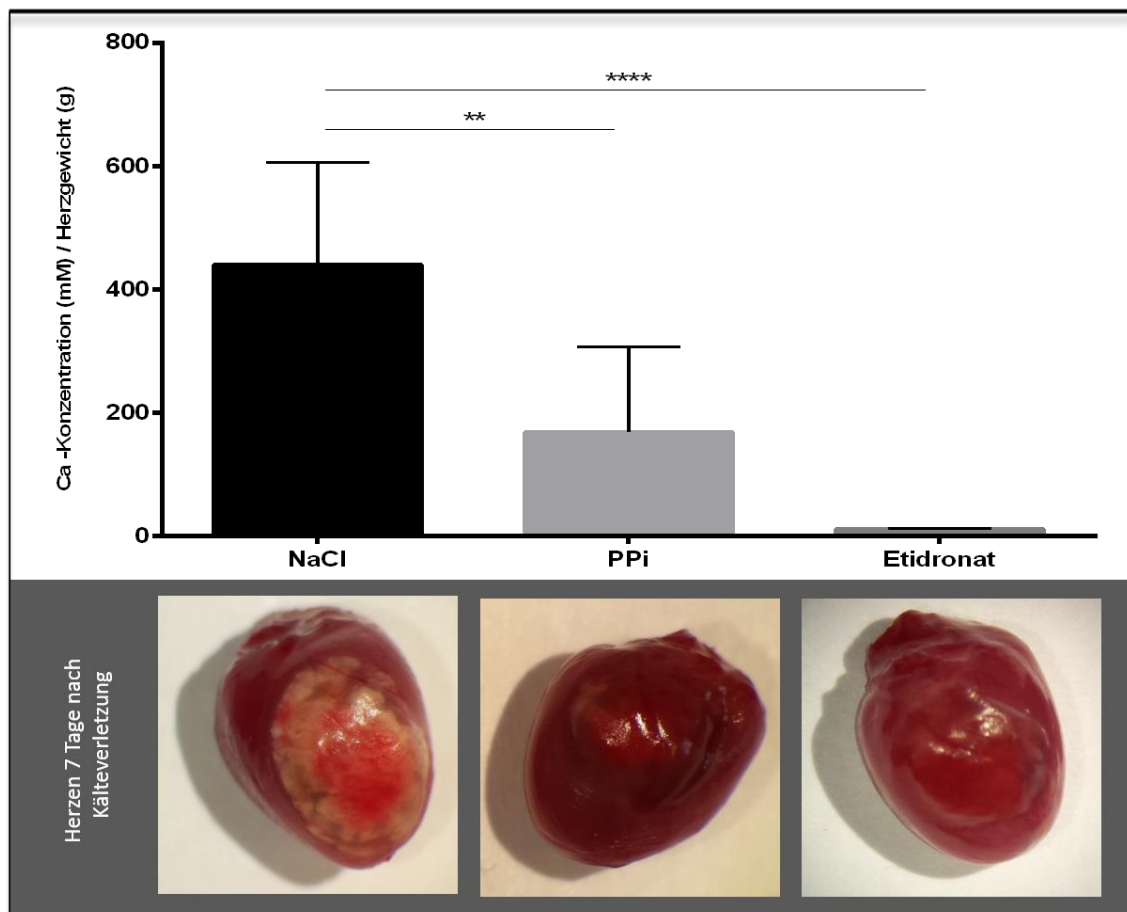


Abbildung 3.39: Behandlung der DCC mit PPI und Etidronat

Durch Kälteapplikation wurde eine Verkalkung des Herzgewebes in DCC-prädisponierten Mäusen induziert. Einen Tag vor Kälteapplikation sowie 7 Tage danach erhielten die Mäuse eine tägliche Einmaldosis PPI oder Etidronat. In der Kontrollgruppe wurde nur NaCl injiziert. Eine Woche nach Kälteapplikation wurden die Mäuse euthanasiert und der Calciumgehalt im nekrotischen Herzgewebe bestimmt.

3.6 Präventive und postoperative Etidronatgabe

Um zu prüfen, zu welchem Zeitpunkt die Etidronatgabe den größten Effekt zeigt, wurde eine Dosis von 8 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht zu unterschiedlichen Zeitpunkten intraperitoneal appliziert. Nach Kältverletzung wurde die Dosis täglich für drei oder sieben Tage injiziert. Eine Gruppe erhielt lediglich eine Einmalgabe an Tag 3. Eine weitere Gruppe erhielt eine tägliche Applikation von Tag 4 bis Tag 7. Die Etidronatbehandlung direkt nach Kälteverletzung am Herzen verhindert die Gewebeverkalkung. Ein Behandlungsbeginn einige Tage nach Gewebeverletzung am Herzen, wenn der Verkalkungsprozess bereits begonnen hat, schwächt das Ausmaß der Verkalkung lediglich ab. Interessant ist allerdings, dass auch eine Einmalgabe an Tag 3 die Gewebeverkalkung bereits reduziert.

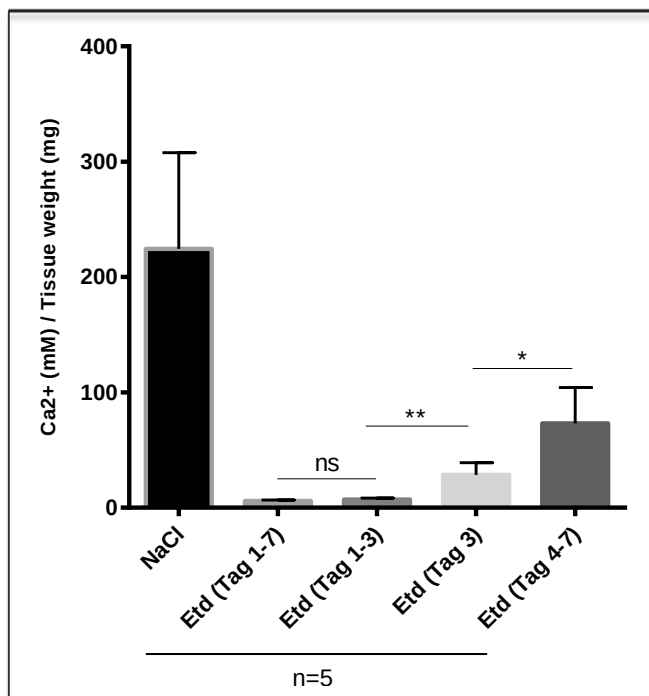


Abbildung 3.40 Einfluss einer Etidronatinjektion auf die dystrophe kardiale Verkalkung. Die Gabe erfolgte einmal täglich intraperitoneal. Der Kontrollgruppe wurde nur NaCl injiziert.

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

DCC (dystrophe kardiale Verkalkung) wird durch eine Mutation im *Abcc6*-Gen verursacht. Zur Erforschung der Pathomechanismen werden Mausmodelle herangezogen. Der Mausstamm C3H/He hat natürlicherweise einen *Abcc6*-Polymorphismus und entwickelt eine DCC, wohingegen die Mauslinie C57BL/6 resistent für DCC ist.

Anorganisches Pyrophosphat (PPi) ist ein natürlicher Verkalkungsinhibitor des Stoffwechsels. C3H-Mäuse zeigen niedrigere PPi-Konzentrationen im Blut als B6-Mäuse. Eine PPi-Substitution durch Bisphosphonatbehandlung kann die DCC bei C3H-Mäusen verhindern, der Wirkmechanismus ist allerdings bisher unbekannt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die zur Verkalkung führende Entzündungsreaktion bei C3H-Mäusen deutlich ausgeprägter ist als beim DCC-resistenten B6-Mausstamm. PPi schwächt diese Reaktion vermutlich ab und verhindert so die Gewebeverkalkung.

Der nekrotische Bereich im Herzen bei C3H-Mäusen zeigt noch vor sichtbarer Kalkeinlagerung eine starke TRAP-Färbung sowie die Akkumulation von Makrophagen und deren Fusion zu MN-Zellen. Weiterhin zeigen Milzmonozyten von C3H-Mäusen ein starkes Potential zur Differenzierung zu MN-Zellen. Die MN-Zellen geben Zytokine ab, die die Gewebeverkalkung begünstigen. DCC-resistente Mäuse zeigen nur eine schwache TRAP-Färbung und die Differenzierung von MN-Zellen ist insuffizient, jedoch konnte eine PPi-Sekretion in B6-Makrophagen detektiert werden.

4 Diskussion

4.1 Genetik der Arteriosklerose: seltene Erkrankungen dienen als Grundlage

Arteriosklerose, eine Gewebeverkalkung im kardiovaskulären System, verursacht die sogenannten Volkskrankheiten pAVK und KHK, an denen ein großer Anteil der Bevölkerung leidet (Bauer, 2009). Sowohl Herzinfarkte als auch der Schlaganfall als Folge der Arteriosklerose sind unter den 10 häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt gelistet (Bundesamt für Statistik). Arteriosklerose entsteht aus dem Zusammenspiel vieler Faktoren wie Metabolismus, Genetik und Entzündung. Auch Umweltfaktoren wie Tabakkonsum und Ernährungsgewohnheiten beeinflussen die Entstehung der Gefäßverkalkung (O'Donnell et al., 2002). Aufgrund dieser komplexen multifaktoriellen Entstehungsmechanismen und verschiedener individueller Genvarianten, werden zur Erforschung der Arteriosklerose seltene Erkrankungen mit ähnlichem Phänotyp herangezogen (Nitschke and Rutsch, 2012), die dann als Model zum Verständnis für die Pathomechanismen der komplexeren Krankheiten dienen. Zu diesen seltenen Erkrankungen zählen General arterial calcification of Infancy (GACI) und Pseudoxanthoma elasticum (PXE), die durch eine Mutation im *ABCC6*-Gen verursacht werden. Betroffene zeigen bereits in jungem Alter eine Verkalkung der elastischen Fasern der Haut, Augen und des kardiovaskulären Systems (LaRusso et al., 2011).

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine *ABCC6*-Mutation neben PXE beim Menschen auch zur sogenannten dystrophen kardialen Verkalkung (DCC) bei Mäusen führt. Der Mausstamm C3H/He ist für die Entwicklung der DCC durch eine Mutation im Gen *Abcc6* prädisponiert, wohingegen der Mausstamm C57BL/6 resistent für diese Art der Gewebeverkalkung ist (Aherrahrou et al., 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand dieses Mausmodelles versucht zu verstehen, über welche Mechanismen ein *Abcc6*-Polymorphismus die Gewebeverkalkung beeinflusst.

4.2 Dystrophe kardiale Verkalkung (DCC) ist eine metabolische Erkrankung

DCC der Maus wird ebenso wie die Erkrankungen PXE und GACI beim Menschen durch eine Mutation im *Abcc6*-Gen verursacht (Meng et al., 2007). *Abcc6* (auch Multidrug Resistance Protein 6 (MRP6) genannt) codiert einen Transmembrantransporter, der vor allem in Leber und Niere exprimiert ist (Le Saux et al., 2012). Die pathologischen Verkalkungen durch den Funktionsverlust des ABCC6-Transporters bei PXE, GACI und DCC treten aber nicht direkt in Leber und Niere, sondern vor allem ektop im peripheren Weichgewebe und kardiovaskulärem System auf, in denen der ABCC6-Transporter nicht exprimiert ist. In der sogenannten „metabolischen Hypothese“ wird deshalb vermutet, dass der ABCC6-Transporter Stoffe aus der Leber in das Blut abgibt, die Gewebeverkalkung im Körper verhindern. Jiang et al. (2009) zeigten dies, indem sie Haut mit Tasthaaren von *Abcc6* ^{-/-} Mäusen auf den Rücken von WT-Mäusen transplantierten und umgekehrt. WT-Mäuse mit dem KO-Transplantat zeigten keine Verkalkung der Tasthaare, während KO-Mäuse mit WT-Transplantat Tasthaarverkalkungen aufwiesen.

Um diese metabolische Hypothese zu überprüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst der Einfluss von Mausplasma aus DCC-prädisponierten C3H-Mäusen und DCC-resistenten B6-Mäusen auf die Verkalkung *in vitro* getestet. Es konnte gezeigt werden, dass Mausplasma von B6-Mäusen mit intaktem *Abcc6*-Transporter in der Leber Stoffe enthält, die die Verkalkung glatter Muskelzellen *in vitro* und die Osteoklastendifferenzierung reduzieren.

Die mesenchymale Stammzelllinie C3H/10T1/2 exprimiert kein *Abcc6* (Sowa, 2014). Wenn man C3H/10T1/2-Zellen mit der Variante des *Abcc6*-Transporters von C3H und B6-Mäusen transfiziert, wird der *Abcc6*-Transporter überexprimiert und die Zellen geben vermehrt Stoffwechselprodukte ins Medium ab. Das konditionierte Medium der mit der *Abcc6*-B6-Variante transfizierten Zellen reduziert ebenso wie B6-Mausplasma die Verkalkung *in vitro*. Durch die Überexpression des *Abcc6*-Transporters und vermehrte Abgabe von Stoffwechselprodukten ins Medium, ist hier ein stärkerer antimineralisierender Effekt zu beobachten als nur beim Einsatz von B6-Mausplasma.

Dies lässt vermuten, dass der *Abcc6*-Transporter Stoffe ins Blut abgibt, die Verkalkung verhindern können. Weist der *Abcc6*-Transporter wie im C3H-Mausstamm durch einen Polymorphismus Funktionsdefizite auf, kommt es aufgrund des Fehlens dieser antimineralisierenden Metabolite zur Entstehung der Gewebeverkalkung. Die Metabolite und

Stoffwechselprozesse, in die der Abcc6-Transporter involviert ist, konnten bisher noch nicht vollständig identifiziert werden. Auch über welche Mechanismen diese Stoffe die Gewebeverkalkung inhibieren, ist bisher unbekannt.

