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

**Untersuchung zur atherosklerotischen Intimaverkalkung
mit Hilfe einer Knochenmark-Transplantation am
LDL-Rezeptor Knockout-Mausmodell**

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

vorgelegt von
Christian-Hendrik Heeger
aus Nordhorn

Lübeck 2010

Gefördert durch ein Promotionsstipendium „Exzellenzmedizin“ der Universität zu Lübeck

-
1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Eva-Maria Ehlers
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Hölscher

Tag der mündlichen Prüfung: 20.09.2011

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 20.09.2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1. Arterielle Gefäßverkalkung - ein aktiv regulierter Prozess	2
1.1.1. Historischer Rückblick	2
1.2. Grundlagen der arteriellen Gefäßverkalkung	3
1.2.1. Überblick	3
1.3. Pathophysiologie der atherosklerotischen Intimaverkalkung	4
1.3.1. Endotheliale Dysfunktion und Schaumzell-Läsion	4
1.3.2. Atherosklerotischer Plaque und komplizierte atherosklerotische Läsion	6
1.3.3. Pathologie der atherosklerotischen Intimaverkalkung	10
1.3.4. Hypothesen zur Herkunft der chondrozytären Zellen	12
1.4. Charakterisierung von nativen orthotopen Chondrozyten	14
1.5. RANK/RANKL/OPG-System	15
1.6. Das Mausmodell	16
1.6.1. Die LDL-Rezeptor Knockout-Maus als Tiermodell der atherosklerotischen Intimaverkalkung	16
1.6.2. Die transgene C57BL/6 ROSA-26 Maus	17
1.7. Ziele der Arbeit	18
2. Material und Methoden	19
2.1. Material	19
2.1.1. Reagenzien	19
2.1.2. Antikörper	20
2.1.3. Pufferlösungen	20
2.1.4. Instrumente	20
2.1.5. Tierfutter	21
2.1.6. Software	21
2.2. Versuchstiere	21
2.3. Myeloablative Ganzkörperbestrahlung und Knochenmark-Transplantation	22
2.4. Highfat-Diät	22
2.5. Histologie	23
2.5.1. Oil Red O-Färbung	23
2.5.2. Calcein-Färbung	24
2.6. Chimärenanalyse	24
2.7. Immunhistochemie	25
2.8. Immunphänotypisierung von hämatopoetischen Zellen	26
2.9. Statistische Methoden	28
3. Ergebnisse	29
3.1. Histologie	29
3.1.1. Oil Red O- und Calcein-Färbungen	29

3.2. Immunhistochemie	31
3.2.1. Chimärenanalyse	31
3.2.2. Kollagen II/ β -Galaktosidase-Doppelmarkierung	32
3.2.3. Vergleich von Chimärenanalyse und β -Galaktosidase ⁺ -Zellen	37
3.2.4. SM-22 α /Sox-9-Doppelmarkierung	38
3.2.5. Kollagen II/Sox-9-Markierung	38
3.2.6. Kollagen II/RANKL-Markierung	41
3.3. Immunphänotypisierung der chondrozytären Zellen	42
3.3.1. Kollagen II/CD13-Doppelmarkierung	42
3.3.2. Kollagen II/MOMA-2-Doppelmarkierung	44
3.3.3. Kollagen II/CD115-Doppelmarkierung	45
3.3.4. Kollagen II/CD34-Doppelmarkierung	46
3.3.5. Übersicht zur Bestimmung von Herkunft und hämatopoetischer Zelllinie der chondrozytären Zellen	48
4. Diskussion	49
4.1. Histologie	49
4.2. Herkunftsbestimmung der chondrozytären Zellen	50
4.2.1. Chimärenanalyse	50
4.2.2. Kollagen II/ β -Galaktosidase-Immunhistochemie	50
4.3. Charakterisierung der chondrozytären Zellen	51
4.3.1. Kollagen II/Sox-9- und SM-22 α /Sox-9-Immunhistochemie	51
4.3.2. Kollagen II/RANKL-Immunhistochemie	52
4.4. Immunphänotypisierung der chondrozytären Zellen	53
4.4.1. Stammzellen und atherosklerotische Intimaverkalkung	55
4.5. Zukünftige Ansätze	56
5. Zusammenfassung	58
6. Literaturverzeichnis	59
7. Anhang	69
7.1. Statistische Auswertung	69
7.2. Abbildungsverzeichnis	73
7.3. Tabellenverzeichnis	74
7.4. Diagrammverzeichnis	74
7.5. Erklärung nach § 8 Abs. 1 Nr. 9, 10, 13, 14 und 15 Prom O	75
8. Danksagung	76
9. Lebenslauf	77
10. Publikationen	78

Abkürzungsverzeichnis

A	Tunica ad ventitia
A. dm.	Aqua d emineralisata
ApoE-/-	A polipoprotein E Knockout
AK	A ntikörper
ALP	a lkalische P hosphatase
Cbfa1	c ore b inding factor- α 1
CC	CC -motive-chemokine
CD	c luster of d ifferentiation
CD40L	CD40 -Ligand
CFU	c olony forming u nit
CXC	CXC -motive-chemokine
CXCL	CXC -motive-chemokine ligand
CX3C	CX3C -motive-chemokine
CXCR-2/4	CXC -motive-chemokine-receptor- 2/4
BMP-2/4	b one m orphogenic p rotein- 2/4
BSA	b ovines S erumalbumin
cGy	c enti G ray
DAPI	4' , 6 - D iamidino- 2 - p henylindol
EDTA	E thylendiamintetraacetat
eGFP	e nanced g reen f luorescent p rotein
E-Selektin	e ndothelial- S elektin
FC	f ibrous c ap
FCS	f etal c alf s erum
HDL	h igh d ensity l ipoprotein
ho-LDL	h och- o xidiertes L DL
ICAM-1	i ntercellular c ell a dhesion m olecule- 1
IDL	i ntermediate d ensity l ipoprotein
IFN-γ	I nterferon- γ
IL-8	I nterleukin- 8
L	G efäßlumen
LDL	l ow d ensity l ipoprotein
LDLr-/-	l ow d ensity l ipoprotein r eceptor Knockout

M	Tunica media
MAC-2	macrophage-2
M-CSF	makrophage-colony-stimulating factor
MCP-1	monocyte chemoattractand protein-1
MGP	Matrix Gla Protein
MHC-II	major histocompatibility complex class-II
MMP	Matrix Metalloproteinase
mo-LDL	minimal oxidiertes LDL
MOMA-2	Monozyten und Makrophagen Marker-2
NC	necrotic core
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
P	Phosphat
p.a.	pro analysi
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphate buffered saline
PCMO	programmable cells of monocytic origin
PFA	Paraformaldehyd
PPi	inorganisches Pyrophosphat
P-Selektin	plateled-Selektin
PTHrP-R	parathyroid hormone-related protein-receptor
RANK	receptor activator of NF-κB
RANKL	receptor activator of NF-κB ligand
Sox-9	sex-determining region Y box-9
SM-Actin	smooth muscle-Actin
SM-22 α	smooth muscle-22α
SR-A	scavenger receptor class A
SRY	sex-determining region Y
TBS	tris buffered saline
TGF- β	transforming growth factor-β
TNF	Tumornekrosefaktor
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VLDL	very low density lipoprotein
VSMC	Vascular smooth muscle cells

1. Einleitung

Atherosklerose und atherosklerotische Intimaverkalkung haben mit ihren Folgeerkrankungen wie koronare Herzkrankheit, plötzlicher Herztod, zerebrale Insulte und pAVK aktuell in den westlichen Industrienationen eine höhere Morbidität und Mortalität als jede andere Erkrankung.¹⁻³ In Deutschland lassen sich derzeit mehr als 45 % aller Todesfälle direkt oder indirekt auf sie zurückführen.⁴

Die Atherosklerose weist ausgeprägte geografische Divergenzen auf. In den Industrienationen eine Volkskrankheit, zeigt sie in den Entwicklungsländern Asiens, Afrikas und Südamerikas eine signifikant niedrigere Progression und klinische Relevanz. Mit zunehmender Urbanisierung dieser Länder gleichen sich die epidemiologischen Daten den o.g. an.⁵⁻⁷ Gleiches geschieht im Falle von Migration der Personen aus Entwicklungsländern in die Industrienationen.⁸ Beobachtungen wie diese weisen auf eine multifaktorielle Genese der Atherosklerose hin, die eng mit den Lebens- und Ernährungsgewohnheiten der westlichen Welt korreliert. Zusätzlich spielen genetische Faktoren eine Rolle.^{9,10}

Durch den demografischen Wandel unserer Gesellschaft wird die Bedeutung der Atherosklerose auch in Zukunft weiter zunehmen.¹¹ Diese Sachlage, verbunden mit der immensen Einschränkung der Lebensqualität der betroffenen Personen, und der Tatsache, dass die Atherosklerose die insgesamt höchsten Behandlungskosten für das Gesundheitssystem verursacht, machen es notwendig, die Pathogenese dieser Krankheit genauer zu erforschen, um eine gezielte Prävention und Therapie zu ermöglichen.⁴

1.1. Arterielle Gefäßverkalkung - ein aktiv regulierter Prozess

1.1.1. Historischer Rückblick

Die arterielle Gefäßverkalkung ist, entgegen früherer Meinungen, keine passive Ablagerung von Kalziumphosphat im atherosklerotischen Plaque, sondern ein von Zellen, aktiv regulierter Prozess, der eine große morphologische, biologische und molekulare Übereinstimmung mit der embryonalen Osteogenese und dem adulten Knochenstoffwechsel aufweist.^{11,12}

Erste Hinweise auf eine osteogenetische Metaplasie lassen sich bis in die Antike zurückverfolgen. So wurden die steinharten Ablagerungen in den Arterien, auf die man bei Autopsien stieß, als Ossifikationen bezeichnet.¹³ Im 19. Jahrhundert beschrieb Rudolf Virchow (1821-1902) die verkalkten Regionen innerhalb des atherosklerotischen Plaque als lammellenknochenartig und erwähnte zusätzlich osteoblastenartige Zellen und hämatopoetische Elemente.¹⁴ 1906 veröffentlichte C. Bunting seine Theorie zum Thema arterielle Verkalkung. Seiner Auffassung nach handelte es sich dabei um eine metaplastische Umwandlung von Bindegewebszellen zu Osteoblasten. Er beobachtete die Bildung von reifem Knochengewebe und eine Kolonisation und Umwandlung von peripheren Blutstammzellen zu Knochenmark innerhalb der atherosklerotisch veränderten Gefäßwand.¹⁵

Entgegen dieser Aussagen war man bis zum Ende des 20. Jahrhunderts der Meinung, dass es sich bei der arteriellen Verkalkung um einen passiven und unregulierten Prozess handelte.^{11,16} 1983 lieferten Tanimura et al. das erste Indiz für einen aktiven knochenstoffwechselartigen Prozess, indem sie den Nachweis erbrachten, dass Matrixvesikel an der arteriellen Verkalkung beteiligt sind.¹⁷ Matrixvesikel stellen während der physiologischen enchondralen Ossifikation die Loci der initialen Verkalkung des Knorpelgerüsts dar.¹⁸ Der erste molekularbiologische Hinweis auf aktiven Knochenstoffwechsel wurde von Bostrom et al. 1993 veröffentlicht. Sie zeigten, dass atherosklerotische Verkalkung auf einem durch BMP-2a (bone morphogenic protein-2a) und OPN (Osteopontin) regulierten osteogenetischen Signaltransduktionsweg basiert.¹⁹

In den letzten 15 Jahren konnte in zahlreichen Untersuchungen gezeigt werden, dass osteozyten-, osteoklasten- und chondrozytenartige Zellen in der verkalkten Gefäßwand auftreten und in der Lage sind, die orthotopen Proteine des Knochen- und Knorpelstoffwechsels zu exprimieren.^{20,21}

Diese Erkenntnisse führten schließlich Anfang dieses Jahrtausends zu der heute von Fachleuten anerkannten Auffassung zur arteriellen Verkalkung. Demnach handelt es sich um einen aktiven, pathobiologischen Prozess, der die embryonale Osteogenese rekapituliert, und von osteozyten-, osteoklasten- und chondrozytenartigen Zellen reguliert, aufrechterhalten und aktiv vorangetrieben wird.²²

1.2. Grundlagen der arteriellen Gefäßverkalkung

1.2.1. Überblick

Grundsätzlich unterscheidet man vier Haupttypen arterieller Gefäßverkalkung, die sich in Lokalisation, Ätiologie, Histologie und klinischer Ausprägung unterscheiden.¹²

1.) Die atherosklerotische Intimaverkalkung ist die häufigste Form der extraossären arteriellen Gefäßverkalkung und Folgeerscheinung der Atherosklerose.¹¹ Das Ausmaß der Verkalkung ist dabei direkt mit der Größe des atherosklerotischen Plaque und einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert.^{23,24}

2.) Die Mediaverkalkung (syn. Mönckeberg-Sklerose) manifestiert sich in der Tunica media, tritt unabhängig von Atherosklerose auf und erscheint als lineare Verkalkung, wobei sich Kalziumapatitkristalle zwischen Schichten von elastischen Fasern und glatten Gefäßmuskelzellen ablagern.²⁵ Diese Form der Erkrankung tritt bei älteren Patienten mit Diabetes mellitus Typ II, Urämie oder chronischem Nierenversagen auf.²⁶⁻²⁸ Sie ist mit einem hohen Risiko für kardiovaskuläre Mortalität und Amputationen assoziiert.²⁷ Zelluläre Basis dieser Kalzifizierung sind die glatten Gefäßmuskelzellen der Tunica media.²⁹

3.) Die Aortenklappenverkalkung besitzt sowohl Aspekte der Intima- als auch der Mediaverkalkung und entsteht aufgrund des fortwährenden mechanischen Reizes, der auf die Klappe einwirkt. Eine aktive osteochondrozytäre Differenzierung mit Knochen- und Knorpelbildung konnte, wie im Falle der Intimaverkalkung, bereits nachgewiesen werden. Klinisches Korrelat dieser Form der Verkalkung sind die Aortenklappenstenose und -insuffizienz.³⁰

4.) Die urämisch-kalzifizierende Arteriopathie (syn. Calciphylaxie) ist eine seltene Erkrankung die etwa 1 % der dialysepflichtigen Patienten mit fortgeschrittener chronischer Niereninsuffizienz, besonders in Kombination mit Warfarin-Therapie betrifft.³¹ Diese schwerwiegende, eher diffus lokalisierte Form der arteriellen Verkalkung führt über eine

pathologische Erhöhung des Kalzium- und Phosphatspiegels im Blutserum zu einer ausgeprägten Kalziumphosphateinlagerung in den Gefäßwänden, dem Unterhautfettgewebe und zahlreichen Organen.¹² Die Folgen sind Vaskulitis, Pannikulitis und ischämische Nekrosen der betroffenen Organe.¹¹

1.3. Pathophysiologie der atherosklerotischen Intimaverkalkung

Die atherosklerotische Intimaverkalkung manifestiert sich im Spätstadium der Atherosklerose, allerdings lassen sich bereits im Frühstadium erste Kalziumphosphatkristalle nachweisen.³² Es handelt sich bei der Atherosklerose um eine chronisch inflammatorische Systemerkrankung der Arterienwand.³³ Nach der heute allgemein anerkannten, im Jahre 1976 von R. Ross postulierten, *responce-to-injury* Hypothese, ist der initiale Stimulus zur Ausbildung der Atherosklerose eine Endothelschädigung jedweder Herkunft.³⁴ Die Atherosklerose beginnt als endotheliale Dysfunktion, entwickelt sich über eine Schaumzell-Läsion zum atherosklerotischen Plaque und schließlich zur komplizierten atherosklerotischen Läsion. Nahezu alle komplizierten atherosklerotischen Läsionen verkalken. Besonders Patienten mit Diabetes mellitus und chronischem Nierenversagen zeigen eine deutliche Progression der Gefäßverkalkung.^{2,35,36}

1.3.1. Endotheliale Dysfunktion und Schaumzell-Läsion

Nach A.J. Lusis lassen sich genetische und umweltbedingte kardiovaskuläre Risikofaktoren für Atherosklerose unterscheiden.³⁷ Einen weiteren wichtigen Einfluss auf die Genese der Atherosklerose hat die Art des im jeweiligen Gefäßabschnitt vorherrschenden Blutflusses. Man unterscheidet die laminäre von der turbulenten Strömung. An Gefäßbifurkationen und -abgängen, sowie in Klappenebenen und im Aortenbogen überwiegt die turbulente Strömung. Diese erzeugt Scherkräfte, welche einen mechanischen Reiz für das Endothel darstellen. Ferner konnte gezeigt werden, dass Scherkräfte die Endothelzellen zu vermehrter Expression von proatherogenen Leukozytenadhäsionsmolekülen anregen.³⁸ Aufgrund des mechanischen Reizes sind Gefäßregionen mit turbulenter Strömung prädisponiert für Atherosklerose, während Regionen mit laminärer Strömung eher verschont bleiben.³⁹ Die Risikofaktoren bewirken oxidativen, mechanischen, metabolischen, toxischen oder immunologischen Stress auf das Endothel.

Unter ihrem Einfluss kommt es zur endothelialen Dysfunktion. (Abbildung 1)

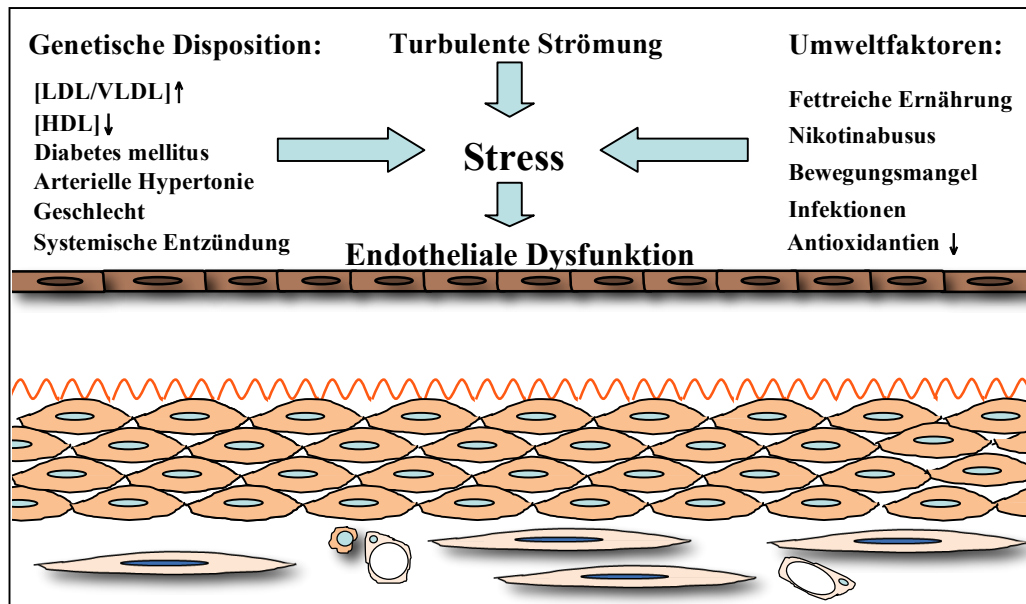


Abbildung 1: Modell der arteriellen Gefäßwand mit kardiovaskulären Risikofaktoren und endothelialer Dysfunktion.

Die Folge ist eine vermehrte Permeabilität für LDL (low density lipoprotein), das durch das Endothel eindringt und sich innerhalb des intimalen Bindegewebes abgelagert. Zusätzlich exprimiert das Endothel vermehrt die Leukozyten-Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), E-Selektin und P-Selektin,⁴⁰ sowie die Chemokine MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) und IL-8 (Interleukin-8).⁴¹⁻⁴³ Die Expression dieser Moleküle führt zur Adhäsion von Makrophagen und T-Lymphozyten an das Endothel und zur gerichteten Migration dieser Zellen in die Gefäßwand. Es kommt zu einer lokalen Entzündungsreaktion.³³ (Abbildung 2)

Die ersten morphologischen Anzeichen für Atherosklerose lassen sich bereits im Kindesalter nachweisen. Sie manifestieren sich als sogenannte „fatty streaks“ (syn. Schaumzell-Läsionen), treten unabhängig von geografischen, ethnischen, geschlechtlichen und Umweltfaktoren auf und entwickeln sich risikofaktorabhängig über atherosklerotische Plaqueablagerungen zur komplizierten atherosklerotischen Läsion.⁴⁴⁻⁴⁷ Im intimalen Bindegewebe wird das eingedrungene LDL von endothelialen Lipoxygenasen und reaktiven Sauerstoffspezies über mo-LDL (minimal oxidiertes LDL) zu ho-LDL (hochoxidiertes LDL) oxidiert. Aufgrund der Oxidation sind die eingewanderten Makrophagen in der Lage dieses mit Hilfe ihrer Scavenger Rezeptoren (SR-A = scavenger receptor

class A) zu phagozytieren.⁴⁸ Es akkumuliert intrazellulär und lässt die Makrophagen im Lichtmikroskop schaumig (Schaumzellen) aussehen. (Abbildung 2)

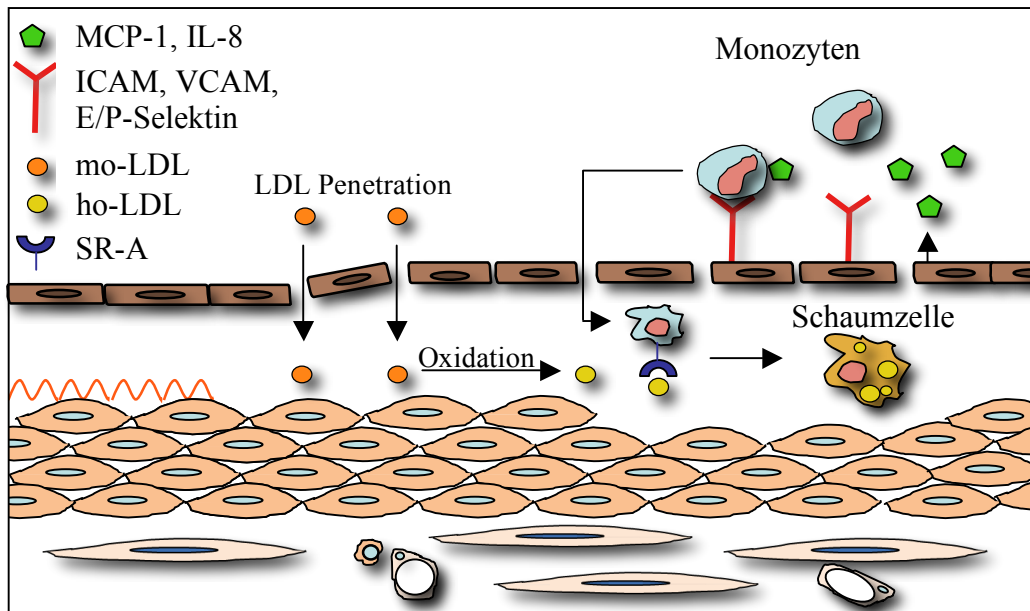


Abbildung 2: Endotheliale Dysfunktion, lokale Entzündung und Entstehung von Schaumzellen.

Das ho-LDL wirkt als Autoantigen für die eingewanderten T-Lymphozyten und führt neben der durch Makrophagen induzierten unspezifischen Immunantwort im Verlauf auch zu einer spezifischen zellulären Immunantwort.⁴⁹ Zusätzlich findet eine wechselseitige Interaktion und Aktivierung zwischen den beiden Zelltypen statt. Die Makrophagen aktivieren die T-Lymphozyten mit Hilfe von MHC-II, während die T-Lymphozyten mittels Expression des CD40-Liganden (CD40L) die Makrophagen durch Bindung an CD40 aktivieren.^{41,50} (Abbildung 3)

1.3.2. Atherosklerotischer Plaque und komplizierte atherosklerotische Läsion

Die morphologischen Charakteristika dieser Spätstadien sind die Ausbildung der *fibrösen Kappe* und des *nekrotischen Kerns*. Die chronische Entzündungsreaktion stellt einen Reiz dar, der ortsständige Zellen zur Expression und Sekretion von weiteren Chemokinen wie CC, CXC, CX3C und Wachstumsfaktoren (TGF- β) anregt.⁴¹ Unter dem Einfluss dieser Moleküle wandern neben glatten Gefäßmuskelzellen auch hämatopoetische Vorläuferzellen, die auf ihrer Oberfläche die entsprechenden Chemokin-Rezeptoren (CXCR2 und CXCR4) exprimieren, in die Region ein.⁴² (Abbildung 3)

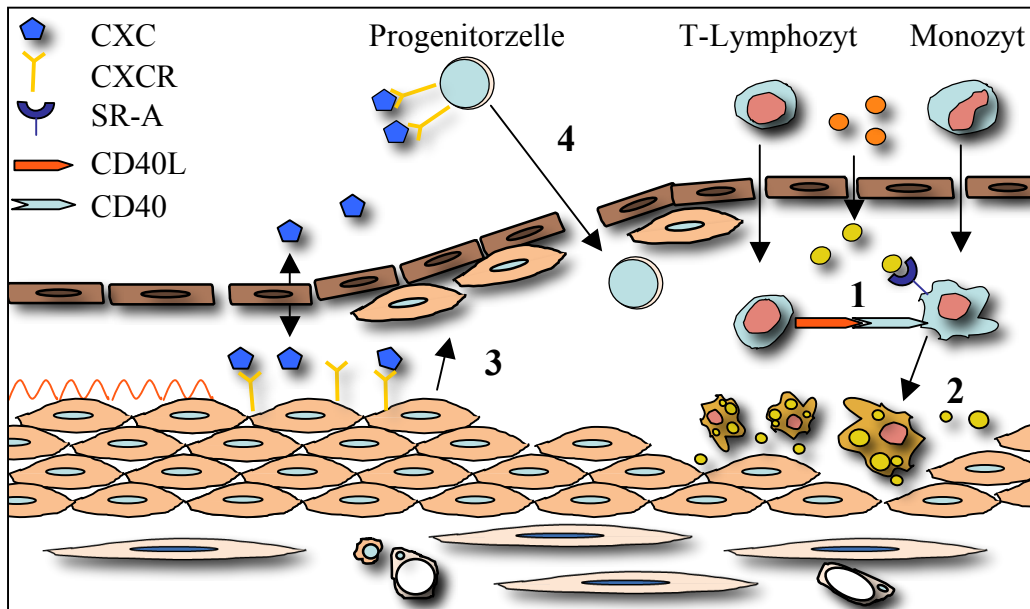


Abbildung 3: Makrophagen-T-Zell Interaktion (1), Bildung des nekrotischen Kerns (2) und der fibrösen Kappe (3), sowie Einwanderung von Progenitorzellen (4).

Die glatten Gefäßmuskelzellen bilden die adluminal gelegene fibröse Kappe, die das Gefäßlumen vom nekrotischen Kern trennt. Dieser entsteht durch Akkumulation von Lipiden und Zelldetritus von apoptotischen und nekrotischen Schaumzell-Makrophagen. Der nekrotische Kern unterhält im Sinne eines Circulus vitiosus aufgrund der freigesetzten hochgradig proinflammatorisch wirkenden Lipide und des Zelldetritus die chronische Entzündung und führt so zur vermehrten Einwanderung von Makrophagen, glatten Gefäßmuskelzellen und weiteren Entzündungszellen.³³ Die fibröse Kappe besitzt eine wichtige Barrierefunktion, da im nekrotischen Kern der thrombogene tissue factor von den Makrophagen sezerniert wird. Auf diese Weise wird ein Kontakt der Gerinnungskaskade mit dem tissue factor und somit eine Thrombenbildung verhindert.⁵¹ Mit der Zeit gewinnt der atherosklerotische Plaque an Durchmesser, bleibt jedoch in seiner Gesamtheit intakt (sogenannter stabiler Plaque, Abbildung 4) und führt schließlich zur Manifestation von klinischen Symptomen. Diese äußern sich zum Beispiel als belastungsabhängige stabile Angina pectoris.

