

Aus dem Zentrum für Kardiologie, Kardiologie I  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

# **Bedeutung der Arginase-1 in Erythrozyten für die vaskuläre Kalzifizierung in der Maus**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Luisa Vivienne Renner  
aus Heilbronn-Neckargartach

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild  
1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Katrin Schäfer  
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Christoph Reinhardt  
Tag der Promotion: 15.07.2024

Ich widme diese Arbeit

meinen Eltern

Dres. Elke und Christian Renner

und meinen Geschwistern

Laura, Niklas, Lukas, Lars, Lilien

Diese Arbeit wurde publiziert:

**Arginase-1 Deletion in Erythrocytes Promotes Vascular Calcification via Enhanced GSNOR (S-Nitrosoglutathione Reductase) Expression and NO Signaling in Smooth Muscle Cells**

Rajinikanth Gogiraju\*, Luisa Renner\*, Magdalena L. Bochenek, Konstantinos Zifkos, Michael Molitor, Sven Danckwardt, Philip Wenzel, Thomas Münzel, Stavros Konstantinides and Katrin Schäfer

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2022 | Volume 42, Issue 12: e291–e310, first published October 13, 2022

\*R. Gogiraju und L. Renner teilen sich die Erstautorenschaft.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturdiskussion .....</b>	<b>2</b>
2.1	<i>Arterien .....</i>	<i>2</i>
2.1.1	Makroskopische Anatomie .....	2
2.1.2	Mikroskopische Anatomie .....	2
2.2	<i>Atherosklerose .....</i>	<i>3</i>
2.2.1	Relevante Zelltypen .....	3
2.2.2	Endothelial produziertes Stickstoffmonoxid .....	6
2.2.3	Epidemiologie .....	7
2.2.4	Risikofaktoren und protektive Faktoren.....	7
2.2.5	Pathogenese .....	8
2.2.6	Klinische Relevanz.....	9
2.3	<i>Vaskuläre Kalzifizierung.....</i>	<i>9</i>
2.3.1	Risikofaktoren und Epidemiologie .....	10
2.3.2	Pathogenese .....	10
2.3.3	Osteogene Marker in vaskulärer Kalzifizierung (Auswahl) .....	13
2.3.4	Klinische Bedeutung.....	15
2.4	<i>Bedeutung der Erythrozyten in kardiovaskulären Erkrankungen.....</i>	<i>15</i>
2.4.1	Einfluss der Erythrozyten auf den Gefäßtonus .....	15
2.4.2	Erythrozytärer Stoffwechsel in pathologischen Bedingungen .....	16
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>17</b>
3.1	<i>Material .....</i>	<i>17</i>
3.1.1	Genetisch modifizierte Tiere.....	17
3.1.2	Zellen.....	17
3.1.3	Antikörper .....	17
3.1.4	Chemikalien.....	19
3.1.5	Verbrauchsmaterialien .....	22
3.1.6	Geräte .....	23
3.1.7	Software .....	24
3.2	<i>Methoden.....</i>	<i>25</i>
3.2.1	Versuchstiere .....	25
3.2.2	Blut .....	27
3.2.3	Aorta .....	33
3.2.4	Histologie .....	34

3.2.5	Zellkultur .....	37
3.2.6	Western Blot Analysen.....	40
3.2.7	RNA-Isolierung und quantitative Echtzeit-PCR .....	42
3.2.8	Statistische Analyse.....	43
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>45</b>
4.1	<i>Erzeugung und Validierung einer genetisch veränderten Tierlinie.....</i>	<i>45</i>
4.1.1	Überprüfung des Knockouts .....	45
4.1.2	Bestimmung des erythrozytär freigegebenen Stickstoffmonoxids .....	47
4.1.3	Proteinexpression der Arg-1, Arg-2, eNOS in Knochenmark und Milz .....	48
4.1.4	Einfluss des Knockouts auf die Blutbildung .....	49
4.2	<i>Eigenschaften der apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Maus.....</i>	<i>50</i>
4.2.1	Körper- und Organgewichte .....	50
4.2.2	Vollblut-Zellzählung .....	51
4.2.3	Plasmalipidspiegel.....	52
4.3	<i>Vaskuläre Kalzifizierung in vivo .....</i>	<i>52</i>
4.3.1	Osteogene Aktivität in vivo .....	52
4.3.2	Histologischer Nachweis der vaskulären Kalzifizierung .....	54
4.3.3	Hämodynamische Relevanz der vaskulären Kalzifizierung .....	57
4.4	<i>Veränderungen in atherosklerotischen Plaques der Aortenklappe auf zellulärer Ebene .....</i>	<i>58</i>
4.5	<i>Osteogene Aktivität in vitro .....</i>	<i>62</i>
4.5.1	Einflussfaktoren auf die vaskuläre Kalzifizierung in vitro .....	64
4.5.2	Osteogene Marker in vitro.....	67
4.5.1	mRNA-Expression von Enzymen aus dem Stoffwechsel der Arginase-1 und der Differenzierung glatter Muskelzellen in vaskulärer Kalzifizierung .....	68
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>78</b>

## A

Aa	Arteriae
ABC	ATP-Bindungskassetten-Transporter Siehe
ABK	Avidin/Biotin-Komplex
ACh	Acetylcholin
ACTA2	smooth muscle alpha-actin, alpha-smooth muscle actin
Actb	beta-Aktin
ADP	Adenosin Diphosphat
ALP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg1	Arginase-1
ATP	Adenosintriphosphat

## B

BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare, Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin

## C

CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CBR1	Carbonyl Reduktase 1
CCND1	Cyclin D1
cGMP	zyklischem 3',5' -Guanosinmonophosphat
COL1A1	Kollagen Typ 1 A1
CPP	Calciproteinpartikeln

## D

DAF-2-DA	4,5-Diaminofluoresceindiacetat
----------	--------------------------------

## E

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum

## F

FBS	fetalem Kälberserum
FS	fractional shortening

## G

GSNO .....	S-Nitrosoglutathion
GSNOR .....	S-Nitrosoglutathion-Reduktase
GSR .....	Glutathion Reduktase

## H

H&E-Färbung .....	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	Wasserstoffperoxid
HDL .....	High Density Lipoprotein
HIF-1 $\alpha$ .....	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
HPRT1 .....	Hypoxanthin Phosphoribosyl Transferase 1
HSP .....	Hitzeschockprotein

## I

ICAM 1 .....	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IFN- $\gamma$ .....	Interferon gamma
IL-1 .....	Interleukin 1
IL-1 $\beta$ .....	Interleukin-1-beta
IL-6 .....	Interleukin-6

## K

KO .....	Knockout
----------	----------

## L

LDL .....	Low-Density Lipoprotein
L-NNA .....	Nomega-Nitro-L-Arginin
LV AWT .....	linksventrikuläre vordere Wanddicke
LV PWT .....	linksventrikuläre hintere Wanddicke
LVEDD .....	enddiastolischer linksventrikulärer Durchmesser
LVESD .....	endsystolischer linksventrikulärer Durchmesser

## M

MGP .....	Matrix-GLA-Protein
M-MLV RT .....	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase
MPO .....	Meerrettichperoxidase
MSX2 .....	Msh Homeobox 2

## N

NaOH .....	Natriumhydroxid
NGS .....	Normalem Ziegenserum

NO ..... Stickstoffmonoxid

## O

OAT ..... Ornithin Aminotransferase

OC ..... Osteocalcin

ODC ..... Ornithin Decarboxylase

OPG ..... Osteoprotegerin

OPN ..... Osteopontin

ORO ..... Oil Red O

## P

PBS ..... Phosphate-Buffered Saline

PDGF ..... platelet-derived growth factor

PEG ..... Polyethylenglykol

PGI<sub>2</sub> ..... Prostacyclin

PIT ..... Phosphattransporter

PMSF ..... Polymethylsulfonylfluorid

PTIO ..... 2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid

## R

rpm ..... rounds per minute

Runx2 ..... runt-related transcription factor 2

## S

SDS-PAGE ..... Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese

sGC ..... lösliche Guanylatcyclase

sIL-6R ..... löslichen Interleukin-6-Rezeptor

SMA ..... smooth muscle alpha-actin

SOD ..... Superoxid-Dismutase

SR ..... Scavenger-Rezeptor

## T

TEMED ..... N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis-(dimethylamino)-ethan