4.2.1 Mögliche Substrate des Abcc6-Transporters

Durch Computer-Strukturanalysen konnte der Abcc6-Transporter den ABC-Transportern zugeordnet werden. Aufgrund der Lokalisation in der basolateralen Hepatozytenmembran ist Abcc6 vermutlich ein Efflux-Transportprotein, das ATP-abhängig Stoffe in den Extrazellularraum abgibt (Viola Pomozi, 2013). Über massenspektrometrische Untersuchungen wurde bereits durch mehrere Forschungsgruppen versucht, Unterschiede in der Blutzusammensetzung zwischen PXE-Patienten und Gesunden ausfindig zu machen. Ziel ist es, die Metabolite des Abcc6-Transporters zu identifizieren, das metabolische Ungleichgewicht bei Abcc6-Insuffizienz auszugleichen und somit PXE-Patienten Therapiemöglichkeiten anbieten zu können.

Jiang et al. (2010) fanden heraus, dass PXE-Patienten und Abcc6 ^{-/-} Mäuse um 30% reduzierte Fetui-A-Level im Blut aufwiesen. Fetuin-A ist ein in der Leber synthetisiertes Glykoprotein, das Verkalkung verhindert. Durch eine Überexpression von Fetuin-A in Abcc6 ^{-/-} Mäusen konnte die Gewebeverkalkung um 70% reduziert werden.

LaRusso et al.(2011) zeigten, dass eine magnesiumhaltige Ernährung die Gewebeverkalkung bei Abcc6 ^{-/-} Mäusen reduziert.

Kuzaj et al. (2014) kultivierten Hautfibroblasten von PXE-Patienten, da die *ABCC6*-Expression in PXE-Fibroblasten im Gegensatz zu Gesunden reduziert ist. Guanin, Leucin, oxidierte Fettsäuren und Arachidonsäure waren im Medium *ABCC6*-insuffizienter PXE-Fibroblasten erhöht und Xanthin und Vitamin B5 erniedrigt. Ein Funktionsverlust des Abcc6-Transporters könnte folglich über verstärktes extrazelluläres Remodeling, oxidativen Stress und vermehrte Fettsäureoxidation eine Gewebeverkalkung induzieren. Jansen et al. (2013) postulierten das Fehlen von anorganischem Pyrophosphat (PPi) im Blut als den entscheidenden Faktor, da sie bei Abcc6 ^{-/-} Mäusen um bis zu 40% reduzierte PPi-Werte im Blut messen konnten. Auch die Messungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass C3H-Mäuse ebenso wie Abcc6 ^{-/-} Mäuse niedrige PPi-Plasmaspiegel aufweisen.

Die Forschungsgruppe um Jansen transfizierte außerdem HEK-Zellen mit dem Abcc6-Transporter und stellte einen erhöhten Gehalt an Nukleosiden, Nukleotiden, AMP und PPi im konditionierten Medium dieser Zellen fest. Die Wirkung von PPi als endogener

Inhibitor der Gewebe- und Knochenmineralisierung ist bereits seit 1960 bekannt (Orriss et al., 2016). Aufgrund der neusten Forschungsergebnisse rückt die Wirkungsweise von PPI jedoch nun wieder erneut in den Vordergrund.

Die Vielzahl der oben aufgeführten Stoffwechselprodukte, in die der Abcc6-Transporter involviert sein könnte, zeigt die Komplexität der Stoffwechselprozesse. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob PPI der entscheidende Faktor bei der DCC sein kann und über welche Wirkmechanismen dieses Phosphat die Gewebeverkalkung verhindern könnte.

4.2.2 Anorganisches Pyrophosphat (PPI) : Der Schlüsselfaktor gegen Verkalkung?

Bei DCC-prädisponierten Mausstämmen und PXE-Patienten mit Abcc6-Insuffizienz ist das Auftreten dystropher Verkalkung Folge eines PPI-Mangels im Blut (Jansen et al., 2014) (Jiang et al., 2007). Auch andere Erkrankungen, die mit starker Gefäßverkalkung einhergehen, sind mit reduziertem Plasma- PPI-Spiegeln assoziiert. Hierzu zählen unter anderem chronische Niereninsuffizienz und das Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (O'Neill et al., 2010). Durch PPI-Substitution in Tiermodellen konnte die Entstehung der pathologischen Verkalkung in den beschriebenen Erkrankungen reduziert werden (O'Neill et al., 2011; Villa-Bellosta et al., 2013).

Die Messung von Stoffen in konditioniertem Medium Abcc6-transfizierter Zellen durch Jansen et al. (2013) zeigte, dass die PPI-Werte im Medium von Zellen mit intaktem Abcc6-Transporter erhöht waren und auch B6-Mäuse im Blut höhere PPI-Werte aufweisen als Abcc6 ^{-/-} Mäuse. Der Abcc6-Transporter scheint also ATP freizusetzen, das durch die Enpp1 zu PPI und AMP gespalten wird (Jansen et al., 2013).

Für das Gleichgewicht der Mineralisierung ist das Pi/PPI-Verhältnis entscheidend (Alfrey and Ibels, 1978). Das auf die Verkalkung inhibierend wirkende PPI kann über die TNAP (tissue non specific alkaline phosphatase) zu Pi (anorganisches Phosphat) verstoffwechselt werden, das wiederum Gewebeverkalkung fördert. Sowohl ENPP1 als auch TNAP sind in der Zellmembran lokalisiert (Harmey et al., 2004). Bei PXE-Patienten und Abcc6-defizienten Mäusen könnte es folglich durch einen PPI-Mangel im Blut zum Überwiegen des promineralisierenden Pi-Effektes kommen.

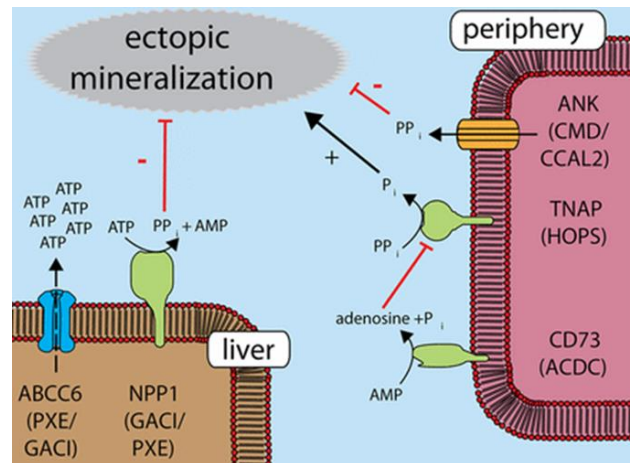


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Entstehung von anorganischem Pyrophosphat (PPi) über den ABCC6-Transporter publiziert von Jansen et al. (2013)

Vom ABCC6-Transporter freigesetztes ATP wird durch die ENPP1 (Ecto-Nucleotid Phosphodiesterase) in AMP und PPi gespalten. Der PPi-Abbau zu anorganischem Phosphat (Pi) erfolgt durch die TNAP (engl. *Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase*). ANK ist ein Transporter, der PPi aus der Zelle freisetzt. PXE, GACI, ACDC (arterial calcification due to deficiency of CD73), Hypophosphatasie (HOPS), Chondrokalzinose Typ 2 (CCAL2) und Craniometaphysäre Dysplasie (CMD) sind Erkrankungen, die mit Funktionsverlust des jeweiligen Transporters einhergehen und zu Störungen im Pi/PPi-Gleichgewicht führen.

In dieser Arbeit wurde das Pi/PPi-Verhältnis im Zellkulturmodell untersucht. Um die direkte verkalkungsinhibierende Wirkung von PPi zu testen, wurden nach Induktion der Verkalkung mit 2,6mM Pi verschiedene PPi-Konzentrationen zu mesenchymalen Stammzellen (C3H/10T1/2) gegeben. Es zeigte sich ein dosisabhängiger inhibierender Effekt von PPi auf die Verkalkung *in vitro*, der bereits ab einer PPi-Konzentration von 10nM signifikant war. Kleinste Konzentrationen PPi können also bereits die Pi-induzierte Verkalkung hemmen. Der Einfluss des Abcc6-Transporters und der beteiligten Enzyme Enpp1 und Tnap auf das Pi/PPi Gleichgewicht ist noch nicht vollständig geklärt.

Die Expression der im Phosphatstoffwechsel beteiligten Enzyme wurde in Leber, Herz und Makrophagen in dieser Arbeit mittels qPCR analysiert. Die Ergebnisse unterstützen die oben erwähnte These von Jansen et al. B6-Mäuse exprimieren im Vergleich zu C3H-Mäusen in der Leber sowohl höhere Level *Abcc6* als auch *Enpp1*. Dies könnte folglich die PPi-Entstehung begünstigen, sodass bei B6-Mäusen höhere PPi-Blutspiegel messbar sind. Aus der Milz von DCC-resistenten B6-Mäusen isolierte und differenzierte Makrophagen zeigen ebenfalls eine höhere *Enpp1*-Expression als C3H-Makrophagen. Im Herzgewebe wird die *Enpp1*-Expression nach Kälteverletzung sowohl bei B6 als auch C3H-Mäusen hochreguliert. Bei Herzverkalkung entwickelnden C3H-Mäusen ist

dieser Anstieg unerwartet ausgeprägter. Dies könnte jedoch reaktiv durch die Entstehung der Gewebeverkalkung als Gegenregulation im Rahmen des Pi/PPi-Gleichgewichtes hervorgerufen sein. Bei der Expression der Alkalischen Phosphatase (Alpl) konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Mauslinien festgestellt werden. Die durch die Funktion des Abcc6-Transporters und Enpp1 erhöhten PPi-Level bei B6-Mäusen könnten folglich protektiv auf die Mineralisierung wirken. Bei C3H-Mäusen wird durch den defekten Abcc6-Transporter weniger PPi extrazellulär freigesetzt und die promineralisierende Wirkung von Pi überwiegt.

Den entscheidenden Hinweis für die Rolle von PPi als Schlüsselfaktor lieferten jedoch Experimente, in denen versucht wurde den PPi-Mangel auszugleichen. Eine Substitution von PPi mittels Bisphosphonaten verhindert im Mausmodel die dystrophe kardiale Verkalkung bei C3H-Mäusen (Pomozi et al., 2017).

4.2.3 Bisphosphonate: Neue Behandlungsoption für pathologische Verkalkung?

Bisher gibt es keine Behandlungsmöglichkeiten, um die früh einsetzende progressive Verkalkung von Haut, Augen und kardiovaskulärem System bei PXE-Patienten zu verhindern oder zu verlangsamen. Die Tatsache, dass erniedrigte PPi-Spiegel im Blut von PXE-Patienten gefunden worden sind, die mit dem Funktionsverlust des ABCC6-Transporters in Zusammenhang stehen, zeigt neue Behandlungsmöglichkeiten auf. In ersten Studien wurde deshalb im Mausmodel versucht, PPi zu substituieren. Da PPi eine kurze Halbwertszeit im Blut aufweist, wurden in Studien häufig Bisphosphonate getestet. Bisphosphonate sind nicht hydrolysierbare PPi-Strukturanaloga, die einen längeren Effekt zeigen und aktuell zur Behandlung von Osteoporose und Knochenmetastasen zugelassen sind (Maraka and Kennel, 2015).

Li et al zeigten, dass eine Fütterung von Abcc6 ^{-/-} Mäusen mit der 12-fachen der beim Menschen üblichen Dosis Etidronat (96 mg/100g Futter) die Verkalkung in den Tasthaaren verhindert. Alendronatgabe (2.2 mg / 100g Futter) zeigte jedoch keinen Effekt auf die Gewebeverkalkung (Li et al. 2015). Weiterführende Experimente der Arbeitsgruppe von Li erwiesen, dass auch die subkutane Applikation zweimal pro Woche der 0,01-fachen Dosis Etidronat (0.283mg/kg/d) signifikant die Tasthaarverkalkung in Abcc6 ^{-/-} Mäusen verhindert. Eine bereits bestehende ektope Mineralisierung im Mausmodel konnte jedoch nicht durch Bisphosphonattherapie rückgängig gemacht werden. (Li et al., 2016). Wir konnten zeigen, dass bereits eine einmalige intraperitoneale

Etidronatgabe an Tag 3 nach Kälteverletzung am Herzen das Ausmaß der Verkalkung reduziert. Vollständig verhindert werden kann die dystrophe kardiale Verkalkung jedoch nur durch eine unmittelbare Pyrophosphatsubstitution nach Kälteverletzung. Bisphosphonate scheinen folglich nur präventiv effektiv eingesetzt werden zu können.