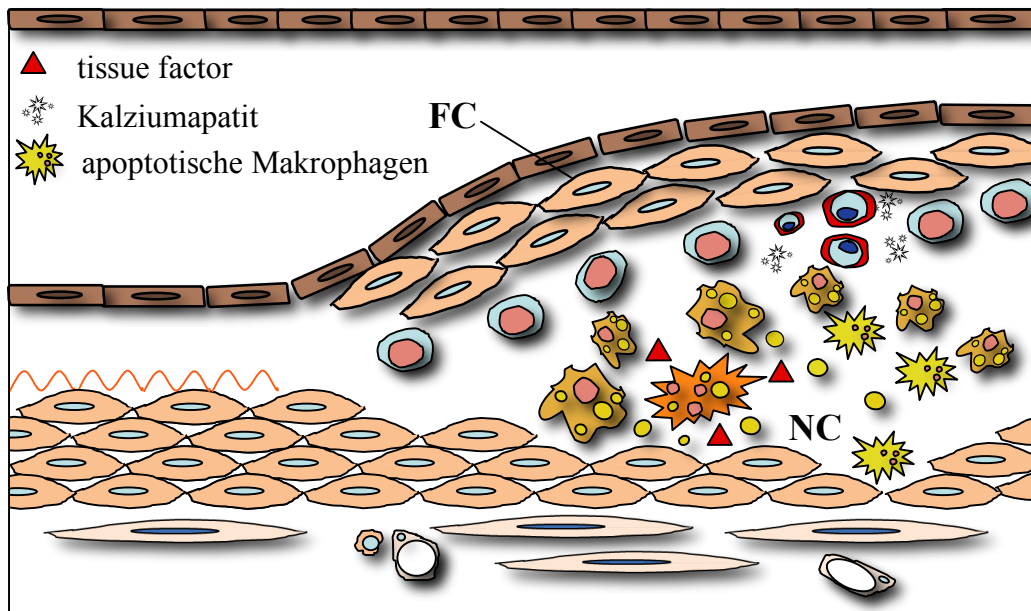


Abbildung 4: Stabiler atherosklerotischer Plaque mit fibröser Kappe (FC) und nekrotischem Kern (NC).

Da die Geschwindigkeit dieses Wachstums dabei stark von den kardiovaskulären Risikofaktoren abhängt, bildet sich früher oder später die komplizierte atherosklerotische Läsion aus.⁵² Dieses Spätstadium der Atherosklerose zeichnet sich durch einen instabilen atherosklerotischen Plaque sowie atherosklerotische Intimaverkalkung aus und besitzt die höchste klinische Relevanz. Der Übergang von einem stabilen in einen instabilen Plaque ist auf verschiedene Ursachen zurückzuführen.⁵³ Die mechanische Belastbarkeit der fibrösen Kappe hängt von ihrem Anteil an Kollagenfasern ab. Diese werden von den glatten Gefäßmuskelzellen synthetisiert. T-Lymphozyten und Makrophagen inhibieren die Kollagensynthese durch Expression von IFN- γ (Interferon- γ) und MMP (Matrix Metalloprotease). Des Weiteren führt die inflammationsbedingte Expression von proteolytischen Enzymen durch Makrophagen zur Erosion der fibrösen Kappe.⁵² (Abbildung 5)

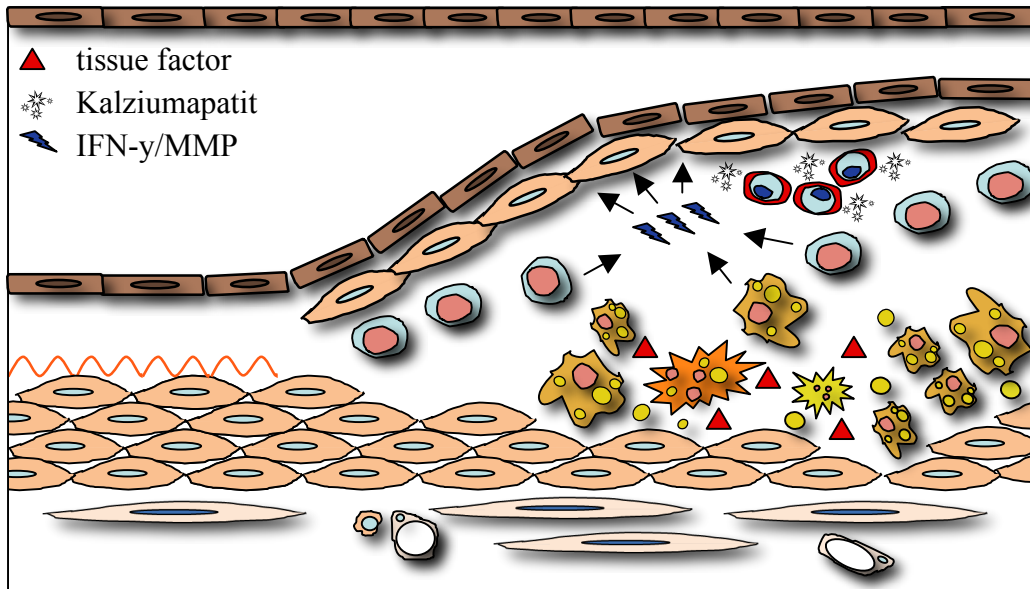


Abbildung 5: Instabiler Plaque mit IFN- γ und MMP sowie fibröser Kappe.

Der instabile Plaque weist eine dünne, fragile fibröse Kappe auf, die plötzlich rupturieren kann. Im Falle der Ruptur gelangt der tissue factor in Kontakt mit der Gerinnungskaskade. Die Folge ist eine Thrombusbildung mit anschließender Stenosierung oder vollständiger Okklusion des betroffenen Gefäßes.⁵² (Abbildung 6) Klinisch äußert sich ein solches Ereignis u.a. in Form eines akuten Koronarsyndroms.⁵²

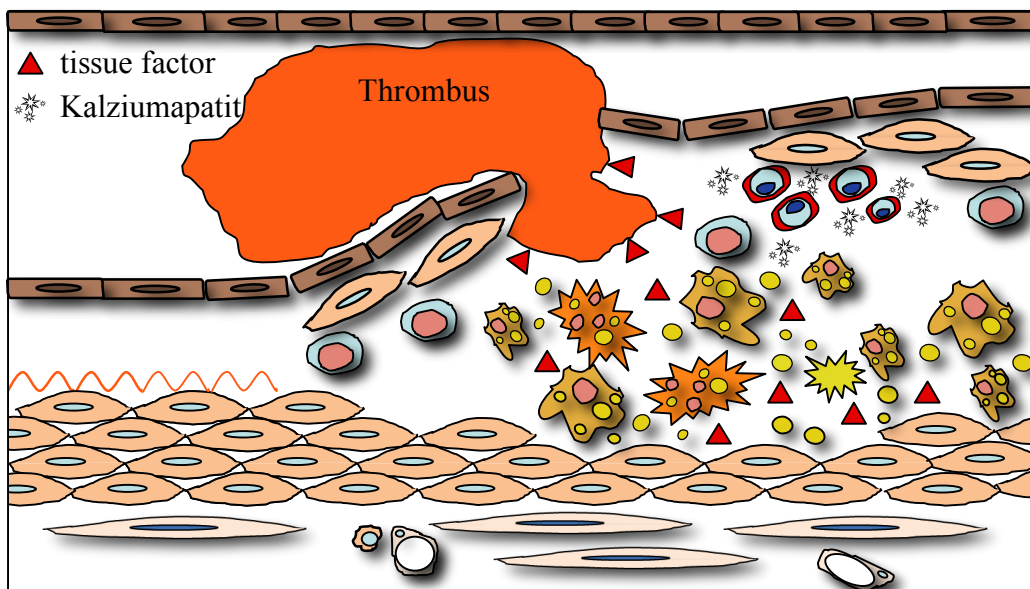


Abbildung 6: Ruptur eines instabilen Plaques und thrombotischer Verschluss des Gefäßes.

1.3.3. Pathologie der atherosklerotischen Intimaverkalkung

In der Altersgruppe der 50- bis 60-Jährigen finden sich bereits in 50 bis 55 %, bei den über 70-jährigen in 100 % der Fälle Kalziumphosphatablagerungen in den großen Blutgefäßen.⁴⁵ Die häufigste Form der Verkalkung ist die atherosklerotische Intimaverkalkung, welche die embryonale Osteogenese rekapituliert.^{11,22} Während dieses Prozesses sezernieren Osteoblasten Matrixvesikel und Osteoid. Matrixvesikel enthalten Kalzium, Phosphat und ALP (alkalische Phosphatase), und stellen die Orte der initialen Verkalkung der Kollagenfasern dar.¹⁷ Osteoid ist eine extrazelluläre Matrix, bestehend aus Kollagen I, Osteocalcin, OPN und weiterer Knochenmatrixproteinen.⁵⁴ Das charakteristische Mineral im Knochenstoffwechsel ist das kalzium- und phosphathaltige Hydroxylapatit.¹¹ Die extrazelluläre Kalziumkonzentration liegt nahe am Löslichkeitsprodukt für verschiedene Kalziumsalze. Um eine spontane ektopische Verkalkung des Bindegewebes zu unterdrücken, herrscht im Gewebe unter physiologischen Bedingungen ein Gleichgewicht zwischen pro- und antikalzifizierenden Faktoren.⁵⁵ Im Zuge der Biomineralisation im Knochengewebe findet eine lokal begrenzte, präzise Hemmung der antikalzifizierenden Faktoren statt, und erlaubt somit eine regulierte Hydroxylapatitbildung an Kollagenfasern.¹¹ Schlüsselenzym und wichtiger Marker für die Osteochondrogenese ist die ALP, da sie PPi (inorganisches Pyrophosphat), einen der wichtigsten Inhibitoren der Verkalkung, inhibiert.⁵⁶ Weitere Inhibitoren der Kalzifizierung sind MGP (Matrix Gla Protein), Fetuin-A, OPN und OPG (Osteoprotegerin).² Ihnen stehen verschiedene Induktoren der Verkalkung gegenüber. Hierzu zählen BMP-2/4 (bone morphogenic protein), Hyperphosphatämie, Hyperkalzämie, Diabetes mellitus, Dyslipidämie und Inflammation.¹² Im atherosklerotischen Plaque wird das Gleichgewicht dieser Faktoren durch Endothelverletzung und nachfolgende lokale chronische Entzündungsreaktion zu Gunsten der Verkalkung verschoben.⁵⁵ (Abbildung 7)

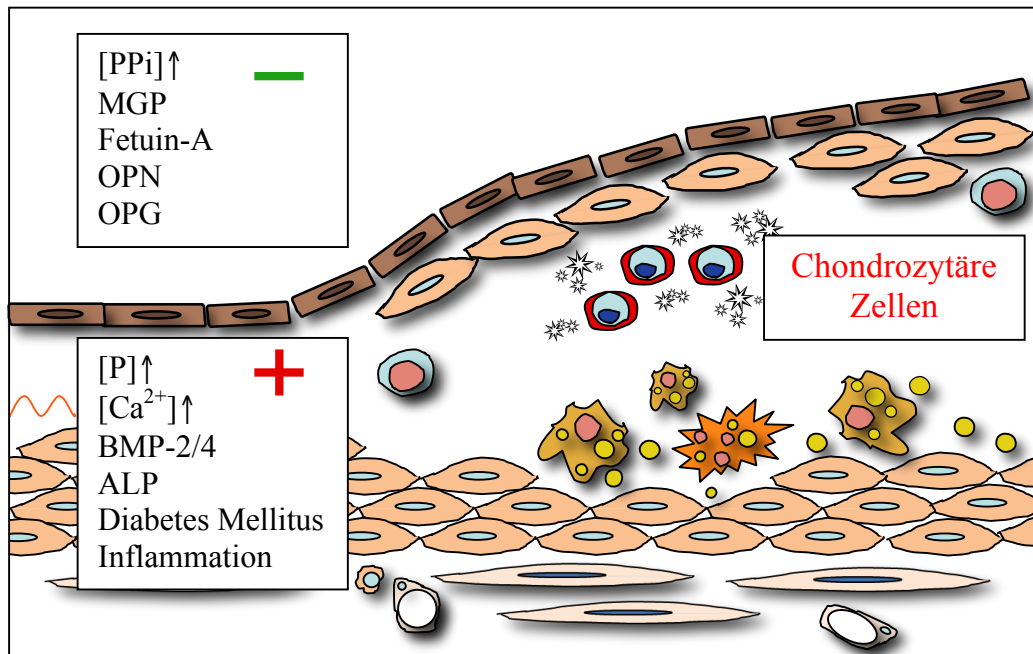


Abbildung 7: Chondrozytäre Zellen im atherosklerotischen Plaque, sowie pro- (+) und antikalzifizierende (-) Faktoren.

Im Verlauf des Prozesses kommt es zu einer chondro- und osteogenetischen Metaplasie mesenchymaler Zellen, d.h. sie nehmen einen chondrozytären/osteoblastischen Phänotyp an und sind in der Lage, die Proteine des Knorpel-/Knochenstoffwechsels innerhalb der Gefäßwand zu exprimieren.⁵⁷ Einige Proteine induzieren eine chondroide/osteoid Differenzierung der mesenchymalen Zellen. BMP-2 und BMP-4 sind Signalproteine des Knochenstoffwechsels und gehören zur TGF- β -Superfamilie (TGF- β = transforming growth factor- β). BMP-2 führt im Tiermodell zur Induktion von ektopischer Knorpel- und Knochenbildung. BMP-4 spielt eine entscheidende Rolle während der enchondralen Ossifikation.⁵⁸ Beide Proteine werden in atherosklerotischen Läsionen exprimiert, und wurden bereits als Mediatoren der atherosklerotischen Verkalkung identifiziert.¹² Cbfa1 (Core binding factor- α 1) und Osterix sind Transkriptionsfaktoren deren Aktivität durch BMP-2 reguliert wird. Sie sind Schlüsselproteine der osteoblastischen Differenzierung. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ein Knockout dieser Moleküle zu einer Unfähigkeit der Produktion von Knorpel- und Knochengewebe führt. Beim Menschen führt eine Mutation in diesen Genen zu Cleidocranialer-Dysplasie.¹² Zahlreiche Hinweise deuten daraufhin, dass die chondrozytären/osteoblastischen Zellen den Verkalkungsprozess aktiv vorantreiben.^{11,59} Die zellvermittelte extraossäre Verkalkung beinhaltet bei Maus und Mensch sowohl chondrozytäre als auch osteoblastische Zellen (Abbildung 7), welche einen Prozess, ähnlich der enchondralen Ossifikation in Gang bringen.⁶⁰ Während beim

Menschen der größte Teil der extraossären Verkalkung knochenartig aufgebaut ist,^{61,62} handelt es sich bei der Maus vorwiegend um einen knorpelartigen Aufbau.^{63,64} Die Gründe für diese Diversität sind nicht bekannt. Es existieren jedoch einige Hypothesen zu diesem Thema. So fehlen den Blutgefäßen der Maus die für die enchondrale Ossifikation essentiellen vasa vasorum. Zusätzlich sind die BMP-2 Gewebskonzentrationen bei der Maus geringer als beim Menschen, wobei BMP-2 in hohen Konzentrationen eine chondroide, in geringeren Konzentrationen eine osteoide Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen induziert.⁶⁵ Die Bezeichnung dieser Zellen als chondrozytär, basiert auf ihrer morphologischen Ähnlichkeit zu Chondrozyten und ihrer Eigenschaft, für den Knorpelstoffwechsel typische Proteine wie Kollagen II und Aggrecan zu exprimieren.^{66,67}

1.3.4. Hypothesen zur Herkunft der chondrozytären Zellen

Die Herkunft der chondrozytären und osteoblastischen Zellen, die die arterielle Gefäßverkalkung aktiv vorantreiben, ist unbekannt.^{11,12} Aktuell werden lokale und knochenmarkstämmige Zellen als Vorläufer der chondrozytären und osteoblastischen Zellen diskutiert.¹¹ In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass pluripotente und myeloide hämatopoetische Progenitorzellen in vitro in der Lage sind, sich zu chondrozytären Zellen zu differenzieren.^{68,69} Eine weitere aktuelle Studie zeigte bei Patienten mit Atherosklerose im Vergleich zur Kontrollgruppe, einen signifikanten Anstieg von CD34⁺/CD133⁺-Progenitorzellen im peripheren Blut. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass diese Zellen neben den Stammzellmarkern CD34 und CD133 den Osteoblastenmarker Osteocalcin exprimieren.⁷⁰ Unter geeigneten in vitro-Bedingungen sind glatte Gefäßmuskelzellen und Perizyten in der Lage, sich zu Chondrozyten und Osteoblasten zu differenzieren und eine kalzifizierende Extrazellulärmatrix auszubilden.^{11,71,72} Aufgrund der Ergebnisse dieser und weiterer Studien wurden drei Hypothesen zur Herkunft der chondrozytären Zellen formuliert (Abbildung 8):

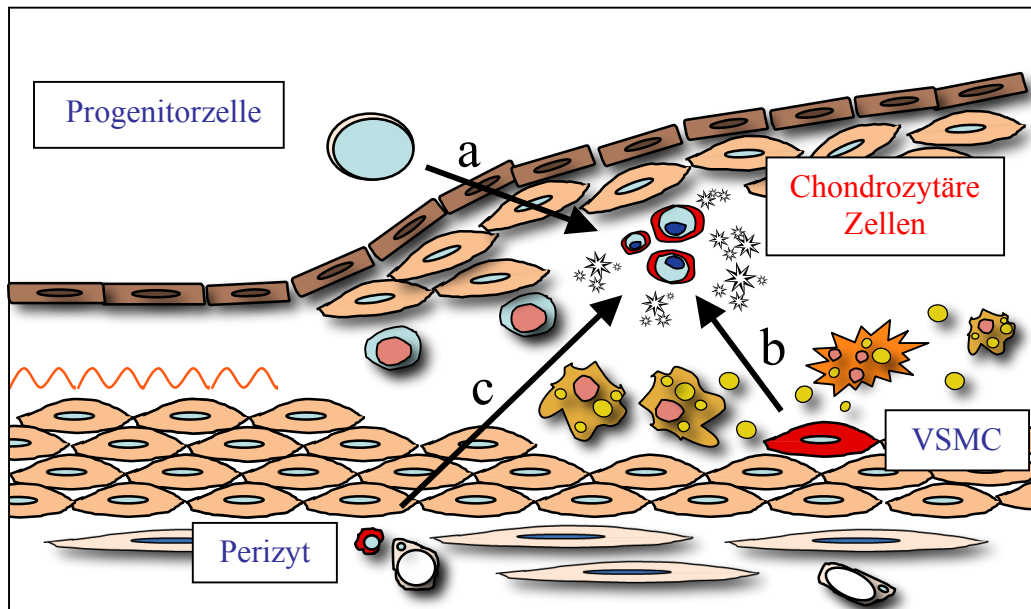


Abbildung 8: Hypothesen zur Herkunft der chondrozytären Zellen.

- a) Hämatopoetische Progenitorzellen aus dem Knochenmark gelangen über die Blutbahn in den atherosklerotischen Plaque und differenzieren zu chondrozytären Zellen.
- b) Transdifferenzierung von ortsständigen glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) zu chondrozytären Zellen nach Einwanderung aus der Tunica media in den atherosklerotischen Plaque.
- c) Transdifferenzierung von ortsständigen Perizyten der Tunica adventitia zu chondrozytären Zellen.^{11,12,62}

2009 konnten Speer et al. in einer Studie am LDLr^{-/-} Mausmodell zeigen, dass die chondrozytären Zellen, die für die Mediaverkalkung verantwortlich sind, durch Transdifferenzierung aus glatten Gefäßmuskelzellen hervorgehen.⁷³ Bei der Intimaverkalkung ist die Frage nach der Herkunft der kalzifizierenden Zellen weiterhin ungelöst.

1.4. Charakterisierung von nativen orthotopen Chondrozyten

Hyaliner Knorpel besteht zu einem Großteil aus extrazellulärer Matrix, in der die Chondrozyten in sogenannten Lakunen eingebettet sind. Sie sezernieren Kollagen II, das ca. 40 % des Trockengewichtes ausmacht, Proteoglykane, Glykoproteine und weitere knorpelspezifische Proteine. Es handelt sich um nerven- und gefäßfreies, bradythropes Gewebe, welches ausschließlich durch Diffusion ernährt wird. Aus diesem Grund ist die Regenerationsfähigkeit stark eingeschränkt. Die Chondrozyten liegen in Gruppen von Zellen zusammen und werden mit der sie umgebenden Matrix als Chondrone bezeichnet.⁷⁴

Knorpelgewebe ist mesenchymalen Ursprungs. Im Verlauf der Chondrogenese differenzieren sich mesenchymale Stammzellen zu Chondrozyten und im weiteren Verlauf über Säulenchondrozyten zu prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten. Die verschiedenen Zelltypen der Chondrogenese exprimieren unterschiedliche knorpel-spezifische Proteine. Sox-9 (SRY-box-9) und weitere Transkriptionsfaktoren der Sox-Familie spielen eine wichtige Rolle während der Frühphase der Chondrogenese. Aus diesem Grund wird Sox-9 als Frühmarker für chondrogenetische Prozesse verwendet.⁷⁶ Im weiteren Verlauf der Chondrogenese exprimieren Chondrozyten Kollagen II und Aggrecan, während die Fähigkeit, Sox-9 zu exprimieren, verloren geht. Prähypertrophe und hypertrophe Chondrozyten sezernieren Kollagen X und PTHrP-R (Parathyroid hormone-related protein-receptor). Kollagen II lässt sich in dieser Spätphase nicht mehr nachweisen. Mit Hilfe dieser spezifischen Markerproteine lassen sich die verschiedenen Stadien der Chondrogenese auf molekularbiologischer Ebene identifizieren.⁷⁷

Während der Embryonalentwicklung stellen mesenchymale Stammzellen die Vorläuferzellen der Chondrozyten dar. Im Erwachsenenalter werden lokale Progenitorzellen nur unter bestimmten Voraussetzungen für die Chondrogenese herangezogen. Laut Zuscik et al. induziert sowohl physiologischer Stress, wie mechanische Beanspruchung, als auch pathologischer Stress im Sinne von Entzündungen und Verletzungen die adulte Chondrogenese.⁷⁷ Bei Knochenbruchheilung werden ortsständige Progenitorzellen aus Periost und Knochenmark rekrutiert und zur Regeneration herangezogen. In einer Studie von Olmsted-Davis et al. konnten die Autoren zeigen, dass zusätzlich ein hypoxisches Milieu essentiell für die Chondrogenese ist.⁷⁵

1.5. RANK/RANKL/OPG-System

Die RANK/RANKL/OPG-Achse ist essentiell für das Remodeling des physiologischen Knochenstoffwechsels⁷⁸ und scheint auch bei der arteriellen Verkalkung eine zentrale Rolle zu spielen.⁷⁹ RANK (receptor activator of NF- κ B), ein Transmembranprotein der TNF-Rezeptor-Superfamilie (TNF = Tumornekrosefaktor), wird auf osteoklastischen Vorläuferzellen der monozytären Zelllinie exprimiert und ist ein etablierter Marker für adulte Osteoklasten.⁸⁰ Der zugehörige Ligand RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) kommt sowohl membrangebunden als auch in löslicher Form vor und ist ein Klasse II-Transmembranglykoprotein auf Osteoblasten, Chondrozyten,⁸¹ Stromazellen des Knochenmarks sowie T-Lymphozyten. RANKL induziert durch Bindung an RANK unter anderem die Differenzierung und Aktivierung der Vorläuferzellen von Osteoklasten.^{82,83} OPG, ein lösliches basisches Glykoprotein, wird von Osteoblasten und Chondrozyten sezerniert,⁸⁴ und konkurriert mit RANK um die Bindung an RANKL. Es besitzt keine intrinsische Aktivität und führt zu einer kompetitiven Inhibition von RANK. (Abbildung 9) Im physiologischen Knochenstoffwechsel herrscht ein Gleichgewicht zwischen den Konzentrationen von RANKL und OPG. Untersuchungen an Knockout-Mausmodellen haben gezeigt, dass ein Fehlen von RANK und RANKL aufgrund mangelnder Osteoklastenfunktion zu Osteopetrose,⁸⁵ ein Fehlen von OPG aufgrund mangelnder Inhibition der Osteoklasten zu Osteoporose führt.⁸⁶ Die Rolle von OPG bezogen auf die arterielle Verkalkung wird aktuell diskutiert. In einigen Studien konnte eine positive Korrelation zwischen der OPG Plasmakonzentration und der Ausprägung von atherosklerotischer Intimaverkalkung, Mediaverkalkung, KHK sowie kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität nachgewiesen werden.^{87,88} Andere Autoren kommen zu dem Ergebnis, dass eine Behandlung mit OPG die Verkalkung inhibiert.⁸⁹ So konnten Morony et al. im Jahre 2009 im C57BL/6 LDLr^{-/-} Mausmodell zeigen, dass eine Langzeitinhibition von RANKL mittels rekombinatem OPG zu einer deutlich geringeren Ausprägung der Intimaverkalkung führt, ohne jedoch die Bildung von Atherosklerose zu beeinträchtigen.⁷⁹

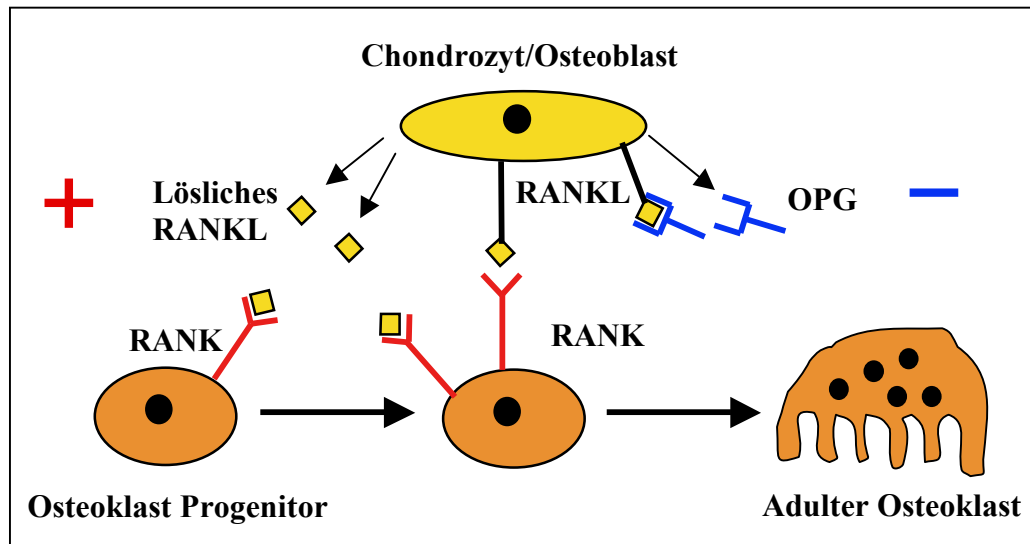


Abbildung 9: RANK/RANKL/OPG-System (+/- = Induktion/Hemmung der Bildung von Osteoklasten).