TGF- $\alpha$  ..... Transforming growth factor alpha

TGF- $\beta$  ..... Transforming growth factor beta

## V

VAT ..... Viszerales Fettgewebe

VCAM-1 ..... Gefäßzelladhäsionsprotein 1

VLDL ..... Very low-Density Lipoproteine

**W**

WT ..... Wildtyp

**X**

XBP-1 ..... X-Box binding protein

Abbildung 1: Mäuse mit Arginase-1 Knockout in Erythrozyten .....	25
Abbildung 2: Genotypisierung .....	45
Abbildung 3: mRNA-Konzentration Arg-1 .....	46
Abbildung 4: Konfokal-Mikroskopie Erythrozyten.....	46
Abbildung 5: Arginase-Aktivitäts-Assay .....	47
Abbildung 6: Durchflusszytometrie DAF-2 DA.....	47
Abbildung 7: Durchflusszytometrie DAF-2-DA + L-NNA .....	48
Abbildung 8: eNOS, Arg-1, Arg-2 in Knochenmark und Milz .....	49
Abbildung 9: Morphologie der blutbildenden Zellen und des Knochenmarks .....	50
Abbildung 10: Morphologie der Milz.....	50
Abbildung 11: OsteoSense .....	53
Abbildung 12: Kalzifizierung der Aortenklappe.....	54
Abbildung 13: Kalzifizierung des Aortenbogens .....	55
Abbildung 14: Korrelation von Kalzifizierungs- und Plauefläche .....	55
Abbildung 15: Atherosklerose der Aortenklappe .....	56
Abbildung 16: Aortenklappe und Aortenbogen in apoE-Wildtyp Mäusen.....	56
Abbildung 17: Echokardiographie .....	57
Abbildung 18: Kolokalisation Erythrozytenmembranen und vaskuläre Kalzifizierung	59
Abbildung 19: Immunhistochemie der Aortenklappe mit SMA und PCNA .....	60
Abbildung 20: Immunhistochemie der Aortenklappe mit MAC2, CD45, MMP9 .....	61
Abbildung 21: interstitielles Kollagen in der Aortenklappe .....	62
Abbildung 22: Kalzifizierung in vitro .....	63
Abbildung 23: Runx2 in Kalzifizierungen in vitro .....	64
Abbildung 24: Kalzifizierung in vitro unter Zugabe von L-Arginin oder PTIO .....	65
Abbildung 25: Kalzifizierung in vitro unter Zugabe von ODQ oder N6022 .....	66
Abbildung 26: Kalzifizierung in vitro (primäre glatte Muskelzellen der Maus) .....	67
Abbildung 27: osteogene Marker in vitro .....	68
Abbildung 28: mRNA-Konzentration von relevanten Enzymen .....	69
Abbildung 29: L-Arginin Stoffwechsel in Erythrozyten .....	71

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Osteogene Marker in vaskulärer Kalzifizierung.....	13
Tabelle 2: Genetisch modifizierte Tiere .....	17
Tabelle 3: Zellen .....	17
Tabelle 4: Antikörper .....	19
Tabelle 5: Chemikalien.....	22
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien .....	23
Tabelle 7: Geräte.....	24
Tabelle 8: Software.....	25
Tabelle 9: Primer für Genotypisierung .....	26
Tabelle 10: Primer für Echtzeit PCR für Gewebe und Zellen der Maus .....	43
Tabelle 11: Auflistung statistischer Tests .....	44
Tabelle 12: Körper- und Organgewichte.....	51
Tabelle 13: Vollblut-Zellzählung.....	52
Tabelle 14: Plasmalipidspiegel.....	52
Tabelle 16: Echokardiographie .....	58

Zur besseren Lesbarkeit wird in dieser Arbeit das generische Maskulinum verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich – sofern nicht anders kenntlich gemacht – auf alle Geschlechter.

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

## 1 EINLEITUNG

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind weltweit aufgrund ihrer hohen Inzidenz eine große Herausforderung für Wissenschaft, Medizin und Wirtschaft. Die Pathophysiologie ist hochkomplex und multifaktoriell, was die Entwicklung von Medikamenten erschwert. In den letzten zwei Jahrzehnten rücken die roten Blutkörperchen, die Erythrozyten zunehmend in den Fokus der kardiovaskulären biologischen Forschung.

Erythrozyten sind der Hauptbestandteil des Blutes und verantwortlich für den Sauerstofftransport im Körper. Ihre Präsenz in atherosklerotischen Läsionen [1] und ihre Beteiligung am Stickstoffmonoxid (NO) -Stoffwechsel machen sie zu einem interessanten Objekt in der Pathophysiologie der Atherosklerose und der vaskulären Kalzifizierung [2, 3].

Erythrozyten tragen in ihrer Membran sowohl Arginase-1 (Arg-1) als auch die endotheliale NO-Synthase (eNOS). Arg-1 wandelt L-Arginin in L-Ornithin und Harnstoff um, während eNOS L-Arginin in L-Citrullin und NO umwandelt. Da beide Enzyme das gleiche Substrat haben, bedingen sie sich gegenseitig. Erythrozytenmembranen können in vitro und in vivo (Maus) zur Verkalkung von Gefäßläsionen beitragen. Es kommt zur osteoblastischen Differenzierung von glatten Muskelzellen. Dabei scheint erythrozytär freigesetztes NO eine große Rolle zu spielen [4].

Das Enzym Arginase-1 wird in Erythrozyten exprimiert und beeinflusst als kompetitiver Hemmstoff der eNOS die erythrozytäre NO-Freisetzung. Im Gegensatz dazu ist die Arginase-2 in Mitochondrien lokalisiert und somit nicht in Erythrozyten vorhanden. Sie kommt hauptsächlich in Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Makrophagen vor und kann hier kardiovaskuläre Erkrankungen begünstigen [5].

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der Arginase-1 in Erythrozyten für die vaskuläre Kalzifizierung atherosklerotischer Läsionen in der Maus und die osteoblastische Differenzierung glatter Muskelzellen im Kontext der erythrozytären NO-Signalgebung zu untersuchen.

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

## 2 LITERATURDISKUSSION

### 2.1 Arterien

#### 2.1.1 Makroskopische Anatomie

Arterien sind Blutgefäße, die im Kreislauf des Körpers das Blut vom Herzen in die Peripherie leiten. Dabei ist die größte Arterie des Körpers die Aorta. Diese entspringt aus dem linken Ventrikel des Herzens. Sie teilt sich von proximal nach distal in die Aorta ascendens aus der die Aa. coronariae dextra und sinistra abgehen, geht dann über in den Arcus aortae aus dem der Truncus brachiocephalicus, die A. carotis communis sinistra und die A. subclavia sinistra abgehen und läuft als Aorta descendens weiter nach distal. Letztere lässt sich weiter unterteilen in den Pars thoracica, dessen Abgänge den Brustraum versorgen und in den Pars abdominalis. Dieser beginnt nach Durchtritt des Gefäßes durch das Zwerchfell. Er versorgt den Bauchraum und hat von kranial nach kaudal folgende Abgänge:

- Aa. phrenicae inferiores
- Truncus coeliacus
- A. suprarenalis media, dextra, sinistra
- A. renalis dextra/sinistra
- A. ovarica (weiblich) bzw. A. testicularis (männlich) dextra und sinistra
- Aa. lumbales
- A. mesenterica inferior
- A. sacralis mediana

[6]

#### 2.1.2 Mikroskopische Anatomie

Der Wandaufbau einer Arterie ist dreischichtig. Innenliegend befindet sich die Tunica interna. Sie besteht aus einer einschichtigen Endothelzellschicht, der eine dünne subendotheliale Bindegewebsschicht aufliegt. Die Tunica interna ist durch die Membrana elastica interna von der Tunica media getrennt. Diese besteht aus glatten Muskelzellen. In großen Arterien wird das innere Drittel dieser Schicht durch Diffusion von Nährstoffen aus dem Lumen versorgt. Hierzu finden sich Löcher in der Membrana elastica interna. Die äußeren zwei Drittel der Tunica media werden durch gefäßeigene Gefäße, genannt Vasa vasorum, versorgt. Außenliegend findet sich die Tunica

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

adventitia, die durch die Membrana elastica externa von der Tunica media abgegrenzt wird. Die Tunica adventitia enthält Fibroblasten, Bindegewebe, Nervi vasorum und kleine Gefäße, aus denen die bereits erwähnten Vasa vasorum abgehen [6].