Basierend auf dem Therapieversuch im PXE-Mausmodell, wurde in dieser Arbeit die Therapie der DCC mit weiteren Bisphosphonaten *in vivo* getestet. Da bei oraler Zufuhr die Bioverfügbarkeit der Bisphosphonate nur etwa 1% beträgt, erfolgte die Applikation intraperitoneal (Scriba, 2000). Die einzelnen Wirkstoffe unter den Bisphosphonaten unterscheiden sich in Nebenwirkungsprofil und Wirkpotenz. Im Gegensatz zu Bisphosphonaten der ersten Generation wie Etidronat, zeigen Bisphosphonate mit Stickstoffgruppe einen deutlich stärkeren inhibierenden Effekt auf Osteoklasten (Dunford et al., 2001). Folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Potenz einzelner Bisphosphonate (Scriba 2000):

Substanz	Relative Potenz
Etidronat	1
Tiludronat	10
Pamidronat	100
Alendronat	100-1000
Ibandronat	1000-10000
Zolendronat	>10000

Tabelle 4.1: Übersicht über die Potenz der einzelnen Bisphosphonate

Interessanterweise zeigte Alendronat trotz der hohen Potenz im Tierversuch keinen Einfluss auf die Gewebeverkalkung bei DCC (Li et al. 2015). PPi hingegen schwächt trotz kurzer Halbwertszeit die Ausprägung der DCC ab. Dies zeigt, dass bei der Gewebeverkalkung anscheinend andere Wirkmechanismen als bei der Osteoporose maßgebend sind und die Potenz der einzelnen Substrate zweitrangig ist. Etidronat stellte sich bisher als effektivstes Bisphosphonat heraus, da es DCC bei Mäusen vollständig verhindert.

Erste Therapieversuche der Gewebeverkalkung mit Bisphosphonaten am Menschen wurden bei Patienten mit GACI durchgeführt, eine der schwersten Formen der genetisch determinierten kardiovaskulären Verkalkung. Ohne Therapie sterben 85% der GACI-Patienten innerhalb der ersten 6 Lebensmonate an kardialer Ischämie oder Herzversagen

(Otero et al., 2013). Aufgrund des dramatischen Verlaufs ist bei dieser seltenen Erkrankung der Therapieversuch mit Bisphosphonaten in Einzelfällen bereits unternommen worden. Ramjan et al. (2009) berichten über einen Fall, bei dem einem betroffenen Neugeborenen ab der 1. Lebenswoche 0,1mg/kg/d Pamidronat intravenös appliziert wurde und die Behandlung ab der 4. Woche auf 1mg/kg/d Risedronat oral umgestellt worden ist. Die bei der Geburt nicht palpablen Pulse waren kurz nach Therapiebeginn wieder tastbar und kaum noch Gefäßverkalkung festzustellen. Die Bisphosphonattherapie erforderte jedoch zusätzlich eine Einnahme von Vitamin D und Antihypertensiva. Die Einnahme von Etidronat, Pamidronat, Clodronat oder Risedronat ab dem 1. Lebenstag verlängerte in den durchgeführten Studien signifikant das Überleben in der Kindheit. In der mit Bisphosphonaten behandelten Kohorte erreichten 65% der Kinder den 35. Lebensmonat, in der unbehandelten Kontrollgruppe waren es nur rund 30% (Rutsch et al., 2008).

Edouard et al. behandelten 2011 ein Neugeborenes mit GACI ebenfalls ab der ersten Lebenswoche intravenös mit Pamidronat und stellten die Therapie ab der 3. Woche auf Etidronat mit einer Erhaltungsdosis von 5mg/kg KG/d oral um. Unter dieser Therapie konnte die Gefäßverkalkung erfolgreich bis zum zweiten Lebensjahr verhindert werden. Außer einer milden Hypophosphatämie zeigten sich keine Nebenwirkungen.

Otero et al berichteten jedoch 2013 über einen 7-jährigen männlichen GACI-Patienten, der schwere Nebenwirkungen der Langzeittherapie mit Etidronat (20mg/kg KG/d oral) zeigte. Neben Odynodysphagie litt er unter Ganzkörperschmerzen, Torticollis, Zahnverlust wegen Karies, Kontrakturen, Gesichtsdysmorphie, Skoliose und Osteopetrose. Die kardiovaskuläre Verkalkung und postpartale Kardiomegalie bildeten sich zwar zurück, aber es entwickelten sich paradoxe Verkalkungen der Gelenke. Obwohl vermehrt Knochenmasse aufgebaut wurde, veränderte die Bisphosphonattherapie die Knochenstruktur derartig, dass der Patient zu Frakturen neigte. Der Abbruch der Therapie im 7. Lebensjahr führte zu einer Reduktion der nötigen Schmerzmedikation und deutlich höherer Aktivität und Beweglichkeit des Jungen. Dem lebensrettenden Effekt der Bisphosphonattherapie steht folglich die Entwicklung von Skelettdeformitäten, Knochen-schmerzen und Gelenkverknöcherung durch die Langzeittherapie entgegen.

In dieser Arbeit konnten wir im Tierversuch nach intraperitonealer Applikation von Pamidronat eine starke Verschlechterung des Allgemeinzustandes am Folgetag feststellen. Einige Mäuse wirkten wie gelähmt, sodass sie frühzeitig euthanasiert werden mussten (Daten nicht gezeigt). Starke Muskelschmerzen sind als häufige Nebenwirkung von

Pamidronat beschrieben. PPI, Etidronat und Alendronat hingegen wurden von den Mäusen sehr gut vertragen.

Da Bisphosphonate nicht verstoffwechselt, sondern über den Urin ausgeschieden oder im Knochen abgelagert werden, bleiben sie Jahrzehnte lang im Körper nachweisbar. Eine Akkumulation der Wirkstoffe im Knochen kann durch Veränderung des Knochenumbaus dann auch gegenteilig wirken und adäquate Knochenmineralisierung verhindern (Ott, 2005).

PXE und GACI zeigen einen ähnlichen Phänotyp, jedoch ist die Klinik bei PXE deutlich langsamer fortschreitend. Daher wurden bisher aus ethischen Gründen noch keine Therapieversuche mit Bisphosphonaten bei PXE-Patienten durchgeführt.

Es gilt folglich zunächst alle Wirkstoffe der Bisphosphonate auf ihre Toxizität und Wirksamkeit zur Verhinderung der Gewebeverkalkung im Mausmodell zu testen, um das Präparat mit der niedrigsten effektiven Dosis und den wenigsten Nebenwirkungen ausfindig zu machen. Wenn die Bisphosphonattherapie einen Therapieerfolg bei seltenen Erkrankungen, die mit Arteriosklerose einhergehen, zeigt, so ist auch über einen Einsatz bei Patienten mit KHK und pAVK nachzudenken.

Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie oder familiär gehäuft vorkommenden Herzinfarkten könnten so eine niedrig dosierte präventive Bisphosphonateinnahme erhalten.

Klinische Analysen von Patienten, die aufgrund anderer Erkrankungen wie Osteoporose regelmäßig Bisphosphonate einnehmen, zeigten, dass die Verkalkung der Gefäßwand zwar reduziert wird, aber die Therapie keinen Einfluss auf Wandsteifigkeit und kardiovaskuläre Ereignisse hat. Bisphosphonateinnahme zeigte jedoch eine, wenn auch nicht signifikante, Änderung der kardiovaskulären Mortalität und reduzierte die Gesamtsterblichkeit unter allen Patientenkollektiven (Osteoporose und Krebspatienten eingeschlossen) (Kranenburg et al., 2016). Da eine Bisphosphonattherapie über 36 Monate keinen Effekt auf kardiovaskuläre Events hat, sind vermutlich andere Dosierungsschemata als bei der Osteoporosebehandlung zur Verhinderung der Arteriosklerose nötig. Beachtet werden muss auch, dass vor allem starke Bisphosphonate wie Zolendronat und Alendronat das Risiko für Vorhofflimmern erhöhen können und deshalb nur bedingt zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen geeignet sind (Rhee et al., 2012).

Zusammenfassend ist die Bisphosphonattherapie aufgrund der Langzeitnebenwirkungen eher bei Patienten mit genetisch hohem kardiovaskulärem Risiko zu erwägen. Dieses

Patientenkollektiv wurde bisher in den Meta-Analysen nicht herausgefiltert und separat betrachtet (Kim et al., 2015).

4.3 Wirkungsmechanismus von PPI

C3H-Mäuse haben aufgrund eines Funktionsverlustes des Abcc6-Transporters erniedrigte Pyrophosphatspiegel (PPI) im Blut und neigen deshalb zur Entwicklung einer starken Gewebeverkalkung. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PPI-Substitution bei C3H-Mäusen die Entstehung der dystrophen kardialen Verkalkung effektiv verhindern kann.

Über welche Mechanismen PPI allerdings die Gewebeverkalkung am Herzen inhibiert und welchen Einfluss es auf molekularer Ebene hat, ist unklar und wurde im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht.

Anorganisches Pyrophosphat (PPI) ist der Gegenspieler von anorganischem Phosphat (Pi) und wirkt antimineralisierend. Bisher sind 2 Grundmechanismen bekannt, über die PPI den Mineralisierungsprozess verhindert: Es beeinflusst direkt die Mineralisierung, indem es in das Löslichkeitsgleichgewicht von Mineralien eingreift und verhindert indirekt Gewebeverkalkung, indem es die Rekrutierung und Aktivierung von Osteoklasten hemmt. Somit wird weniger Calcium aus dem Knochen in die Blutbahn freigesetzt, das die Gefäßverkalkung fördert (Rodan and Fleisch, 1996).

4.3.1 Multinukleäre Zellen im nekrotischen Herzgewebe - dystrophe kardiale Verkalkung (DCC) zeigt Charakteristika der Knochenmineralisierung

Vaskuläre Verkalkung entsteht durch die Ablagerung von Calcium und anorganischem Phosphat (Pi) in Form von Hydroxylapatit. Durch einen begleitenden entzündlichen Prozess wird über Genregulation die osteogenetische Differenzierung von glatten Muskelzellen induziert (Prosdocimo et al., 2010) (Tyson et al. 2003).

Im Knochenstoffwechsel herrscht ein Gleichgewicht zwischen Aufbau von Mineralsubstanz durch Osteoblasten und Abbau von Knochen durch Osteoklasten. Bei der Gefäßverkalkung stehen diese Zellinteraktionen in einem Ungleichgewicht. Doherty et al. stellten die Theorie auf, dass sogenannte CVC's (calcifying vascular cells) in der Gefäßwand während der Plaqueentstehung zu osteoblastenähnlichen Zellen differenzieren, die RANKL und M-CSF sezernieren. Hierdurch werden osteoklastische Transkriptionsfaktoren in Makrophagen aktiviert (Tyson et al. 2003).

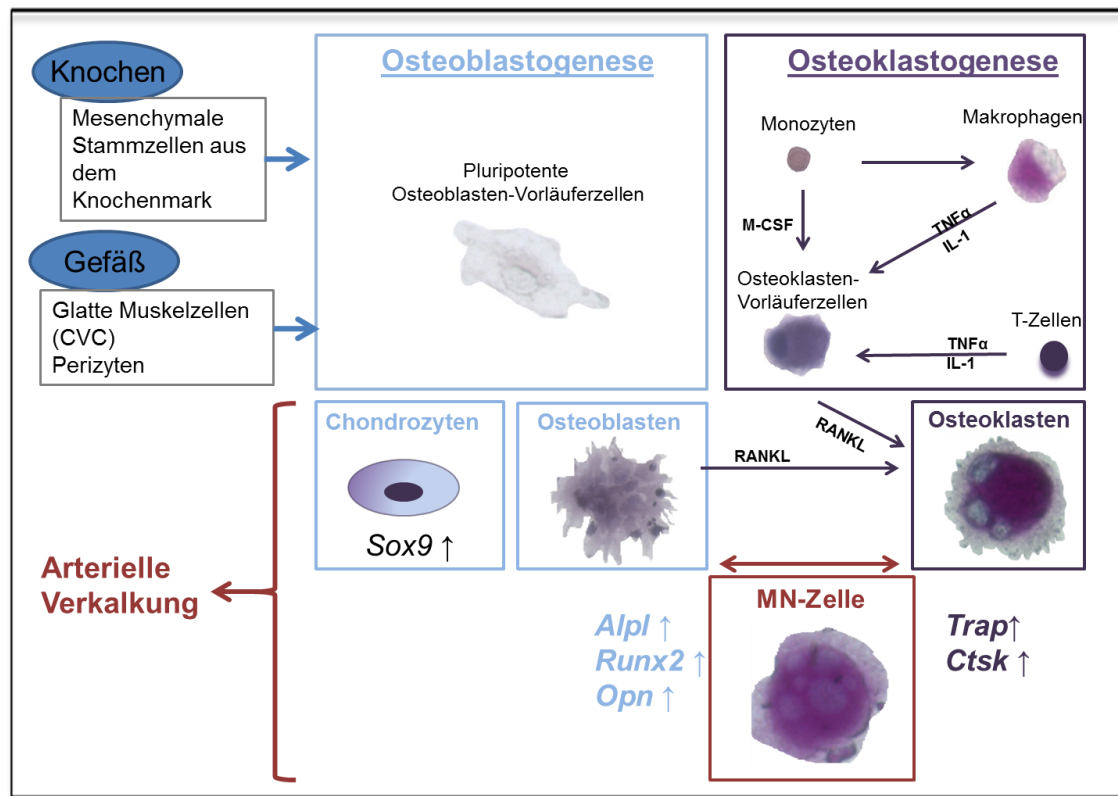
Die Dystrophe Verkalkung bei PXE-Patienten entsteht durch eine Induktion von chondro- und osteogenetischen Markern wie *RUNX2*, *BSP*, *BGP*, *SOX9* in glatten Gefäßmuskelzellen und durch den Verlust von Inhibitoren der extrazellulären Mineralisierung wie PPI (Kauffenstein et al., 2014). Ähnliche Mechanismen führen auch zur Entstehung der DCC bei der Maus.