1.6. Das Mausmodell

1.6.1. Die LDL-Rezeptor Knockout-Maus als Tiermodell der atherosklerotischen Intimaverkalkung

Zur Untersuchung der Atherosklerose haben sich die C57BL/6 LDL-Rezeptor Knockout-Maus (LDLR^{-/-}) und die C57BL/6 Apolipoprotein E Knockout-Maus (ApoE^{-/-}) in zahlreichen Studien bewährt. Unter cholesterin- und fettreicher Diät bilden diese Tiere innerhalb von Wochen spontan Atherosklerose und Verkalkung aus.⁹⁰⁻⁹² Unterschiede zwischen den Modellen liegen überwiegend in der Höhe des Cholesterinspiegels sowie der Geschwindigkeit der Plaquentwicklung. Während die ApoE^{-/-} Maus bereits ohne Highfat-Diät einen sehr hohen Cholesterinspiegel und Atherosklerosebildung aufweist, benötigt die LDLR^{-/-} Maus eine Highfat-Diät, um Atherosklerose zu entwickeln.⁹² In beiden Fällen wurde in atherosklerotischen Läsionen eine chondrozytäre Metaplasie und Verkalkung nachgewiesen.^{63,79} Der LDL-Rezeptor wird von Hepatozyten exprimiert und sorgt für die Aufnahme von LDL und IDL (intermediate density lipoprotein) aus dem Blut in die Hepatozyten. Er ist auf diese Weise direkt an der Regulation der Plasma-cholesterinkonzentration beteiligt. Beim Menschen führt eine Mutation dieses Rezeptors zum Bild der familiären Hypercholesterinämie Typ IIa, die mit stark ausgeprägter, juveniler Atherosklerose einhergeht.⁹³ Im Mausmodell führt der Knockout dieses Rezeptors, in Kombination mit einer Highfat-Diät, im Vergleich zum Wildtyp (2 mmol/L)

zu einer mehr als zehnfachen Erhöhung des Cholesterinspiegels (> 25 mmol/L), ohne dabei den Triglyzerid- und HDL-Spiegel zu verändern.⁹⁰ Die Folge sind manifeste atherosklerotische Veränderungen der aortalen Gefäßwand.⁹⁴

1.6.2. Die transgene C57BL/6 ROSA-26 Maus

Reporter Gene werden in der molekularbiologischen Forschung vielfach eingesetzt, um Migration, Expression und Aktivität von Zellen *in vivo* zu untersuchen.^{73,95} Die C57BL/6 ROSA-26 Maus ist ein transgenes Tier, das nach vektorieller Implantation des β -geo-Gens, β -Galaktosidase und Neomycin-Phosphotransferase, ubiquitär in sämtlichen Körperzellen exprimiert.⁹⁶ Die β -Galaktosidase ist als bakterielles Enzym und Teil des Lactose-Operons (*lac*-Operon) nicht in nativen Säugetierzellen nachweisbar. Transplantierte Zellen der ROSA-26 Maus lassen sich durch immunhistochemischen Nachweis präzise identifizieren.⁹⁷

Die Kombination der beiden genetisch modifizierten Tiere soll die für die Untersuchung erforderliche atherosklerotische Intimaverkalkung bewirken und knochenmarkstämmige Zellen mittels β -Galaktosidasenachweis identifizierbar machen. Nach myeloablativer Ganzkörperbestrahlung der C57BL/6 LDLr^{-/-} Mäuse und anschließender C57BL/6 ROSA-26 Maus Knochenmark-Transplantation ist dieses Enzym mittels Immunhistochemie in den transplantierten Zellen nachweisbar.

1.7. Ziele der Arbeit

Das Primärziel der vorliegenden Untersuchung ist die Identifizierung und Klassifizierung der an der Entstehung der atherosklerotischen Intimaverkalkung ursächlich beteiligten chondrozytären Zellen. Hierzu wird ein etabliertes Tiermodell für atherosklerotische Intimaverkalkung (C57BL/6 LDLr^{-/-} Maus) mit einem weiteren Tiermodell (C57BL/6 ROSA-26 Maus) kombiniert.

Folgende Fragen wurden gestellt und korrespondierende Experimente durchgeführt:

1.) *Zu welchem Zeitpunkt treten die chondrozytären Zellen erstmalig auf?*

Hierzu werden die Tiere in drei Gruppen aufgeteilt, für 8, 10 und 16 Wochen auf eine Highfat-Diät gesetzt und die Aorta ascendens im Anschluss histologisch aufgearbeitet. Zur Orientierung werden Färbungen zur Bindegewebe-, Fett- und Kalkdarstellung eingesetzt. Geeignete Präparate werden ausgewählt und mittels Immunhistochemie untersucht.

2.) *Stammen die chondrozytären Zellen aus dem Knochenmark?*

Mit Hilfe einer Knochenmark-Transplantation von ROSA-26 Mäusen werden die knochenmarkstämmigen Zellen mittels β -Galaktosidase nachweisbar. Anhand einer immunhistochemischen Doppelmarkierung von Kollagen II und β -Galaktosidase werden die chondrozytären Zellen im verkalkten Plaquareal identifiziert und auf eine Kolokalisation mit β -Galaktosidase hin untersucht.

3.) *Expriemieren die chondrozytären Zellen weitere knorpelspezifische Markerproteine, und kann eine Herkunft aus glatten Gefäßmuskelzellen ausgeschlossen werden?*

Zur weiteren Charakterisierung der chondrozytären Zellen werden Plaquareale mittels immunhistochemischem Nachweises eines Frühmarkers der Chondrogenese (Sox-9), RANKL und einem Marker für glatte Gefäßmuskelzellen (SM-22 α) untersucht.

4.) *Welcher hämatopoetischen Zelllinie entstammen die chondrozytären Zellen?*

Zur Eingrenzung der hämatopoetischen Zelllinie und zur Phänotypisierung der chondrozytären Zellen werden diese mittels Immunhistochemie auf eine Kolokalisation von Kollagen II und verschiedenen Leukozytenoberflächenantigenen untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Reagenzien

Aceton p.a.	Merck
Aquatex	Merck
BSA (Albumin from bovine Serum)	Bio Chemika
Calcein	Sigma
Dako Glycergel Mounting Medium	Dako Cytomation
DAPI	Sigma
EDTA	Merck
Essigsäure 2 %	Merck
Ethanol p.a.	Merck
Glutaraldehyd	Sigma
Hämalaun	Merck
Heparin (100 U/ml)	Merck
Immersionsöl 518 N	Zeiss
Isofluran	Curamed
Isopropanol	Sigma
Methanol p.a.	Merck
MgCl ₂	Merck
Oil Red O	Sigma
Paraformaldehyd	Merck
Tiefkühlmedium	Leica Instruments
Trypanblau	Merck
Tween® 20	Merck

2.1.2. Antikörper

Primäre Antikörper:

Huhn Anti- β -Galaktosidase AK, ab93161	Abcam
Kaninchen Anti-Kollagen II AK, NCL-COLL-IIp	Novocastra
Kaninchen Anti-RANKL AK, AAM56B	AbD serotec
Kaninchen Anti-SM-22 α AK, ab 14106	Abcam
Ratte Anti-Maus-CD13: Alexa Fluor® 488 AK, MCA2395A488	AbD serotec
Ratte Anti-Maus-CD115 AK, MCA 1898GA	AbD serotec
Ratte Anti-Maus-CD34 AK, MCA 1825	AbD serotec
Ratte Anti-MOMA-2 AK, 17PO0503	Dianova
Ziege Anti-Sox-9 AK, sc-17340	Santa Cruz

Sekundäre Antikörper:

Esel Anti-Kaninchen AK Alexa Fluor® 488, A-21206	Invitrogen
Esel Anti-Kaninchen AK Alexa Fluor® 555, A-31572	Invitrogen
Esel Anti-Ziege AK Alexa Fluor® 555, A-21432	Invitrogen
Ziege Anti-Huhn AK Alexa Fluor® 488, A-11039	Invitrogen
Ziege Anti-Ratte AK Alexa Fluor® 555, A-21434	Invitrogen

2.1.3. Pufferlösungen

Tris buffered saline (TBS) pH: 9,0 / 0,05 M	6,06 g Trispuffer ad 1 l A. dm.
Phosphat buffered saline (PBS) pH: 7,45	Invitrogen
PBS + Tween® 20	10 ml Tween® 20 ad 1 l PBS
PBS + Mg ²⁺ (2 mM MgCl ₂)	2 mM MgCl ₂ ad 1 l PBS

2.1.4. Instrumente

Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 2 plus)	Zeiss
Konfokales Laserscanning Mikroskop (LSM 510 Meta)	Zeiss
Kryotom (Jung 3000CM)	Leica

Lichtmikroskop (Axioskop 2 plus)	Zeiss
Linearbeschleuniger (Mevatron 74®)	Siemens
pH-Meter	Knick
Zentrifuge (Rotofix 32)	Hettich
Zytospin Zytozentrifuge	Leica

2.1.5. Tierfutter

Highfat Diät	TD 90221, Harlan Teklad
Standard-Maus-Diät	1324-pellet, Altromin®, Lage, Deutschland

2.1.6. Software

Adobe Photoshop 9.0	Adobe
AxioVision Rel. 4.6	Zeiss
EndNote X3	Thomson Research Soft
LSM Image Browser 3.2	Zeiss
Microsoft® Office 2004 für Mac® Version 11.0	Microsoft®
SPSS 18.0	SPSS inc.

2.2. Versuchstiere

Insgesamt wurden 23 weibliche Mäuse für diese Arbeit verwendet. Im Einzelnen handelte es sich um 17 C57BL/6 LDLr^{-/-} und 6 C57BL/6 ROSA-26 Mäuse, erworben von den Charles River Lab. (Sulzbach-Rosenberg Deutschland). Die C57BL/6 LDLr^{-/-} Mäuse wurden in drei Gruppen aufgeteilt und im Alter von 12 Wochen für 8 (Gruppe 1), 10 (Gruppe 2) und 16 Wochen (Gruppe 3) auf eine Highfat-Diät gesetzt. (Tabelle 1)

Die Tiere hatten einen 12-stündigen Tag/Nacht-Rhythmus, wurden jeweils zu fünf in einem Käfig gehalten und erhielten Wasser und Futter ad libitum. Außerhalb der Highfat-Diät Phase erhielten die Tiere Standard-Maus-Diät.

Tier	Anzahl
C57BL/6 ROSA-26	6
C57BL/6 LDLr/- 8 Wochen Highfat-Diät (Gruppe 1)	5
C57BL/6 LDLr/- 10 Wochen Highfat-Diät (Gruppe 2)	5
C57BL/6 LDLr/- 16 Wochen Highfat-Diät (Gruppe 3)	5
C57BL/6 LDLr/- Kontrolle	2
Gesamt	23

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Versuchstiere.

2.3. Myeloablative Ganzkörperbestrahlung und Knochenmark-Transplantation

Nach Narkotisierung mit Isofluran, Euthanasie durch zervikale Dislokation und Desinfektion (70 % Ethanol) des gesamten Versuchstieres, wurden Femura und Tibiae der Spendertiere (C57BL/6 ROSA-26) explantiert und präpariert. Die Epiphysen wurden gekappt, die Markhöhle mit 5 ml steriler PBS/5 % FCS-Lösung gespült. Anschließend wurde die Spülflüssigkeit mit den Knochenmarkzellen bei 4°C 10 Minuten zentrifugiert (1200 rpm), mit 5 ml PBS/5 % FCS/Eis gewaschen, erneut zentrifugiert und mit 1 ml PBS-Eis ohne FCS resuspendiert.

Um das native Knochenmark der Empfängertiere (C57BL/6 LDLr/-) zu zerstören, wurden die Mäuse im Alter von 12 Wochen für drei Minuten mittels einer 900 cGy Cäsiumquelle ganzkörperbestrahlt. Direkt im Anschluss fand die Knochenmark-Transplantation unter Isofluran-Narkose statt. (Abbildung 10) Die Knochenmarkszellen der C57BL/6 ROSA-26 Mäuse wurden auf eine Verdünnung von mindestens $5 \times 10^6 / 250 \mu\text{l}$ gebracht und mit Heparin (100 U/ml, 5 μl auf 1 ml Zellsuspension) versetzt. Durch Injektion von jeweils 1 ml Zellsuspension in die Schwanzvene wurden die Zellen transplantiert. Das Knochenmark einer Spendermaus wurde auf etwa vier bis fünf Empfängertiere aufgeteilt.

2.4. Highfat-Diät

Um eine alimentär bedingte Hypercholesterinämie zu erreichen und so die Atherosklerosebildung zu verstärken, erhielten die C57BL/6 LDLr/- Tiere im Anschluss an die

Knochenmark-Transplantation eine cholesterin- und fettreiche Diät (TD 90221, Harlan Teklad Bioservice for Science GmbH, Walsrode, Germany), bestehend aus 15 % Fett, 1,25 % Cholesterin und 0,5 % Natriumchofat. Die Mäuse (n = 5 pro Gruppe) wurden narkotisiert und 8, 10 und 16 Wochen nach Knochenmark-Transplantation euthanasiert. Das Herz und die Aorta ascendens wurden explantiert, in flüssigem Stickstoff fixiert und bis zur Aufarbeitung bei -80° C gelagert.

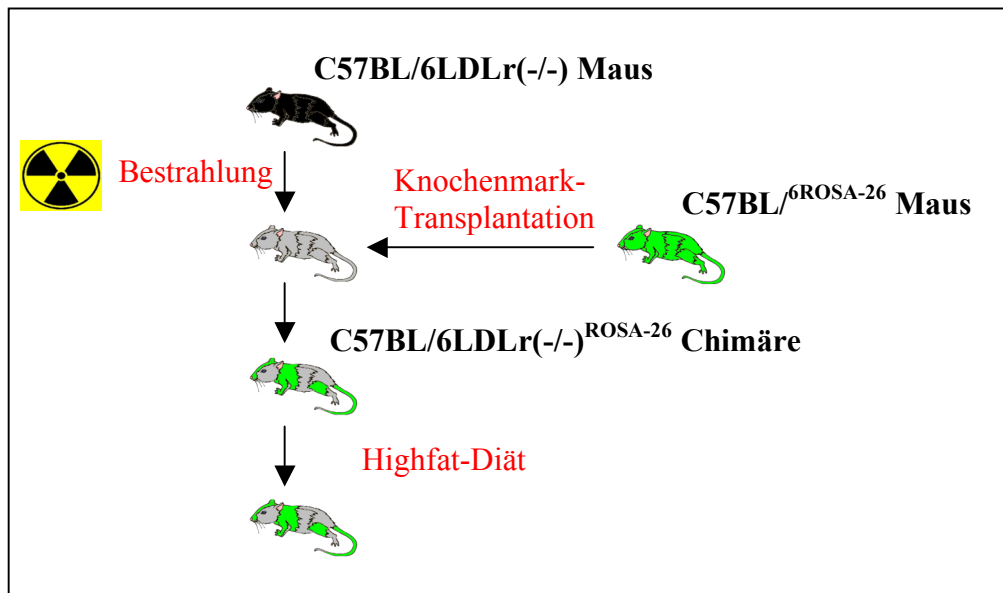


Abbildung 10: Ablauf von Radiatio, Knochenmark-Transplantation und Highfat-Diät.

2.5. Histologie

Die Präparate wurden mit Hilfe eines Kryotoms (Jung 3000CM, Leica) in 100-200 μm dicke Serienschnitte geschnitten. Untersucht wurden die atherosklerotischen Plaquelagerungen im Bereich der Aorta ascendens.

2.5.1. Oil Red O-Färbung

Mit Hilfe der Oil Red O-Färbung werden fetthaltige Areale rötlich angefärbt.⁹⁸ Die Objektträger wurden für 10 Minuten in 4 %igem Formaldehyd fixiert und dann 5 Minuten in 60 %igem Isopropylalkohol gebracht. Im Anschluss wurden die Präparate in einer 0,3 %igen Oil Red O-Lösung 10 Minuten lang inkubiert und in 60 %igem Isopropylalkohol differenziert. Zur Kerngegenfärbung wurden die Objektträger für 3 Minuten in Hämalaun-Lösung gebracht und danach unter fließendem Wasser 10 Minuten gebläut.

2.5.2. Calcein-Färbung

Mittels Calcein-Färbung werden wasserunlösliche Kalziumphosphat-Kristalle sichtbar gemacht.⁹⁹ Zur Färbung wurden die Objektträger für 30 Minuten in 0,1 mM Calcein-Gebrauchslösung gebracht und anschließend auf einem Schüttler dreimal 5 Minuten mittels 0,05 M TBS (pH: 9,0) gespült. Nach Kernfärbung mit DAPI wurden die Präparate in Glycergel eingeschlossen.

2.6. Chimärenanalyse

Nach retrookulärer Entnahme von 1-2 ml Blut zum Zeitpunkt der Euthanasie, wurde dieses mit Hilfe eines Zytospins auf einen Objektträger aufgebracht und konzentriert. Mit Markierung der β -Galaktosidase durch indirekte Immunfluoreszenz konnte der Anteil der β -Galaktosidase⁺-Zellen durch Auszählen erfasst werden. Pro Tier und Zytospin wurden 1000 Zellen evaluiert. Als Negativprobe wurde das Blut zweier C57BL/6 LDLr^{-/-} Mäuse untersucht.

Protokoll: Chimärenanalyse

- | | | |
|----|---|---------|
| 1. | Fixieren in -20°C Methanol/Aceton | 10 min |
| 2. | Trocknen | 15 min |
| 3. | Blocken mit 5 % BSA/PBS | 30 min |
| 4. | Inkubation mit primären AK (Huhn Anti- β -Galaktosidase, Verdünnung 1:250) in 5 % BSA/PBS | 60 min |
| 5. | Spülen in PBS | 3x5 min |
| 6. | Inkubation mit sekundärem AK (Ziege Anti-Huhn, Verdünnung 1:250) in PBS | 30 min |
| 7. | Spülen in PBS | 3x5 min |
| 8. | Kernfärbung mit 20 μ l DAPI in 200 ml PBS | 3 min |
| 9. | Eindecken mit Glycergel | |

Die Bewertung und Auszählung der immunhistochemischen Ergebnisse fand an einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 2 plus, Zeiss) statt.

2.7. Immunhistochemie

Zur Identifikation der verschiedenen Zelltypen im Plaque wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz neben β -Galaktosidase, chondrozytäre Marker (Kollagen II, Sox-9, RANKL), Marker glatter Gefäßmuskelzellen (SM-22 α) und Leukozytenoberflächenantigene (CD13, MOMA-2, CD115, CD34) nachgewiesen.

Antikörperkonzentrationen:

Primäre Antikörper:

Huhn Anti- β -Galaktosidase AK: 1/200
Kaninchen Anti-Kollagen II AK: 1/250
Kaninchen Anti-RANKL AK: 1/200
Kaninchen Anti-SM-22 α AK: 1/50
Ratte Anti-Maus CD13:Alexa Fluor® AK: 1/20
Ratte Anti-Maus CD115 AK: 1/500
Ratte Anti-Maus CD34 AK: 1/100
Ratte Anti-MOMA-2 AK: 1/1000
Ziege Anti-Sox-9 AK: 1/50

Sekundäre Antikörper:

Esel Anti-Kaninchen AK: 1/1000
Esel Anti-Ziege AK: 1/250
Ziege Anti-Huhn AK: 1/250
Ziege Anti-Ratte AK: 1/500

Protokoll: Immunhistochemische Markierung/Doppelmarkierung

1.	Auftauen	10 min
2.	Trocknen	15 min
3.	Rehydrieren mit PBS/Tween®	10 min
4.	Fixieren in 4 % PFA/PBS	10 min
5.	Spülen mit PBS/Tween®	3x5 min
6.	Blocken mit 5 % BSA/PBS	30 min

7.	Inkubation mit primären AK in 5 % BSA/PBS	60 min
8.	Spülen in PBS/Tween®	3x5 min
9.	Inkubation mit sekundären AK in PBS	30 min
10.	Spülen in PBS/Tween®	3x5 min
11.	Kernfärbung mit 20 µl DAPI in 200 ml PBS/Tween®	3 min
12.	Eindecken mit Glycergel	

Die Untersuchung und Auswertung der immunhistochemischen Befunde wurden an einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (LSM Meta 510, Zeiss) durchgeführt. Pro Färbung und Tier wurden sechs Präparate untersucht. Für jedes Präparat wurden zehn zufällig ausgewählte Regionen (jede mit einer Fläche von 1000 µm²) innerhalb des atherosklerotischen Plaque untersucht und die Gesamtzellzahl, die Anzahl der Kollagen II⁺-Zellen, sowie die Anzahl der für Kollagen II und das jeweilige Markerprotein doppelt positiven Zellen ermittelt.

2.8. Immunphänotypisierung von hämatopoetischen Zellen

Um die hämatopoetische Zelllinie der chondrozytären Zellen zu bestimmen und diese genauer zu charakterisieren, wurden immunhistochemische Doppelmarkierungen von Kollagen II und unterschiedlichen Leukozytenoberflächenantigenen durchgeführt. Die folgende Liste gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Leukozytenmarker.

CD13 ist eine membranständige N-Aminopeptidase, und ein Marker für Progenitorzellen der myeloiden Zellreihe.^{100,101} Dieses Enzym erlaubt eine Differenzierung zwischen der myeloiden und lymphatischen hämatopoetischen Zelllinie. (Abbildung 20)

MOMA-2 (Monocyte + Macrophage antibody-2) ist ein monoklonaler Antikörper der ein unbekanntes 140 kD schweres Glykoprotein im Cytoplasma und auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen detektiert.¹⁰² (Abbildung 21)

CD115 wird von dendritischen Zellen und den Zellen der monozytären Reihe, einschließlich Promonozyten und Monozyten, exprimiert.⁷⁸ (Abbildung 22)

CD34, ein wichtiger Oberflächenantigen zur Identifizierung von hämatopoetischen Stammzellen, wird von multipotenten Progenitorzellen exprimiert und geht im Laufe der weiteren Differenzierung verloren.¹⁰³ (Abbildung 23)

Mit jedem positiven oder negativen Nachweis wird eine Gruppe von hämatopoetischen Vorläuferzellen als in Frage kommende Quelle der chondrozytären Zellen aus- oder eingeschlossen. (Abbildung 11)

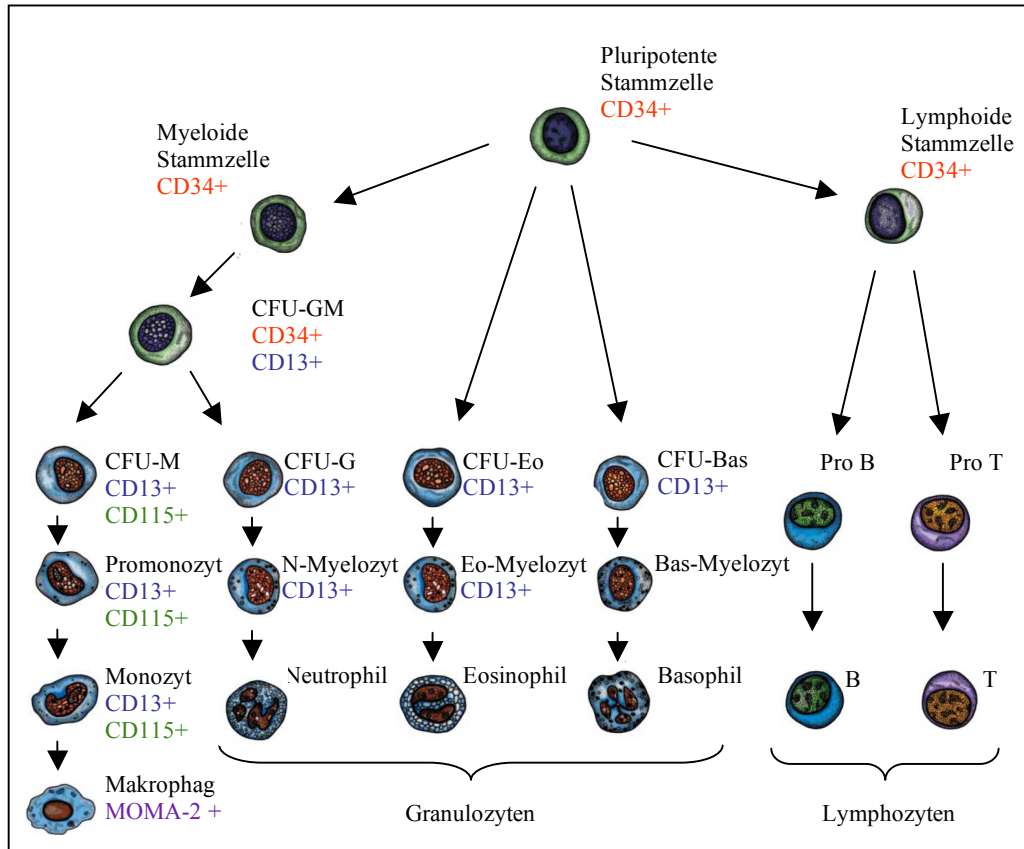


Abbildung 11: Überblick zur Hämatopoese und den verwendeten Markern zur Immunphänotypisierung der chondrozytären Zellen. CFU = colony forming unit (modifiziert aus¹⁰⁴).

2.9. Statistische Methoden

Für die einzelnen Gruppen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Es wurden nicht parametrische Tests für unabhängige Stichproben eingesetzt. Einzelvergleiche zwischen den Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Der Vergleich der Chimärenanalyse mit dem Anteil der Kollagen II⁺/β-Galaktosidase⁺-Zellen, erfolgte mittels des student's t-Tests. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha = 0,05$ definiert. Ein Test mit $p < 0,05$ wurde somit als signifikant, ein Test mit $p \geq 0,05$ als nicht signifikant bezeichnet. Die Auswertung erfolgte mit dem Statistik-Paket SPSS 18.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, USA).

3. Ergebnisse

3.1. Histologie

3.1.1. Oil Red O- und Calcein-Färbungen

Nach 8 Wochen unter Highfat-Diät zeigten sämtliche Tiere (5/5) homogene, Oil Red O-positive Fettablagerungen in der Gefäßwand der Aorta ascendens. Zusätzlich ließen sich in diesem Frühstadium der Atherosklerose bereits punktförmige Kalziumphosphatkristalle innerhalb der Plaqueablagerungen mittels Calcein nachweisen. Ein intermediäres Stadium der Atherosklerose zeigte sich nach 10-wöchiger Highfat-Diät. Die Gefäßwand wies eine deutliche Progression von Atherosklerose und Verkalkung auf. Bei drei von fünf Mäusen waren erste Anzeichen eines Atheroms (zellulärer Detritus, Zellarmut, positiver Lipid- und Kalziumphosphatnachweis) erkennbar. Eine fortgeschrittene Ausprägung der atherosklerotischen Intimaverkalkung war nach 16 Wochen Highfat-Diät erkennbar. Bei allen Tieren (5/5) ließ sich der Plaque in einen basal gelegenen, atheromatösen Bereich (Atherom, Lipidkern) sowie einen adluminal gelegenen fibrotischen Bereich (fibröse Kappe) einteilen. Das Atherom zeichnete sich durch starken Kalziumphosphat- und Lipidnachweis, sowie deutliche Zellarmut aus, während die fibröse Kappe weniger Kalziumphosphat und Lipide, jedoch eindeutig mehr Zellen aufwies. (Tabelle 2, Abbildung 12)

Gruppe	Plaqueablagerungen	Atherom/fibröse Kappe
8 Wochen Highfat-Diät	5/5	0/5
10 Wochen Highfat-Diät	5/5	3/5
16 Wochen Highfat-Diät	5/5	5/5
Gesamt	15/15	8/15

Tabelle 2: Ergebnisse der morphologischen Untersuchung der Plaqueareale.

Die in den folgenden Abbildungen verwendeten Buchstaben dienen der Orientierung und sind wie folgt definiert: L = Gefäßlumen, M = Tunica media, A = Tunica adventitia, NC = nekrotischer Kern (engl. necrotic core), FC = fibröse Kappe (engl. fibrous cap).