## 2.2 Atherosklerose

Zur Begriffsklärung gehört die Unterscheidung der Unterbegriffe der Arteriosklerose, zu der die Atherosklerose zählt. Es gibt drei Arten der Arteriosklerose: die Mönckebergs Arteriosklerose, die Kalziumablagerungen in der Tunica media älterer Patienten beschreibt. Die Arteriolosklerose, die für die Gefäßversteifung und den Elastizitätsverlust in kleinen Arterien und Arteriolen, vorwiegend in Verbindung mit arterieller Hypertonie und Diabetes mellitus steht und die Atherosklerose als Verhärtung der elastischen und muskulären Arterien [7].

Die allgemeine Antwort auf Gefäßschädigung durch Noxen wie Nikotin oder mechanische Schädigung wie Hypertonie oder iatrogen mit Ballonkatheter ist eine Proliferation von glatten Muskelzellen in die Intima. Diese Art der glatten Muskelzellen produziert extrazelluläre Matrix und führt so zu einer Verdickung der Intima. Sie sind allerdings im Gegensatz zu den glatten Muskelzellen der Tunica media nicht kontraktionsfähig. Die chronische Intimaverdickung bei dauerhafter Schädigung führt zur Einengung des Gefäßlumens und birgt die Gefahr der Thrombusbildung und konsekutiver Emboliegefahr. Die Intimaverdickung ist auch ein physiologischer Alterungsprozess ohne Krankheitswert [7].

### 2.2.1 Relevante Zelltypen

#### 2.2.1.1 Endothelzellen

Die Endothelzellen, die einschichtig die Tunica interna der Arterien bilden, sind mit ihren zahlreichen Funktionen und Eigenschaften relevant für die Physiologie und Pathophysiologie der Gefäße. Im Normalzustand - bei Normotension, laminarem Blutfluss und stabilen Konzentrationen von Wachstumsfaktoren - bilden sie eine nicht-adhäsive, nicht-thrombogene Oberfläche. Unter pathologischen Gegebenheiten, seien es Bluthochdruck, Hypoxie, Infektion oder Azidose, können Endothelzellen aktiviert werden. Sie regulieren dann die Gefäßpermeabilität und produzieren vasoaktive Faktoren wie Stickstoffmonoxid (NO) und Endothelin, gerinnungshemmende Faktoren wie Thrombomodulin sowie prokoagulierende Faktoren wie den Gewebefaktor, Faktor V, Faktor VIIIa (von Willebrand Faktor) und Plasminogen Aktivator/Inhibitor. Weiterhin

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

produzieren aktivierte Endothelzellen Fibrinolytika wie Urokinase oder gewebsspezifischen Plasminogenaktivator und Entzündungsmediatoren wie Interleukin 1, Interleukin 6, Chemokine, Adhäsionsmoleküle wie Gefäßzelladhäsionsprotein 1 (VCAM-1), Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM 1), E-/P-Selektin und Histokompatibilitätskomplexe. Außerdem regulieren Endothelzellen das Zellwachstum und oxidieren das Low-density Lipoprotein (LDL). Letzteres spielt bei der Ätiologie der Atherosklerose eine bedeutende Rolle. Einige der produzierten Faktoren werden lokal ausgeschüttet, wirken in unmittelbarer Umgebung und haben eine kurze Halbwertszeit. Eine Aktivierung der Endothelzellen im Übermaß oder konstant über lange Zeit führt zur endothelialen Dysfunktion. Eine pathologische Vasokonstriktion, Hyperkoagulabilität und die vermehrte Produktion von Sauerstoffradikalen charakterisieren diesen Prozess. Gefäße mit dysfunktionaler Endothelzellschicht neigen zur Thrombusbildung und Atherosklerose [8, 9].

#### *2.2.1.2 Glatte Muskelzellen*

Die glatten Muskelzellen finden sich in der Tunica media. Sie regulieren den Blutfluss über Vasodilatation und Vasokonstriktion. Sie produzieren das vaskuläre Bindegewebe mit Elastin, Kollagen und Proteoglykanen. Wachstumsfaktoren wie platelet-derived growth factor (PDGF), Endothelin, Thrombin, Fibroblasten Wachstumsfaktor, Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Interleukin 1 (IL-1) regen die glatten Muskelzellen zur Proliferation an. Heparinsulfat, Stickstoffmonoxid und Transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) hemmen die glatten Muskelzellen. SM-22 $\alpha$  ist ein Markerprotein für adulte glatte Muskelzellen [10]. Die glatten Muskelzellen spielen eine große Rolle im Pathomechanismus der Atherosklerose [7].

Vaskuläre glatte Muskelzellen besitzen die Fähigkeit, sich während ihrer Entwicklung phänotypisch zu verändern. Sie durchlaufen dabei allerdings keinen endgültigen Differenzierungsprozess. Als Reaktion auf eine Verletzung können glatte Muskelzellen ihren Phänotyp verändern, um Reparaturmechanismen zu unterstützen. Nach Abschluss der Reparatur kehren sie in ihren Normalzustand zurück, der durch Gene wie das smooth muscle  $\alpha$ -actin (SMA/ACTA2) aufrechterhalten wird, und nehmen einen nicht proliferierenden, kontraktilen Phänotyp an. Im Krankheitsfall werden modulatorische Signale gestört und die glatten Muskelzellen durch dysregulierte Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )-Signalwege zur Differenzierung in

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

osteoblastenähnliche, chondrozytenähnliche und adipozytenähnliche Zellen angeregt [11, 12]. Diese Differenzierung bedingt Kalzifizierung, vermehrte Matrixproduktion und Fettanhäufung in Atherosklerose [13].

#### *2.2.1.3 Leukozyten*

Die Leukozyten, oder weiße Blutkörperchen, stellen eine vielfältige Gruppe von Zellen dar, die aus lymphatischen Stammzellen hervorgehen und eine zentrale Rolle im Immunsystem einnehmen. Zu den bedeutendsten Zelltypen gehören die natürlichen Killerzellen sowie die B- und T-Lymphozyten. Die Differenzierung der Leukozyten erfolgt über verschiedene Vorläuferzellen, darunter die myeloische Stammzelle, die sich in die Mastzelle entwickelt. Des Weiteren differenzieren sich die Granulozyten aus Myeloblasten und die Monozyten aus dem Monoblasten, letztere entwickeln sich schließlich zu Makrophagen [14].

Im Kontext der Atherogenese kommt den T-Lymphozyten und Monozyten in der Blutbahn eine herausragende Rolle zu. Ihr Zusammenspiel und ihre Aktivierung spielen eine zentrale Funktion bei den pathophysiologischen Prozessen, die zur Entwicklung von Atheromen führen [15].

Makrophagen exprimieren den Scavenger-Rezeptor (SR) SR-B1, der primär auf Hepatozyten lokalisiert ist. Dieser Rezeptor zeichnet sich durch eine ausgeprägte Affinität zu lipidreichen High-Density Lipoproteinen (HDL) aus, zeigt jedoch gleichzeitig die Fähigkeit zur Internalisierung von oxidiertem Low-Density-Lipoprotein (LDL) [16].

#### *2.2.1.4 Lipoproteine*

Lipoproteine sind Molekülkomplexe, die Lipide (wie Cholesterin und Triglyzeride) mit Proteinen kombinieren, um diese im Blut transportieren zu können. Auf ihrer Oberfläche tragen sie Apolipoproteine, bedeutend für die Struktur, Stabilität und Funktion von Lipoproteinen.

Es unterscheiden sich 3 Haupttypen von Lipoproteinen.