Durch CD68-Färbung im nekrotischen Bereich des Herzgewebes nach Kälteapplikation konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sowohl bei B6 als auch bei C3H-Mäusen Makrophagen das verletzte Herzgewebe ab Tag 1 infiltrieren. Die Fusion dieser Makrophagen zu multinukleären (MN) Zellen an Tag 3 war hingegen nur beim DCC-entwickelnden C3H-Mausstamm zu beobachten. Das verletzte Herzgewebe von C3H-Mäusen zeigt eine starke Trap-Färbung. Im Gegensatz zu B6-Mäusen ist im Herzgewebe von C3H-Mäusen außerdem ein starker Expressionsanstieg osteogener Marker wie *CTSK*, *RUNX2* und *OPN* zu verzeichnen. Bei der Expression von Entzündungsmediatoren und Makrophagenmarkern im Herzgewebe besteht jedoch kein Unterschied zwischen B6- und C3H-Mäusen. Es scheint folglich weniger die Entzündungsreaktion, sondern vielmehr die osteogenetische Differenzierungspotenz der beteiligten Zellen eine Rolle bei der Gewebeverkalkung zu spielen (siehe 3.1.5).

Es mag zunächst suspekt scheinen, dass multinukleäre (MN) Zellen bzw osteoklastenähnliche Riesenzellen, die im Körper knochenabbauend wirken, in diesem Model als die Mineralisierung verursachende Zellen beschrieben werden. Da diese multinukleären Zellen im nekrotischen Herzgewebe bei der DCC bereits an Tag 3, vor sichtbarer reifer Gewebeverkalkung ab Tag 5, ausgemacht werden können, scheinen sie direkt nach Entstehung durch Makrophagenfusion noch unreife Vorläuferzellen zu sein (Sowa et al., 2013). Die in der vorliegenden Arbeit im Herzgewebe detektierten „osteoklastenähnlichen Zellen“ werden als MN-Zellen bezeichnet, da sie zwar osteoklastentypisch Trap-positiv sind, allerdings vor Verkalkung im Gewebe akkumulieren, Osteoblastenmarker wie *Runx2* exprimieren und vermutlich eine eher entzündungsverstärkende Reaktion im Herzgewebe ausüben. Der klassische Osteoklast mit seiner knochenresorbierenden Funktion stellt folglich hier nicht den Fokus dar und diese Begriffsbezeichnung ist in dieser Arbeit nicht zutreffend.

Es erscheint zunächst paradox, dass Bisphosphonate, obwohl sie die Osteoklastenaktivität hemmen und über die Osteoblastenstimulation den Mineralisierungsprozess fördern, in dem hier aufgeführten Mausmodell genau Gegenteiliges bewirken und die dystrophe kardiale Verkalkung (DCC) bei C3H-Mäusen verhindern.

Bisphosphonate könnten durch Verhinderung der osteogenen Zelldifferenzierung glatten Muskelzellen und Verhinderung der Fusion von Makrophagen zu MN-Zellen bei der dystrophen kardialen Verkalkung (DCC) die Entzündungsreaktion im nekrotischen Gewebe abschwächen und Gewebemineralisierung verhindern.



Modifiziert nach Doherty et al 2003

Abbildung 4.2: Entstehung MN-Zellen bei der Gewebeerkrankung

Osteoblasten entstehen aus mesenchymalen Knochenmarkstammzellen und exprimieren die typische Gene *Alpl*, *Runx2* und *Opn*. Monozyten werden durch M-CSF zu Makrophagen differenziert. Durch das von Osteoblasten sezernierte RANKL werden aus den Makrophagen schließlich reife Osteoklasten, die *Trap* und *Ctsk* exprimieren.

4.4 Die Plaquebildung bei der DCC ist ein entzündliches Geschehen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nicht allein das Fehlen der Metabolite des Abcc6-Transporters für die Entstehung der DCC bei C3H-Mäusen verantwortlich sein kann. Abcc6 scheint auch in zelluläre Prozesse bei der Plaqueentstehung einzugreifen, da deutliche Unterschiede im Verhalten von Makrophagen zwischen den hier untersuchten Mauslinien festgestellt werden konnten. Es liegt die Vermutung nahe, dass anorganisches Pyrophosphat (PPi) über eine Hemmung der Makrophagendifferenzierung zu multinukleären Zellen zu einer Abschwächung der Entzündungsreaktion führt.

4.4.1 Die Milz als Reservoir für Monozyten

Monozyten zirkulieren frei im Blut. Kommt es zur Gewebeverletzung und Entzündung wie bei der Arteriosklerose, migrieren die Monozyten durch die Gefäßwand ins Gewebe und differenzieren zu Makrophagen und dendritischen Zellen. Nach einem Herzinfarkt werden Monozyten aus der Milz mobilisiert und zirkulieren zum Herzen in das verletzte Gewebe (Swirski et al., 2009). In der frühen Phase bis zu 5 Tage nach Herzinfarkt sind die CD14⁺ Monozyten zunächst in der Randzone um den nekrotischen Bereich zu finden. Danach infiltrieren sie auch den nekrotischen Bereich (van der Laan et al., 2014). Um zu überprüfen, ob Monozyten aus der Milz auch bei der dystrophen DCC in den Verkalkungsprozess eingreifen, wurde ein Assay zur Isolierung von Milzmonozyten aus B6- und C3H-Mäusen etabliert. Bei der DCC scheinen ähnliche Prozesse wie nach einem Herzinfarkt beim Menschen abzulaufen, die jedoch im Mausmodell anders als beim Menschen nicht nur zu Gewebeuntergang, sondern zusätzlich zu einer Gewebeverkalkung führen. In DCC-prädisponierten C3H-Mäusen konnten wir neben den Makrophageninfiltraten im nekrotischen Herzbereich nach Kälteapplikation die Ansammlung multinukleärer Riesenzellen nachweisen. Isoliert man Milzmonozyten aus diesem Mausstamm, zeigen die Monozyten unter M-CSF und RANKL-Stimulation eine starke Differenzierungstendenz zu multinukleären Zellen. Es ist also wahrscheinlich, dass in DCC-prädisponierten Mäusen eine Monozyteninfiltration und stärkere Entzündungsreaktion als bei DCC-resistenten B6-Mäusen zu Entstehung der Gewebeverkalkung führen.

4.4.2 Die Rolle von Makrophagen bei der DCC

Makrophagen können in die zwei Subgruppen M1 und M2 eingeteilt werden. M1-Polarisation wirkt proinflammatorisch, wohingegen M2 Makrophagen bei der Defektheilung eine Rolle spielen (Rath et al., 2014). In dieser Arbeit wurden Monozyten aus der Milz mit M-CSF zu Makrophagen differenziert. M-CSF wird im Organismus nicht nur von Makrophagen selbst, sondern auch von T-Zellen, Endothelzellen und Fibroblasten sezerniert (Shi et al., 2006). M-CSF stimuliert die Antigenpräsentation von Makrophagen, Komplement- und antikörpervermittelte Phagozytose, die Chemotaxis und Adhäsion von Lymphozyten und fördert die Zytokinproduktion (Martinez and Gordon, 2014).

Unterschiedliche Mauslinien zeigen genetisch bedingte Unterschiede in der Immunreaktion. Der B6-Mausstamm weist eine gute lokale und daraus resultierend eine abgeschwächte systemische Entzündung auf (Watanabe et al., 2004). Als sogenannter Th1-

dominanter Stamm können B6-Makrophagen durch IFN- γ oder LPS im Gegensatz zu anderen Mausstämmen einfach aktiviert und zur NO-Produktion angeregt werden (Hill Charles D Mills et al., 2000). C3H-Makrophagen zeigen hingegen eine abgeschwächte Reaktion auf LPS-Stimulation und C3H-B-Zellen eine reduzierte Klonierungsrate (Vetvicka et al., 1986). Auch in dieser Arbeit sind deutliche Unterschiede in der Makrophagenaktivität zwischen den Mauslinien C3H und B6 erkennbar.

Die aus Monozyten differenzierten Makrophagen des DCC-prädisponierten Mausstammes C3H zeigen im Gegensatz zu B6-Makrophagen eine erhöhte Expression der Marker *iNOS* für M1- und *Arg-1* für M2-Makrophagen. Die stärkere Makrophagenpolarisation könnten auf eine erhöhte systemische entzündliche Reaktivität bei C3H-Mäusen hindeuten und Gewebeverkalkung triggern. Da die Makrophagen jedoch separat in einem Zellkulturmodell durch M-CSF differenziert worden sind, ist dieses Modell natürlich nur begrenzt zum Rückschluss auf Entzündungsmechanismen geeignet, da die von anderen Zellen der Gefäßwand produzierten Zytokine und Zell-Interaktionen bei der Arteriosklerose in diesem Modell fehlen.

Neben der starken Tendenz zur Makrophagenpolarisierung bei DCC-prädisponierten C3H-Mäusen, produzieren C3H-Makrophagen mehr promineralisierende Zytokine als B6-Makrophagen (Abbildung 3.30). Von C3H-Makrophagen konditioniertes Medium bedingt eine Verkalkung von C3H/10T1/2-Zellen *in vitro*, während das Medium von B6-Makrophagen die Zellverkalkung fast vollständig inhibiert. Von B6-Makrophagen produzierte Stoffe oder Zytokine wirken folglich sogar antimineralisierend.

Um die beteiligten Zytokine zu identifizieren, wurde in dieser Arbeit ein Zytokinscreening im konditionierten Makrophagenmedium angeschlossen. PPI-Messungen im Makrophagenmedium ergeben eine höhere PPI-Konzentration im B6-Makrophagenmedium. B6-Makrophagen scheinen folglich PPI zu sezernieren oder es findet durch C3H-Makrophagen ein stärkerer PPI-Abbau/-Verbrauch statt.

Im C3H-Makrophagenmedium waren weiterhin hohe Konzentrationen der CC-Chemokinfamilie (CCL1, 2, 3, 4, 12 und 17) messbar, die im akuten Entzündungsprozess der Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten und Lymphozyten dienen (Neote et al., 1993).

CD54/ Icam-1, ein endotheliales Adhäsionsmolekül, das bei der Arteriosklerose die Monozytenaggregation in der Gefäßwand vermittelt (Cybulsky et al., 2001), zeigte neben IL1ra (Interleukin-Rezeptor-Antagonist) im C3H-Medium die höchste Konzentration.

on und könnte bei C3H-Mäusen die Monozytenadhäsion im nekrotischen Herzgewebe begünstigen.

IL1ra wird als Akute-Phase Protein von Hepatozyten sezerniert und inhibiert das proinflammatorisch wirkende Zytokin IL-1 (Arend et al., 1998). *IL-1ra* ^{-/-} Mäuse mit ApoE-Hintergrund entwickeln beispielsweise im Gegensatz zu *IL1ra* ^{+/+} Mäusen keine Arteriosklerose (Merhi-Soussi et al., 2005).

Der erste Schritt der Plaqueentstehung bei der Arteriosklerose ist die Rekrutierung von Monozyten und Lymphozyten, die über das Adhäsionsmolekül Icam-1 initiiert wird (Nakashima et al., 1998). Sowohl im Herzgewebe als auch im konditionierten Makrophagenmedium von DCC-prädisponierten C3H-Mäusen kann eine höhere Icam-1-Konzentration als bei DCC-resistenten B6-Mäusen gemessen werden. Dies führt dann über die Verstärkung der Entzündungsreaktion, Makrophagenakkumulation und osteogenetische Zelldifferenzierung zur Verkalkung.

Passend zu diesen Daten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Makrophagen aus für die dystrophe kardiale Verkalkung (DCC) prädisponierten C3H-Mäusen promineralisierenden Zytokine stärker sezernieren als Makrophagen aus der DCC-resistenten B6-Mäusen, wohingegen die im B6-Makrophagenmedium die erhöhte PPi-Konzentration antimineralisierend wirkt.

4.4.3 Das Komplementsystem und Gefäßverkalkung

C3a und C5a sind aktivierte Anaphylatoxine des Komplementsystems. Über ihre Rezeptoren C3aR und C5aR steuern sie Chemotaxis, Phagozytose von geschädigten Zellen und Mastzelldegranulation im entzündeten Gewebe (Carter et al., 2012). Die Komponenten des Komplementsystems sind vor allem in arteriosklerotischen Plaques und nicht in der normalen Gefäßwand zu finden, was ihre Bedeutung bei der Gefäßverkalkung aufzeigt (Seifert and Hansson, 1989).

Erhöhte C3a-Werte im Blut gehen mit einem höheren Risiko für KHK einher (ONAT et al., 2005). Patienten zeigen auch nach einem Myokardinfarkt erhöhte C5a und C3a-Werte im Blut (Langlois and Gawryl, 1988). Das Komplementsystem reguliert aber nicht nur den Gewebeschaden nach einem Herzinfarkt, sondern spielt auch im Knochen eine wichtige Rolle. *C3a* wird während der Osteogenese hochreguliert, was sich auch in dem hier verwendeten Monozyten-Differenzierungsassay bestätigte (Ignatius, Schoengraf et al., 2011). Ausdifferenzierte Multinukleäre Zellen exprimieren höhere *C3a*-Level als Monozyten und Makrophagen (Abbildung 3.21)

C5a vermittelt die Osteoblastenmigration (Ignatius, Ehrnthaller et al., 2011). Monozyten können auch ohne den Einfluss von M-CSF und RANKL durch Stimulation mit C3a und C5a zu Osteoklasten differenziert werden (Ignatius, Schoengraf et al., 2011). C3 wird von Tu et al. (2010) sogar als essentiell für eine Osteoklastenentwicklung beschrieben.