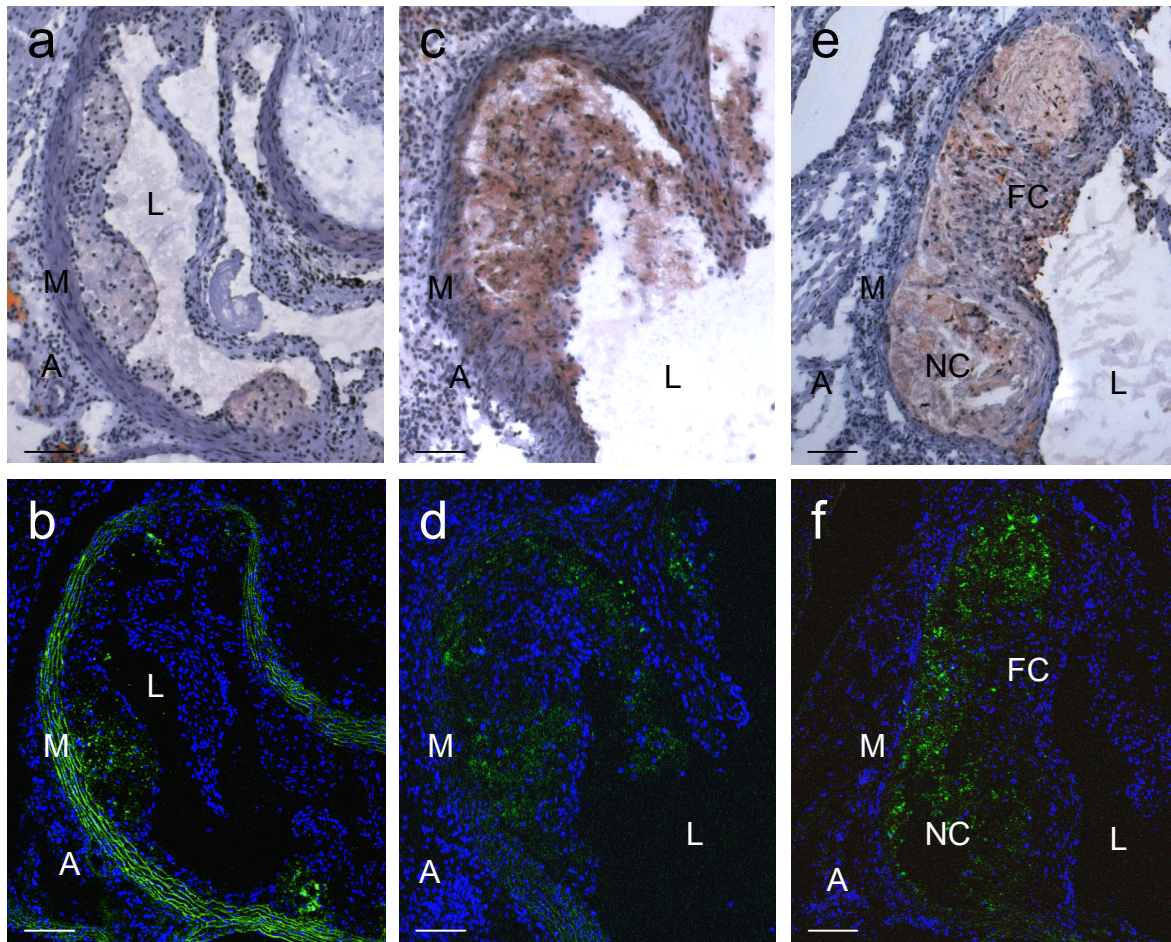


Abbildung 12: Übersicht zur histologischen Untersuchung. Aorta ascendens 8 (a/b), 10 (c/d) und 16 Wochen (e/f) unter Highfat-Diät. a/c/e: Oil Red O-Färbung: Lipide werden rötlich, Zellkerne lila dargestellt. b/d/f: Calcein-Färbung: Intakte elastische Fasern der Tunica media und Kalziumphosphat werden grün, Zellkerne blau dargestellt. Maßstabsleiste: 100 μ m.

3.2. Immunhistochemie

Auf den folgenden Diagrammen ist auf der x-Achse die Dauer der Highfat-Diät in „Wochen“ und auf der y-Achse der prozentuale Anteil der für den entsprechenden Marker positiven Zellen von der Gesamtzellzahl in „%“ aufgeführt. Diagramm 2 zeigt auf der y-Achse die Gesamtzellzahl in „Zellen/mm²“. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit „*“, nicht signifikante Unterschiede mit „n.s.“ markiert.

3.2.1. Chimärenanalyse

Diagramm 1 zeigt den Gruppenvergleich der Chimärenanalyse. Der Anteil der β -Galaktosidase⁺-Leukozyten im peripheren venösen Blut belief sich auf 84,6 % \pm 3,6 % bei den 8 Wochen, auf 91,2 % \pm 3,4 % bei den 10 Wochen und auf 88,4 % \pm 1,1 % bei den 16 Wochen Tieren. Die Negativkontrollen zweier nicht transplantierter C57BL/6 LDLr^{-/-} Mäuse zeigten keine Markierung.

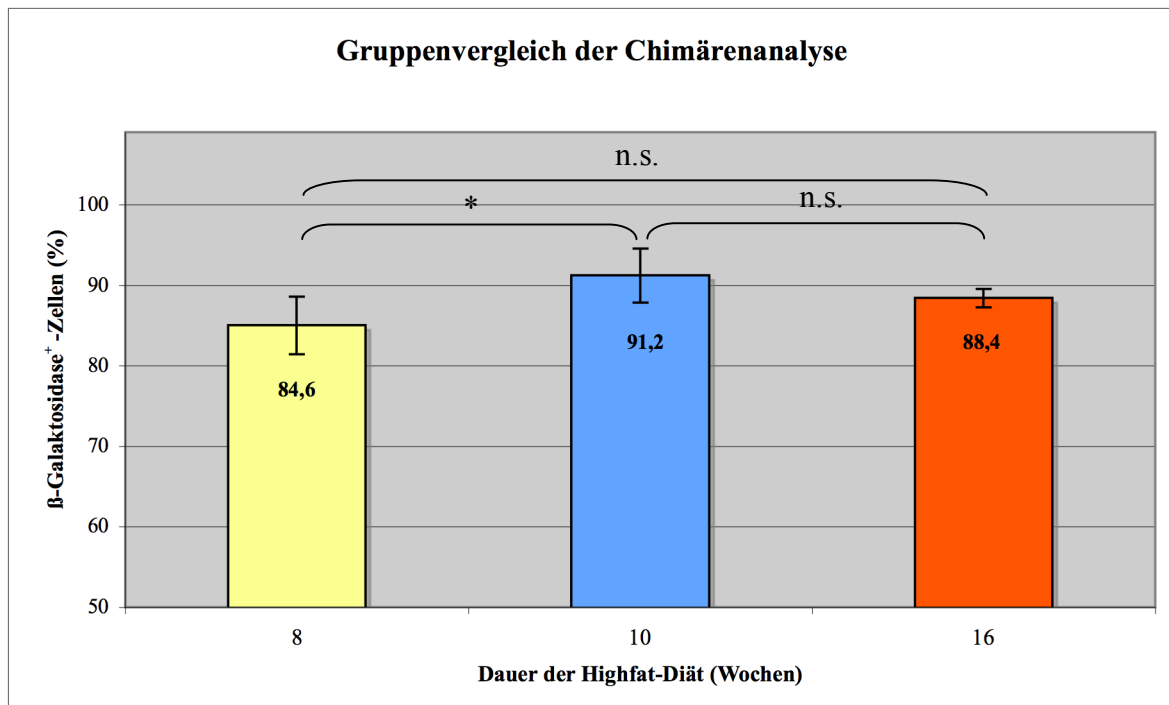


Diagramm 1: Übersicht der Chimärenanalyse zu den drei untersuchten Zeitpunkten.

3.2.2. Kollagen II/ β -Galaktosidase-Doppelmarkierung

Das Frühstadium (Abbildung 13, Diagramme 2-4), 8 Wochen unter Highfat-Diät, zeigte eine mittlere Zellularität von $1528,6 \pm 184,1$ Zellen/mm². Es konnten in diesem Stadium keine Kollagen II⁺-Zellen nachgewiesen werden. Der Anteil der β -Galaktosidase⁺-Zellen lag bei $83,4 \% \pm 7,8 \%$. Im Intermediärstadium der Atherosklerosebildung, 10 Wochen unter Highfat-Diät (Abbildung 14, Diagramme 2-4), erreichte die Zellularität ein Maximum von $1998,9 \pm 167,7$ Zellen/mm². Chondrozytäre Zellen traten in diesem Stadium erstmalig auf. Ihr Anteil belief sich auf $7,1 \% \pm 1,6 \%$, von denen $90,1 \% \pm 9,3 \%$ zusätzlich eine Doppelmarkierung für β -Galaktosidase aufwiesen. Der Gesamtanteil der β -Galaktosidase⁺-Zellen lag bei $86,6 \% \pm 6,1 \%$. Unter 16-wöchiger Highfat Diät (Abbildung 15, Diagramme 2-4) zeigten die Plaqueablagerungen eine deutliche Abnahme der Zellularität auf $1661,1 \pm 157,9$ Zellen/mm². Kollagen II ließ sich in $14,1 \% \pm 1,7 \%$ der Zellen nachweisen. $87,5 \% \pm 5,9 \%$ dieser chondrozytären Zellen waren zusätzlich positiv für β -Galaktosidase. Insgesamt zeigten $81,1 \% \pm 2,9 \%$ der Zellen im Plaque eine positive Markierung für β -Galaktosidase.

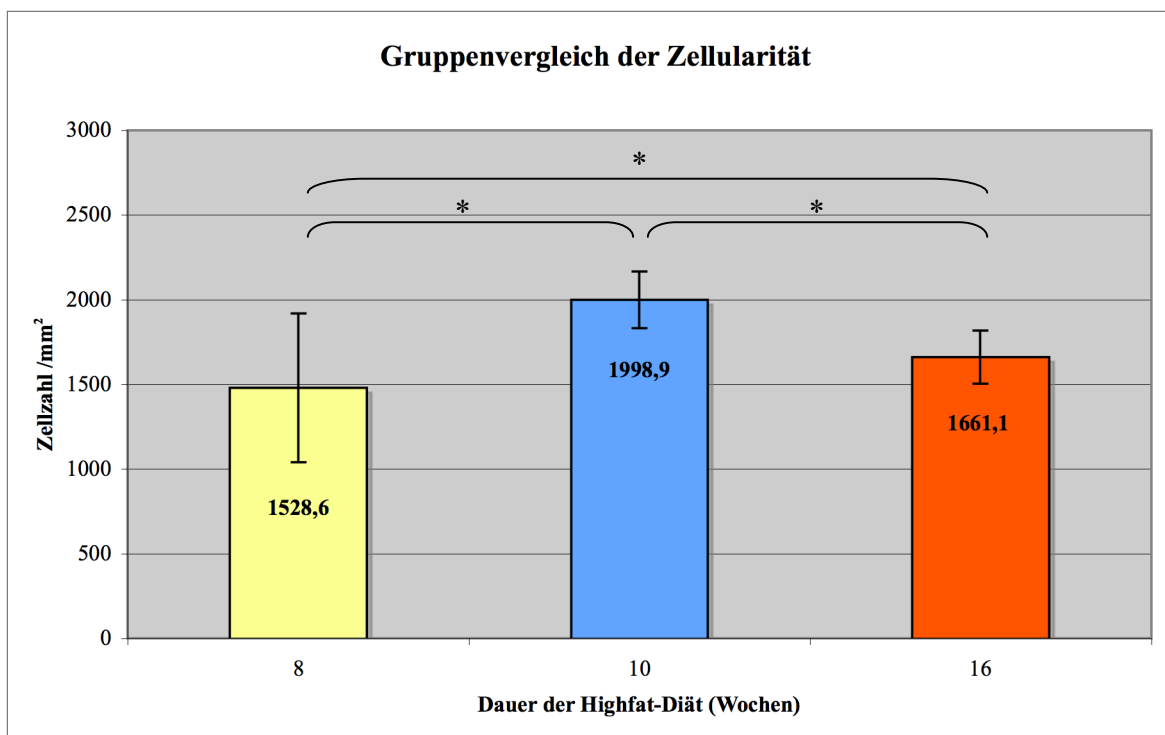


Diagramm 2: Verteilung der Zellularität zu den verschiedenen Zeitpunkten.

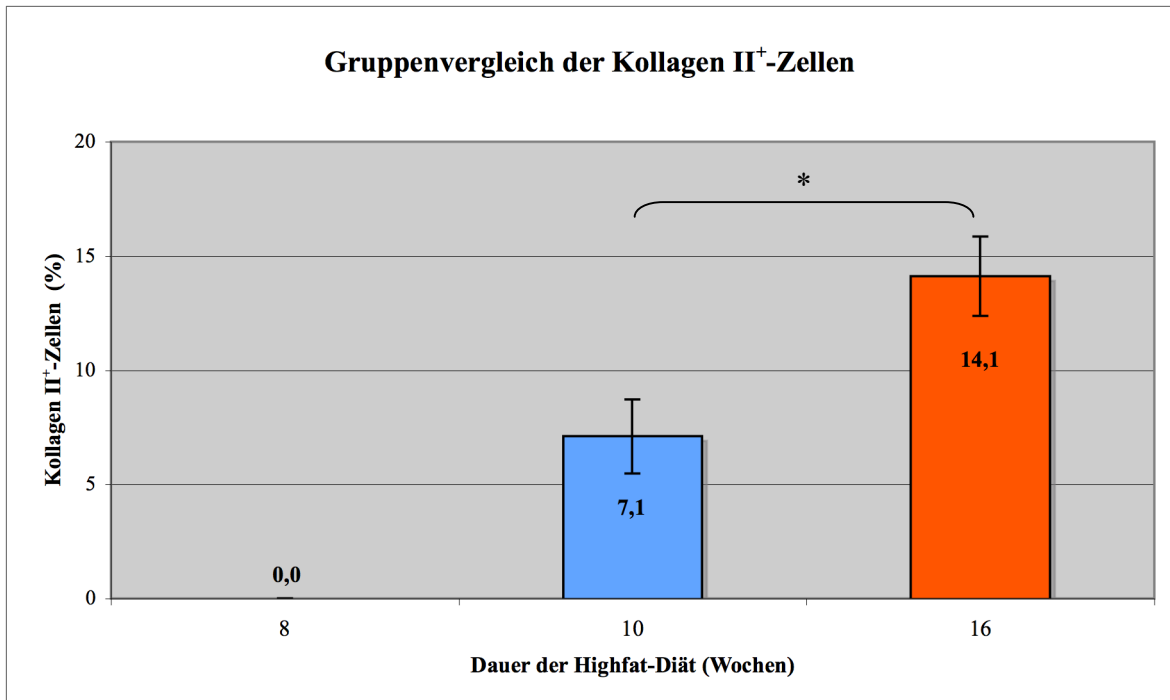


Diagramm 3: Anteil der Kollagen II⁺-Zellen im untersuchten Plaquareal zu den verschiedenen Zeitpunkten.

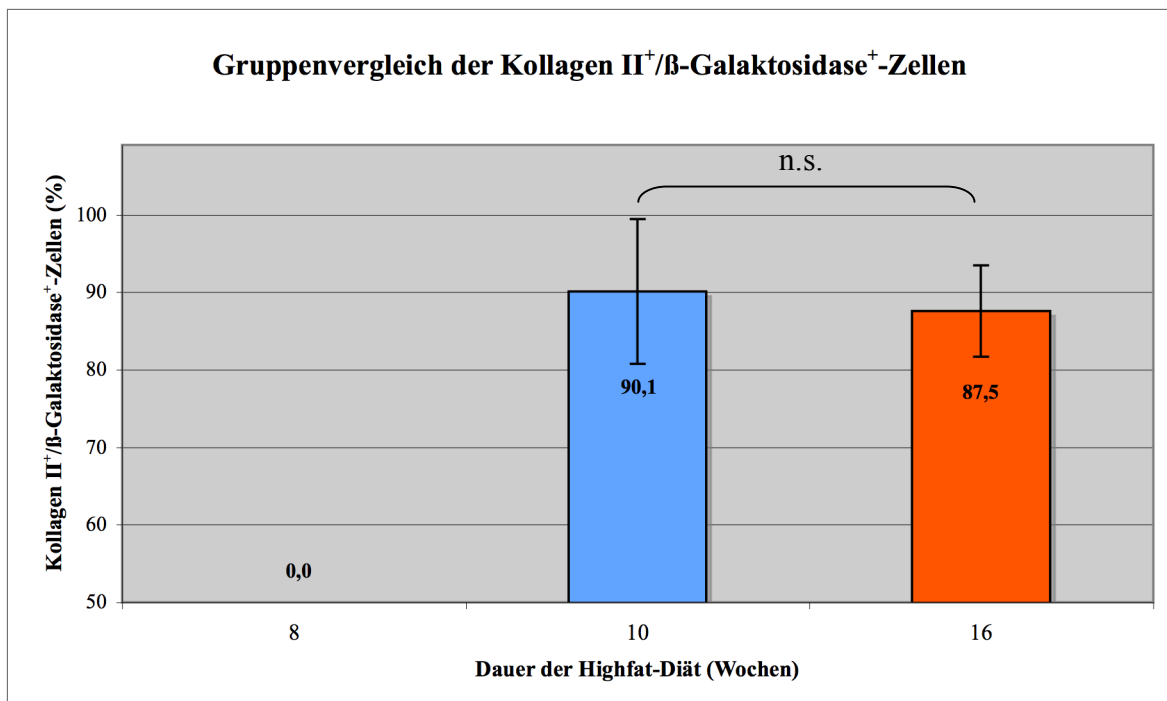


Diagramm 4: Anteil der Kollagen II⁺/β-Galaktosidase⁺-Zellen im untersuchten Plaquareal zu den verschiedenen Zeitpunkten.

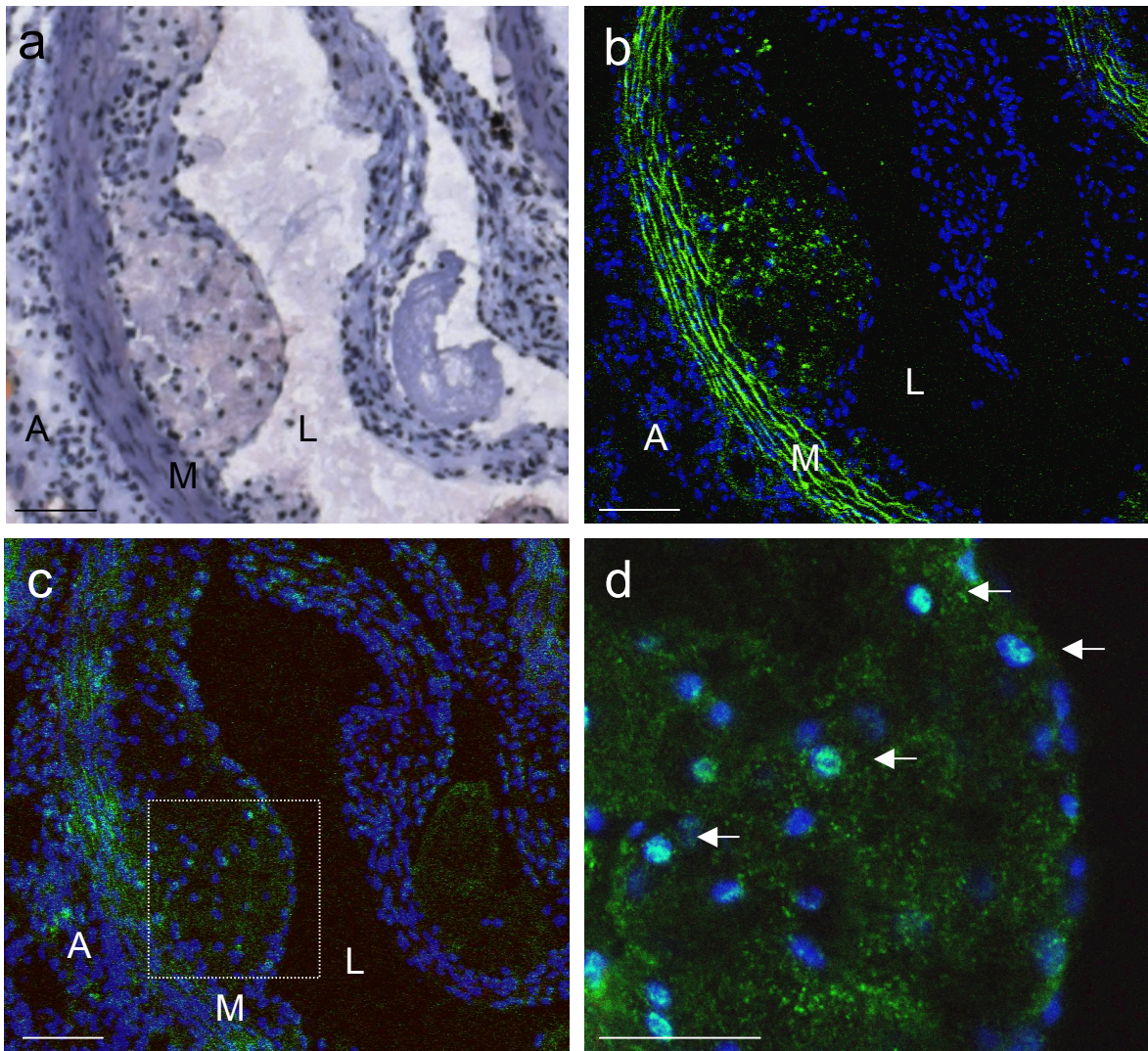


Abbildung 13: Oil Red O- und Calcein-Färbung sowie Doppelmarkierung von Kollagen II und β -Galaktosidase im atherosklerotischen Plaque nach 8 Wochen unter Highfat-Diät. a: Oil Red O-Färbung: Lipide werden rötlich, Zellkerne lila dargestellt. b: Calcein-Färbung: Intakte elastische Fasern der Tunica media und Kalziumphosphat werden grün, Zellkerne mittels DAPI-Markierung blau dargestellt. c/d: Doppelmarkierung von Kollagen II und β -Galaktosidase: Zellkerne = blau, β -Galaktosidase = grün, Kollagen II = rot. d: Vergrößerter Ausschnitt des in c markierten Bereiches: Die Pfeile verweisen auf ausgewählte β -Galaktosidase⁺-Zellen. Kollagen II ist nicht nachweisbar. Maßstabsleiste: a-c: 100 μ m, d: 50 μ m.

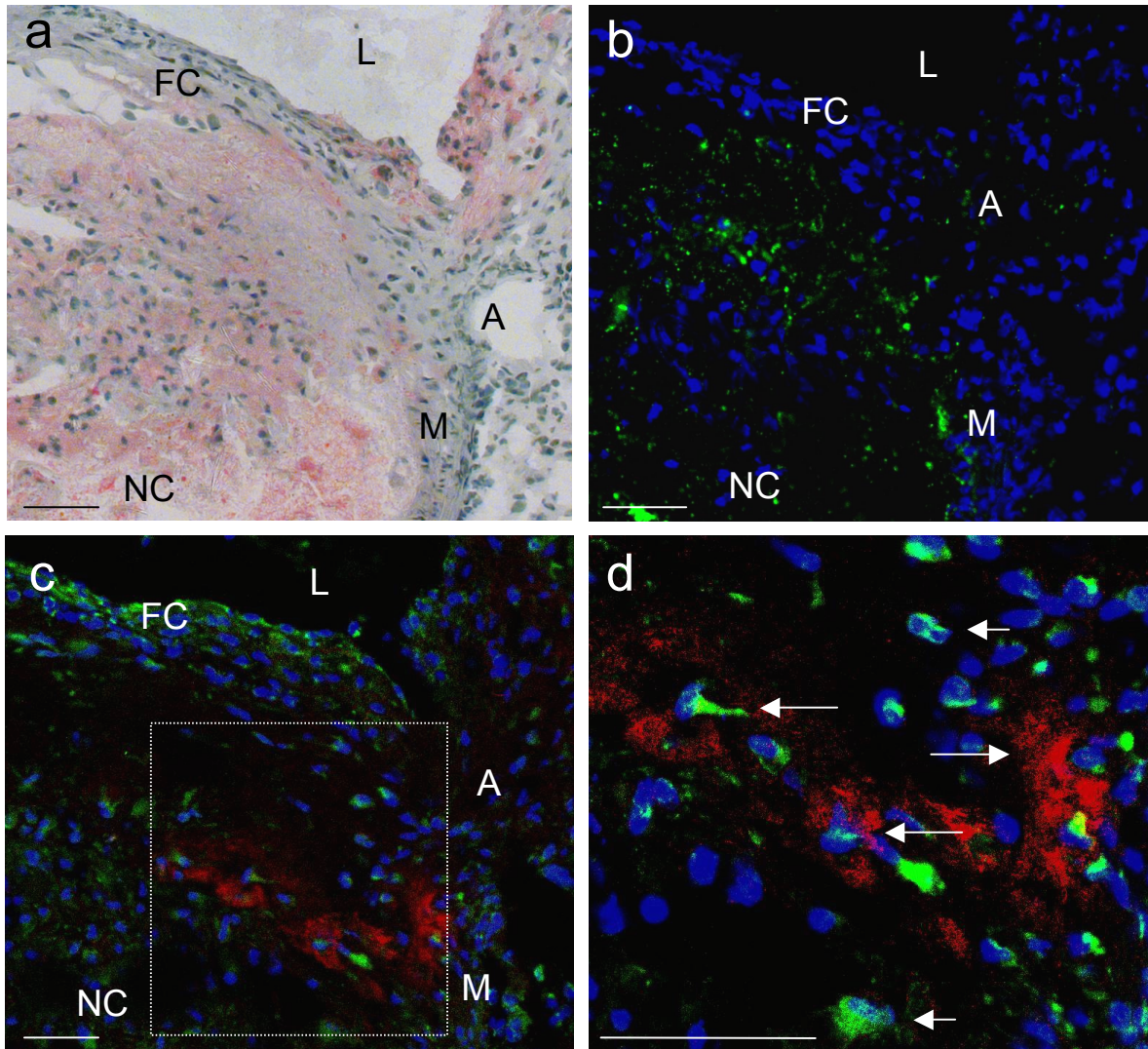


Abbildung 14: Oil Red O- und Calcein-Färbung sowie Doppelmarkierung von Kollagen II und β -Galaktosidase im atherosklerotischen Plaques nach 10 Wochen unter Highfat-Diät. a: Oil Red O-Färbung: Lipide werden rötlich, Zellkerne lila dargestellt. b: Calcein-Färbung: Intakte elastische Fasern der Tunica media und Kalziumphosphat werden grün, Zellkerne mittels DAPI-Markierung blau dargestellt. c/d: Doppelmarkierung von Kollagen II und β -Galaktosidase: Zellkerne = blau, β -Galaktosidase = grün, Kollagen II = rot. d: Vergrößerter Ausschnitt des in c markierten Bereiches: Die kurzen Pfeile verweisen auf ausgewählte β -Galaktosidase⁺/Kollagen II⁻-Zellen, die längeren Pfeile verweisen auf β -Galaktosidase⁺/Kollagen II⁺-Zellen. Maßstabsleiste: a/c: 50 μ m, d: 20 μ m.