Die Low-Density Lipoproteine (LDL) sind die Hauptträger von Cholesterin im Blut. Ihr wichtigstes Apolipoprotein ist B-100. Sie können in den Arterienwänden akkumulieren und durch oxidativen Stress eine entzündliche Reaktion initiieren, was die Bildung von atherosklerotischen Plaques begünstigt. LDL stellt somit einen zentralen Ansatzpunkt in lipidsenkenden Therapien dar [17].

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

Die Very low-Density Lipoproteine (VLDL) transportieren Triglyzeride im Blut und können - in LDL umgewandelt - zur Atherosklerose beitragen.

High-Density Lipoproteine (HDL) transportieren Cholesterin von den extrahepatischen Geweben und Arterienwänden zu der Leber, wo es nach Oxidation mit der Galle ausgeschieden wird. HDL tragen auf ihrer Oberfläche die Apolipoproteine A1, C und E. Ein niedriger HDL-Spiegel ist mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Atherosklerose assoziiert [18].

Dyslipidämien sind komplexe Störungen des Fettstoffwechsels, die sich durch abnorme Konzentrationen von Lipoproteinen und/oder Lipiden im Blut kennzeichnen. Die Ätiologie von Hyperlipidämien, gekennzeichnet durch eine erhöhte Konzentration von Plasmalipoproteinen, ist vielfältig und umfasst neben genetischen Prädispositionen vorrangig metabolische Dysregulation sowie einen ungesunden Lebensstil [19].

Neben Hyperlipoproteinämien sind auch isolierte Erhöhungen der Triglyzeride (Hypertriglyzeridämie) [20] und des Cholesterins (Hypercholesterinämie) von vergleichbarer pathologischer Relevanz [21].

### 2.2.2 Endothelial produziertes Stickstoffmonoxid

Bei Aktivierung durch Stoffe wie Acetylcholin (ACh), Bradykinin oder Adenosin Diphosphat (ADP) wandelt die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) L-Arginin und Sauerstoff in L-Citrullin und Stickstoffmonoxid (NO) um. NO inhibiert zusammen mit Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) die Plättchenadhäsion und -aggregation. Weiterhin erhöht NO über den intrazellulären NO-Rezeptor (lösliche Guanylatcyclase, sGC) die Konzentration von zyklischem 3',5' -Guanosinmonophosphat (cGMP) woraufhin die cGMP-abhängigen Proteinkinasen aktiviert werden. Diese beeinflussen den Gefäßtonus und die Proliferation der glatten Muskelzellen. Das Molekül hat eine sehr kurze Halbwertszeit von sechs Sekunden [22].

NO wird durch physiologischen Blutfluss kontinuierlich von der Endothelzellschicht produziert. S-Nitrosoglutathion (GSNO) ist ein Tripeptid-Antioxidans, das entsteht, wenn NO mit reduziertem Glutathion (GSH) reagiert. GSNO kann NO speichern und im Körper transportieren. Es wird durch die GSNO-Reduktase (GSNOR) abgebaut. Hierbei wird NO frei [23]. Es reguliert die Gefäßweite und beeinflusst den Blutfluss. NO

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

hat in physiologischen Konzentrationen und gesunden Bedingungen atheroprotektive Eigenschaften, einschließlich der Verbesserung der Gefäßentspannung und -zusammen mit PGI<sub>2</sub> - der Hemmung von Thrombozytenaktivierung, Apoptose und endothelabhängiger Monozytenadhäsion [24]. Bei gestörtem Blutfluss, wie in atherosklerotischen Gefäßen, kommt es zu einer endothelialen Dysfunktion und oxidativem Stress. Dieser kann, neben einer veränderten Substratverfügbarkeit oder einem Ko-Enzymmangel, eine Entkopplung von eNOS bewirken. Diese führt zu einer verminderten Produktion von NO und einer erhöhten Bildung von Superoxid. Ein solcher Zustand fördert die atherosklerotische Progression [25]. Die erhöhte NO-Konzentration erklärt sich durch das Vorkommen des Enzyms NO-Synthase nicht nur im gesunden Endothel, sondern auch in unter anderem in atherosklerotischen Läsionen anwesenden, lysierten Erythrozytenmembranen [4] und Makrophagen [15]. NO hat also offenbar sowohl protektive als auch atherogene Effekte abhängig von seiner Produktionsquelle [15] und Konzentration [26, 27].

### 2.2.3 Epidemiologie

Aufgrund der Ernährungsgewohnheiten ist die Verfettung der Gefäße und die nachfolgende Verhärtung besonders in Industrienationen ein weit verbreitetes Gesundheitsproblem. Männer sind häufiger betroffen als prämenopausale Frauen, aber weniger häufig als postmenopausale Frauen (Leitlinie der deutschen Gesellschaft für Kardiologie zur Diagnostik und Therapie von Dyslipidämien, Version 2019).

### 2.2.4 Risikofaktoren und protektive Faktoren.

Zu den Risikofaktoren der Atherosklerose zählen ein hohes Alter, Diabetes mellitus, Übergewicht, Rauchen, das männliche Geschlecht und die arterielle Hypertonie [15]. Der größte Risikofaktor ist ein erhöhter Cholesterinspiegel im Plasma. Zu den protektiven Faktoren der Atherosklerose gehören Sport, moderater Alkoholkonsum und ein hoher Serumspiegel von HDL sowie dessen Haupt-Apolipoprotein ApoA-1 [28]. Darüber hinaus haben sich in den letzten Jahren zahlreiche weitere Einflussfaktoren gezeigt, unter anderem die Darmflora [29] oder das Immunsystem [30].

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

### 2.2.5 Pathogenese

Atherosklerose ist eine Gefäßerkrankung, beeinflusst durch u.a. Scherkräfte, die v.a. in hämodynamisch beanspruchten Regionen in ein biochemisches Signal übersetzt werden [31].

Die Entstehung atherosklerotischer Plaques ist ein komplexer und chronisch entzündlicher Prozess, der über einen ausgedehnten Zeitraum hinweg, beginnend im Kindesalter, fortschreitet und mehrere aufeinanderfolgende Schritte umfasst [32].

Der Prozess beginnt mit einer endothelialen Dysfunktion, die zu einer erhöhten Permeabilität und Leukozytenadhäsion führt. Die Monozyten und T-Lymphozyten binden - durch Chemokine angelockt - VCAM-1 vermittelt an das geschädigte Endothel und dringen in die subendotheliale Schicht der Gefäßwand ein. Nach ihrer Infiltration differenzieren sich die Monozyten innerhalb der Gefäßwand zu Makrophagen. Diese Makrophagen nehmen, insbesondere vermittelt über den Rezeptor SR-B1, oxidiertes LDL-Cholesterin und Cholesterinkristalle auf, was zu ihrer Umwandlung in Schaumzellen führt.

Die lokale Freisetzung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen durch Makrophagen und aktivierte T-Lymphozyten verstärkt die endotheliale Dysfunktion. Die Wachstumsfaktoren induzieren die Proliferation von glatten Muskelzellen, die ebenfalls Lipide aufnehmen und die Synthese von kollagenen Fasern und extrazellulärer Matrix. Infolgedessen entsteht eine fibröse Kappe über einem lipidreichen Kern, die den atherosklerotischen Plaque stabilisiert. Der ständige Prozess von Zelltod und Zelldegeneration, chronischer Entzündung und Kalzifizierung bedingt eine kontinuierliche Progression des atherosklerotischen Plaques.

In fortgeschrittenen Stadien besteht die Möglichkeit von Plaquerupturen. Diese führen zur Exposition des lipidreichen Kerns gegenüber dem Blutstrom und können zu Thrombenbildung führen. Die unterschiedliche Zusammensetzung der Plaques trägt wesentlich zum Risiko einer Plaqueruptur bei. Plaques, die viele Schaumzellen und Lipide enthalten, eine dünne fibröse Kappe haben, wenige glatte Muskelzellen enthalten oder viele Entzündungszellen aufweisen, werden als instabile Plaques bezeichnet. Im Gegensatz dazu werden Plaques, die eine dicke fibröse Kappe haben, wenige Entzündungszellen enthalten und einen kleinen Lipidkern besitzen, als stabile

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

Plaques bezeichnet. Stabile Plaques haben ein geringeres Ruptur-Risiko als instabile Plaques [7].