Da bei der dystrophen kardialen Verkalkung vermutlich dieselben Mechanismen wie bei der Knochenmineralisierung ablaufen, wurde in dieser Arbeit die Expression von *C3a* und *C5a* und deren Rezeptoren in Monozyten und den Differenzierungsstufen gemessen. Bei aus DCC-prädisponierten C3H-Mäusen isolierten Makrophagen wurde im Gegensatz zu B6-Makrophagen eine erhöhte Expression von *C3a*, *C3aR* und *C5aR* gemessen. Osteoklastenähnliche Zellen zeigen keine *C5a*-Expression. Das Komplementsystem scheint also auch bei der DCC eine entscheidende Rolle für das Ausmaß der Gewebeverkalkung zu spielen, möglicherweise indem *C3a* und *C5a* die osteogenetische Zelldifferenzierung induzieren. Makrophagenpolarisation, Komplementaktivierung und Zytokinausschüttung könnten bei B6-Mäusen abgeschwächt sein, wodurch eine Gewebeverkalkung ausbleibt.

4.4.4 Verbindung zwischen Genetik und Ausmaß der Entzündung

Zuvor wurde eine Mutation im *Abcc6*-Transporter als Ursache für die DCC definiert und die mögliche Rolle MN-Zellen und Makrophagen bei der DCC beschrieben. *Abcc6* ist allerdings nur in Leber und Nieren und nicht in Monozyten, Makrophagen oder MN-Zellen exprimiert (Abbildung 3.23). Es ist nicht sicher auszuschließen, dass *Abcc6* nur kurzzeitig in Entzündungszellen unter dem Einfluss bestimmter Zytokine exprimiert wird und deshalb nicht messbar war.

Obwohl in den Monozyten und deren Differenzierungsstufen kein Unterschied in der *Abcc6*-Expression festgestellt werden konnte, so ist doch ein starker Unterschied in der Monozytendifferenzierung zwischen C3H- und B6-Mäusen *in vitro* zu verzeichnen. Um den Einfluss der Zytokinproduktion von MN-Zellen und Makrophagen der beiden Mauslinien auf die Verkalkung zu untersuchen, wurden Monozyten aus der Milz von B6 und C3H-Mäusen isoliert und zu Makrophagen differenziert. Anschließend wurde durch die Makrophagen konditioniertes Zellmedium auf mesenchymale Stammzellen gegeben und der Einfluss auf die Verkalkung beobachtet. B6-Makrophagen und B6-MN-Zellen geben Stoffe in die Umgebung ab, die Verkalkung inhibieren. Zytokine von C3H-Makrophagen wirken hingegen promineralisierend.

4.4.4.1 Unterschiede zwischen den Mausstämmen C57BL/6J (B6) und C3H/HeJ (C3H)

B6 und C3H-Mäuse weisen sowohl Unterschiede in der Knochen- als auch bei der Gewebemineralisierung auf. C3H-Mäuse haben im Gegensatz zu B6-Mäusen eine höhere Differenzierungskapazität und Aktivität von aus der Schädelkalotte isolierten Osteoblasten, was die höhere Knochendichte der C3H-Mauslinie erklären könnte (Yan et al., 2007). Außerdem konnte in C3H-Osteoblasten eine 50% niedrigere Apoptoserate als bei B6-Osteoblasten festgestellt werden (Sheng et al., 2006). Dies kann ein Grund für die stärkere Knochenbildungsrate und Gewebemineralisierung bei C3H-Mäusen sein.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Milzmonozyten von C3H-Mäusen *in-vitro* eine starke Differenzierungskapazität zu osteoklastenähnlichen Zellen haben, während bei DCC-resistenten B6-Mäusen kaum MN-Zellen zu detektieren waren. Aus DCC-prädisponierten C3H-Mäusen gewonnene MN-Zellen exprimieren sowohl typische Osteoklastenmarker wie *Ctsk* und *Trap* als auch Osteoblastenmarker wie *Runx2*.

In vivo konnte bei C3H-Mäusen eine starke Akkumulation TRAP-positiver MN-Zellen im verkalkten Gewebe nach Kälteapplikation detektiert werden. Bei B6 waren keine MN-Zellen im nekrotischen Herzbereich sichtbar. Die Unterschiede *in vivo* und *in vitro* zwischen den beiden Mausstämmen zeigen, dass Monozyten und deren Differenzierungskapazität eine wichtige Rolle bei der Modulation der DCC spielen.

Yan et al. isolierten Stammzellen aus dem Knochenmark (BMDC) beider Mausstämme und differenzierten diese nach ähnlichem Protokoll wie in dieser Arbeit zu Osteoklasten. Allerdings waren die Ergebnisse hier invers, da die Forschungsgruppe bei B6-Mäusen eine höhere Osteoklastenbildung beschreibt als bei C3H-Mäusen (Yan et al., 2007). Hämatopoietische Stammzellen aus dem Knochenmark und Monozyten aus der Milz scheinen folglich verschiedene Charakteristika aufzuweisen und unterschiedliche Rollen bei der Mineralisierung zu spielen. Die Milz könnte nicht nur als Reservoir für Monozyten, sondern auch deren Polarisierung und Differenzierung dienen.

4.5 Weiterführende Experimente

Zwischen der zugrundeliegenden *Abcc6*-Mutation und dem Endpunkt der pathologischen kardiovaskulären Verkalkung liegen eine Vielzahl einander beeinflussende Enzym- und Zellinteraktionen. Diese konnten in dieser Arbeit nur zum Teil entschlüsselt und einige wichtige Ansatzpunkte zur Verhinderung der Verkalkung dargelegt werden.

So gilt es, die Bisphosphonatversuche *in vivo* fortzuführen, um das potenteste und nebenwirkungsärmste Bisphosphonat zur Verhinderung der Verkalkung mit der niedrigsten effektiven Dosis ausfindig zu machen.

Weiterhin könnte der *Icam-1*-Spiegel im Blut nach *PPi*-Gabe gemessen werden, um zu überprüfen, ob *PPi* auch die *Icam-1*-Sekretion beeinflusst.

Um die Rolle der Makrophagenaggregation bei der dystrophen kardialen Verkalkung (DCC) genauer zu untersuchen, könnte in zukünftigen Tierversuchen eine Knochenmarktransplantation von B6 auf C3H durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob hämatopoietische Stammzellen aus dem B6-Knochenmark in C3H-Mäusen das Ausmaß der DCC beeinflussen. Weiterhin könnte die DCC in C3H-Mäusen mit Makrophagen-*Knock-out* untersucht werden. Nach der in dieser Arbeit aufgestellten Theorie dürften diese *Knock-out*-C3H-Mäuse dann keine bzw. eine abgeschwächte Form der DCC zeigen.

4.6 Ausblicke

Ziel eines jeden Projektes ist es über die Grundlagenforschung hinaus in die klinische Anwendung zu gehen. So könnten zukünftig die hier am Mausmodell etablierten Methoden auf den Menschen angewandt werden. Es liegt nahe, Monozyten aus dem peripheren Blut von Patienten zu isolieren und zu überprüfen, ob die Differenzierungstendenz zu Makrophagen bzw. Osteoklasten mit dem Vorhandensein von Arteriosklerose und deren Folgekrankheiten korreliert. So könnte man durch eine einfache Blutentnahme über die Makrophagendifferenzierung *in vitro* Risikopatienten für Arteriosklerose screenen. Als problematisch stellt sich hier natürlich die Komplexität an individuellen genetischen Varianten und der aktuellen Infektlage jedes Einzelnen dar, die die Entzündungszelldifferenzierung beeinflusst. So ist allein schon zwischen Männern und Frauen ein Unterschied in der Monozytendifferenzierung erkennbar.

Als ein weiterer prognostischer Biomarker für das kardiovaskuläre Risiko wäre ICAM-1 denkbar. Einige Studien zeigen bereits, dass ICAM-1-Spiegel im Blut mit dem Ausmaß

der Gefäßverkalkung korrelieren (Gross et al., 2012). Auch PPI-Spiegel im Blut könnten als Biomarker für das kardiovaskuläre Risiko getestet werden.

Die Erforschung der Pathomechanismen der Arteriosklerose anhand einzelner Genmutationen wie z.B. des Gens *Abcc6* in dieser Arbeit dient dazu, einzelne Mediatoren zu identifizieren, die antimineralisierend wirken. Es konnte hier gezeigt werden, dass IL1ra und anorganisches Pyrophosphat Gewebemineralisierung verhindert. Eine IL1ra-Gabe zur Arterioskleroseprävention könnte folglich im Mausmodel und später beim Menschen getestet werden.

5 Zusammenfassung

Ursache für die Entstehung der dystrophen kardialen Verkalkung (DCC) bei C3H-Mäusen ist ein Polymorphismus im Gen *Abcc6*. Der daraus entstehende Funktionsverlust des *Abcc6*-Transporters in Leber und Niere führt zu einem Mangel an anorganischem Pyrophosphat (PPi), das normalerweise Gewebeverkalkung verhindert. Die Pathomechanismen für die Entstehung der DCC sind bisher nicht vollständig geklärt.

Als Versuchsmodel wurden in der vorliegenden Arbeit der DCC-resistente Mausstamm B6 und der zu DCC-prädisponierte Mausstamm C3H verwendet.

DCC kann durch Kälteapplikation am Herzen induziert werden. Makrophagen akkumulieren im nekrotischen Herzgewebe. Noch vor der Entstehung reifer Kalkablagerungen ist eine Fusion der Makrophagen zu multinukleären Riesenzellen (MN-Zellen) zu beobachten. Die Gewebeverkalkung DCC-prädisponierter C3H-Mäuse läuft nach ähnlichen Pathomechanismen ab, wie die Knochenmineralisierung. Durch die osteogenetische Differenzierung von Makrophagen, glatten Muskelzellen und Perizyten kommt es zu einer Gewebemineralisierung. Um die Rolle der MN-Zellen bei der Verkalkung zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein Differenzierungsassay von aus der Milz isolierten Monozyten zu multinukleären Riesenzellen etabliert. Dabei zeigte sich eine deutlich stärkere Differenzierungstendenz der Monozyten aus dem DCC-prädisponierten C3H-Mausstamm. Die MN-Zellen exprimierten neben den osteoklastischen Markern *Ctsk* und *Trap* ebenso die Osteoblastenmarker *Alpl* und *Runx2*. Makrophagen der verkalkenden Mäuse zeigen außerdem eine hohe Expression von M1/M2-Markern, was für eine stärkere Entzündungsreaktion in diesem Mausstamm spricht. In Zellkulturversuchen konnte weiterhin gezeigt werden, dass aus C3H-Monozyten differenzierte Makrophagen Mediatoren wie *Icam-1* sezernieren, die Zellverkalkung verstärken. Mediatoren von B6-Makrophagen wie z.B. PPi inhibieren im Gegensatz dazu die Gewebeverkalkung.

DCC-prädisponierte C3H-Mäuse zeigen niedrigere Blutspiegel an anorganischem Pyrophosphat (PPi). PPi und dessen stabile Strukturanaloga Bisphosphonate sind als Inhibitoren der Osteoklastenaktivität bekannt und werden zur Osteoporosebehandlung eingesetzt. Daher überprüften wir den Zusammenhang zwischen der Rolle MN-Zellen bei der DCC und niedrigen PPi-Blutkonzentrationen in C3H-Mäusen. Hierzu wurden C3H-Mäusen nach Kälteverletzung mit PPi und andere Bisphosphonaten behandelt. Wir

konnten beweisen, dass PPi nicht nur effektiv die Bildung MN-Zellen *in vitro*, sondern auch die Entstehung der DCC im Mausmodell verhindert.