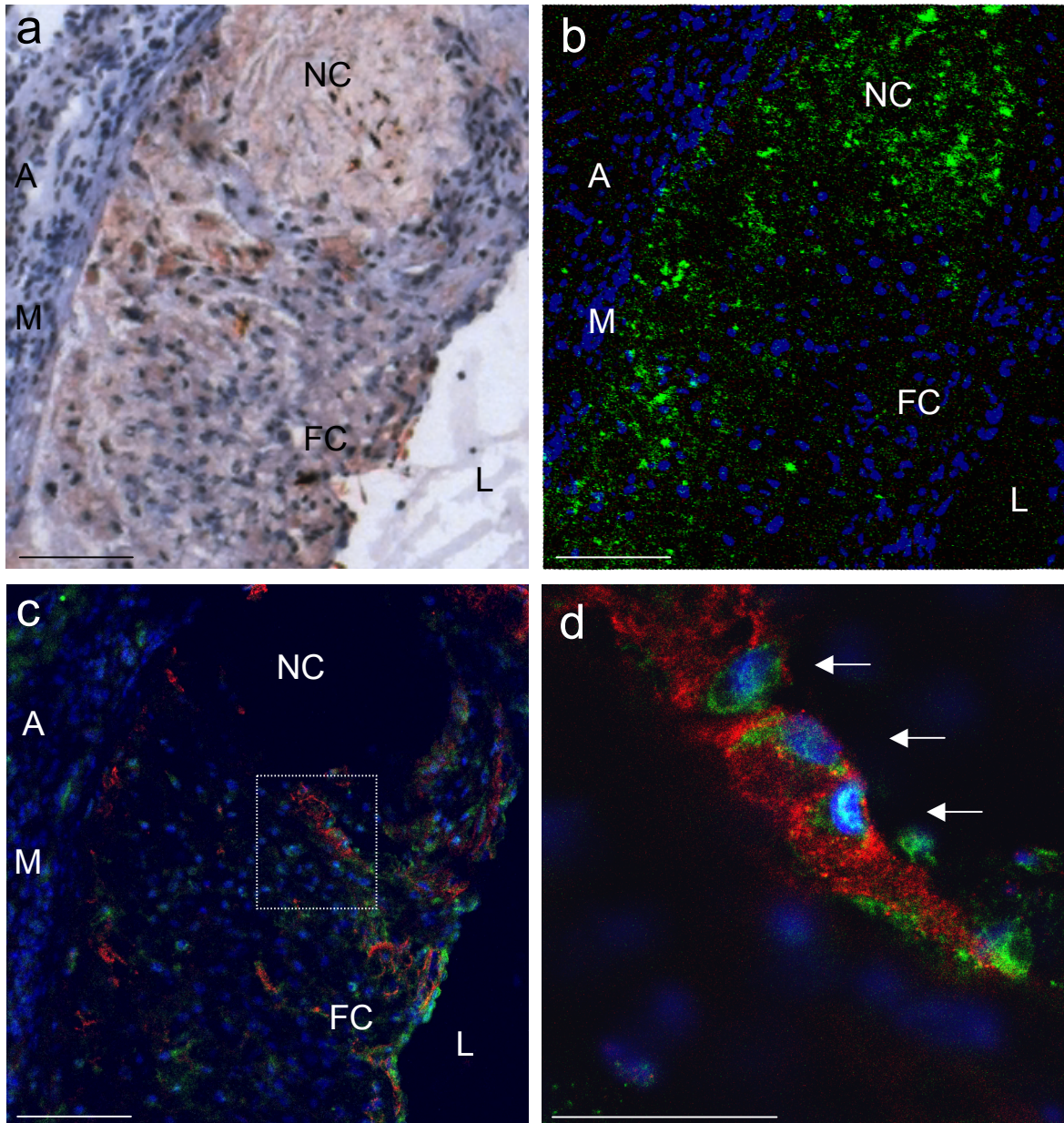


Abbildung 15: Oil Red O- und Calcein-Färbung sowie Doppelmarkierung von Kollagen II und β -Galaktosidase im atherosklerotischen Plaque nach 16 Wochen unter Highfat-Diät. a: Oil Red O-Färbung: Lipide werden rötlich, Zellkerne lila dargestellt. b: Calcein-Färbung: Intakte elastische Fasern der Tunica media und Kalziumphosphat werden grün, Zellkerne mittels DAPI-Markierung blau dargestellt. c/d: Doppelmarkierung von Kollagen II und β -Galaktosidase: Zellkerne = blau, β -Galaktosidase = grün, Kollagen II = rot. d: Vergrößerter Ausschnitt des in c markierten Bereiches: Die Pfeile verweisen auf β -Galaktosidase⁺/Kollagen II⁺-Zellen. Maßstabsleiste: a-c: 100 μ m, d: 50 μ m.

3.2.3. Vergleich von Chimärenanalyse und β -Galaktosidase⁺-Zellen

Diagramm 5 zeigt einen vergleichenden Überblick über die Chimärenanalyse und den Anteil der Kollagen II⁺-Zellen im atherosklerotischen Plaque, die zusätzlich eine Markierung von β -Galaktosidase aufwiesen. Es werden die drei untersuchten Zeitpunkte dargestellt. Nach 8 Wochen unter Highfat-Diät ließen sich keine Kollagen II⁺-Zellen nachweisen, daher wird an dieser Stelle nur der Wert der Chimärenanalyse gezeigt. In der 2. Gruppe, 10 Wochen unter Highfat-Diät, gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Chimären- und der Plaqueanalyse. Die 3. Gruppe, 16 Wochen unter Highfat-Diät, zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied auf.

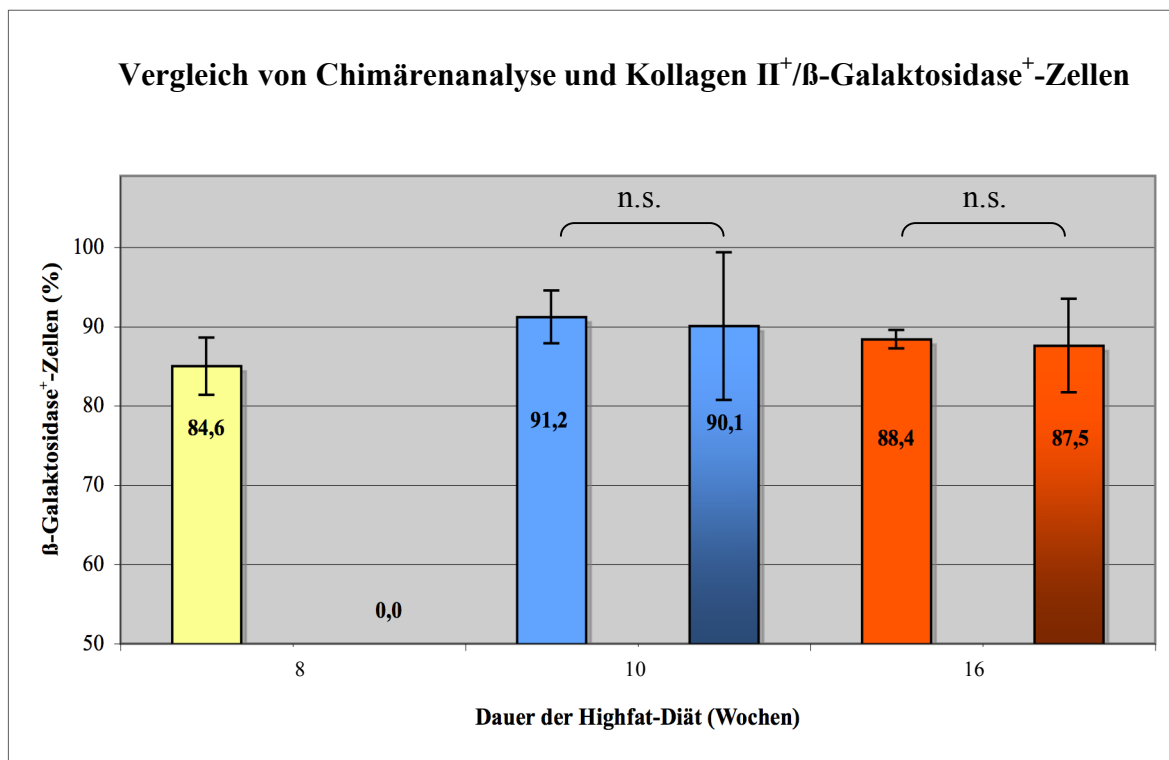


Diagramm 5: Übersicht der im peripheren Blut (Chimärenanalyse) und im atherosklerotischen Plaque (Plaqueanalyse, dunkel hervorgehoben) nachweisbaren β -Galaktosidase⁺-Zellen.

3.2.4. SM-22 α /Sox-9-Doppelmarkierung

Die Tiere der Gruppe 1 zeigten eine ausgeprägte Markierung der Tunica media mit SM-22 α . Es konnten in diesem Stadium keine SM-22 α ⁺- und Sox-9⁺-Zellen innerhalb des atherosklerotischen Plaques identifiziert werden. (Abbildung 16) Im Intermediärstadium der Atherosklerose, 10 Wochen unter Highfat-Diät, zeigte die Tunica media ebenfalls eine deutliche Markierung mit SM-22 α . Die Tiere zeigten eine Markierung einzelner Zellen im Bereich der fibrösen Kappe mit SM-22 α . Sox-9⁺-Zellen traten bei sämtlichen untersuchten Tieren der Gruppe 2 erstmalig auf. Eine Kollokalisierung von SM-22 α und Sox-9 in denselben Zellen konnte nicht nachgewiesen werden. (Abbildung 17) Im Spätstadium beschränkte sich die Markierung mit SM-22 α auf Anteile der Tunica media und der fibrösen Kappe. Dieses Stadium zeigte eine deutliche Progression der Anzahl der Sox-9⁺-Zellen. Auch zu diesem Zeitpunkt konnte keine intrazelluläre Kollokalisierung von Sox-9⁺ und SM-22 α ⁺ festgestellt werden. (Abbildung 18)

3.2.5. Kollagen II/Sox-9-Markierung

Anhand von Serienschnitten konnte gezeigt werden, dass die Kollagen II⁺-chondrozytären Zellen und Sox-9⁺-Zellen in denselben Regionen des atherosklerotischen Plaques vorkommen. (Abbildung 18)

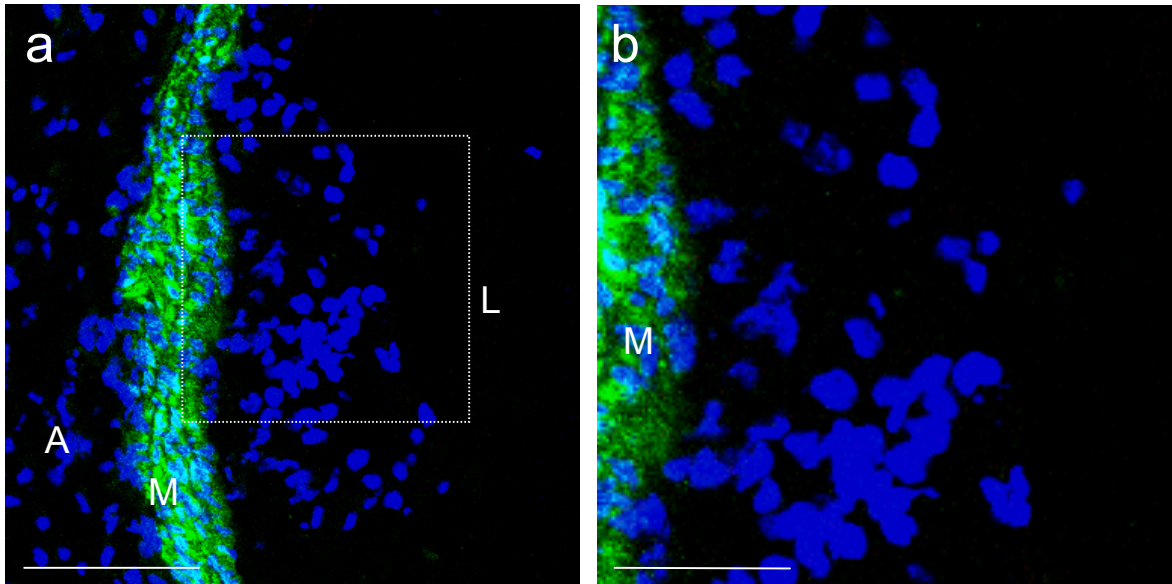


Abbildung 16: Doppelmarkierung von SM-22 α und Sox-9 im atherosklerotischen Plaque nach 8 Wochen unter Highfat-Diät. a/b: Zellkerne = blau, SM-22 α = grün, Sox-9 = rot. b: Vergrößerter Ausschnitt des in a markierten Bereichs. Das gezeigte Areal weist keine positive Markierung für Sox-9 auf. Maßstabsleiste: a: 100 μ m, b: 50 μ m.

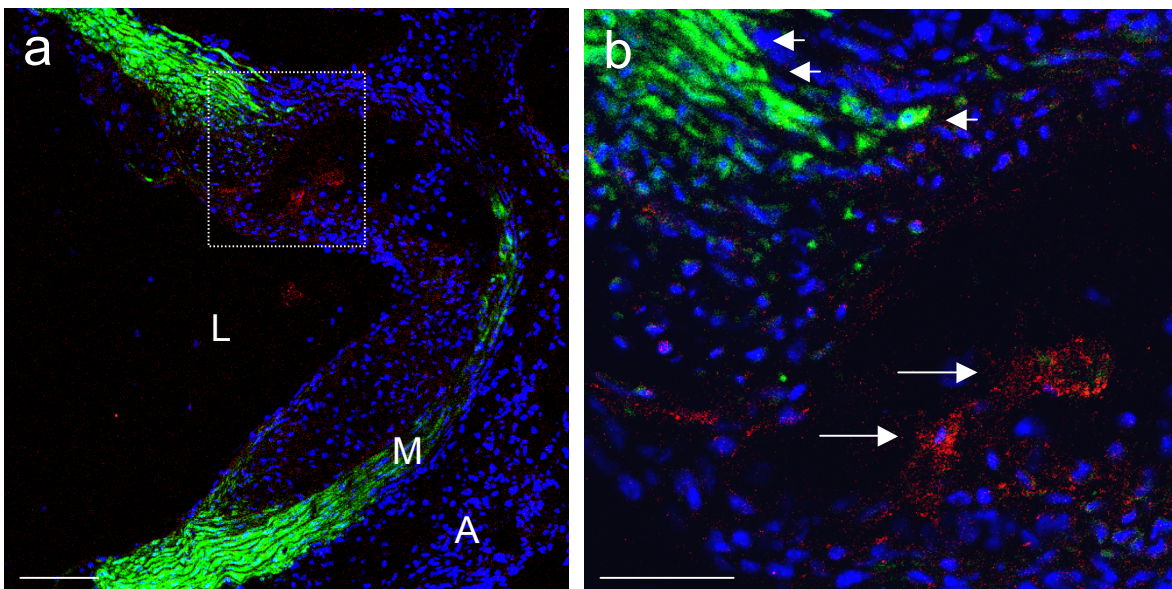


Abbildung 17: Doppelmarkierung von SM-22 α und Sox-9 im atherosklerotischen Plaque nach 10 Wochen unter Highfat-Diät. a/b: Zellkerne = blau, SM-22 α = grün, Sox-9 = rot. b: Vergrößerter Ausschnitt des in a markierten Bereichs. Die langen Pfeile verweisen auf Sox-9⁺-Zellen im Bereich des atherosklerotischen Plaques. Die kurzen Pfeile verweisen auf SM-22 α ⁺-Zellen der Tunica media. Maßstabsleiste: a: 100 μ m, b: 50 μ m.

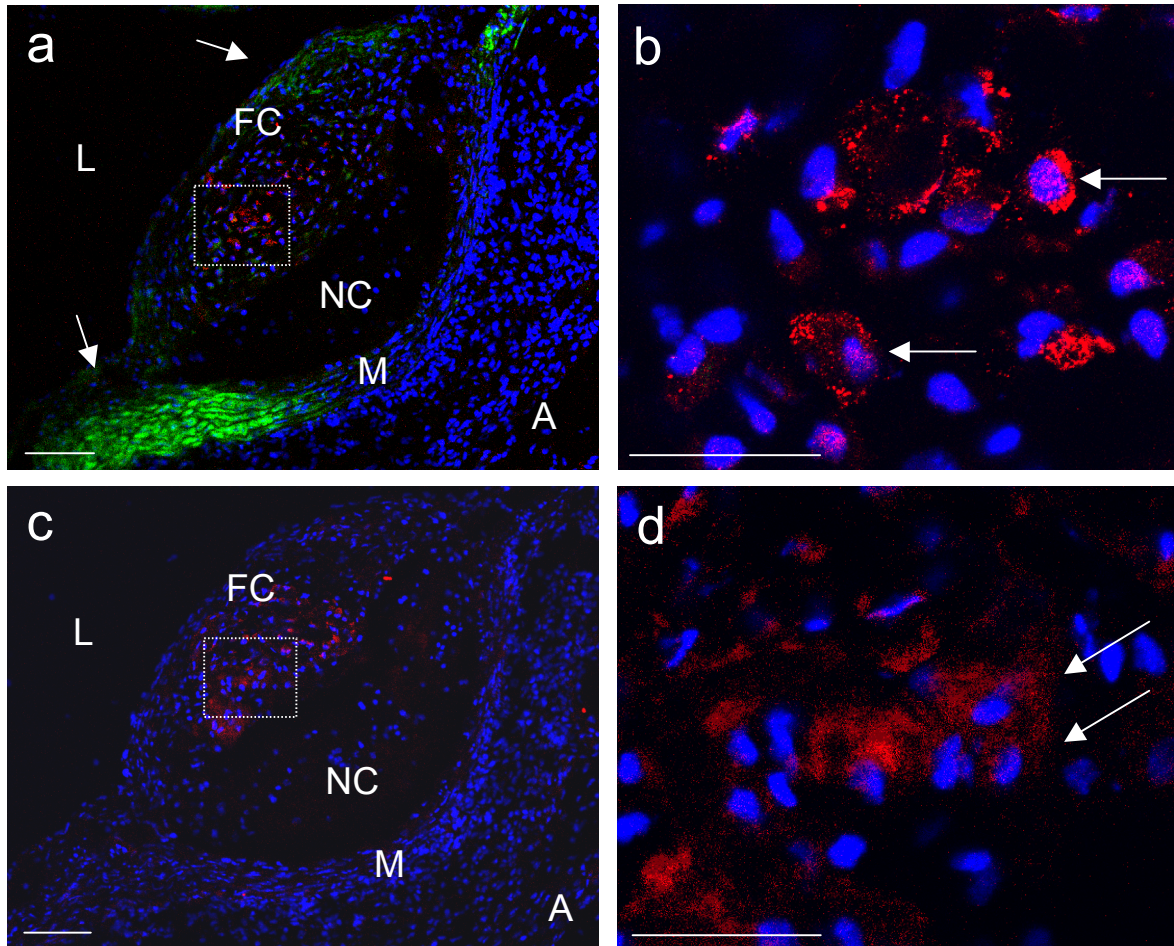


Abbildung 18: Doppelmarkierung von SM-22 α und Sox-9 sowie Markierung von Kollagen II im atherosklerotischen Plaque nach 16 Wochen unter Highfat-Diät. a/b: Zellkerne = blau, SM-22 α = grün, Sox-9 = rot. a: Pfeile weisen auf Sm-22 α positive Bereiche der Tunica media und der fibrösen Kappe. b: Vergrößerter Ausschnitt des in a markierten Bereichs. Die langen Pfeile verweisen auf Sox-9⁺-Zellen im Bereich des atherosklerotischen Plaque. c/d: Serienschnitt direkt neben a/b. Kollagen II-Markierung. Zellkerne = blau, Kollagen II = rot. Die Pfeile verweisen auf Kollagen II⁺-Zellen im Bereich des atherosklerotischen Plaque. Kollagen II und Sox-9 kommen in denselben Arealen des atherosklerotischen Plaque vor. Maßstabsleiste: a/b: 100 μ m, c/d: 50 μ m.

3.2.6. Kollagen II/RANKL-Markierung

Es konnte nachgewiesen werden, dass RANKL⁺- und Kollagen II⁺-chondrozytäre Zellen in aufeinanderfolgenden Serienschnitten in denselben Arealen vorkommen. (Abbildung 19)

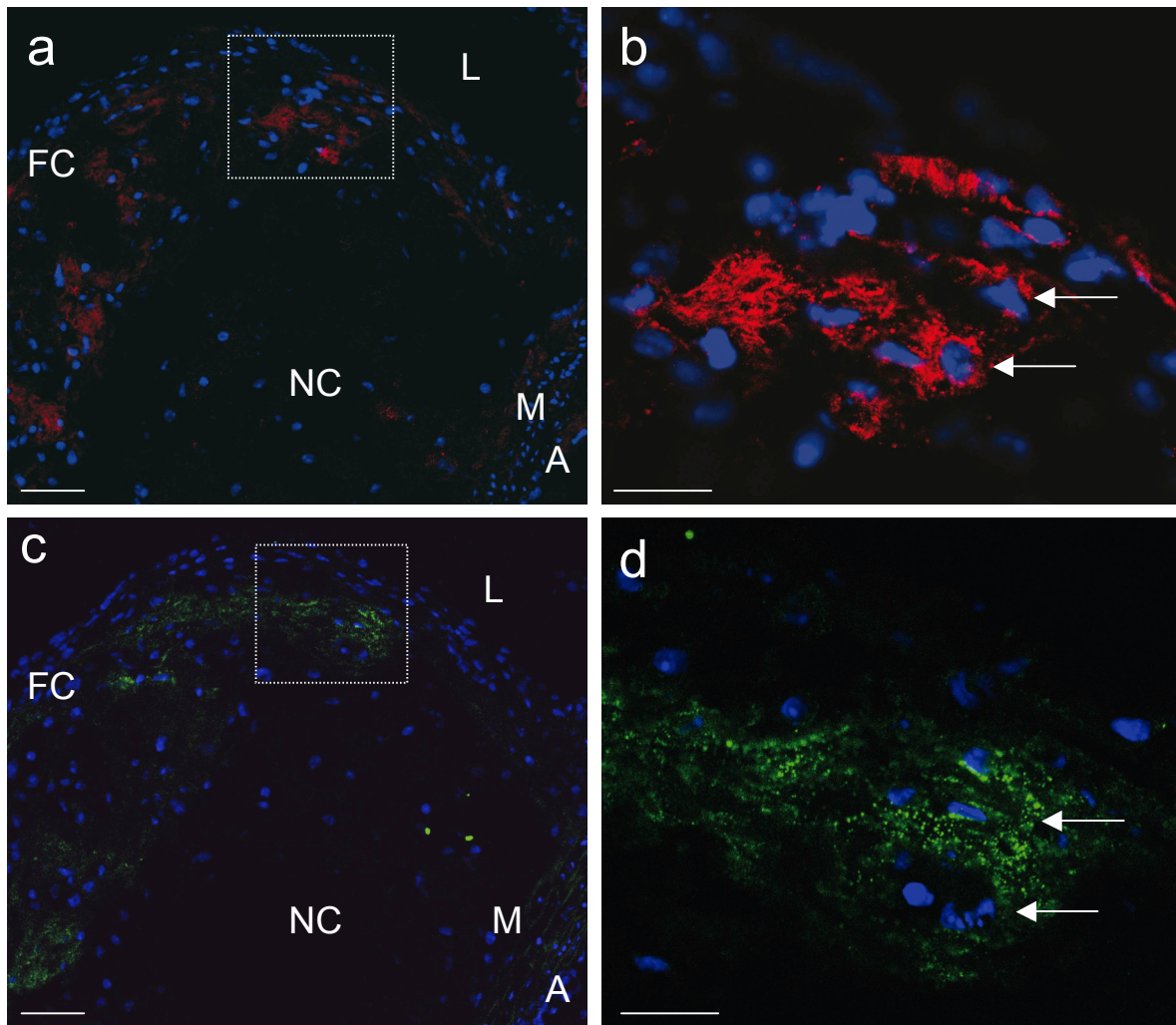


Abbildung 19: Markierung von Kollagen II und RANKL im atherosklerotischen Plaque nach 16 Wochen unter Highfat-Diät. a/b Markierung von Kollagen II. Zellkerne = blau, Kollagen II = rot. b: Vergrößerter Ausschnitt des in a markierten Bereichs. Die Pfeile verweisen auf Kollagen II⁺-Zellen im Bereich des atherosklerotischen Plaque. c: Serienschnitt direkt angrenzend an a. d: Vergrößerter Ausschnitt des in c markierten Bereichs. Die Pfeile verweisen auf RANKL⁺-Zellen im Bereich des Plaque. Kollagen II⁺- und RANKL⁺-Zellen kommen in nebeneinander liegenden Serienschnitten in denselben Arealen vor. Maßstabsleiste: a/c: 50 μ m, b/d: 20 μ m.

3.3. Immunphänotypisierung der chondrozytären Zellen

Zur Bestimmung der hämatopoetischen Zelllinie der chondrozytären Zellen wurden immunhistochemische Doppelmarkierungen von Kollagen II und verschiedenen Progenitorzellen- und Leukozytenoberflächenantigenen durchgeführt.

3.3.1. Kollagen II/CD13-Doppelmarkierung

CD13, ein Antigen auf der Oberfläche von myeloiden Progenitorzellen, wurde verwendet, um zwischen Zellen der lymphoiden und der myeloiden Zellreihe zu unterscheiden. In intermediären Plaqueablagerungen zeigten 61,0 % \pm 6,0 % der chondrozytären Zellen, in fortgeschrittenen 47,4 % \pm 9,2 % eine Kolokalisation mit CD13. (Diagramm 6, Abbildung 20)

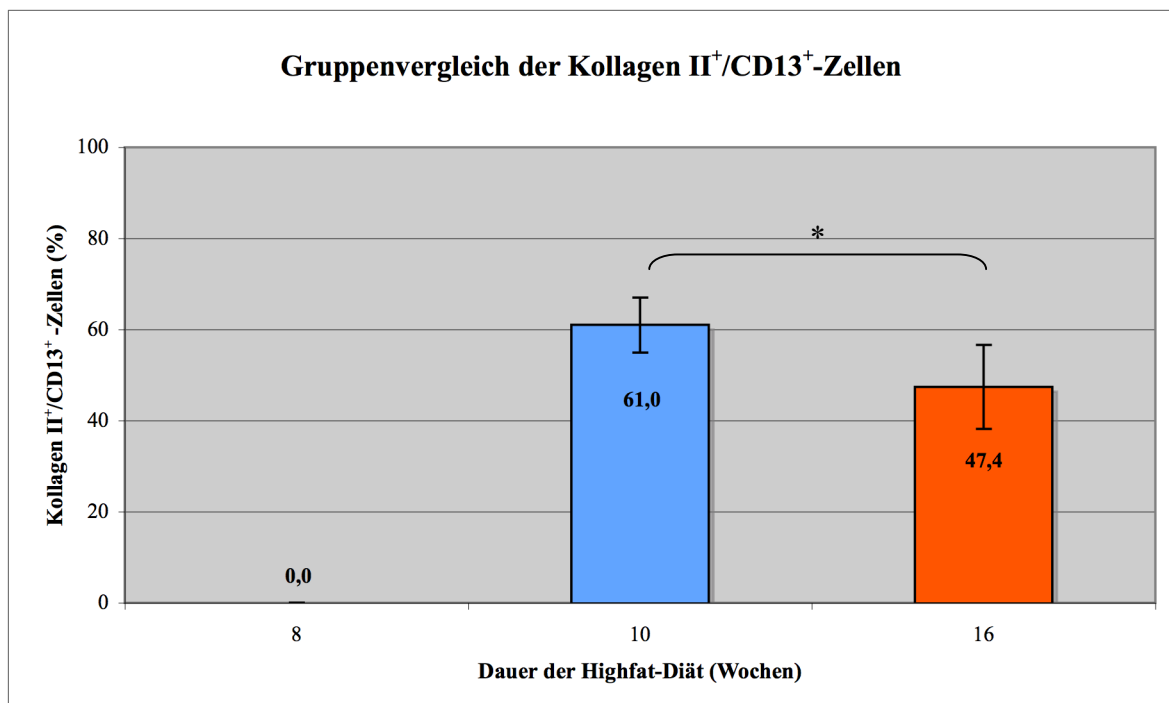


Diagramm 6: Anteil der Kollagen II⁺/CD13⁺-Zellen im untersuchten Plaqueareal zu den verschiedenen Zeitpunkten.