Die Neovaskularisation trägt maßgeblich zum Wachstum von Plaques bei, da die neu entstehenden Gefäße fragil sind und leicht reißen können. Dies führt zu einem weiteren Plaque-Wachstum aufgrund von Intraplaquehämorrhagien [33].

### 2.2.6 Klinische Relevanz

Die klinische Relevanz der Atherosklerose manifestiert sich in ihrer zentralen Rolle als Hauptursache für kardiovaskuläre Erkrankungen. Je nach Lokalisation bedingt sie bei Ruptur instabiler atherosklerotischer Plaques und konsekutiver Thrombenbildung Diagnosen wie Herzinfarkt und Schlaganfall oder bei Gefäß-stenosierenden stabilen atherosklerotischen Plaques die periphere arterielle Verschlusskrankheit, kurz pAVK. Aufgrund ihrer klinischen Bedeutung erfordert die Atherosklerose ein umfassendes Risikomanagement, angefangen bei Lebensstiländerung, über medikamentöse Therapie bis hin zu interventionellen Maßnahmen wie die Transkatheter-Aortenklappen-Implantation (TAVI) [28].

### 2.3 Vaskuläre Kalzifizierung

Vaskuläre Kalzifizierung ist definiert als Ablagerung von Kalziumphosphat-Komplexen in der Tunica intima und Tunica media von Blutgefäßen. Man findet auch valvuläre Verkalkung und Kalziphyllaxie. Letztere ist ein Syndrom der Arteriolenverkalkung, das bei Dialysepatienten mit terminaler Niereninsuffizienz auftreten kann [13]. Während der Prozess der Kalzifizierung früher als ein passiver deklariert wurde, so zeigt der heutige Forschungsstand, dass der Prozess ein hochkomplexes Zusammenspiel aus aktivierenden und inhibierenden Faktoren, genetischen Komponenten und Hormonen ist. Die Kalzifizierung der Gefäßwände erhöht das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse um das Drei- bis Vierfache [34]. Dies gilt unabhängig von den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren [35]. Früher wurde die Kalzifizierung als unausweichliches Endstadium atherosklerotischer Plaques angesehen. Die heutige Forschung zeigt jedoch, dass die vaskuläre Kalzifizierung bereits in frühen Stadien der Atherosklerose auftritt und eigenen, spezifischen Mechanismen unterliegt [36]. Die Intima-bezogene vaskuläre Kalzifizierung findet auf Grundlage der atherosklerotischen Veränderungen statt [37].

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

### 2.3.1 Risikofaktoren und Epidemiologie

Folgende Risikofaktoren für vaskuläre Kalzifizierung konnten identifiziert werden: das hohe Alter, das weibliche Geschlecht, der niedrige Bildungsstatus, das Rauchen und die Hypertonie. Bei Frauen konnten zusätzlich die afrikanische Herkunft und ein hoher Gesamtcholesterinspiegel  $>6,6$  mmol/l als Risikofaktoren identifiziert werden [35]. Kalzifizierungen erhöhen das kardiovaskuläre Risiko unabhängig von den genannten Risikofaktoren und sind – wenn in der Tunica media lokalisiert - mit Erkrankungen wie Diabetes und chronischer Niereninsuffizienz assoziiert [38].

Die Kalzifizierung der Herzklappen, hauptsächlich der Aortenklappe, entwickelt sich als Folge der Degeneration im Alter und weist ähnliche Risikofaktoren wie die Atherosklerose auf [39].

### 2.3.2 Pathogenese

Die vaskuläre Kalzifizierung entsteht durch verschiedene Faktoren, wie die osteochondrogene Differenzierung vaskulärer glatter Muskelzellen, Apoptose, Kalzium- und Phosphatungleichgewicht, Umbau der extrazellulären Matrix und fehlende Schutzmechanismen [40].

Phosphat spielt eine große Rolle in der Pathophysiologie vaskulärer Kalzifizierung [41, 42]. Phosphatkomplexe begünstigen zur Kalzifizierung führende intrazelluläre Signalwege [43, 44]. Unter hyperphosphatämischen Bedingungen, wie z.B. bei einer chronischen Niereninsuffizienz oder bei einem Hypoparathyreoidismus, sind die vaskulären glatten Muskelzellen einem erhöhten Phosphatspiegel ausgesetzt. Über Phosphattransporter (PiT1 oder PiT2) [45], als Nanopartikel an Kalzium gebunden oder als Teil von Calciproteinpartikeln (CPP) [46] gelangt das Phosphat in die vaskulären glatten Muskelzellen, wo es über zahlreiche Signalwege eine Differenzierung derer in Osteoblasten- und Chondroblasten-ähnliche Zellen bewirkt. Die Signalwege involvieren die erhöhte Expression von osteogenen Transkriptionsfaktoren wie Msh Homeobox 2 (MSX2), Osterix, Alkalische Phosphatase (ALP) und runt-related transcription factor 2 (Runx2). Darüber hinaus führt die Überladung der vaskulären glatten Muskelzellen mit Phosphat zur Vesikelfreisetzung, Apoptose, zum Umbau extrazellulärer Matrix und zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren. Diese Prozesse tragen zur Kalzifizierung bei.

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

Im physiologischen Zustand enthalten die extrazellulären Vesikel Kalzifizierungsinhibitoren wie Vitamin-K-abhängiges Matrix-GLA-Protein (MGP) und Fetuin-A [47]. Im Gegensatz dazu enthalten extrazelluläre Vesikel im pathologischen Zustand keine Kalzifizierungsinhibitoren [48], induzieren osteogene Gene wie Runx2 und Osterix sowie proinflammatorische Gene [49] und sind in der Lage, durch Selbstaggregation Mikrokalzifizierungen zu bilden [50].

Weiterhin kann es zu einem nekrotischen oder apoptotischen Zelluntergang vaskulärer glatter Muskelzellen kommen. Die apoptotischen Organellen dienen dabei als Ausgangspunkt für Kalziumphosphatablagerungen [51]. Die Apoptose verstärkt zudem die mitochondriale Dysfunktion, erhöht den oxidativen Stress [52], induziert über osteogene Transkriptionsfaktoren die Differenzierung der vaskulären glatten Muskelzellen in Osteoblasten-/Chondroblasten-ähnliche Zellen [53] und führt zu weiterer Apoptose [52].

Der Umbau der Extrazellulären Matrix wird bedingt durch die Produktion von Matrix-Metalloproteinasen [54, 55], die elastische Fasern und Kollagen abbauen und begünstigt die vaskuläre Kalzifizierung [42]. In dem Katabolismus von L-Ornithin liefern die Enzyme Ornithin-Aminotransferase (OAT) und Ornithin-Decarboxylase (ODC) nötige Bausteine für die Kollagensynthese [56]. Ein Markerprotein für das in den Gefäßwänden am häufigsten vorkommende Kollagen ist COL1A1 [57]. Diesem wurde eine regulatorische Funktion in der Entstehung vaskulärer Kalzifizierung nachgewiesen [58].

Die Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Interleukin-1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) fördert die Entstehung von vaskulärer Kalzifizierung [59]. Darüber hinaus verstärken Komplexe aus Interleukin-6 (IL-6) und dem löslichen Interleukin-6-Rezeptor (sIL-6R) die osteochondrogene Differenzierung vaskulärer glatter Muskelzellen [60].

Weitere Signalwege, die die Kalzifizierung beeinflussen können, sind Autophagie [61, 62], mitochondriale Dysfunktion und Stress des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Bei letzterem handelt es sich um einen Zustand, in dem das ER einer Zelle überlastet ist und der durch u.a. oxidativen Stress ausgelöst wird [63].

Die Autophagie ist ein zellulärer Mechanismus zum Abbau fehlgefalteter Proteine und anderer zellulärer Abfallprodukte, der für die physiologische Zellfunktion unerlässlich

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

ist [64]. Eine gesteigerte Autophagie führt dazu, dass Proteine wie SMA (smooth muscle  $\alpha$ -actin), Calponin und SM22 $\alpha$  vermehrt abgebaut werden, was wiederum zur Umdifferenzierung vaskulärer glatter Muskelzellen in Osteoblasten-/Chondroblasten-ähnliche Zellen führt [65].