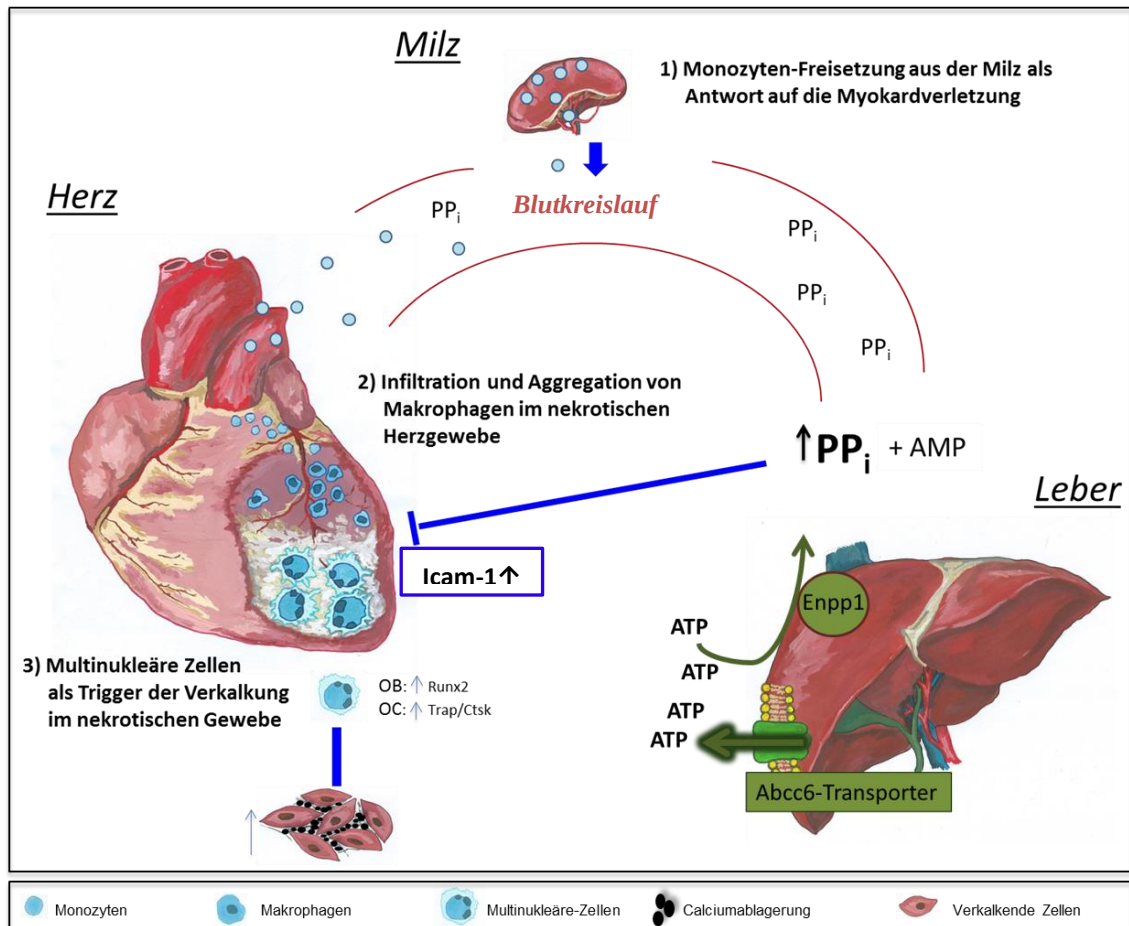


Abbildung 5.1: Theorie zum Pathomechanismus der dystrophen kardialen Verkalkung (DCC)

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine durch Kälteapplikation ausgelöste Gewebeerletzung am Herzen eine inflammatorische Reaktion auslöst, bei der Leber, Herz und Milz eine wichtige Rolle zukommt. Nach einer Gewebeerletzung im kardiovaskulären System werden hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark mobilisiert und wandern über das Blut zur Milz, die zur Speicherung und Differenzierung von Monozyten dient (1). Die zirkulierenden Monozyten infiltrieren das nekrotische Herzgewebe und differenzieren unter dem Einfluss lokaler Entzündungsmediatoren zu Makrophagen (2). Makrophagen DCC-prädisponierter C3H-Mäuse sezernieren Icam-1 und promineralisierende Zytokine. In Kombination mit einer reduzierten PPi -Sekretion kommt es zu einer verstärkten Gewebeerkrankung. Die Makrophagen aggregieren zu multinukleären Zellen (MN-Zellen), die eine wichtige Rolle bei der Mineralisierung spielen (3). Mäuse, die DCC entwickeln, zeigen eine erhöhte Bildung MN-Zellen, die sowohl osteoklastische Marker (OC) als auch osteoblastische Marker (OB) exprimieren.

Abcc6 ist ein Gen, das vor allem in Hepatozyten exprimiert ist und einen Membrantransporter codiert. DCC bei Mäusen entsteht durch eine Abcc6 -Mutation und den dadurch hervorgerufenen Defekt des Abcc6 -Transporters. Ein intakter Abcc6 -Transporter fördert die ATP-Freisetzung aus der Zelle. ATP wird dann extrazellulär durch die Enpp1 (ectonucleotide pyrophosphatase) in AMP und anorganisches Pyrophosphat (PPi) gespalten. PPi ist ein potenter Inhibitor für die Verkalkung glatter Muskelzellen und hemmt die Osteoklastenentstehung. Hohe PPi -Blutspiegel bei DCC-resistenten Mäusen oder PPi -Substitution bei DCC-prädisponierten Mäusen hemmt folglich die Differenzierung von Makrophagen zu MN-Zellen und verhindert dadurch Gewebeerkrankung.

6 Literaturverzeichnis

- Acharya G, Armstrong M, McFall C, Quinn RW, Hilbert SL, Converse GL, Toth PB, Sherman AK, Lee CH, Lofland GK, Hopkins RA (2014) Calcium and phosphorus concentrations in native and decellularized semilunar valve tissues. *J Heart Valve, Dis* 23(3):259–70
- Aherrahrou Z, Axtner SB, Kaczmarek PM, Jurat A, Korff S, Doebling LC, Weichenhan D, Katus HA, Ivandic BT (2004) A locus on chromosome 7 determines dramatic up-regulation of osteopontin in dystrophic cardiac calcification in mice. *Am J Pathol*, 164(4):1379–87
- Aherrahrou Z, Doebling LC, Ehlers E-M, Liptau H, Depping R, Linsel-Nitschke P, Kaczmarek PM, Erdmann J, Schunkert H (2008) An alternative splice variant in *Abcc6*, the gene causing dystrophic calcification, leads to protein deficiency in C3H/He mice. *J Biol Chem*, 283(12):7608–15
- Alfrey AC, Ibels LS (1978) Role of phosphate and pyrophosphate in soft tissue calcification. *Adv Exp Med Biol*, 103:187–93
- Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C (1998) INTERLEUKIN-1 RECEPTOR ANTAGONIST: Role in Biology. *Annu Rev Immunol*, 16(1):27–55
- Atkinson BL, Fantle KS, Benedict JJ, Huffer WE, Gutierrez-Hartmann A (1997) Combination of osteoinductive bone proteins differentiates mesenchymal C3H/10T1/2 cells specifically to the cartilage lineage. *J Cell Biochem*, 65(3):325–39
- Di Bartolo BA, Schoppet M, Mattar MZ, Rachner TD, Shanahan CM, Kavurma MM (2011) Calcium and osteoprotegerin regulate IGF1R expression to inhibit vascular calcification. *Cardiovasc Res*, 91(3):537–45
- Bauer H, Vogel B, Schumpelick V, Bergdolt K, Kirchhof P, Lübke H, Henke KD, Wippermann C, Sawicki PT, Polonius MJ, Steinau G, Zerres K, Arnold N, Glahn (2009) Volkskrankheiten - Gesundheitliche Herausforderungen in der Wohlstandsgesellschaft, Kapitel III Volkskrankheiten - Begriffsbestimmungen aus der Sicht der Medizin, S. 80-98, Herder Verlag
- Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE (1992) Inorganic phosphate added exogenously or released from beta-glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules in vitro. *Bone Miner*, 17(1):15–29
- Blau HM, Chiu CP, Webster C (1983) Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell*, 32(4):1171–80
- Böcker W, Denk H, Heitz PhU (2004) “Pathologie”, Kapitel 19: Herz, S. 462-463, Kapitel 20: Gefäße, S.484-494, 3. Auflage, Elsevier Urban & Fischer, München
- Bonjour J-P (2011) Calcium and phosphate: a duet of ions playing for bone health. *J Am Coll Nutr*, 30(5 Suppl 1):438S–48S
- Brunnert SR (1997) Morphologic response of myocardium to freeze-thaw injury in mouse strains with dystrophic cardiac calcification. *Lab Anim Sci*, 47(1):11–8
- Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, McDonald JM,

- Chen Y (2008) Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem*, 283(22):15319–27
- Capulli M, Paone R, Rucci N (2014) Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Arch Biochem Biophys*, 561:3–12
- Carter AM (2012) Complement activation: an emerging player in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Scientifica (Cairo)*, 2012:402783
- Cattalini JP, Boccaccini AR, Lucangioli S, Mouriño V (2012) Bisphosphonate-based strategies for bone tissue engineering and orthopedic implants. *Tissue Eng Part B Rev*, 18(5):323–40
- Collin-Osdoby P (2004) Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ Res*, 95(11):1046–57
- Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS (2001) A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest*, 107(10):1255–62
- D’Amelio P, Isaia G, Isaia GC (2009) The osteoprotegerin/RANK/RANKL system: a bone key to vascular disease. *J Endocrinol Invest*, 32(4 Suppl):6–9
- Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF (2013) The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocr Rev*, 34(5):658–90
- Demer LL, Tintut Y (2014) Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34(4):715–23
- Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, Luckman SP, Hahn FM, Poulter CD, Ebetino FH, Rogers MJ (2001) Structure-Activity Relationships for Inhibition of Farnesyl Diphosphate Synthase in Vitro and Inhibition of Bone Resorption in Vivo by Nitrogen-Containing Bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther*, 296(2).
- Eaton GJ, Custer RP, Johnson FN, Stabenow KT (1978) Dystrophic cardiac calcinosis in mice: genetic, hormonal, and dietary influences. *Am J Pathol*, 90(1):173–86
- Edouard T, Chabot G, Miro J, Buhac DC, Nitschke Y, Lapierre C, Rutsch F, Alos N (2011) Efficacy and safety of 2-year etidronate treatment in a child with generalized arterial calcification of infancy. *Eur J Pediatr*, 170(12):1585–90
- Everitt JJ, Olson LM, Mangum JB, Visek WJ (1988) High Mortality with Severe Dystrophic Cardiac Calcinosis in C3H/OUJ Mice Fed High Fat Purified Diets. *Vet Pathol*, 25(2):113–118
- Felix R, Hofstetter W, Wetterwald A, Cecchini MG, Fleisch H (1994) Role of colony-stimulating factor-1 in bone metabolism. *J Cell Biochem*, 55(3):340–9
- Ferreira C, Ziegler S, Gahl W (1993) Generalized Arterial Calcification of Infancy. *GeneReviews*
- Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS (2015) Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*, 2015:421746
- Gang DL, Barrett L V, Wilson EJ, Rubin RH, Medearis DN (1986) Myopericarditis and enhanced dystrophic cardiac calcification in murine cytomegalovirus infection. *Am J Pathol*, 124(2):207–15
- Garcia JH, Khang-Loon H (1996) Carotid atherosclerosis. Definition, pathogenesis, and

- clinical significance. *Neuroimaging Clin N Am*, 6(4):801–10
- Gerrity RG (1981) The role of the monocyte in atherogenesis: II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*, 103(2):191–200
- Gregory CA, Grady Gunn W, Peister A, Prockop DJ (2004) An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*, 329(1):77–84
- Hackam DG, Anand SS (2003) Emerging Risk Factors for Atherosclerotic Vascular Disease. *JAMA*, 290(7):932
- Harmey D, Hessle L, Narisawa S, Johnson KA, Terkeltaub R, Millán JL (2004) Concerted Regulation of Inorganic Pyrophosphate and Osteopontin by Akp2, Enpp1, and Ank. *Am J Pathol*, 164(4):1199–1209
- Higgins CF (1992) ABC Transporters: From Microorganisms to Man. *Annu Rev Cell Biol*, 8(1):67–113
- Hill Charles D Mills AM, Kincaid K, Alt JM, Mills CD, Heilman MJ, Hill AM (2000) Paradigm M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J Immunol Ref*, 164:6166–6173
- Hosen MJ, Zubaer A, Thapa S, Khadka B, De Paepe A, Vanakker OM (2014) Molecular docking simulations provide insights in the substrate binding sites and possible substrates of the ABCC6 transporter. *PLoS One*, 9(7):e102779
- Ignatius A, Ehrnthaller C, Brenner RE, Kreja L, Schoengraf P, Lisson P, Blakytyn R, Recknagel S, Claes L, Gebhard F, Lambris JD, Huber-Lang M (2011) The anaphylatoxin receptor C5aR is present during fracture healing in rats and mediates osteoblast migration in vitro. *J Trauma*, 71(4):952–60
- Ignatius A, Schoengraf P, Kreja L, Liedert A, Recknagel S, Kandert S, Brenner RE, Schneider M, Lambris JD, Huber-Lang M (2011) Complement C3a and C5a modulate osteoclast formation and inflammatory response of osteoblasts in synergism with IL-1 β . *J Cell Biochem*, 112(9):2594–605
- Ivandic BT, Utz HF, Kaczmarek PM, Aherrahrou Z, Axtner SB, Klepsch C, Lysis AJ, Katus HA (2001) New Dyscalc loci for myocardial cell necrosis and calcification (dystrophic cardiac calcinosis) in mice. *Physiol Genomics*, 6(3):137–44
- Jansen RS, Duijst S, Mahakena S, Sommer D, Szeri F, Váradi A, Plomp A, Bergen AA, Oude Elferink RPJ, Borst P, van de Wetering K (2014) ABCC6-mediated ATP secretion by the liver is the main source of the mineralization inhibitor inorganic pyrophosphate in the systemic circulation-brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34(9):1985–9
- Jansen RS, Küçükosmanoglu A, de Haas M, Sapthu S, Otero JA, Hegman IEM, Bergen AAB, Gorgels TGMF, Borst P, van de Wetering K (2013) ABCC6 prevents ectopic mineralization seen in pseudoxanthoma elasticum by inducing cellular nucleotide release. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(50):20206–11
- Jian R-L, Mao L-B, Xu Y, Li X-F, Wang F-P, Luo X-G, Zhou H, He H-P, Wang N, Zhang T-C (2015) Generation of insulin-producing cells from C3H10T1/2 mesenchymal progenitor cells. *Gene*, 562(1):107–116
- Jiang Q, Dibra F, Lee MD, Oldenburg R, Uitto J (2010) Overexpression of fetuin-a counteracts ectopic mineralization in a mouse model of pseudoxanthoma elasticum (abcc6(-/-)). *J Invest Dermatol*, 130(5):1288–96