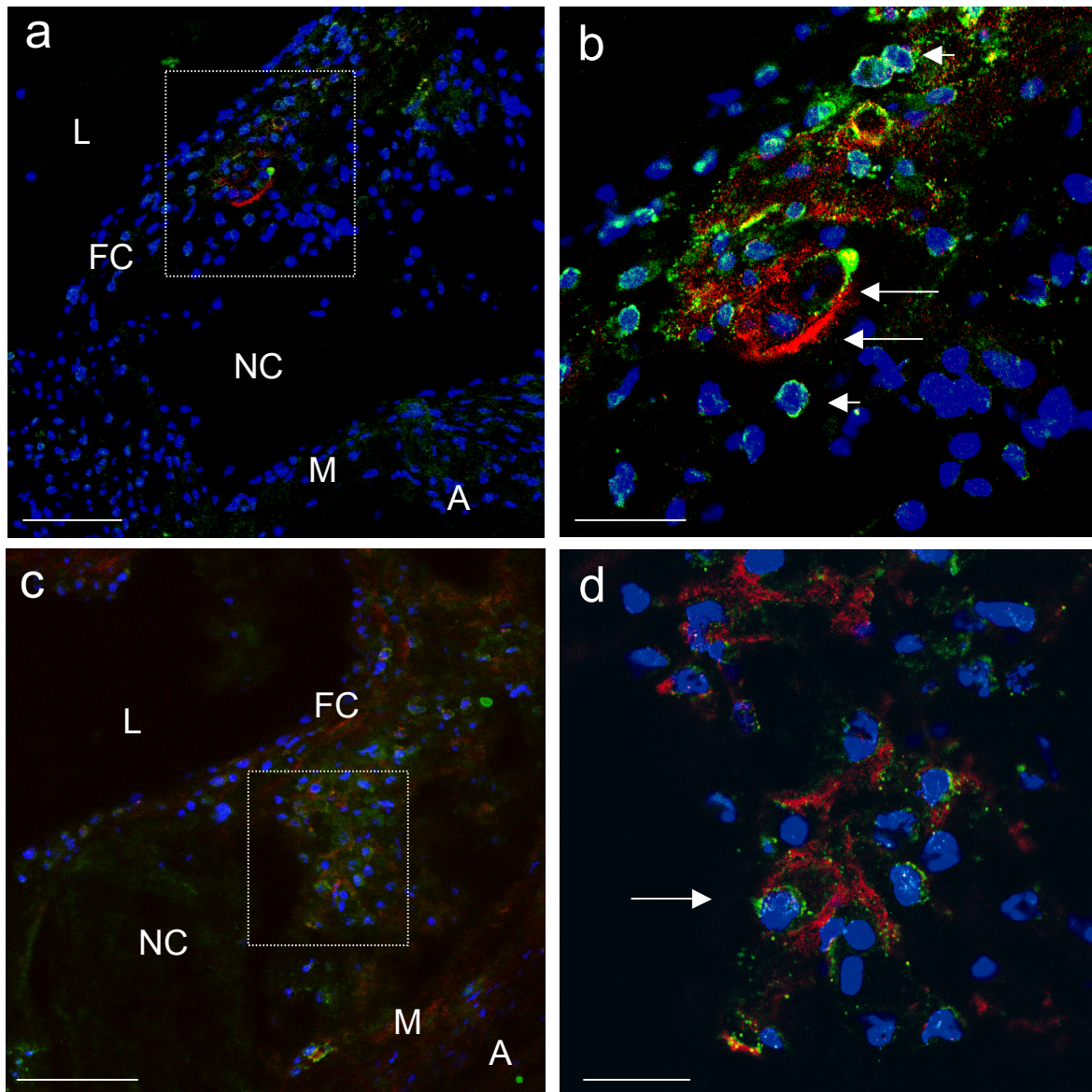


Abbildung 20: Doppelmarkierung von Kollagen II und CD13 im atherosklerotischen Plaque nach 10 (a/b) und 16 Wochen (c/d) unter Highfat-Diät. Zellkerne = blau, CD13 = grün, Kollagen II = rot. b: Vergrößerter Ausschnitt des in a markierten Bereichs. Die langen Pfeile verweisen auf CD13⁺/Kollagen II⁺-Zellen, kurze Pfeile auf CD13⁺/Kollagen II-Zellen im Bereich des atherosklerotischen Plaque. d: Vergrößerter Ausschnitt des in c markierten Bereichs. Der Pfeil verweist auf eine CD13⁺/Kollagen II⁺-Zelle im Bereich des Plaque. Maßstabsleiste: a: 100 µm, b: 50 µm.

3.3.2. Kollagen II/MOMA-2-Doppelmarkierung

Als Marker der monozytären Zellreihe wurden MOMA-2 eingesetzt. Es konnte zu keinem Zeitpunkt eine Kolokalisation von Kollagen II und MOMA-2 identifiziert werden. (Abbildung 21)

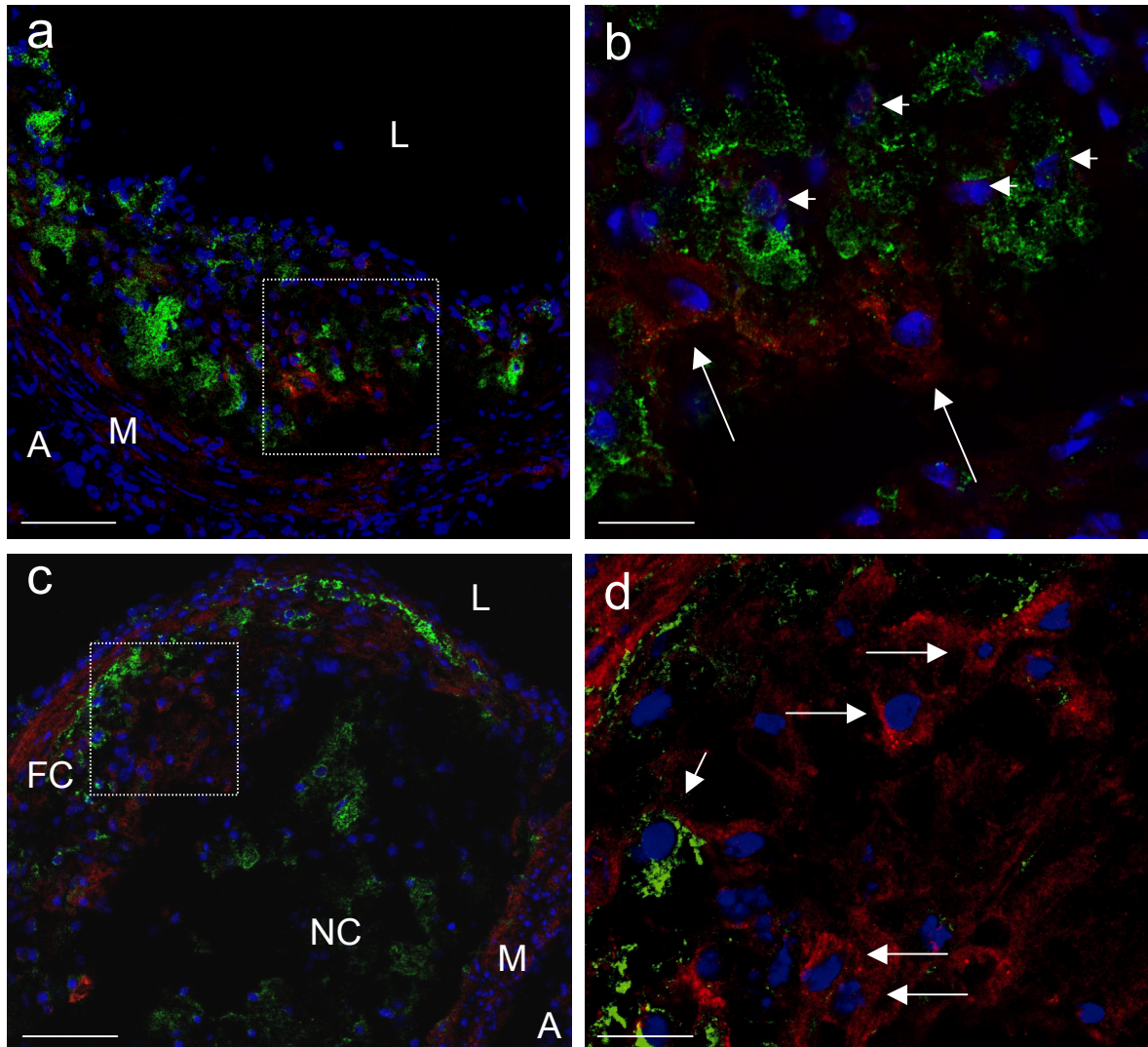


Abbildung 21: Doppelmarkierung von Kollagen II und MOMA-2 im atherosklerotischen Plaque nach 10 (a/b) und 16 Wochen (c/d) unter Highfat-Diät. Zellkerne = blau, MOMA-2 = grün, Kollagen II = rot. b: Vergrößerter Ausschnitt des in a markierten Bereichs. Die langen Pfeile verweisen auf Kollagen II⁺-Zellen, kurze Pfeile auf MOMA-2⁺-Zellen im Bereich des atherosklerotischen Plaque. d: Vergrößerter Ausschnitt des in c markierten Bereichs. Die langen Pfeile verweisen auf Kollagen II⁺-Zellen, der kurze Pfeil auf eine MOMA-2⁺-Zelle im Bereich des Plaque. Eine Kolokalisation von MOMA-2 und Kollagen II konnte nicht festgestellt werden. Maßstabsleiste: a/c: 100 µm, b/d: 20 µm.

3.3.3. Kollagen II/CD115-Doppelmarkierung

Als Marker für monozytäre Progenitorzellen wurde CD115 eingesetzt. Es konnte zu keinem Zeitpunkt eine Kolokalisation von Kollagen II und CD115 identifiziert werden. (Abbildung 22)

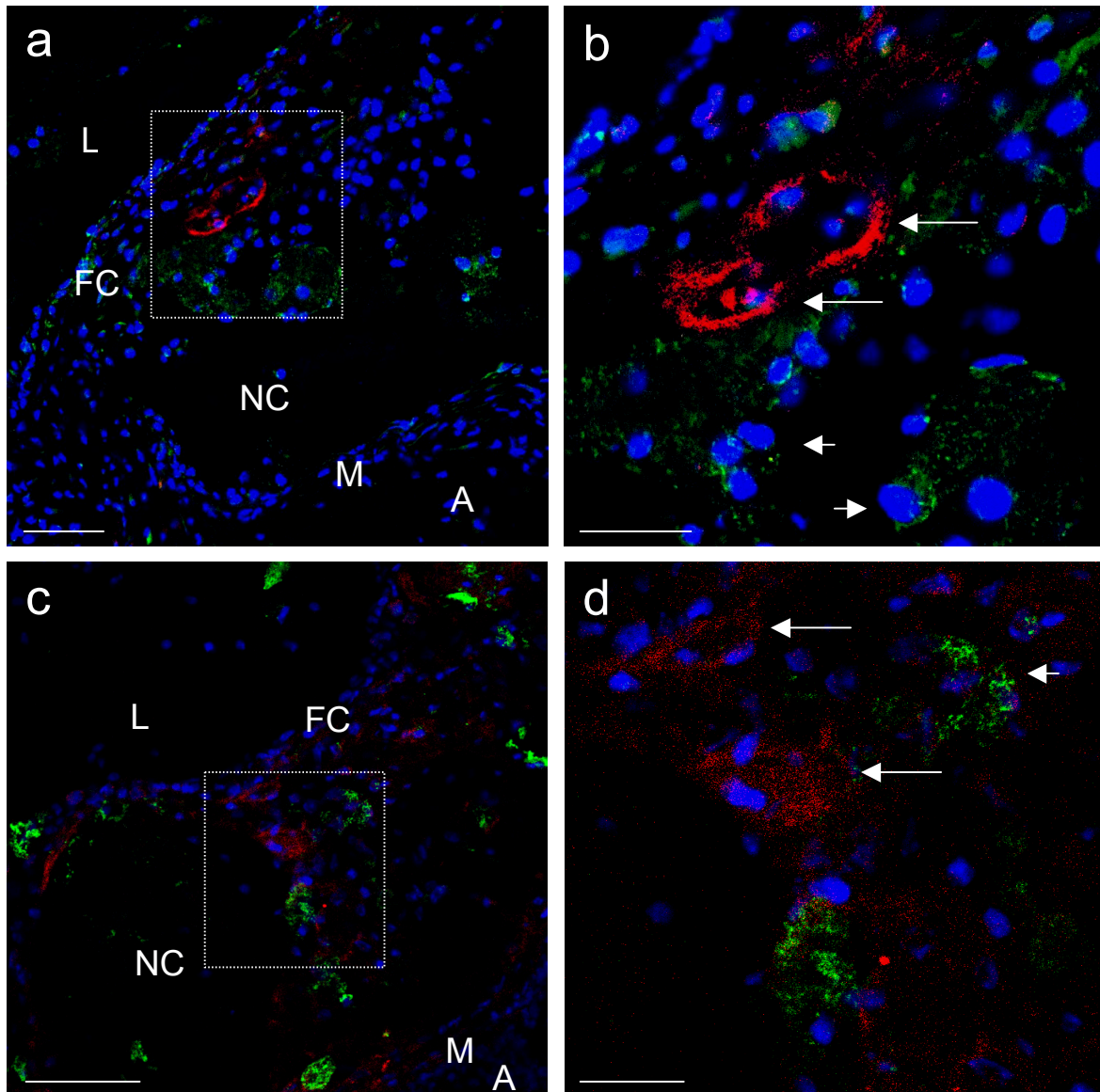


Abbildung 22: Doppelmarkierung von Kollagen II und CD115 im atherosklerotischen Plaque nach 10 (a/b) und 16 Wochen (c/d) unter Highfat-Diät. Zellkerne = blau, CD115 = grün, Kollagen II = rot. b: Vergrößerter Ausschnitt des in a markierten Bereichs. Die langen Pfeile verweisen auf Kollagen II⁺-Zellen, die kurzen Pfeile auf CD115⁺-Zellen im Bereich des atherosklerotischen Plaque. d: Vergrößerter Ausschnitt des in c markierten Bereichs. Die langen Pfeile verweisen auf Kollagen II⁺-Zellen, der kurze Pfeil auf eine CD115⁺-Zelle im Bereich des Plaque. Eine Kolokalisation von CD115 und Kollagen II konnte nicht festgestellt werden. Maßstabsleiste: a/c: 100 μ m, b/d: 50 μ m.

3.3.4. Kollagen II/CD34-Doppelmarkierung

CD34, ein Zellmembranantigen, welches von hämatopoetischen Stammzellen und Endothelzellen exprimiert wird, wurde zur präziseren Differenzierung der myeloiden Progenitorzellen eingesetzt. Im intermediär Stadium zeigten $88,9\% \pm 9,8\%$, im Spätstadium $84,9\% \pm 6,5\%$ der chondrozytären Zellen eine Doppelmarkierung mit CD34 und Kollagen II. (Diagramm 7, Abbildung 23)

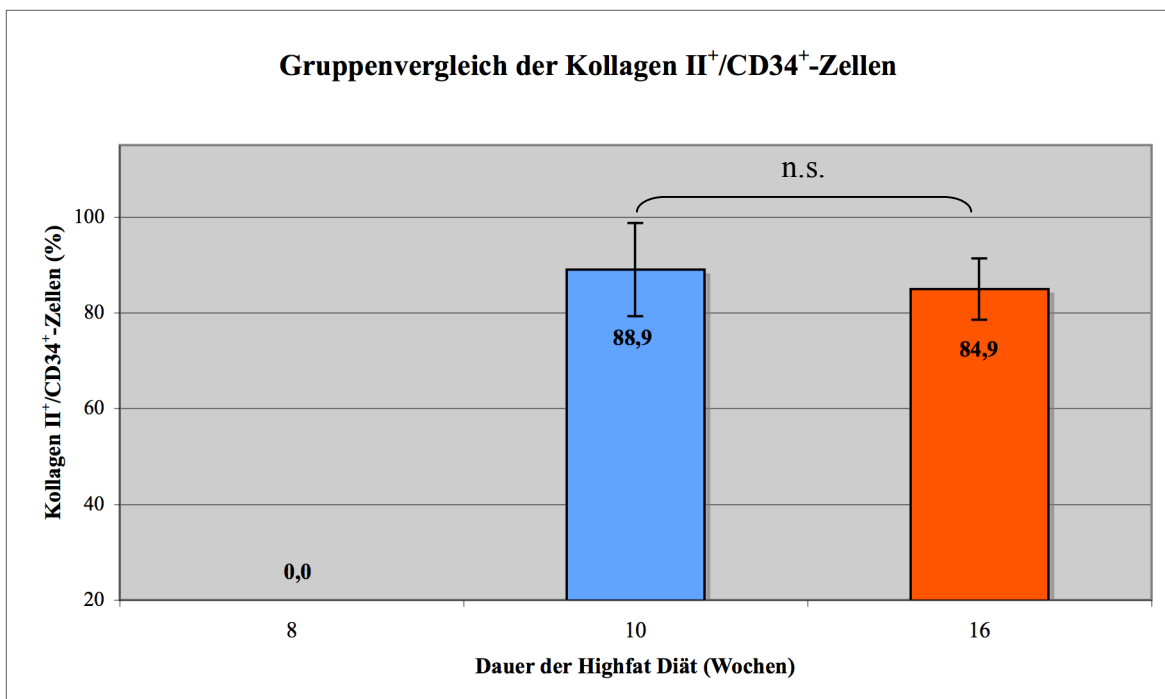


Diagramm 7: Anteil der Kollagen II⁺/CD34⁺-Zellen im untersuchten Plaquareal zu den verschiedenen Zeitpunkten.

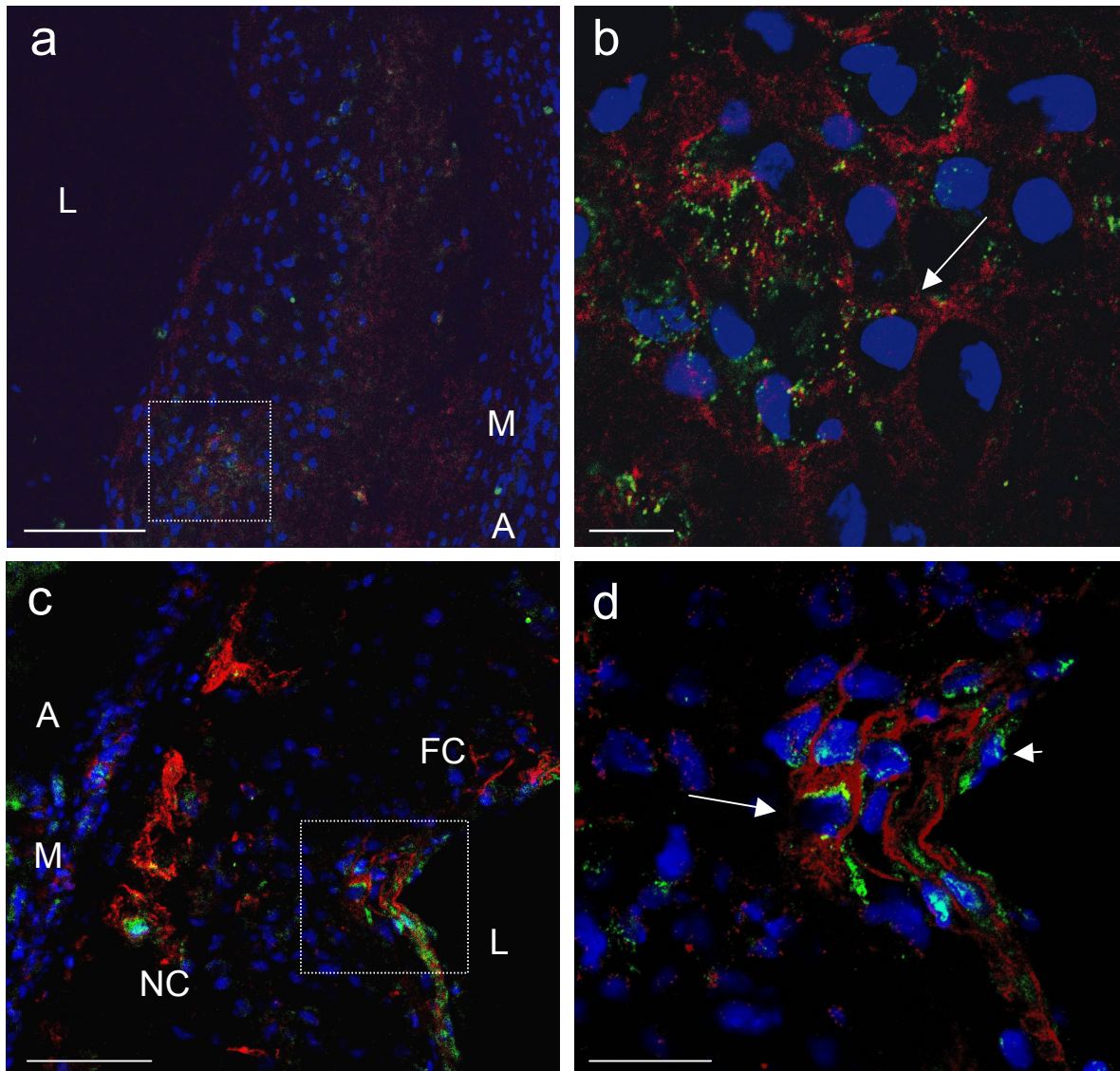


Abbildung 23: Doppelmarkierung von Kollagen II und CD34 im atherosklerotischen Plaque nach 10 (a/b) und 16 Wochen (c/d) unter Highfat-Diät. Zellkerne = blau, CD34 = grün, Kollagen II = rot. b: Vergrößerter Ausschnitt des in a markierten Bereichs. Der lange Pfeil verweist auf eine CD34⁺/Kollagen II⁺-Zelle. d: Vergrößerter Ausschnitt des in c markierten Bereich. Der Pfeil verweist auf eine CD34⁺/Kollagen II⁺-Zelle im Bereich des Plaques. Der kurze Pfeil verweist auf eine CD34⁺/Kollagen II⁻-Zelle, bei der es sich am ehesten um eine Endothelzelle handelt. Maßstabsleiste: a/c: 100 μ m, b/d: 50 μ m.

3.3.5. Übersicht zur Bestimmung von Herkunft und hämatopoetischer Zelllinie der chondrozytären Zellen

Im ersten Schritt wurde die Knochenmarks-Hypothese bestätigt und die lokale Hypothese (glatte Gefäßmuskelzellen und Perizyten) verworfen. Im Zuge der anschließenden Immunphänotypisierung mittels CD13, CD115, MOMA-2 und CD34 wurden Zellen der lymphatischen und monozytären Zellreihe ausgeschlossen und myeloide Progenitorzellen als mögliche Vorläufer der chondrozytären Zellen identifiziert. (Abbildung 24)

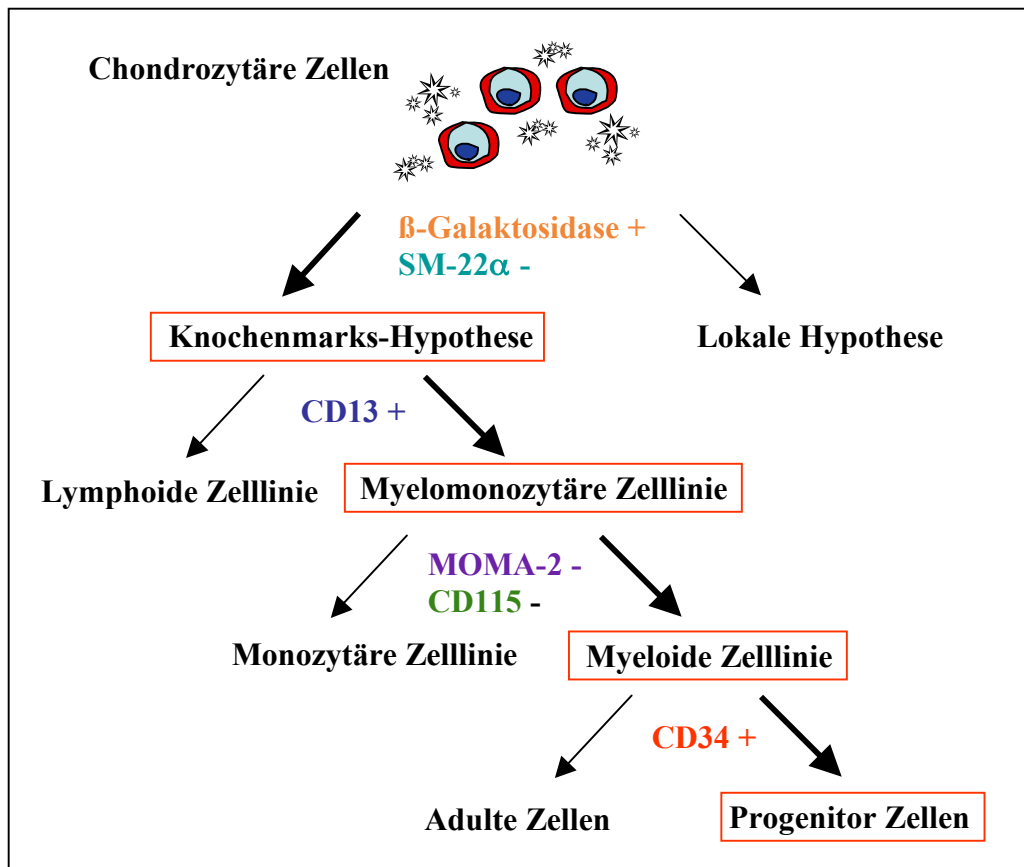


Abbildung 24: Übersicht der Bestimmung von Herkunft und hämatopoetischer Zelllinie der chondrozytären Zellen. Breite Pfeile und rote Kästchen markieren die durch die jeweiligen Marker nachgewiesenen Hypothesen.

4. Diskussion

Die atherosklerotische Intimaverkalkung ist kein passiver Vorgang, sondern wird aktiv von chondrozytären und osteoblastischen Zellen reguliert und angetrieben.¹¹ Die Mechanismen und die Herkunft der ektopischen chondrozytären und osteoblastischen Metaplasie, im Zuge der arteriellen Verkalkung, waren lange Zeit unbekannt. Während der Ursprung der chondrozytären Zellen im Tiermodell der Mediaverkalkung eindeutig nachgewiesen wurde,⁷³ ist die Herkunft der chondrozytären Zellen der atherosklerotischen Intimaverkalkung noch unbekannt und Gegenstand aktueller Diskussionen.¹⁰⁵ Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war, die Herkunft dieser für die Verkalkung essentiellen Zellen zu bestimmen und ihre hämatopoetische Zelllinie genauer zu identifizieren.