Das ER synthetisiert, modifiziert und transportiert Proteine [66]. ER-Stress führt zudem zu einer vermehrten Freisetzung von X-Box binding protein (XBP-1), einem Transkriptionsfaktor, der an den Runx2-Promotor bindet [63].

### Valvuläre Kalzifizierung

Die atherosklerotische Veränderung und die Verkalkung der Aortenklappe sind die Vorstufen einer Aortenklappenstenose [39]. Die Aortenklappenstenose ist das häufigste behandlungsbedürftige und zweithäufigste diagnostizierte Klappenvitium (nach der Mitralklappeninsuffizienz) weltweit [67].

Risikofaktoren sind vererbbar, wie im Fall einer bikuspiden Aortenklappe, oder erworben, wie bei Personen mit metabolischem Syndrom oder Nikotinabusus [68]. Hauptrisikofaktor ist jedoch die altersbedingte Degeneration der Herzklappen.

Die Entstehung valvulärer Kalzifizierung ähnelt der Pathogenese der Atherosklerose [39].

Infolge von Lipidablagerungen und der daraus resultierenden Bildung von oxidiertem LDL werden Entzündungsmediatoren ausgeschüttet. Dies führt zu Veränderungen in der extrazellulären Matrix und zur Differenzierung von Fibroblasten in valvuläre Myofibroblasten mit einem Osteoblasten-ähnlichen Phänotyp [69] auch durch unter anderem BMP2 und Runx2 [70].

Bei fortschreitender Aortenklappenstenose kommt es zu einer Erhöhung der Flussgeschwindigkeit über die Aortenklappe und zu einer konzentrischen Hypertrophie des linken Ventrikels. Bei fortschreitender Pathologie müssen therapeutische Maßnahmen ergriffen werden. In schweren Fällen kann dies einen chirurgischen Klappenersatz erforderlich machen [39].

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

### 2.3.3 Osteogene Marker in vaskulärer Kalzifizierung (Auswahl)

<u>Aktivatoren für vaskuläre Kalzifizierung</u>	<u>Inhibitoren für vaskuläre Kalzifizierung</u>
CCDN1	OPG
OCN	OPN
BMP2	BMP7
ALP	
Runx2	

*Tabella 1: Osteogene Marker in vaskulärer Kalzifizierung  
CCDN1 Cyclin D1, OCN Osteocalcin, BMP Bone morphogenic protein, ALP Alkalische Phosphatase, Runx2 runt-related transcription factor 2, OPG Osteoprotegerin, OPN Osteopontin*

#### *Aktivatoren für Vaskuläre Kalzifizierung*

#### **Cyclin D1 (CCDN1)**

Cyclin D1 ist ein wichtiges Enzym im Zellzyklus, insbesondere beim Übergang von der G1- in die S-Phase [71], und fördert die Proliferation und Differenzierung von glatten Muskelzellen in Osteoblasten/Chondroblasten-ähnliche Zellen [72]. Bei Dysregulation des Zellzyklus kommt es zu vermehrter Apoptose, die, wie oben beschrieben, die vaskuläre Kalzifizierung fördert.

#### **Osteocalcin (OCN)**

Osteocalcin fördert die Differenzierung glatter Muskelzellen in Osteo-/Chondroblasten-ähnliche Zellen und fördert damit die vaskuläre Kalzifizierung [73].

#### **Bone Morphogenic Protein (BMP) 2**

BMP2, ein Teil der transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Proteinfamilie, wird hochreguliert bei Vaskulärer Kalzifizierung [74]. BMP2 induziert die osteochondrogene Differenzierung vaskulärer glatter Muskelzellen [75, 76] über MSX-2 [77], Runx2 und Osterix [78]. Darüber hinaus induziert es Apoptose [42], produziert reaktive Sauerstoffspezies und führt zur gesteigerten Freisetzung von Entzündungsmediatoren [79]. Außerdem bewirkt BMP2 eine erhöhte Genexpression von pro-kalzifizierenden Proteinen wie ALP, OPN und MSX-2 [80].

#### **Alkalische Phosphatase (ALP)**

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

Die Alkalische Phosphatase hat die Fähigkeit, Pyrophosphat abzubauen und organische Moleküle (wie OPN) zu dephosphorylieren. Dadurch wird die Ablagerung von Kalziumphosphat in den Gefäßwänden ermöglicht [81].

### **Runx-related transcription factor (Runx) 2**

Die Bedeutung von Runx2 für die vaskuläre Kalzifizierung liegt in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor, der die Expression von osteoblastischen Genen wie Osteocalcin (OCN), OPN, Osterix und ALP erhöht [82, 83]. Er gilt als früher Marker für die osteochondrogene Differenzierung vaskulärer glatter Muskelzellen [84].

*Inhibitoren für Vaskuläre Kalzifizierung*

### **Osteoprotegerin (OPG)**

Osteoprotegerin ist ein Protein, das an RANKL, einen Aktivator der Osteoklasten, bindet und dessen Aktivität blockiert [85]. Im Kontext der vaskulären Kalzifizierung kann OPG eine protektive Rolle spielen, indem es die Kalziumablagerung in den Gefäßwänden verhindert [86, 87]. Die Bedeutung von OPG in vaskulärer Kalzifizierung bleibt umstritten, da erhöhte OPG-Spiegel in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen wurden [88] und mit Gefäßsteifigkeit, Gefäßwandverdickung sowie kardiovaskulären Erkrankungen und kardiovaskulären Risikofaktoren assoziiert sind [89].

### **Osteopontin (OPN)**

Osteopontin verhindert ektopische Kalziumablagerungen [90]. Aufgrund seiner chemischen Struktur mit negativ geladenen Phosphoserinen besitzt es in phosphorylierter Form [91] eine hohe Affinität zu Hydroxylapatit [92]. Osteopontin wird durch ALP dephosphoryliert und damit inaktiviert [81].

### **Bone morphogenic Protein (BMP) 7**

BMP7 hemmt die osteochondrogene Differenzierung vaskulärer glatter Muskelzellen [93] und senkt den Phosphatspiegel im Blut [94]. Die hemmende Wirkung von BMP7 auf vaskuläre Kalzifizierung hängt dabei von dessen Stadium ab [95]. In stark verkalkten Gefäßen zeigt BMP7 keine Wirkung [96].

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

### 2.3.4 Klinische Bedeutung

Kalzifizierung erhöht die Gefäßsteifigkeit und führt zur diastolischen Hypertonie, Linksherzhypertrophie, Herzinsuffizienz [97] sowie Ischämien [98, 99].

Die valvuläre Kalzifizierung bedingt den häufigsten Herzklappenfehler der westlichen Welt, die Aortenklappenstenose. Je nach Grad wird eine Intervention notwendig [39, 100].

### 2.4 Bedeutung der Erythrozyten in kardiovaskulären Erkrankungen

Erythrozyten, auch bekannt als rote Blutkörperchen, sind die häufigste Zelle im menschlichen Blut. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, Sauerstoff ( $O_2$ ) von der Lunge zu den Organen und Kohlenstoffdioxid ( $CO_2$ ) von den Organen zur Lunge zu transportieren. Aufgrund ihrer bikonkaven Form und einem maximalen Durchmesser von ca. 7  $\mu m$  können sie problemlos enge Kapillaren passieren. Erythrozyten bestehen zu 90% aus Hämoglobin, dem roten Blutfarbstoff, der  $O_2$  und  $CO_2$  bindet. Erythrozyten werden im Knochenmark produziert. Reife Erythrozyten tragen keinen Zellkern mehr und haben eine Lebensdauer von etwa 120 Tagen, bevor sie in Milz und Leber abgebaut werden [7]. Darüber hinaus regulieren Erythrozyten den Gefäßtonus durch die Freisetzung von Mediatoren wie NO und Adenosintriphosphat (ATP) [101].

Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass neben Endothelzellen auch Erythrozyten eine große Bedeutung für die kardiovaskuläre Pathophysiologie haben [102, 103].

#### 2.4.1 Einfluss der Erythrozyten auf den Gefäßtonus

Erythrozyten können den Gefäßtonus über NO regulieren. Sie können NO aufnehmen und durch Reaktion mit Oxyhämoglobin inaktivieren [104] oder durch die Reduktion von Nitrit NO produzieren [105]. Erythrozyten tragen die endotheliale NO-Synthase (eNOS), die aus L-Arginin NO produziert [106]. Ein weiteres erythrozytäres Enzym ist die Arginase, speziell die Isoform Arginase 1 in Erythrozyten [107], die L-Arginin in Ornithin und Harnstoff spaltet [108]. Sie gilt als kompetitiver Hemmstoff für die eNOS, da beide Enzyme das gleiche Substrat, nämlich L-Arginin, haben [108]. Es gibt verschiedene Theorien zum Mechanismus der Freisetzung von NO in hypoxer Umgebung. Eine dieser Theorien besagt, dass Hämoglobin NO fest bindet und es erst bei Deoxygenierung in den peripheren Geweben freisetzt [109]. Dadurch kommt es zur hypoxischen Vasodilatation, die zu einer vermehrten Durchblutung und

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

Sauerstoffversorgung führt [110]. Eine andere Theorie betrachtet Nitrit als NO-Quelle bei Deoxygenierung [111].

Erythrozyten enthalten die lösliche Guanylatcyclase (sGC), einen intrazellulären NO-Rezeptor. Nach Aktivierung durch Bindung an NO, bewirkt die sGC eine Erhöhung des cGMP, was wiederum die Proteinkinase G (PKG) aktiviert [112]. Die PKG reguliert das Zytoskelett und somit die Kontraktion und Dilatation von vaskulären glatten Muskelzellen [113].

Erythrozyten können den Gefäßtonus auch über ATP regulieren. ATP wird aus den Erythrozyten exportiert, sowohl durch ATP-Bindungskassetten-Transporter (ABC) [114] als auch über Pannexin-1-Kanäle [115]. Das exportierte ATP bindet dann an Rezeptoren auf den Endothelzellen und führt zur Freisetzung von NO und PGI<sub>2</sub>, die eine Vasodilatation bewirken [116, 117]. Darüber hinaus kann ATP selbst nach seiner Spaltung in Adenosin eine Vasodilatation auslösen [117].

#### 2.4.2 Erythrozytärer Stoffwechsel in pathologischen Bedingungen

In pathologischen Situationen, wie zum Beispiel bei Diabetes mellitus, verändern sich die Eigenschaften von Erythrozyten. Sie binden verstärkt an das Endothel, setzen weniger NO frei und führen zu erhöhtem oxidativem Stress [118]. Bei endothelialer Dysfunktion binden die Erythrozyten vermehrt an das Endothel. Die dadurch resultierende enge Lagebeziehung der Erythrozyten zu den Endothelzellen korreliert positiv mit Endothelschäden [119]. In diabetischen Bedingungen fördern reaktive Sauerstoffspezies und Glukose die Aktivität der Arginase-1 [120]. Die gesteigerte Aktivität der Arginase-1 führt zur verminderten Freisetzung von NO, da das Substrat der eNOS verbraucht wird [108]. Dadurch trägt sie zur Entkoppelung der eNOS bei [121], was zu einer vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt [122]. Als Konsequenz kommt es zu einer endothelialen Dysfunktion. Studienergebnisse belegen, dass die Hemmung der Arginase-1 eine Verbesserung der endothelialen Funktion bei diabetischen Patienten bewirkt [123, 124]. Ungeklärt bleibt die Bedeutung von NO in diesem Zusammenhang.

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Genetisch modifizierte Tiere

Tierart	Verkäufer	Stamm	Geschlecht	URL
Arg1 <sup>tm1Pmu</sup> /J	The Jackson Laboratory	C57BL/6J	male and female	<a href="https://www.jax.org/strain/008817">https://www.jax.org/strain/008817</a>
ApoE <sup>tm1Unc</sup> /J	The Jackson Laboratory	C57BL/6J	male and female	<a href="https://www.jax.org/strain/002052">https://www.jax.org/strain/002052</a>
ErGFPcre	Ursula Klingmüller	C57BL/6 / BALB/c chimeras	male	DOI: <a href="https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1442">10.1182/blood-2003-05-1442</a>

Tabelle 2: Genetisch modifizierte Tiere

##### 3.1.2 Zellen

Name	Firma	URL
Primäre aortale glatte Muskelzellen der Maus		In domo isoliert
primäre humane aortale glatte Muskelzellen	PromoCell	C-12533

Tabelle 3: Zellen

##### 3.1.3 Antikörper

Ziel-Antigen	Firma	Katalognummer	Verdünnung	URL
Alpha-Aktinin	Cell Signaling Technology	3134	1:1,000	RRID:AB_2223798
Arginase-1	Cell Signaling Technology	93668	1:1,000	RRID: AB_2800207
Arginase-2	Cell Signaling Technology	55003	1:1,000	RRID: AB_2799475
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories	SP-2001		
Beta-Aktin	abcam	8226	1:5,000	RRID: AB_306371

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

CD31 (PECAM-1)	Santa Cruz Biotechnology	sc-18916	1:200	RRID: AB_627028
CD45	Santa Cruz Biotechnology	sc-20056		RRID: AB_627072
eNOS	Cell Signaling Technology	32027	1:1,000	RRID: AB_2728756
Esel anti-Hase IgG, MPO-konjugiert	GE Healthcare	NA934	1:5,000	RRID: AB_772206
Esel anti-Ziege IgG, Alexa Fluor Plus 488	Thermo Fisher Scientific	A32814	1:500	RRID: AB_2762838
Esel anti-Ziege IgG, MPO-konjugiert	R&D Systems	HAF109	1:5,000	RRID: AB_357236
Mac2	Cedarlane	CL8942AP		RRID: AB_10060357
MMP9	Aviva Systems Biology	ARP33090_ T100		RRID: AB_2144889
PCNA	abcam	92552	1:100	RRID: AB_10561973
S-Nitroso-Cysteine (SNO-Cys)	Alpha Diagnostic International	NISC11-A	1:100	RRID: AB_1622553
Schaf anti-Maus IgG, MPO-konjugiert	GE Healthcare	NA931	1:5,000	RRID: AB_772210
SMA	Sigma-Aldrich	A2547	1:1,000	RRID: AB_476701
Ter119	R&D Systems	MAB1125	1:100	RRID: AB_2297123
VCAM1	abcam	ab134047	1:100	RRID: AB_2721053
VECTASTAIN® Elite ABC-HRP Kit, Peroxidase	Vector Laboratories	PK-6100		
Ziege anti-Hase IgG, Alexa Fluor Plus 555	Thermo Fisher Scientific	A32732	1:500	RRID: AB_2633281
Ziege anti-Maus IgG, Alexa Fluor Plus 488	Thermo Fisher Scientific	A32723	1:500	RRID: AB_2633275
Ziege anti-Maus IgG, Alexa Fluor Plus 555	ThermoFisher Scientific	A32727	1:500	RRID: AB_2633276
Ziege anti-Maus IgG, Biotin-XX konjugiert	Innovative Research	B2763	1:1,000	RRID: AB_1500659

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

Ziege anti-Maus IgG, Biotin-XX konjugiert	Innovative Research	B2770	1:1,000	RRID: AB_1500688
Ziege anti-Ratte IgG, Alexa Fluor Plus 488	abcam	ab150157	1:500	RRID: AB_2722511