- Jiang Q, Endo M, Dibra F, Wang K, Uitto J (2009) Pseudoxanthoma elasticum is a metabolic disease. *J Invest Dermatol*, 129(2):348–54
- Jiang Q, Li Q, Uitto J (2007) Aberrant Mineralization of Connective Tissues in a Mouse Model of Pseudoxanthoma Elasticum: Systemic and Local Regulatory Factors. *J Invest Dermatol*, 127(6):1392–1402
- Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM (2000) Phosphate Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Calcification. *Circ Res*, 87(7):e10–e17
- Kessler T, Kaess B, Bourrier F, Erdmann J, Schunkert H (2014) Genetic analyses as basis for a personalized medicine in patients with coronary artery disease. *Herz*, 39(2):186–93
- Kim DH, Rogers JR, Fulchino LA, Kim CA, Solomon DH, Kim SC (2015) Bisphosphonates and risk of cardiovascular events: a meta-analysis. *PLoS One*, 10(4):e0122646
- Komori T (2009) Regulation of Osteoblast Differentiation by Runx2. In: Springer US, pp. 43–49
- Kool M, van der Linden M, de Haas M, Baas F, Borst P (1999) Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer Res*, 59(1):175–82
- Kranenburg G, Bartstra JW, Weijmans M, de Jong PA, Mali WP, Verhaar HJ, Visseren FLJ, Spiering W (2016) Bisphosphonates for cardiovascular risk reduction: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*, 252:106–15
- Kurabayashi M (2016) Interaction between bone and artery. *Clin Calcium*, 26(8):1119–26
- Kuzaj P, Kuhn J, Michalek RD, Karoly ED, Faust I, Dabisch-Ruthe M, Knabbe C, Hendig D (2014) Large-Scaled Metabolic Profiling of Human Dermal Fibroblasts Derived from Pseudoxanthoma Elasticum Patients and Healthy Controls. In: Dardis A (ed) *PLoS One*, 9(9):e108336
- van der Laan AM, Ter Horst EN, Delewi R, Begieneman MP V, Krijnen PAJ, Hirsch A, Lavaei M, Nahrendorf M, Horrevoets AJ, Niessen HWM, Piek JJ (2014) Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir. *Eur Heart J*, 35(6):376–85
- Langlois PF, Gawryl MS (1988) Detection of the terminal complement complex in patient plasma following acute myocardial infarction. *Atherosclerosis*, 70(1):95–105
- Lanzer P, Boehm M, Sorribas V, Thiriet M, Janzen J, Zeller T, St Hilaire C, Shanahan C (2014) Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *Eur Heart J*, 35(23):1515–25
- LaRusso J, Li Q, Uitto J (2011) Pseudoxanthoma elasticum, the paradigm of heritable ectopic mineralization disorders - can diet help? *J Dtsch Dermatol Ges*, 9(8):586–93
- Lefthériotis G, Omarjee L, Le Saux O, Henrion D, Abraham P, Prunier F, Willoteaux S, Martin L (2013) The vascular phenotype in Pseudoxanthoma elasticum and related disorders: contribution of a genetic disease to the understanding of vascular calcification. *Front Genet*, 4:4

- Li Q, Kingman J, Sundberg JP, Levine MA, Uitto J (2016) Etidronate prevents, but does not reverse, ectopic mineralization in a mouse model of pseudoxanthoma elasticum (Abcc6^{-/-}). *Oncotarget* 10738
- Li Q, Sundberg JP, Levine MA, Terry SF, Uitto J (2015) The effects of bisphosphonates on ectopic soft tissue mineralization caused by mutations in the ABCC6 gene. *Cell Cycle*, 14(7)
- Liu C, Walter TS, Huang P, Zhang S, Zhu X, Wu Y, Wedderburn LR, Tang P, Owens RJ, Stuart DI, Ren J, Gao B (2010) Structural and Functional Insights of RANKL-RANK Interaction and Signaling. *J Immunol*, 184(12):6910–6919
- Lomashvili KA, Monier-Faugere M-C, Wang X, Malluche HH, O'Neill WC (2009) Effect of bisphosphonates on vascular calcification and bone metabolism in experimental renal failure. *Kidney Int*, 75(6):617–625
- Maraka S, Kennel KA (2015) Bisphosphonates for the prevention and treatment of osteoporosis. *BMJ*, 351:h3783
- Martinez FO, Gordon S (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*, 6:13
- Meng H, Vera I, Che N, Wang X, Wang SS, Ingram-Drake L, Schadt EE, Drake TA, Lusis AJ (2007) Identification of Abcc6 as the major causal gene for dystrophic cardiac calcification in mice through integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(11):4530–5
- Merhi-Soussi F, Kwak BR, Magne D, Chadjichristos C, Berti M, Pelli G, James RW, Mach F, Gabay C (2005) Interleukin-1 plays a major role in vascular inflammation and atherosclerosis in male apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc Res*, 66(3)
- Munro JM, Cotran RS (1988) The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab Invest*, 58(3):249–61
- Murshed M, Schinke T, McKee MD, Karsenty G (2004) Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J Cell Biol*, 165(5):625–30
- Neote K, DiGregorio D, Mak JY, Horuk R, Schall TJ (1993) Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor. *Cell*, 72(3):415–25
- Nitschke Y, Baujat G, Botschen U, Wittkamp T, du Moulin M, Stella J, Le Merrer M, Guest G, Lambot K, Tazarourte-Pinturier M-F, Chassaing N, Roche O, Feenstra I, Loechner K, Deshpande C, Garber SJ, Chikarmane R, Steinmann B, Shahinyan T, Martorell L, Davies J, Smith WE, Kahler SG, McCulloch M, Wraige E, Loidi L, Höhne W, Martin L, Hadj-Rabia S, Terkeltaub R, Rutsch F (2012) Generalized Arterial Calcification of Infancy and Pseudoxanthoma Elasticum Can Be Caused by Mutations in Either ENPP1 or ABCC6. *Am J Hum Genet*, 90(1):25–39
- Nitschke Y, Rutsch F (2012) Genetics in arterial calcification: lessons learned from rare diseases. *Trends Cardiovasc Med*, 22(6):145–9
- O'Donnell CJ, Chazaro I, Wilson PWF, Fox C, Hannan MT, Kiel DP, Cupples LA (2002) Evidence for Heritability of Abdominal Aortic Calcific Deposits in the Framingham Heart Study. *Circulation*, 106(3).
- O'Neill WC, Lomashvili KA, Malluche HH, Faugere M-C, Riser BL (2011) Treatment

- with pyrophosphate inhibits uremic vascular calcification. *Kidney Int*, 79(5):512–7
- O'Neill WC, Sigrist MK, McIntyre CW (2010) Plasma pyrophosphate and vascular calcification in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*, 25(1):187–91
- ONAT A, UZUNLAR B, HERGENÇ G, YAZICI M, SARI I, UYAREL H, CAN G, SANSOY V (2005) Cross-sectional study of complement C3 as a coronary risk factor among men and women. *Clin Sci*, 108(2).
- Orozco C, Maalouf NM (2012) Safety of Bisphosphonates. *Rheum Dis Clin North Am*, 38(4):681–705
- Orriss IR, Arnett TR, Russell RGG (2016) Pyrophosphate: a key inhibitor of mineralisation. *Curr Opin Pharmacol*, 28:57–68
- Otero JE, Gottesman GS, McAlister WH, Mumm S, Madson KL, Kiffer-Moreira T, Sheen C, Millán JL, Ericson KL, Whyte MP (2013) Severe skeletal toxicity from protracted etidronate therapy for generalized arterial calcification of infancy. *J Bone Miner Res*, 28(2):419–30
- Ott SM (2005) Long-Term Safety of Bisphosphonates. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(3):1897–1899
- Panizo S, Cardus A, Encinas M, Parisi E, Valcheva P, Lopez-Ongil S, Coll B, Fernandez E, Valdivielso JM (2009) RANKL Increases Vascular Smooth Muscle Cell Calcification Through a RANK-BMP4-Dependent Pathway. *Circ Res*, 104(9):1041–1048
- Pomozi V, Brampton C, van de Wetering K, Zoll J, Calio B, Pham K, Owens JB, Marh J, Moisyadi S, Váradi A, Martin L, Bauer C, Erdmann J, Aherrahrou Z, Le Saux O (2017) Pyrophosphate Supplementation Prevents Chronic and Acute Calcification in ABCC6-Deficient Mice. *Am J Pathol*, 187(6):1258–1272
- Ramjan KA, Roscioli T, Rutsch F, Sillence D, Munns CF (2009) Generalized arterial calcification of infancy: treatment with bisphosphonates. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 5(3):167–172
- Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI, Munder M (2014) Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol*, 5:532
- Reilly MP, Li M, He J, Ferguson JF, Stylianou IM, Mehta NN, Burnett MS, Devaney JM, Knouff CW, Thompson JR, Horne BD, Stewart AFR, Assimes TL, Wild PS, Allayee H, Nitschke PL, Patel RS, Myocardial Infarction Genetics Consortium MIG, Wellcome Trust Case Control Consortium WTCC, Martinelli N, Girelli D, Quyyumi AA, Anderson JL, Erdmann J, Hall AS, Schunkert H, Quertermous T, Blankenberg S, Hazen SL, Roberts R, Kathiresan S, Samani NJ, Epstein SE, Rader DJ (2011) Identification of ADAMTS7 as a novel locus for coronary atherosclerosis and association of ABO with myocardial infarction in the presence of coronary atherosclerosis: two genome-wide association studies. *Lancet (London, England)*, 377(9763):383–92
- Rhee CW, Lee J, Oh S, Choi NK, Park BJ (2012) Use of bisphosphonate and risk of atrial fibrillation in older women with osteoporosis. *Osteoporos Int*, 23(1):247–254
- Rodan GA, Fleisch HA (1996) Bisphosphonates: mechanisms of action. *J Clin Invest*, 97(12):2692–6
- Russell RGG (2011) Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone*, 49(1):2–19

- Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, Dixon RJ, Meitinger T, Braund P, Wichmann H-E, Barrett JH, König IR, Stevens SE, Szymczak S, Tregouet D-A, Iles MM, Pahlke F, Pollard H, Lieb W, Cambien F, Fischer M, Ouwehand W, Blankenberg S, Balmforth AJ, Baessler A, Ball SG, Strom TM, Braenne I, Gieger C, Deloukas P, Tobin MD, Ziegler A, Thompson JR, Schunkert H, WTCCC and the Cardiogenics Consortium (2007) Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med*, 357(5):443–53
- Le Saux O, Martin L, Aherrahrou Z, Leftheriotis G, Váradi A, Brampton CN (2012) The molecular and physiological roles of ABCC6: more than meets the eye. *Front Genet*, 3:289
- Schweighofer N, Aigelsreiter A, Trummer O, Graf-Rechberger M, Hacker N, Kniepeiss D, Wagner D, Stiegler P, Trummer C, Pieber T, Obermayer-Pietsch B, Müller H, (2016) Direct comparison of regulators of calcification between bone and vessels in humans. *Bone*, 88:31–38
- Scriba GKE (2000) Bisphosphonate im Überblick. *Pharm unserer Zeit*, 29(1).
- Seifert G (1997) Heterotopic (extraosseous) calcification (calcinosis). Etiology, pathogenesis and clinical importance. *Pathologe*, 18(6):430–8
- Seifert PS, Hansson GK (1989) Complement receptors and regulatory proteins in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 9(6)
- Sheng MH-C, Lau K-HW, Mohan S, Baylink DJ, Wergedal JE (2006) High osteoblastic activity in C3H/HeJ mice compared to C57BL/6J mice is associated with low apoptosis in C3H/HeJ osteoblasts. *Calcif Tissue Int*, 78(5):293–301
- Shi Y, Liu CH, Roberts AI, Das J, Xu G, Ren G, Zhang Y, Zhang L, Yuan ZR, Tan HSW, Das G, Devadas S (2006) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Res*, 16(2):126–33
- Shioi A, Nishizawa Y, Jono S, Koyama H, Hosoi M, Morii H (1995) Glycerophosphate Accelerates Calcification in Cultured Bovine Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15(11):2003–2009
- Sims NA, Gooi JH (2008) Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol*, 19(5):444–451
- Sowa A-K, Kaiser FJ, Eckhold J, Kessler T, Aherrahrou R, Wrobel S, Kaczmarek PM, Doehring L, Schunkert H, Erdmann J, Aherrahrou Z (2013) Functional interaction of osteogenic transcription factors Runx2 and Vdr in transcriptional regulation of Opn during soft tissue calcification. *Am J Pathol*, 183(1):60–8
- Sowa, AK (2014) Funktionelle Untersuchung des Gens Abcc6 und seines Einflusses auf Verkalkungsprozesse. *Med. Diss. Universität zu Lübeck*
- Strydom HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1995) A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 92(5):1355–74
- Statistisches Bundesamt D. Gesellschaft - Todesursachen
<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/HaeufigsteTodesursachen.html;jsessionid=49543EA7636DEBC3BE>

20E5B6DA269EAC.cae1 (letzter Zugriff 25.09.2017)