4.1. Histologie

Die LDLr^{-/-} Maus ist ein gängiges Tiermodell zur Untersuchung der atherosklerotischen Intimaverkalkung.¹⁰⁶ Unter Standard-Diät bildet sich keine signifikante Atherosklerose aus, während eine Highfat-Diät innerhalb von Wochen eine deutliche Atherosklerose mit Intimaverkalkung im Bereich der Aorta ascendens bedingt.^{90,106} Da eine Highfat-Diät von mehr als 16 Wochen häufig letal verläuft,¹⁰⁶ wurden als Untersuchungszeitpunkte 8, 10 und 16 Wochen unter Highfat-Diät gewählt, um unterschiedliche Stadien der atherosklerotischen Intimaverkalkung untersuchen zu können. Es konnte ein Frühstadium (8 Wochen Highfat-Diät) mit homogenen Fettablagerungen, ein Intermediärstadium (10 Wochen) und ein Spätstadium mit verkalkten Plaqueablagerungen, nekrotischem Kern und fibröser Kappe (16 Wochen) identifiziert werden. Diese Ergebnisse stimmen mit denen anderer Arbeitsgruppen überein.¹⁰⁷ Die Pathogenese der atherosklerotischen Läsionen im LDLr^{-/-} Mausmodell ist mit den Stadien der Plaqueentwicklung beim Menschen vergleichbar. So bilden sich bei Maus und Mensch sowohl fatty streaks, als auch stabile und instabile atherosklerotische Plaqueablagerungen mit anschließender Plaqueruptur aus.¹⁰⁸

4.2. Herkunftsbestimmung der chondrozytären Zellen

4.2.1. Chimärenanalyse

In Folge der myeloablativen Ganzkörperbestrahlung und anschließender Knochenmark-Transplantation handelte es sich bei den Empfängertieren genetisch gesehen um Chimären.¹⁰⁹ Um den Erfolg der Transplantation zu bewerten und weitere Ergebnisse zu validieren, führten wir an den Tieren mittels immunhistochemischer Markierung von β -Galaktosidase eine Chimärenanalyse an Cytospins von heparinisiertem Vollblut durch. Die Analyse ergab für die 10 Wochen Highfat-Diät Tiere einen Mittelwert von 91,20 %. Für die 16 Wochen Highfat-Diät Tiere wurde ein Mittelwert von 88,40 % β -Galaktosidase⁺-Leukozyten im peripheren Blut ermittelt. Das Vorhandensein von β -Galaktosidase⁺-Leukozyten im Blut der Empfängertiere dokumentierte den Erfolg des Austausches der hämatopoetischen Stammzellen, da nur diese die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen und in der Lage sind Hämatopoese zu betreiben.¹¹⁰ Unsere Ergebnisse legen nahe, dass in diesem Mausmodell der Großteil der β -Galaktosidase⁺-Zellen aus dem Knochenmark stammt. Die Ergebnisse der Chimärenanalyse stimmen mit denen anderer Arbeitsgruppen weitgehend überein. Eine Studie von Bentzon et al., in der die Herkunft von glatten Gefäßmuskelzellen im atherosklerotischen Plaque am ApoE^{-/-}-Mausmodell mittels Knochenmark-Transplantation und eGFP-Markierung (enhanced green fluorescent protein) untersucht wurde, kam zu einem Mittelwert der Chimärenanalyse von 93,6 %.¹⁰⁹

4.2.2. Kollagen II/ β -Galaktosidase-Immunhistochemie

In der vorliegenden Studie untersuchten wir den zellulären Ursprung der chondrozytären Metaplasie innerhalb der verkalkten atherosklerotischen Plaqueablagerungen. Die chondrozytären Zellen wurden mittels immunhistochemischem Kollagen II-Nachweis identifiziert und auf eine Doppelmarkierung mit β -Galaktosidase untersucht. Der verwendete Antikörper (Kaninchen Anti-Kollagen II AK NCL-COLL-IIp) ist hochspezifisch für Kollagen II, zeigt keine Kreuzreaktionen mit anderen Kollagen-Typen und wurde bereits in anderen Studien zur Identifizierung chondrozytärer Zellen eingesetzt.^{63,111} Kollagen II wurde als Markerprotein für chondrozytäre Zellen ausgewählt, da es ausschließlich in hyalinem und Faserknorpel vorliegt und während der meisten Stadien der

Chondrogenese von den Chondrozyten exprimiert wird.^{77,112} In unserem Mausmodell ließen sich 8 Wochen nach Beginn der Highfat-Diät in keinem der untersuchten Plaqueareale chondrozytären Zellen nachweisen, während nach 10 Wochen unter Highfat-Diät 7,1 % der Zellen als chondrozytäre Zellen identifiziert werden konnten. Der Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens chondrozytärer Zellen liegt in unserem Mausmodell folglich zwischen der 8. und 10. Woche nach Beginn der Highfat-Diät. Nach 16 Wochen Highfat-Diät konnte ein signifikanter Anstieg der chondrozytären Zellen auf 14,1 % der Gesamtzellzahl nachgewiesen werden. 90,08 % (Gruppe 2) bzw. 87,59 % der chondrozytären Zellen (Gruppe 3) wiesen eine Doppelmarkierung für Kollagen II und β -Galaktosidase auf. In beiden Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Chimären- und Plaqueanalyse festgestellt werden. Die Ergebnisse legen nahe, dass die chondrozytären Zellen in unserem Tiermodell aus dem Knochenmark stammen.

4.3. Charakterisierung der chondrozytären Zellen

4.3.1. Kollagen II/Sox-9- und SM-22 α /Sox-9-Immunhistochemie

Sox-9 ist ein für die Chondrogenese wichtiger intrazellulär exprimierter Transkriptionsfaktor und gilt als Frühmarker für die Chondrogenese.⁷⁷ Beim Menschen führen heterozygote Mutationen von Sox-9 auf Chromosom 17 zu campomeler Dysplasie, einer Erkrankung mit schweren Skelettfehlbildungen, die sich bereits in der frühen Jugend manifestieren. Bi et al. postulierten, dass Sox-9 in der Frühphase der Chondrogenese, während der Kondensation des Mesenchyms eine entscheidende Rolle einnimmt, da die Skelettfehlbildungen bereits in utero beobachtet werden konnten.¹¹³ Anhand von aufeinanderfolgenden Serienschnitten konnte gezeigt werden, dass die von uns untersuchten chondrozytären Zellen neben Kollagen II auch Sox-9 exprimieren. Die Kolokalisation der beiden Marker deutet daraufhin, dass es sich bei den hier untersuchten chondrozytären Zellen um juvenile Chondrozyten handelt, die noch nicht das Stadium der Sox-9-prähyperthrophen Chondrozyten erreicht haben. Die zusätzliche Markierung mit dem Stammzellmarker CD34 könnte darauf hinweisen, dass es sich hierbei um Frühstadien der Chondrogenese handelt.

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden häufig als Ursprungszellen der arteriellen chondrozytären Metaplasie postuliert.^{11,62} Dass chondrozytäre Zellen der Mediaverkalkung im Mausmodell aus glatten Gefäßmuskelzellen hervorgehen, konnten Speer et al. 2009 in

einer Studie an MGP^{-/-} Mäusen nachweisen.⁷³ Um glatte Gefäßmuskelzellen als Ursprungszellen der chondrozytären Metaplasie der Intimaverkalkung in unserem Modell auszuschließen, führten wir eine Doppelmarkierung mit Sox-9 und dem Gefäßmuskelzellmarker SM-22 α durch. Dabei sollte ausgeschlossen werden, dass glatte Gefäßmuskelzellen im Verlauf der Differenzierung zu chondrozytären Zellen die Fähigkeit verlieren, SM-22 α zu exprimieren und somit nicht als glatte Gefäßmuskelzellen identifizierbar wären. Aus diesem Grund wurde bei dieser Doppelmarkierung Sox-9, als Frühmarker der Chondrogenese, gegenüber Kollagen II der Vorzug gegeben. In keinem Fall konnte eine Kollokalisierung von Sox-9 und SM-22 α innerhalb derselben Zelle festgestellt werden. Rattazzi et al. führten ebenfalls eine Untersuchung der chondrozytären Zellen auf eine Kollokalisierung mit einem Marker für glatte Gefäßmuskelzellen (SM-Actin) bei ApoE^{-/-} Mäusen durch. Wie in unserer Studie war die Markierung auf die Tunica media und die fibröse Kappe beschränkt, und auch eine Kollokalisierung von chondrozytären Zellen und SM-Actin wurde nicht nachgewiesen. Diese Untersuchungen deuten daraufhin, dass bei der atherosklerotischen Intimaverkalkung, im Gegensatz zur Mediaverkalkung, glatte Gefäßmuskelzellen nicht die Quelle der chondrozytären Zellen darstellen.

Die vorliegende Studie verzichtet darauf, Perizyten als Ursprungszellen der chondrozytären Metaplasie auszuschließen, da die Ergebnisse der Knochenmark-Transplantation valide Hinweise auf die Knochenmarkstämmigkeit der chondrozytären Zellen zeigen.

4.3.2. Kollagen II/RANKL-Immunhistochemie

Interessanterweise kommen arterielle Gefäßverkalkung und Osteoporose häufig gemeinsam vor und teilen sich einige der wichtigsten Risikofaktoren (z.B. Alter, chronische Entzündungen, chronische Niereninsuffizienz).¹¹⁴ Patienten mit Osteoporose haben eine höhere Inzidenz für arterielle Gefäßverkalkung als Patienten ohne diese Erkrankung.¹¹⁵ Eine Studie von Hofbauer et al. konnte eine positive Korrelation zwischen Progression der arteriellen Verkalkung und Osteoporose bei postmenopausalen Frauen nachweisen.¹¹⁶ Ursächlich für diese Beobachtung ist die verminderte Östrogenkonzentration, da dieses als natürlicher Suppressor von RANKL die Osteoklastendifferenzierung nicht ausreichend inhibiert. OPG ist ein weiterer natürlicher Suppressor von RANKL und Teil des RANK/RANKL/OPG-Systems. Morony et al. konnten im LDLr^{-/-} Mausmodell zeigen, dass eine Behandlung mit rekombinantem OPG zu einer deutlich geringer ausgeprägten Intimaverkalkung führt. Als Hypothese für dieses Ergebnis

wurde eine Inhibition von RANKL durch OPG postuliert.⁷⁹ RANKL wird bevorzugt in Knochengewebe und von myelomonozytären Zellen exprimiert. Im atherosklerotischen Plaque wurde es bereits nachgewiesen,⁶³ während es in unverletzten Gefäßwänden nicht nachweisbar war.⁷⁹ Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass RANKL eine wichtige Rolle beim Überleben und bei der Differenzierung von myeloiden Leukozyten spielt.^{117,118} Wir konnten zeigen, dass RANKL in unserem Mausmodell von chondrozytären Zellen exprimiert wird. Wir postulieren daher, dass RANKL ein wichtiger Faktor für die Transdifferenzierung von myeloiden Vorläuferzellen zu chondrozytären Zellen sein könnte. Dies könnte die Inhibition der Verkalkung unter OPG-Behandlung erklären.

4.4. Immunphänotypisierung der chondrozytären Zellen

Die Hämatopoese ist ein hochgradig regulierter Prozess, in dessen Verlauf ein Stammzellenpool mit Selbsterneuerungsfähigkeit sich in verschiedene Zelllinien aufspaltet und sämtliche Zellen des Blutes generiert.¹⁰³ Die einzelnen Zelltypen dieses komplexen Systems zeichnen sich durch unterschiedliche Leukozytendifferenzierungsantigene, den sogenannten cluster of differentiation (CD) aus. Die Immunphänotypisierung wird eingesetzt um zwischen den verschiedenen Leukozytenpopulationen zu unterscheiden und hat eine besondere Bedeutung bei der Klassifikation von Leukämien. Mit Hilfe markierter monoklonaler Antikörper wird das Antigenexpressionsmuster auf der Zelloberfläche der Leukozyten ermittelt. Dieses Muster lässt Rückschlüsse über Funktionen, den Reifungszustand und die zugehörige Zelllinie der jeweiligen Zelle zu.

Mit dem Nachweis der Knochenmarksstämmigkeit der chondrozytären Zellen stellte sich die Frage nach der hämatopoetischen Zelllinie, der diese Zellen entstammen. Um die Vielzahl der möglichen Kandidaten einzugrenzen, wurden die chondrozytären Zellen auf eine Kollokalisierung von Kollagen II mit verschiedenen Leukozytenoberflächenmarkern untersucht.

Die Zellen der Hämatopoese werden grundsätzlich in Zellen der myeloiden und Zellen der lymphoiden Reihe unterschieden. Um zwischen diesen Zellreihen zu differenzieren, wurde mit Anti-CD13/Aminopeptidase N markiert. Dieses Enzym ist ein Marker für myeloide Progenitorzellen.¹¹⁹ In der vorliegenden Untersuchung konnte anhand einer immunhistochemischen Kollagen II/CD13-Doppelmarkierung gezeigt werden, dass chondrozytäre Zellen CD13 exprimieren. Der Anteil der doppelt positiven Zellen zeigte

eine signifikante Abnahme von 61,0 % bei den Tieren der Gruppe 2 auf 47,4 % bei den Tieren der Gruppe 3. Dieses Resultat lässt die Überlegung zu, dass die chondrozytären Zellen im Laufe ihrer Differenzierung die Fähigkeit verlieren, CD13 zu exprimieren. Der positive Nachweis für CD13 spricht dafür, dass die chondrozytären Zellen myeloiden Ursprungs sind.

Makrophagen nehmen eine entscheidende Rolle im atherosklerotischen Plaque ein und stellen, abhängig vom Stadium der Atherosklerose, einen Großteil der Zellen dar.⁵² In unserem Modell nahmen MOMA-2⁺-Zellen je nach Stadium der Atherosklerose einen Anteil zwischen 85 % und 50 % der Gesamtzellzahl ein. Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen anderer Arbeitgruppen.⁶³ In vitro-Studien haben gezeigt, dass humane Monozyten sich zu adulten pluripotenten Blutstammzellen (PCMO = programmable cells of monocytic origin) dedifferenzieren lassen. Diese wiederum besitzen die Fähigkeit, sich zu chondrozytären Zellen zu differenzieren. Im Prinzip liegt hier also eine Transdifferenzierung von adulten Monozyten zu chondrozytären Zellen vor.⁶⁸ Dieses Erkenntnis, verbunden mit ihrem hohen Anteil an der Gesamtzellzahl im atherosklerotischen Plaque, lässt myeloide Monozyten, Makrophagen und ihre Progenitorzellen als mögliche Vorläufer der chondrozytären Zellen in Frage kommen. Zur Beantwortung dieser Fragestellung in vivo führten wir eine immunhistochemische Doppelmarkierung von Kollagen II und MOMA-2 bzw. Kollagen II und CD115 durch. Unsere Ergebnisse schließen Monozyten und Makrophagen als potentielle Vorläufer der chondrozytären Zellen aus, da immunhistochemisch keine Kolokalisation von MOMA-2 und Kollagen II nachweisbar war. Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen an ApoE^{-/-} Mäusen überein. Die in diesem Mausmodell untersuchten chondrozytären Zellen wiesen keine Kolokalisation mit dem Makrophagenmarker MAC-2 auf.⁶³ In dieser Studie wurden allerdings Serienschnitte und low-resolution Mikroskopie eingesetzt. Mit Hilfe dieser Techniken ist es nicht möglich einzelne Zellen auf eine Markierung zu untersuchen, da falsch positive und falsch negative Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden können.¹²⁰ Die in der vorliegenden Studie durchgeführte Untersuchung beruhte auf high-resolution konfokaler Laserscanning Mikroskopie, wodurch eine Doppelmarkierung im selben Präparat präzise nachgewiesen oder ausgeschlossen werden kann. Monozytäre Vorläuferzellen exprimieren weder MAC-2 noch MOMA-2. Um diese Zellen als Quelle der chondrozytären Metaplasie auszuschließen, wurden die chondrozytären Zellen daher auf eine Kolokalisation von Kollagen II mit CD115, einem Marker für Promonozyten, untersucht. In keinem Fall konnte eine Markierung nachgewiesen, und die Zellen der

monozytären Zellreihe somit als mögliche Vorläuferzellen der chondrozytären Zellen ausgeschlossen werden.

Die Untersuchung der chondrozytären Zellen auf eine Markierung mit MOMA-2, CD115 und CD13 lieferte Hinweise darauf, dass es sich bei den Progenitorzellen für chondrozytäre Zellen um myeloide Progenitorzellen handelt und die monozytäre Zellreihe ausgeschlossen werden kann.

Mit Hilfe des Stammzellmarkers CD34 sollte differenziert werden, ob es sich bei den chondrozytären Zellen um frühe (CD34⁺) oder späte (CD34⁻) Formen handelte. Es konnte gezeigt werden, dass die chondrozytären Zellen im Plaque der Gruppe 2 zu 88,9 % und im Plaque der Gruppe 3 zu 84,9 % eine positive Markierung für CD34 zeigten. Eine signifikante Veränderung von Gruppe 2 und 3 konnte nicht festgestellt werden.

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass knochenmarkstämmige, myeloide CD34⁺/CD13⁻-Progenitorzellen aktiv den Plaque infiltrieren und zu chondrozytären Zellen differenzieren.

4.4.1. Stammzellen und atherosklerotische Intimaverkalkung

Neuere Untersuchungen betonten die zentrale Rolle von hämatopoetischen Stammzellen in der regenerativen Medizin sowie ihre möglichen Therapieoptionen in vielfältigen Anwendungsgebieten.¹²¹ So werden mesenchymale Stammzellen experimentell bereits erfolgreich zur Therapie von Knorpelschäden eingesetzt.¹²² In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass hämatopoetische Stammzellen in der Lage sind, sich zu chondrozytären Zellen zu differenzieren.^{68,123} Einerseits ist die Ausprägung der Verkalkung mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert.^{23,24} Andererseits konnte gezeigt werden, dass instabile Angina Pectoris und Herzinfarkt mit einer vergleichsweise geringeren Kalziumphosphatkonzentration als stabile Angina pectoris assoziiert sind.^{53,124} Diese Aussagen stimmen mit der Beobachtung überein, dass ein hohes Maß an Verkalkung den atherosklerotischen Plaque stabilisieren,^{22,125} und eine Ruptur verhindern kann.¹²⁶

Von chronischen Prozessen wie Tuberkulose, dem entzündlichen Infiltrat um Fremdkörper und Parasiten und von malignen Tumoren ist bekannt, dass diese vom Immunsystem mittels Verkalkung von gesundem Gewebe abgrenzt werden.¹²⁷ Bei der Gefäßverkalkung scheint ein ähnlicher Fall vorzuliegen.¹²⁵ Im Falle der Tuberkulose sind keine chondrozytäre Zellen involviert. Diese benötigen für ihre Differenzierung in vivo und in vitro hydrostatischen Druck, Kompression, Scherkräfte und ein hypoxisches Milieu.¹²⁸

Diese Tatsache erklärt das Auftreten chondrozytärer Zellen bei atherosklerotischer Intimaverkalkung im Gegensatz zur Tuberkulose, da das Milieu im atherosklerotischen Plaque mit Hypoxie und mechanischem Stress genau diesen Anforderungen entspricht.

Mikrotraumata im Knorpelgewebe initiieren die Proliferation und Clusterbildung von Chondrozyten und regen sie zur Bildung extrazellulärer Matrix und Kollagen II an.¹²⁹ Größere Defekte werden von mesenchymalen Stammzellen des subchondralen Knochenmarks geheilt.¹³⁰ Diese multipotenten Zellen infiltrieren den defekten Bereich und differenzieren zu chondrozytären Zellen.¹³¹ Es gibt jedoch keine definitiven Marker für diese multipotenten mesenchymalen Stammzellen. Eine fehlende Expression von CD34, CD45, CD14 und CD11b wurden zu ihrer Bestimmung herangezogen.¹³² Diese Eigenschaft der mesenchymalen Zellen lässt die Überlegung zu, dass die CD34⁺ chondrozytären Zellen in unserem Mausmodell eher einen myeloiden als mesenchymalen Ursprung haben.

4.5. Zukünftige Ansätze

In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den chondrozytären Zellen der atherosklerotischen Intimaverkalkung im Gegensatz zur Mediaverkalkung um knochenmarkstämmige, myeloide Progenitorzellen handelt. Diese Erkenntnis lässt verschiedene Überlegungen zur anti-atherosklerotischen Therapie zu.

Ein möglicher Therapieansatz ist die Suche nach den Faktoren der Chemoattraktion der sich zu chondrozytären Zellen differenzierenden Progenitorzellen. Nach Verletzung des Endothels, im Rahmen des chronisch entzündlichen Prozesses, kommt es zu einer lokalen Freisetzung von Chemokinen (v.a. CXC, CC, CX3C) aus verletzten Endothelzellen und/oder aktivierten Thrombozyten.⁴³ Diese Chemokine führen zu einer Chemoattraktion von hämatopoetischen Progenitorzellen, die auf ihrer Oberfläche die korrespondierenden Chemokin-Rezeptoren (insbesondere CXCR2 und CXCR4) exprimieren. CXCR2 wird auf der Oberfläche von Zellen des Immunsystems exprimiert. Dieser Rezeptor kann durch die Chemokine CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL7 und CXCL8 stimuliert werden, und vermittelt seine Effekte durch Aktivierung einer intrazellulären Signaltransduktionskaskade. CXCR2 spielt eine entscheidende Rolle im Homing von endothelialen Progenitorzellen zu Orten arterieller Verletzung und Regeneration.⁴² CXCR4 ist ein Rezeptorprotein aus der Familie der Chemokinrezeptoren, und wird insbesondere auf hämatopoetischen Stammzellen exprimiert.¹³³ Dieser Rezeptor wird durch das

Chemokin CXCL12, seinem einzigen bekannten physiologischen Liganden, aktiviert CXCR4 spielt eine Schlüsselrolle bei der Mobilisierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und der nachfolgenden zielgerichteten Wanderung der Stammzellen an ihre Zielorte. Die Hauptfunktion von CXCR4 ist die Steuerung hämatopoetischer Progenitorzellen zu den Expressionsorten von CXCL12.¹³⁴ Sowohl für CXCR4 als auch für CXCR2 wurden bereits spezifische Inhibitoren identifiziert. CTCE-9908, ein CXCL12-Analogon bindet kompetitiv an CXCR4, hemmt die Migration von CXCR4 exprimierenden Zellen, und wurde experimentell bereits erfolgreich in der Tumorthherapie eingesetzt.^{135,136} Auch für CXCR2 wurde mit SB225002 bereits ein selektiver Inhibitor identifiziert.¹³⁷ In zukünftigen Arbeiten mit diesem Mausmodell wäre es daher interessant nachzuweisen, ob chondrozytäre Zellen CXCR2 und/oder CXCR4 exprimieren. Mit Hilfe der spezifischen Inhibitoren wäre im nächsten Schritt eine Inhibition der Migration der knochenmarkstämmigen myeloiden Progenitorzellen und somit eine Hemmung der atherosklerotischen Intimaverkalkung möglich.

Ein weiterer Ansatz für zukünftige anti-atherosklerotische Therapieoptionen stellt das RANK/RANKL/OPG-System dar.⁷⁹ Wir konnten zeigen, dass chondrozytäre Zellen RANKL exprimieren, und somit eine selektive Hemmung dieser Zellen durch OPG möglich sein könnte.

Letztendlich gilt es, die in dieser Studie am Mausmodell gewonnenen Erkenntnisse auch auf den Menschen zu übertragen. Ein interessanter Ansatz zum Nachweis der Knochenmarkstämmigkeit von chondrozytären und osteoblastischen Zellen wäre z.B. atherosklerotische Plaquareale von weiblichen Patienten nach einer therapeutischen Knochenmark-Transplantation von männlichen Spendern zu untersuchen. Mit Hilfe des Y-Chromosoms wäre somit ein spezifischer Marker für Knochenmarkszellen gegeben.

5. Zusammenfassung

Die atherosklerotische Intimaverkalkung ist eine der weltweit häufigsten Todesursachen.³ Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Verkalkung des atherosklerotischen Plaque nicht passiv abläuft, sondern von chondrozytären Zellen aktiv vorangetrieben und reguliert wird.¹¹ Die Herkunft dieser für die Verkalkungsprozesse essentiellen Zellen ist unbekannt⁶² und sollte im Zuge der vorliegenden Arbeit am Mausmodell ermittelt werden. Hierzu wurde für Intimaverkalkung prädisponierten LDLr^{-/-} Mäusen nach myeloablativer Radiatio das Knochenmark von ROSA-26 Mäusen transplantiert. Diese exprimieren ubiquitär das bakterielle Enzym β -Galaktosidase, das nach Knochenmark-Transplantation als Marker für knochenmarkstämmige Zellen diente. Nach 8, 10 und 16 Wochen unter Highfat-Diät wurde die Aorta ascendens histologisch und immunhistochemisch untersucht und mittels high-resolution konfokaler Laserscanning Mikroskopie ausgewertet. Es konnte gezeigt werden, dass die chondrozytären Zellen nach 10 Wochen Highfat-Diät erstmalig auftraten. Sie nahmen dabei einen Anteil von 7,1 % \pm 1,6 %, nach 16 Wochen einen Anteil von 14,1 % \pm 1,7 % der Gesamtzellzahl ein. Der Anteil der chondrozytären Zellen mit einer Markierung für β -Galaktosidase belief sich auf 88,8 % \pm 7,6 %. Die Chimärenanalyse zur Kontrolle des Transplantationserfolges ergab einen Mittelwert von 89,8 % \pm 2,3 %. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die chondrozytären Zellen dem Knochenmark entstammen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass chondrozytäre Zellen in diesem Mausmodell auch Sox-9, einen Frühmarker der Chondrogenese, exprimieren und es sich somit um Frühstadien der Chondrogenese handelt. Eine Doppelmarkierung von Sox-9 und SM-22 α zeigte, dass die chondrozytären Zellen im vorliegenden Mausmodell keine Markierung für SM-22 α , einem Marker für glatte Muskelzellen, aufwiesen und diese somit nicht aus glatten Gefäßmuskelzellen hervorgehen.⁷³ Weiterhin konnte eine positive Markierung der chondrozytären Zellen mit RANKL gezeigt werden und einen Hinweis für die Erklärung der anti-atherosklerotischen Wirkung einer OPG-Behandlung liefern. Zur Bestimmung der hämatopoetischen Zelllinie wurden die chondrozytären Zellen auf CD13 und CD34 untersucht. 54,2 % \pm 7,6 % waren für CD13 und 86,9 % \pm 8,1 % für CD34 positiv. Weiter konnte gezeigt werden, dass die chondrozytären Zellen keine Kolo-kalisation mit den Makrophagen- und Monozytenmarkern MOMA-2 und CD115 aufwiesen. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die chondrozytären Zellen der atherosklerotischen Intimaverkalkung im LDLr^{-/-} Mausmodell aus dem Knochenmark stammen und myeloiden Ursprungs sind.

6. Literaturverzeichnis

- 1 London, G. M. Vascular disease and atherosclerosis in uremia. *Nefrologia* 25 Suppl 2, 91-95 (2005).
- 2 El-Abbadi, M. & Giachelli, C. M. Arteriosclerosis, calcium phosphate deposition and cardiovascular disease in uremia: current concepts at the bench. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14, 519-524 (2005).
- 3 Giachelli, C. M. The emerging role of phosphate in vascular calcification. *Kidney Int* 75, 890-897 (2009).
- 4 Robert-Koch-Institut. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. (2006).
- 5 Khoo, K. L., Tan, H. Lipids and coronary heart disease in Asia. *Atherosclerosis* 169, 1-10 (2003).
- 6 Akinkugbe, O. O., Nicholson, G. D. Heart disease in blacks of Africa and the Caribbean. *Cardiovasc Clin* 21, 377-391 (1991).
- 7 Muna, W. F. Cardiovascular disorders in Africa. *World Health Stat Q* 46, 125-133 (1993).
- 8 Seedat, Y. K. Hypertension and vascular disease in India and migrant Indian populations in the world. *J Hum Hypertens* 4, 421-424 (1990).
- 9 Fischer, M. *et al.* Distinct heritable patterns of angiographic coronary artery disease in families with myocardial infarction. *Circulation* 111, 855-862 (2005).
- 10 Erdmann J, S. H. *e. a.* New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3. *Nat Genet* 41, 280-282 (2009).
- 11 Demer, L. L. & Tintut, Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation* 117, 2938-2948 (2008).
- 12 Johnson, R. C., Leopold, J. A. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res* 99, 1044-1059 (2006).
- 13 Virchow, R. Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. (1871).
- 14 Virchow, R. Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI-Atheromatous affection of arteries. (1858).
- 15 Bunting, C. The formation of true bone with cellular (red) marrow in a sclerotic aorta. *J Exp Med.*, 365-376 (1906).

- 16 Otto, C. M., Kuusisto, J. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation* 90, 844-853 (1994).
- 17 Tanimura A, M. D., Anderson HC. Matrix vesicles in atherosclerotic calcification. *Proc Soc Exp Biol Med* 172, 173-177 (1983).
- 18 Kirsch, T. Determinants of pathologic mineralization. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 18, 1-9 (2008).
- 19 Bostrom, K. *et al.* Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 91, 1800-1809 (1993).
- 20 Duer, M. J. *et al.* Mineral surface in calcified plaque is like that of bone: further evidence for regulated mineralization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 2030-2034 (2008).
- 21 Tyson, K. L. *et al.* Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 489-494 (2003).
- 22 Abedin, M., Tintut, Y. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1161-1170 (2004).
- 23 Thompson, G. R. & Partridge, J. Coronary calcification score: the coronary-risk impact factor. *Lancet* 363, 557-559 (2004).
- 24 van Popele, N. M. *et al.* Aortic stiffness is associated with atherosclerosis of the coronary arteries in older adults: the Rotterdam Study. *J Hypertens* 24, 2371-2376 (2006).
- 25 Proudfoot, D. & Shanahan, C. M. Biology of calcification in vascular cells: intima versus media. *Herz* 26, 245-251 (2001).
- 26 Mohr, W. & Gorz, E. Morphogenesis of media calcinosis in Monckeberg disease. Light microscopy, scanning electron microscopy and roentgen microanalysis findings. *Z Kardiol* 91, 557-567 (2002).
- 27 London, G. M. *et al.* Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant* 18, 1731-1740 (2003).
- 28 Shioi, A. *et al.* Monckeberg's medial sclerosis and inorganic phosphate in uremia. *Am J Kidney Dis* 38, S47-49 (2001).

-
- 29 Shanahan, C. M. *et al.* Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* 100, 2168-2176 (1999).
- 30 O'Brien, K. D. Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1721-1728 (2006).
- 31 Dosanjh, A. & Kebebew, E. Calciphylaxis: rare but fatal. *Curr Surg* 62, 455-458 (2005).
- 32 Aikawa, E. *et al.* Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation* 116, 2841-2850 (2007).
- 33 Ross, R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 138, S419-420 (1999).
- 34 Ross, R. & Harker, L. Hyperlipidemia and atherosclerosis. *Science* 193, 1094-1100 (1976).
- 35 Chen, N. X. & Moe, S. M. Arterial calcification in diabetes. *Curr Diab Rep* 3, 28-32 (2003).
- 36 Goodman, W. G. *et al.* Vascular calcification in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 43, 572-579 (2004).
- 37 Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature* 407, 233-241 (2000).
- 38 Nagel, T., Resnick, N. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 94, 885-891 (1994).
- 39 McMillan, D. E. Blood flow and the localization of atherosclerotic plaques. *Stroke* 16, 582-587 (1985).
- 40 Springer, T. & Cybulsky, M. Traffic signals on endothelium for leukocytes in health, inflammation, and atherosclerosis. *Philadelphia: Lippincott-Raven*, 511-538 (1996).
- 41 Libby, P., Ridker, P. M. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105, 1135-1143 (2002).
- 42 Hristov, M. *et al.* Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury. *Circ Res* 100, 590-597 (2007).

- 43 Hristov, M., Zerneck, Regulation of endothelial progenitor cell homing after arterial injury. *Thromb Haemost* 98, 274-277 (2007).
- 44 anonym. Relationship of atherosclerosis in young men to serum lipoprotein cholesterol concentrations and smoking. A preliminary report from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. *Jama* 264, 3018-3024 (1990).
- 45 Allison, M. A., Criqui, M. H. Patterns and risk factors for systemic calcified atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 331-336 (2004).
- 46 McNamara, J. J., Molot, M. A. Coronary artery disease in combat casualties in Vietnam. *Jama* 216, 1185-1187 (1971).
- 47 Enos, W. F., Holmes, R. H. Landmark article, July 18, 1953: Coronary disease among United States soldiers killed in action in Korea. Preliminary report. By William F. Enos, Robert H. Holmes *Jama* 256, 2859-2862 (1986).
- 48 Brown, M. S. & Goldstein, J. L. Atherosclerosis. Scavenging for receptors. *Nature* 343, 508-509 (1990).
- 49 Stemme, S. *et al.* T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3893-3897 (1995).
- 50 Lanzavecchia, A. Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Curr Opin Immunol* 8, 348-354 (1996).
- 51 Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868-874 (2002).
- 52 Insull, W., Jr. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am J Med* 122, S3-S14 (2009).
- 53 Virmani, R., Burke, A. P. Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol* 47, C13-18 (2006).
- 54 Stein, G. S. & Lian, J. B. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev* 14, 424-442 (1993).
- 55 Giachelli, C. M. Inducers and inhibitors of biomineralization: lessons from pathological calcification. *Orthod Craniofac Res* 8, 229-231 (2005).
- 56 Speer, M. Y. *et al.* Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *J Exp Med* 196, 1047-1055 (2002).

- 57 Shanahan, C. M. Vascular calcification. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14, 361-367 (2005).
- 58 Dhore, C. R. *et al.* Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 1998-2003 (2001).
- 59 Doehring, L. C. *et al.* Arterial calcification in mice after freeze-thaw injury. *Ann Anat* 188, 235-242 (2006).
- 60 Rutsch, F. & Terkeltaub, R. Parallels between arterial and cartilage calcification: what understanding artery calcification can teach us about chondrocalcinosis. *Curr Opin Rheumatol* 15, 302-310 (2003).
- 61 Hunt, J. L. *et al.* Bone formation in carotid plaques: a clinicopathological study. *Stroke* 33, 1214-1219 (2002).
- 62 Demer, L. L. & Tintut, Y. Return to ectopia: stem cells in the artery wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 1307-1308 (2005).
- 63 Rattazzi, M. *et al.* Calcification of advanced atherosclerotic lesions in the innominate arteries of ApoE-deficient mice: potential role of chondrocyte-like cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 1420-1425 (2005).
- 64 Qiao, J. H., Fishbein, M. C. Genetic determination of cartilaginous metaplasia in mouse aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 2265-2272 (1995).
- 65 Ahrens, M. *et al.* Expression of human bone morphogenetic proteins-2 or -4 in murine mesenchymal progenitor C3H10T1/2 cells induces differentiation into distinct mesenchymal cell lineages. *DNA Cell Biol* 12, 871-880 (1993).
- 66 Strom, A., Ahlqvist, E. Extracellular matrix components in atherosclerotic arteries of Apo E/LDL receptor deficient mice: an immunohistochemical study. *Histol Histopathol* 19, 337-347 (2004).
- 67 Neven, E., Dauwe, S. Endochondral bone formation is involved in media calcification in rats and in men. *Kidney Int* 72, 574-581 (2007).
- 68 Pufe, T. *et al.* Programmable cells of monocytic origin (PCMO): a source of peripheral blood stem cells that generate collagen type II-producing chondrocytes. *J Orthop Res* 26, 304-313 (2008).
- 69 Shafer, J. *et al.* Oxygen tension directs chondrogenic differentiation of myelomonocytic progenitors during endochondral bone formation. *Tissue Eng* 13, 2011-2019 (2007).

-
- 70 Gossel, M., Modder, U. I. Osteocalcin expression by circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 52, 1314-1325 (2008).
- 71 Farrington-Rock, C. *et al.* Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation* 110, 2226-2232 (2004).
- 72 Chen, N. X., Duan, D. High glucose increases the expression of Cbfa1 and BMP-2 and enhances the calcification of vascular smooth muscle cells. *Nephrol Dial Transplant* 21, 3435-3442 (2006).
- 73 Speer, M. Y. *et al.* Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circ Res* 104, 733-741 (2009).
- 74 Pieper, K. S., Fehrmann, P. On the functional organisation of hyaline articular cartilage. *Ital J Anat Embryol* 100 Suppl 1, 113-119 (1995).
- 75 Olmsted-Davis, E. *et al.* Hypoxic adipocytes pattern early heterotopic bone formation. *Am J Pathol* 170, 620-632 (2007).
- 76 Akiyama, H., Chaboissier, M. C. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 16, 2813-2828, (2002).
- 77 Zuscik, M. J., Hilton, M. J. Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress. *J Clin Invest* 118, 429-438 (2008).
- 78 Khosla, S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 142, 5050-5055 (2001).
- 79 Morony, S. *et al.* Osteoprotegerin inhibits vascular calcification without affecting atherosclerosis in *ldlr(-/-)* mice. *Circulation* 117, 411-420 (2008).
- 80 Anderson, D. M. *et al.* A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390, 175-179 (1997).
- 81 Kartsogiannis, V. *et al.* Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone* 25, 525-534 (1999).
- 82 Kong, Y. Y. *et al.* Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 402, 304-309 (1999).
- 83 Tanaka, S., Nakamura, K. Role of RANKL in physiological and pathological bone resorption and therapeutics targeting the RANKL-RANK signaling system. *Immunol Rev* 208, 30-49 (2005).

- 84 Simonet, W. S. *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89, 309-319 (1997).
- 85 Dougall, W. C. *et al.* RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 13, 2412-2424 (1999).
- 86 Bucay, N. *et al.* osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12, 1260-1268 (1998).
- 87 Jono, S. *et al.* Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circulation* 106, 1192-1194 (2002).
- 88 Kiechl, S. *et al.* Osteoprotegerin is a risk factor for progressive atherosclerosis and cardiovascular disease. *Circulation* 109, 2175-2180 (2004).
- 89 Price, P. A., June, H. H. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 1610-1616 (2001).
- 90 Ishibashi, S. *et al.* Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 92, 883-893 (1993).
- 91 Piedrahita, J. A., Zhang, S. H. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4471-4475 (1992).
- 92 Knowles, J. W., Maeda, N. Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 2336-2345 (2000).
- 93 Hobbs, H. H., Brown, M. S. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1, 445-466 (1992).
- 94 Zadelaar, S. *et al.* Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 1706-1721 (2007).
- 95 Zhang, X. *et al.* Periosteal progenitor cell fate in segmental cortical bone graft transplantations: implications for functional tissue engineering. *J Bone Miner Res* 20, 2124-2137 (2005).
- 96 Friedrich, G., Soriano, P. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev* 5, 1513-1523 (1991).
- 97 Kennedy, D. W. & Abkowitz, J. L. Kinetics of central nervous system microglial and macrophage engraftment: analysis using a transgenic bone marrow transplantation model. *Blood* 90, 986-993 (1997).

-
- 98 Adams CWM, B. O. Lipid histochemistry. *Techniques of Biochemical and Biophysical Morphology* 2, 99-156 (1975).
- 99 Murray, G. I. & Ewen, S. W. A new fluorescence method for alkaline phosphatase histochemistry. *J Histochem Cytochem* 40, 1971-1974 (1992).
- 100 Shipp, M. A. & Look, A. T. Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key! *Blood* 82, 1052-1070 (1993).
- 101 Kehlen, A. *et al.* Increased expression of interleukin-8 and aminopeptidase N by cell-cell contact: interleukin-8 is resistant to degradation by aminopeptidase N/CD13. *Eur Cytokine Netw* 12, 316-324 (2001).
- 102 Breel, M., Mebius, R.E. Dendritic cells of the mouse recognized by two monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.*, 1555-1559 (1987).
- 103 Belaaloui, G. *et al.* Functional characterization of human CD34+ cells that express low or high levels of the membrane antigen CD111 (nectin 1). *Leukemia* 17, 1137-1145 (2003).
- 104 <http://www.abdserotec.com/marketing/CDmarkers/index.html> (Tag des Zugriffs: 20.04.2010).
- 105 Hruska, K. A. Vascular smooth muscle cells in the pathogenesis of vascular calcification. *Circ Res* 104, 710-711 (2009).
- 106 Schiller, N. K., Kubo, N. Effect of gamma-irradiation and bone marrow transplantation on atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 1674-1680 (2001).
- 107 Ishibashi, S., Goldstein, J. L. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest* 93, 1885-1893, doi:10.1172/JCI117179 (1994).
- 108 Nakashima, Y., Plump, A. S. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 14, 133-140 (1994).
- 109 Bentzon, J. F. *et al.* Smooth muscle cells in atherosclerosis originate from the local vessel wall and not circulating progenitor cells in ApoE knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 2696-2702 (2006).
- 110 Morrison, S. J. & Weissman, I. L. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1, 661-673 (1994).

- 111 Rosenfeld, M. E. *et al.* Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 2587-2592 (2000).
- 112 Horton, W. A., Dwyer, C. Immunohistochemistry of types I and II collagen in undecalcified skeletal tissues. *J Histochem Cytochem* 31, 417-425 (1983).
- 113 Bi, W. *et al.* Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6698-6703 (2001).
- 114 Sattler, A. M., Schoppet, M. Novel aspects on RANK ligand and osteoprotegerin in osteoporosis and vascular disease. *Calcif Tissue Int* 74, 103-106 (2004).
- 115 Collin-Osdoby, P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ Res* 95, 1046-1057 (2004).
- 116 Hofbauer, L. C. & Schoppet, M. Osteoprotegerin: a link between osteoporosis and arterial calcification? *Lancet* 358, 257-259 (2001).
- 117 Leibbrandt, A. & Penninger, J. M. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci* 1143, 123-150 (2008).
- 118 Lee, H. W. *et al.* RANKL stimulates proliferation, adhesion and IL-7 expression of thymic epithelial cells. *Exp Mol Med* 40, 59-70 (2008).
- 119 van der Velden, V. H., Leenen, P. J. CD13/aminopeptidase N involvement in dendritic cell maturation. *Leukemia* 15, 190-191 (2001).
- 120 Hoofnagle, M. H., Thomas, J. A. Origin of neointimal smooth muscle: we've come full circle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 2579-2581 (2006).
- 121 Kovacic, J. C. & Boehm, M. Resident vascular progenitor cells: an emerging role for non-terminally differentiated vessel-resident cells in vascular biology. *Stem Cell Res* 2, 2-15 (2009).
- 122 Pelttari, K., Steck, E. The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis. *Injury* 39 Suppl 1, S58-65 (2008).
- 123 Uccelli, A., Moretta, L. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* (2008).
- 124 Ehara, S. *et al.* Spotty calcification typifies the culprit plaque in patients with acute myocardial infarction: an intravascular ultrasound study. *Circulation* 110, 3424-3429 (2004).
- 125 Wahlgren, C. M., Zheng, W. Human carotid plaque calcification and vulnerability. Relationship between degree of plaque calcification, fibrous cap inflammatory gene expression and symptomatology. *Cerebrovasc Dis* 27, 193-200 (2009).

- 126 Huang, H. *et al.* The impact of calcification on the biomechanical stability of atherosclerotic plaques. *Circulation* 103, 1051-1056 (2001).
- 127 Demer, L. L., Sage, A. P. Nanoscale architecture in atherosclerotic calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1882-1884 (2008).
- 128 Concaro, S., Gustavson, F. Bioreactors for tissue engineering of cartilage. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 112, 125-143 (2009).
- 129 Schulz, R. M. & Bader, A. Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes. *Eur Biophys J* 36, 539-568 (2007).
- 130 Caplan, A. I., Elyaderani, M. Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop Relat Res*, 254-269 (1997).
- 131 Post, S., Abdallah, B. M., Bentzon Demonstration of the presence of independent pre-osteoblastic and pre-adipocytic cell populations in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone* 43, 32-39 (2008).
- 132 Liu, Z. J., Zhuge, Y. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 106, 984-991 (2009).
- 133 Massberg, S. *et al.* Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues. *Cell* 131, 994-1008 (2007).
- 134 Wojakowski, W. & Tendera, M. Mobilization of bone marrow-derived progenitor cells in acute coronary syndromes. *Folia Histochem Cytobiol* 43, 229-232 (2005).
- 135 Huang, E. H. *et al.* A CXCR4 antagonist CTCE-9908 inhibits primary tumor growth and metastasis of breast cancer. *J Surg Res* 155, 231-236 (2009).
- 136 Kim, S. Y. *et al.* Inhibition of the CXCR4/CXCL12 chemokine pathway reduces the development of murine pulmonary metastases. *Clin Exp Metastasis* 25, 201-211 (2008).
- 137 Bakshi, P. *et al.* Structural optimization of a CXCR2-directed antagonist that indirectly inhibits gamma-secretase and reduces A β . *Bioorg Med Chem* 17, 8102-8112 (2009).

7. Anhang

7.1. Statistische Auswertung

Tabelle 3: Statistische Analyse der Chimärenanalyse zwischen den einzelnen Gruppen durch den Mann-Whitney-U-Test.

Zeitpunkt	8 Wochen	10 Wochen	16 Wochen
8 Wochen		p = 0,028 (*)	p = 0,059 (n.s.)
10 Wochen			p = 0,246 (n.s.)
16 Wochen			

* = P < 0,05

n.s. = P ≥ 0,05

Tabelle 4: Statistische Analyse der Zellularität zwischen den einzelnen Gruppen durch den Mann-Whitney-U-Test.

Zeitpunkt	8 Wochen	10 Wochen	16 Wochen
8 Wochen		p = 0,005 (*)	p = 0,009 (*)
10 Wochen			p = 0,005 (*)
16 Wochen			

* = P < 0,05

n.s. = P ≥ 0,05

Tabelle 5: Statistische Analyse der Kollagen II-Markierung im atherosklerotischen Plaque zwischen den einzelnen Gruppen durch den Mann-Whitney-U-Test.

Zeitpunkt	8 Wochen	10 Wochen	16 Wochen
8 Wochen		-	-
10 Wochen			p = 0,009 (*)
16 Wochen			

* = P < 0,05

n.s. = P ≥ 0,05

Tabelle 6: Statistische Analyse der Kollagen II/β-Galaktosidase-Doppelmarkierung im atherosklerotischen Plaque zwischen den einzelnen Gruppen durch den Mann-Whitney-U-Test.

Zeitpunkt	8 Wochen	10 Wochen	16 Wochen
8 Wochen		-	-
10 Wochen			p = 0,053 (n.s.)
16 Wochen			

* = P < 0,05

n.s. = P ≥ 0,05

Tabelle 7: Statistische Analyse von Chimären- (β -Galaktosidase⁺-Zellen im peripheren Blut) und Plaqueanalyse (Kollagen II⁺/ β -Galaktosidase⁺-Zellen im Plaque) mittels des student's t-test.

Zeitpunkt	8 Wochen Plaqueanalyse	10 Wochen Plaqueanalyse	16 Wochen Plaqueanalyse
8 Wochen Chimärenanalyse	-		
10 Wochen Chimärenanalyse		p = 0,807 (n.s.)	
16 Wochen Chimärenanalyse			p = 0,685 (n.s.)

* = P < 0,05

n.s. = P \geq 0,05

Tabelle 8: Statistische Analyse der Kollagen II/CD13-Doppelmarkierung im atherosklerotischen Plaque zwischen den einzelnen Gruppen durch den Mann-Whitney-U-Test.

Zeitpunkt	8 Wochen	10 Wochen	16 Wochen
8 Wochen		-	-
10 Wochen			p = 0,047 (*)
16 Wochen			

* = P < 0,05

n.s. = P \geq 0,05

Tabelle 9: Statistische Analyse der Kollagen II/CD34-Doppelmarkierung im atherosklerotischen Plaque zwischen den einzelnen Gruppen durch den Mann-Whitney-U-Test.

Zeitpunkt	8 Wochen	10 Wochen	16 Wochen
8 Wochen		-	-
10 Wochen			p = 0,053 (n.s.)
16 Wochen			

* = $P < 0,05$

n.s. = $P \geq 0,05$

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell der arteriellen Gefäßwand mit kardiovaskulären Risikofaktoren und endothelialer Dysfunktion. _____	5
Abbildung 2: Endotheliale Dysfunktion, lokale Entzündung und Entstehung von Schaumzellen. _____	6
Abbildung 3: Makrophagen-T-Zell Interaktion, Bildung des nekrotischen Kern und der fibrösen Kappe, sowie Einwanderung von Progenitorzellen. _____	7
Abbildung 4: Stabiler atherosklerotischer Plaque mit fibröser Kappe (FC) und nekrotischem Kern (NC). _____	8
Abbildung 5: Instabiler Plaque. _____	9
Abbildung 6: Ruptur eines instabilen Plaque und thrombotischer Verschluss. _____	9
Abbildung 7: Chondrozytäre Zellen im atherosklerotischen Plaque. _____	11
Abbildung 8: Hypothesen zur Herkunft der chondrozytären Zellen. _____	13
Abbildung 9: RANK/RANKL/OPG-System. _____	16
Abbildung 10: Ablauf von Radiatio, Knochenmark-Transplantation und Highfat-Diät.	23
Abbildung 11: Überblick zur Hämatopoese. _____	27
Abbildung 12: Übersicht zur histologischen Untersuchung. _____	30
Abbildung 13: Atherosklerotischer Plaque nach 8 Wochen unter Highfat-Diät. Doppelmarkierung von Kollagen II und β -Galaktosidase. _____	34
Abbildung 14: Atherosklerotischer Plaque nach 10 Wochen unter Highfat-Diät. Doppelmarkierung von Kollagen II und β -Galaktosidase. _____	35
Abbildung 15: Atherosklerotischer Plaque nach 16 Wochen unter Highfat-Diät. Doppelmarkierung von Kollagen II und β -Galaktosidase. _____	36
Abbildung 16: Doppelmarkierung von SM-22 α und Sox-9 im atherosklerotischen Plaque nach 8 Wochen unter Highfat-Diät. _____	39
Abbildung 17: Doppelmarkierung von SM-22 α und Sox-9 im atherosklerotischen Plaque nach 10 Wochen unter Highfat-Diät. _____	39
Abbildung 18: Doppelmarkierung von SM-22 α und Sox-9, sowie Markierung von Kollagen II im atherosklerotischen Plaque nach 16 Wochen unter Highfat-Diät. _____	40
Abbildung 19: Markierung von Kollagen II und RANKL im atherosklerotischen Plaque nach 16 Wochen unter Highfat-Diät. _____	41

Abbildung 20: Doppelmarkierung von Kollagen II und CD13 im atherosklerotischen Plaque nach 10 und 16 Wochen unter Highfat-Diät. _____	43
Abbildung 21: Doppelmarkierung von Kollagen II und MOMA-2 im atherosklerotischen Plaque nach 10 und 16 Wochen unter Highfat-Diät. _____	44
Abbildung 22: Doppelmarkierung von Kollagen II und CD115 im atherosklerotischen Plaque nach 10 und 16 Wochen unter Highfat-Diät. _____	45
Abbildung 23: Doppelmarkierung von Kollagen II und CD34 und im atherosklerotischen Plaque nach 10 und 16 Wochen unter Highfat-Diät. _____	47
Abbildung 24: Übersicht zur Bestimmung von Herkunft und hämatopoetischer Zelllinie der chondrozytären Zellen. _____	48

7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Versuchstieren. _____	22
Tabelle 2: Ergebnisse der morphologischen Untersuchung der Plaqueareale. _____	29
Tabelle 3: Statistische Analyse der Chimärenanalyse. _____	69
Tabelle 4: Statistische Analyse der Zellularität. _____	69
Tabelle 5: Statistische Analyse der Kollagen II-Markierung. _____	70
Tabelle 6: Statistische Analyse der Kollagen II/ β -Galaktosidase-Doppelmarkierung. _____	70
Tabelle 7: Statistische Analyse von Chimären- und Plaqueanalyse. _____	71
Tabelle 8: Statistische Analyse der Kollagen II/CD13-Doppelmarkierung. _____	71
Tabelle 9: Statistische Analyse der Kollagen II/CD34-Doppelmarkierung. _____	72

7.4. Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Übersicht der Chimärenanalyse. _____	31
Diagramm 2: Verteilung der Zellularität zu den verschiedenen Zeitpunkten. _____	32
Diagramm 3: Anteil der Kollagen II ⁺ -Zellen. _____	33
Diagramm 4: Anteil der Kollagen II ⁺ / β -Galaktosidase ⁺ -Zellen. _____	33
Diagramm 5: Übersicht der Chimären- und Plaqueanalyse. _____	37
Diagramm 6: Anteil der Kollagen II ⁺ /CD13 ⁺ -Zellen. _____	42
Diagramm 7: Anteil der Kollagen II ⁺ /CD34 ⁺ -Zellen. _____	46

7.5. Erklärung nach § 8 Abs. 1 Nr. 9, 10, 13, 14 und 15 Prom O

Ich, Christian-Hendrik Heeger, erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Untersuchung zur atherosklerotischen Intimaverkalkung mit Hilfe einer Knochenmark-Transplantation am LDL-Rezeptor Knockout-Mausmodell

in der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck unter der Betreuung von Frau PD Dr. med. Eva-Maria Ehlers mit der Unterstützung durch Herrn Dr. med. Lars Christian Doehring ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Die Dissertation wurde in der Zeit von März 2007 bis Juli 2010 erstellt.

Ich habe die Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht und mich noch keinem anderen Promotionsverfahren unterzogen. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Die vorliegende Arbeit beinhaltet genehmigungspflichtigen Tierversuche gem. § 8 TSchG (Versuche an Wirbeltieren). Die Genehmigung wurde am 08.03.2006 beim Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein beantragt und am 15.06.2006 unter dem Aktenzeichen V362-72241.122-4(19-1/06) erteilt.

Lübeck, den 23.07.2010

Christian-Hendrik Heeger

8. Danksagung

Zuallererst möchte ich meiner Betreuerin und Doktormutter PD Dr. med. Eva-Maria Ehlers meinen herzlichen Dank für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas und die zahlreichen Diskussionen und Anregungen aussprechen. Des Weiteren bedanke ich mich bei ihr für die kritische Revision der vorläufigen Fassungen dieser Arbeit.

Mein Betreuer Dr. med. Lars Christian Doehring hat mich während der gesamten Arbeit vorbildlich unterstützt und als Mentor die einzelnen Schritte aufmerksam verfolgt. Ihm danke ich u.a. für die guten Ideen, die in erheblichem Umfang zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Annett Thiemig danke ich für die Einweisung in die Techniken und die freundliche Hilfsbereitschaft im gesamten Verlauf der Arbeit. Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Westermann und Dr. med. Peter König sowie allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Anatomie für die Benutzung der Geräte und Räumlichkeiten. Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. rer. biol. hum. Inke R. König für die freundliche Beratung während der statistischen Auswertung. Außerdem möchte ich mich bei Dr. hum. biol. Zouhair Aherrahrou für die stete Freundlichkeit, Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken. Ein Dankeschön an alle Mitarbeiter des molekulargenetischen Labors der Medizinischen Klinik II, allen voran Prof. Dr. med. Heribert Schunkert und Prof. Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meinem Mentor Prof. Dr. med. Dr. h.c. Karl-Friedrich Klotz danke ich für die stete Hilfsbereitschaft bei allen Fragen zum Thema Promotion.

Zusätzlich bedanke ich mich bei der Universität zu Lübeck für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit mittels des Promotionsstipendiums „Exzellenzmedizin“.

Großer Dank an meine Familie, deren tatkräftige und finanzielle Unterstützung das Studium und den erfolgreichen Abschluss erst ermöglichten.

Mein größter Dank und Anerkennung gilt meiner Partnerin Laura Krümpelmann, ohne deren Unterstützung und anhaltendes Vertrauen der lange Weg bis hierhin nicht möglich gewesen wäre.

9. Lebenslauf

Name:

Christian-Hendrik Heeger



10. Publikationen

1. **C. Heeger**, LC. Doehring, EM. Ehlers. Untersuchung zur Pathogenese der atherosklerotischen Intimaverkalkung mit Hilfe einer Knochenmark-Transplantation am LDL-Rezeptor Knockout-Mausmodell.
Postervortrag, 2. Doktorandentag der Universität zu Lübeck, (2008).
Ausgezeichnet mit dem „Posterpreis für das Jahr 2008“
2. **C. Heeger**, EM. Ehlers, J. Erdmann, Z. Aherrahrou, H. Schunkert, LC. Doehring. Die Intimaverkalkung aortaler Plaques im LDL-Rezeptor Knockout-Mausmodell geht von eingewanderten Zellen aus dem Knochenmark aus.
Postervortrag, 32. Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie in Hamburg, *Clin Res Cardiol* 97, Suppl 2, P145, (2008).
3. **C. Heeger**, EM. Ehlers, J. Erdmann, Z. Aherrahrou, A. Thiemig, H. Schunkert, LC. Doehring. Chondrocyte-like cells in vascular calcification originate from the bone marrow and not from the local vessel wall in LDL-receptor knockout mice. Postervortrag, 1st Annual Meeting NGFN-Plus and NGFN-Transfer in the Program of Medical Genome Research in München, P441, (2008).
4. **C. Heeger**, EM, Ehlers, Z. Aherrahrou, J. Erdmann, H. Schunkert, LC. Doehring. Bone marrow derived progenitor cells in murine atherosclerotic calcification.
Vortrag, 75. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie in Mannheim, *Clin Res Cardiol* 98, Suppl 1, V1633, (2009).
5. **C. Heeger**, EM. Ehlers, Z. Aherrahrou, J. Erdmann, H. Schunkert, LC. Doehring. Bone marrow derived progenitor cells in murine atherosclerotic calcification. Postervortrag, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology Annual Conference in Washington, D.C., *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, e51-e52, P224, (2009).
6. LC. Doehring*, **C. Heeger***, Z. Aherrahrou, PM. Kaczmarek, J. Erdmann, H. Schunkert, EM. Ehlers. Myeloid CD34⁺CD13⁺ precursor cells transdifferentiate into chondrocyte-like cells in atherosclerotic intimal calcification.
Originalarbeit, *Am J Pathol* 177, 473-480, (2010). *geteilte Erstautorenschaft