- Stefan C, Jansen S, Bollen M (2005) NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem Sci*, 30(10):542–550
- Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang H-Y, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM (2001) Smooth Muscle Cell Phenotypic Transition Associated With Calcification: Upregulation of Cbfa1 and Downregulation of Smooth Muscle Lineage Markers. *Circ Res*, 89(12):1147–1154
- Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo J-L, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, Aikawa E, Mempel TR, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ (2009) Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*, 325(5940):612–6
- Tarling EJ, de Aguiar Vallim TQ, Edwards PA (2013) Role of ABC transporters in lipid transport and human disease. *Trends Endocrinol Metab*, 24(7):342–50
- Teitelbaum SL (2000) Bone resorption by osteoclasts. *Science*, 289(5484):1504–8
- Thygesen K, Alpert JS, White HD (2007) Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J*, 28(20):2525–2538
- Torpy JM, Burke AE, Glass RM (2009) Coronary Heart Disease Risk Factors. *JAMA*, 302(21):2388
- Towler DA (2005) Inorganic Pyrophosphate: A Paracrine Regulator of Vascular Calcification and Smooth Muscle Phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(4):651–654
- Tu Z, Bu H, Dennis JE, Lin F (2010) Efficient osteoclast differentiation requires local complement activation. *Blood*, 116(22):4456–63
- Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM (2003) Osteo/Chondrocytic Transcription Factors and Their Target Genes Exhibit Distinct Patterns of Expression in Human Arterial Calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(3):489–494
- Uitto J, Jiang Q, Váradi A, Bercovitch LG, Terry SF (2014) Pseudoxanthoma elasticum: diagnostic features, classification, and treatment opinions. *Expert Opin orphan drugs*, 2(6):567–577
- Vaingankar SM, Fitzpatrick TA, Johnson K, Goding JW, Maurice M, Terkeltaub R (2004) Subcellular targeting and function of osteoblast nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286(5):C1177–87
- Vetvicka V, Lee G, Kincade PW (1986) Intrinsic B lymphocyte and macrophage defects in C3H/HeJ mice. *J Immunol*, 136(7):2370–4
- Villa-Bellosta R, Rivera-Torres J, Osorio FG, Acín-Pérez R, Enriquez JA, López-Otín C, Andrés V (2013) Defective extracellular pyrophosphate metabolism promotes vascular calcification in a mouse model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome that is ameliorated on pyrophosphate treatment. *Circulation*, 127(24):2442–51
- Pomozi V, Le Saux O, Brampton C, Apana A, Iliás A, Szeri F, Martin L, Monostory K, Paku S, Sarkadi B, Szakács G, Váradi A (2013) ABCC6 is a Basolateral Plasma Membrane Protein. *Circ Res*, 112(11):e148.
- Wada T, McKee MD, Steitz S, Giachelli CM (1999) Calcification of Vascular Smooth Muscle Cell Cultures : Inhibition by Osteopontin. *Circ Res*, 84(2):166–178

- Walsh MC, Choi Y (2003) Biology of the TRANCE axis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14(3–4):251–263
- Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A (2004) Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock*, 22(5):460–6
- Wild PS, Zeller T, Schillert A, Szymczak S, Sinning CR, Deiseroth A, Schnabel RB, Lubos E, Keller T, Eleftheriadis MS, Bickel C, Rupprecht HJ, Wilde S, Rossmann H, Diemert P, Cupples LA, Perret C, Erdmann J, Stark K, Kleber ME, Epstein SE, Voight BF, Kuulasmaa K, Li M, Schäfer AS, Klopp N, Braund PS, Sager HB, Demissie S, Proust C, König IR, Wichmann H-E, Reinhard W, Hoffmann MM, Virtamo J, Burnett MS, Siscovick D, Wiklund PG, Qu L, El Mokthari NE, Thompson JR, Peters A, Smith A V, Yon E, Baumert J, Hengstenberg C, März W, Amouyel P, Devaney J, Schwartz SM, Saarela O, Mehta NN, Rubin D, Silander K, Hall AS, Ferrieres J, Harris TB, Melander O, Kee F, Hakonarson H, Schrezenmeir J, Gudnason V, Elosua R, Arveiler D, Evans A, Rader DJ, Illig T, Schreiber S, Bis JC, Altshuler D, Kavousi M, Witteman JCM, Uitterlinden AG, Hofman A, Folsom AR, Barbalic M, Boerwinkle E, Kathiresan S, Reilly MP, O'Donnell CJ, Samani NJ, Schunkert H, Cambien F, Lackner KJ, Tiret L, Salomaa V, Munzel T, Ziegler A, Blankenberg S (2011) A genome-wide association study identifies LIPA as a susceptibility gene for coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Genet*, 4(4):403–12
- Wu M, Rementer C, Giachelli CM (2013) Vascular calcification: an update on mechanisms and challenges in treatment. *Calcif Tissue Int*, 93(4):365–73
- Xu X-L, Gou W-L, Wang A-Y, Wang Y, Guo Q-Y, Lu Q, Lu S-B, Peng J (2013) Basic research and clinical applications of bisphosphonates in bone disease: what have we learned over the last 40 years? *J Transl Med*, 11:303
- YAFFE D, SAXEL O (1977) Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, 270(5639):725–727
- Yan D, Gurumurthy A, Wright M, Pfeiler TW, Loba EG, Everett ET (2007) Genetic background influences fluoride's effects on osteoclastogenesis. *Bone*, 41(6):1036–44
- Yavropoulou MP, Yovos JG (2008) Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 8(3):204–16
- Yu SY (1974) Calcification processes in atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol*, 43(0):403–25
- Yun TJ, Tallquist MD, Aicher A, Rafferty KL, Marshall AJ, Moon JJ, Ewings MK, Mohaupt M, Herring SW, Clark EA (2001) Osteoprotegerin, a Crucial Regulator of Bone Metabolism, Also Regulates B Cell Development and Function. *J Immunol*, 166(3):1482–1491
- Zhang Y, Khan D, Delling J, Tobiasch E (2012) Mechanisms underlying the osteo- and adipo-differentiation of human mesenchymal stem cells. *ScientificWorldJournal*, 2012:793823

7 Anhang

7.1 Sequenzen der verwendeten Primer

Primer	Primer-Sequenz Forward (5'-3')	Primer-Sequenz Reverse (5'-3')
<i>Arg-1</i>	GGAAAGCCAATGAAGAGCTG	CTGGTTGTCAGGGGAGTGTT
<i>β-Aktin</i>	ACTGGGACGACATGGAGAAG	GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA
<i>C3a</i>	GCATCTTGCCTTTGTCTTGG	CTCAAACCTCTGCGGAGAAGA
<i>C3ar</i>	AGTCCTGGAGCCTTTGGATT	TCTTGGGGTTGAAACAGAGG
<i>C5a</i>	TGGCTACACTGAAGCATTTGA	CGTGAGAGACTGGGCTTTCT
<i>C5ar</i>	GGTTACCACAGAACCCAGGA	CCATCCGCAGGTATGTTAGG
<i>CD68</i>	AGGACCGCTTATAGCCCAAG	ATTTCCGTGACTGGTGGTG
<i>Ctsk</i>	AGGGAAGCAAGCACTGGATA	AAGCTGGCCATGTTGGTAAT
<i>Gapdh</i>	GACCACAGTCCATGCCATCAC	CCGTTTCAGCTCTGGGATGAC
<i>Icam-1</i>	GAGAGTGGACCCAACCTGGAA	TGAGGTCCTTGCCTACTTGC
<i>NOS2</i> (<i>iNOS</i>)	CAGAGGACCCAGAGACAAGC	CCTGGCCAGATGTTCTCTA
<i>Runx2</i>	AAGTGCGGTGCAAACCTTTCT	ACGCCATAGTCCCTCCTTTT
<i>Trap</i>	ACTTGCGACCATTGTTAGCC	CTTTGCTTGATGTGCGCACAG

Tabelle 7.1: Sequenzen verwendeter Primer

7.2 Tierversuchsantrag

Die Tierversuche wurden nach aktuellen Tierversuchsrichtlinien durchgeführt und durch das Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume Schleswig-Holstein unter folgenden Aktenzeichen genehmigt:

- Tierversuchsanzeige Nr. 4 vom 05.03.2015 mit dem Titel „Genetik der Atherosklerose“ für die Isolation von Monozyten aus der Milz
- Tierversuchsantrag (V 242-47860/2016 (6-1/15)) vom 05.07.2016 mit dem Titel „Titel: Funktionelle Untersuchung des Einflusses von Biphosphat und Magnesium auf die Myokardkalzifizierung nach myokardialer Kryopexie im Dyscalc-Tiermodell“ für die Durchführung der Kälteapplikation am Herzen

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich einige Worte an die Menschen richten, die maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben:

Ein besonderer Dank gilt Dr. Zouhair Aherrahrou für die wertvolle Betreuung und konstruktiven Diskussionen während dieser Arbeit. Er stand mir selbst an Wochenenden mit Rat und Tat zur Seite, brachte stets neue Ideen hervor und unterstützte mich bei Publikationen.

Ich danke auch Frau Prof. Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann für die finanzielle Unterstützung und die Möglichkeit die Experimente im Labor der Kardiogenetik durchführen zu können. Lieber Zouhair, liebe Jeanette, danke dass ihr mich für die Wissenschaft begeistern konntet und ich Teil eures Teams sein durfte.

Ganz herzlicher Dank gebührt außerdem den technischen Mitarbeiterinnen der Kardiogenetik. Ohne die gute und geduldige Einführung in die praktischen Fertigkeiten der Zellkultur durch Sandra Wrobel und ihre stetige Versuchsoptimierung hätte anfangs keine meiner angezüchteten Zellen überlebt. Nur durch Sandras Unterstützung habe ich immer die gebrauchten Chemikalien und längst verschollen geglaubte Proben finden können. Ich danke auch Anette Liebig, die mir bei den Tierversuchen zur Seite stand und Maren Behrensen, die mich in der Zellkultur unterstützte. Eure Hilfe hat mir so manchen Arbeitsablauf erleichtert.

Vielen Dank auch an den Rest des Teams: Redouane, Karim, Jafaar, Felix, Krishan, Beatrice und Anja, ihr habt mir stets durch eure lustige Art und den netten Umgang miteinander geholfen Tiefpunkte und Frustration zu überwinden. Danke Benedikt, der mir geholfen hat die Wordformatierung zu überlisten. Aus den Kollegen sind durch die viele gemeinsame Zeit auch Freunde geworden, sodass ich immer sehr gerne im Labor gearbeitet habe. Die Zeit bei euch wird unvergesslich bleiben!

Außerdem möchte ich mich bei Viola Pomozi bedanken, die mich bei den PPI-Messungen unterstützte.

Ebenso bedanke ich mich bei der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V. für die finanzielle Förderung.

Danke an meine Familie für die stetige emotionale Unterstützung.

9 Lebenslauf

Name	Carolin Bauer
Geburtsdatum:	05.02.1991
Geburtsort:	Waren/Müritz
Fremdsprachen:	Englisch, Spanisch

Studium/ Beruflicher Werdegang

06/2009	Abitur am „Richard-Wossidlo-Gymnasium Waren(Müritz)“
10/2009 – 10/2016	Medizinstudium an der Universität zu Lübeck • 1.Staatsexamen 08/2011 • 2.Staatsexamen 04/2015 • Auslandssemester Universidad Cantabria (Spanien) 08/2012 – 03/2013 • Praktisches Jahr • 05/2015 – 09/2015 1.Tertial Chirurgie HEODRA Leon (Nicaragua) • 09/2015 – 12/2015 2.Tertial Innere Medizin Segeberger Kliniken • 12/2015 – 04/2016 3.Tertial HNO UKSH Lübeck • 3.Staatsexamen 05/2016
Seit 12/2016	Assistenzarzt für Innere Medizin Sana Klinik Eutin

Promotion

10/2013 – 12/2017 Titel: „Inorganisches Pyrophosphat verhindert Dystrophe kardiale Verkalkung über die Modulation der Makrophagendifferenzierung“

Institut für Kardiogenetik, Universität zu Lübeck

Institutsleitung: Prof. Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann

Betreuer: Dr. hum. biol. Zouhair Aherrahrou

Stipendien/Preise/ Veröffentlichungen

2014-2015 Kaltenbach-Doktorandenstipendium der deutschen Herzstiftung

04/2015 Posterpräsentation 81.DGK-Kongress Mannheim (Titel: ABCC6 regulates spleen-derived osteoclasts in mice)

06/2016 Posterpreis bei „Uni im Dialog“ der Universität zu Lübeck

10 Veröffentlichungen

10.1 Paper

- Viola Pomozi, Christopher Brampton, Koen van de Wetering, Janna Zoll, Bianca Calio, Kevin Pham, Jesse B. Owens, Joel Marh, Stefan Moisyadi, András Váradi, Ludovic Martin, **Carolyn Bauer**, Jeanette Erdmann, Zouhair Aherrahrou, Olivier Le Saux (2017) Pyrophosphate supplementation prevents chronic and acute calcification in ABCC6 deficient mice. Am J Pathol, 187(6): 1258–1272
- **Carolyn Bauer**, Olivier le Saux, Viola Pomozi, Redouane Aherrahrou, Rene Kriesen, Stephanie Stölting, Annett Liebers, Thorsten Kessler, Heribert Schunkert, Jeanette Erdmann, Zouhair Aherrahrou (2018) Etidronate prevents dystrophic cardiac calcification by inhibiting macrophage aggregation. Scientific Reports 8: 5812

10.2 Poster

- 81. Jahrestagung der DGK (Mannheim, April 2015); **Carolyn Bauer**, Redouane Aherrahrou, Sandra Wrobel, Heribert Schunkert, Jeanette Erdmann & Zouhair Aherrahrou
„ABCC6 regulates spleen-derived osteoclasts in mice“
- Uni im Dialog (Lübeck, Juni 2016); **Carolyn Bauer**, Redouane Aherrahrou, Sandra Wrobel, Heribert Schunkert, Jeanette Erdmann & Zouhair Aherrahrou
„Anorganisches Pyrophosphat (PPi) verhindert dystrophe kardiale Verkalkung“

10.3 Abstracts

- 81. Jahrestagung der DGK (Mannheim, April 2015); **Carolyn Bauer**, Redouane Aherrahrou, Sandra Wrobel, Heribert Schunkert, Jeanette Erdmann & Zouhair Aherrahrou
„ABCC6 regulates spleen-derived osteoclasts in mice“