Tabelle 4: Antikörper

### 3.1.4 Chemikalien

Beschreibung	Firma	Bestell-/Katalognummer
10X Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Gibco	70011-051
2-Methylbutan	Carl Roth	3927.1
3-Amino-9-Ethylcarbazol	Vector Laboratories	SK-4200
3, 3'-Diaminobenzidin	Vector Laboratories	SK-4100
Aceton	PanReac AppliChem	131007
Acrolein	Sigma-Aldrich	89116
Agarose Broad Range, 10g	Carl Roth	T846.1
Alizarinrot S	Carl Roth	0348.2
Ammoniak 10%	Carl Roth	6756.1
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	AppliChem	A2941
BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific	23225
CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich	C5670
Chloroform	Carl Roth	T901.1
DAF-2 DA, Fluorescent nitric oxide probe	abcam	ab145283
Destilliertes Wasser	Merck Millipore	CAS7732-18-5
Dexamethason	Sigma-Aldrich	D8893
Dihydroethidium (Hydroethidine)	Invitrogen	D23107
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth	4984.1
DirectPCR® Ear Lysis reagent	Peqlab	402-E
DMEM/F12 Glutmax medium	Gibco	10565018
DNase I	Sigma-Aldrich	AMPD1
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; GlutaMAX™-I)	Gibco	10569010
EDTA- Solution pH 8.0 (0.5 M)	PanReac AppliChem	A4892

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

EnzyChrom™ AF Cholesterol Assay Kit	BioAssay Systems	E2CH-100
Eosin G Lösung 0,5%	Carl Roth	X883.2
Essigsäure 100%	Carl Roth	3738.4
Ethanol 100%	Carl Roth	K928
Ethanol 70%	Carl Roth	0081
Ethanol 96%	Carl Roth	T171.4
Eukitt	Sigma-Aldrich	3989
FBS	Gibco	10270-106
Fischhautgelatine	Sigma-Aldrich	G7041
Fluoreszenz Eindeckmedium	Dako	S3023
Formaline fixative, 10%	VWR Chemicals	9713.5000
Gelatine Lösung 2%	Sigma-Aldrich	G1393
Giemsa Färbelösung	Merck	9204
Gill's Hämatoxylin	Sigma-Aldrich	GHS332
Glycin	Carl Roth	0079
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Carl Roth	9681
Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X)	ThermoFischer Scientific	78444
Hämalaun sauer nach Mayer	Carl Roth	T865.2
Histopaque®-1119	Sigma-Aldrich	11191
Humanes Insulin	Sigma-Aldrich	I3536
ImmuMount	ThermoFisher Scientific	9990402
Invitrogen™ TRIzol™ Reagenz	ThermoFischer Scientific	15596026
Isofluran	Piramal Critical Care	66794-017-25
Isopropanol	Carl Roth	1HPK.1
Kalium-hexacyanoferrin (II)	Sigma-Aldrich	P-3289-100G
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth	P018.2
Kaliumhexacyanoferrat (II)	Sigma-Aldrich	P3289
Kernechrot-Aluminiumsulfat-Lösung	Carl Roth	N069-1
Kollagenase II	Worthington	9001-12-1
L-Arginin (hydrochlorid)	Cayman Chemical	23703
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich	A4403
Luminol-basiertes Chemilumineszenz-Substrat (ECL)	ThermoFischer Scientific	34075

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

M-MLV Reverse Transcriptase	Promega	M1701
Mangan (II) Dichlorid (MnCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich	244589
May-Grünwald Färbelösung	Merck	1424
Methanol	Carl Roth	T909.1
Milchpulver	Carl Roth	T145.4
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, 1,2-Bis-(dimethylamino)-ethan (TEMED)	Carl Roth	2367.1
N6022	Sigma-Aldrich	9054-89-1
NaCl	Carl Roth	9265
Natriumsäure	Sigma-Aldrich	71289
Nomega-Nitro-L-arginine (L-NNA)	abcam	ab141312
Normales Ziegenserum	Abcam	ab156046
Oil red O	Sigma-Aldrich	O0625
Ortho-Phosphorsäure (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth	9079.2
OsteoSense 750EX	Perkin Elmer	NEV10053EX
Paraplast Plus®	Carl Roth	X881.2
Penicillin-Streptomycin	Gibco	15140122
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich	P6744
Poly-L-lysine solution	Sigma-Aldrich	P4707
Polymethylsulfonylfluorid (PMSF)	CellSignaling Technology	8553
Proteinase K Lösung (RNase free)	Peqlab	04-1075
PTIO	Sigma-Aldrich	P5084
Rinderserumalbumin Fraction V (BSA)	Carl Roth	2834.2
RIPA buffer	Cell Signaling Technology	9806
Roti-Clear	Carl Roth	A538.5
Roti-Liquid Barrier Marker, rot	Carl Roth	AN92.1
Rotiphorese ® NF-Acrylamid/Bis- Lösung 30	Carl Roth	A124.1
Salzsäure (HCl)	PanReac AppliChem	122523.1211
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Carl Roth	9316.2
Sirius red (Direct Red 80)	Sigma-Aldrich	365548

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS) 10%	AppliChem	A0676
SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix	BioRad	1725274
SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	ThermoFisher Scientific	34579
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura® Finetek	4583
Triglyceride Assay Kit	BioAssay Systems	ETGA-200
TRIS	Carl Roth	0188
Triton® X 100	Carl Roth	3051
Trypsin-EDTA (0,05 %)	ThermoFisher Scientific	25300054
Tween® 20	PanReac AppliChem	A4974
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water	ThermoFischer Scientific	10977035
Wachstumsmedium für Endothelzellen (MV2 Kit)	PromoCell	C-22022
Weizenkeimagglutinin Alexa Fluor™ 488 conjugate	Invitrogen	W11261
Western type diet	ssniff-Spezialdiäten	TD88137
Whatman® Protran® nitrocellulose membranes	Merck	WHA10402506
Xylol (>98%, rein, für Histologie)	Carl Roth	9713.5
Zinkformalin, FIXX™	Sigma-Aldrich	Z2902
Zitronensäure-Monohydrat	Sigma-Aldrich	C1909
α-Isonitropropiophenon	Sigma-Aldrich	I3502
β-Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich	G5422

*Tabelle 5: Chemikalien*

### 3.1.5 Verbrauchsmaterialien

<b>Name</b>	<b>Firma</b>	<b>Bestellnummer</b>
Deckgläser 24x60 mm	ThermoFisher Scientific	BB022060A1
Einmal-Wägeschalen 14x14 mm	Carl Roth	2159.2
Eppendorf-Cups 1,5 ml SafeLock	Eppendorf AG	0030120086
Eppendorf-Cups 2,0 ml	Eppendorf AG	1003-8760
Falcon ® Zellsiebe	Fisher scientific	10282631

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

Falcon 15 ml	Greiner Bio-One GmbH	188271
Falcon 50 ml	Greiner Bio-One GmbH	227261
LS Säulen	Miltenyi Biotec	130-042-401
Objektträger Superfrost ultra	ThermoFisher Scientific	J3800AMNZ
Omnifix® 100 Solo Einmal- Insulinspritze	Braun	9161708V
Pasteurpipetten kurz	VWR International	612-1701
Pipettenspitzen 0,1-10 µl	Starlab International GmbH	S1110-3000
Pipettenspitzen 100 µl	Starlab International GmbH	S1111-0006
Pipettenspitzen 1000 µl	Starlab International GmbH	S1111-6001
Serologische Pipetten 10 ml steril	Greiner Bio-One GmbH	607107
Sterican® Gr. 1, G 20 x 1 1/2" / ø 0,90 x 40 mm, gelb	Braun	4657519
Sterican® Gr. 18, G 26 x 1" / ø 0,45 x 25 mm, braun	Braun	4657683
Trichter (100mmx155mm)	Carl Roth	YA49.1
Tissue-Tek® Cryomold	Sakura	4565

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

### 3.1.6 Geräte

<b>Beschreibung</b>	<b>Firma</b>
38MHz Schallkopf	FUJIFILM VisualSonics, Toronto, CA
Avanti JXN-26 Centrifuge	Beckman Coulter, Kalifornien, USA
CellXpert C170-Zellkulturinkubator	Eppendorf SE, Hamburg, D
Centrifuge 5424 R	Eppendorf SE, Hamburg, D
Centrifuge 5702R	Eppendorf SE, Hamburg, D
CFX Connect Real-Time PCR Detection System	BioRad, Kalifornien, USA
CODA 4-Kanal High-Throughput-Non- Invasive Blood Pressure System	Kent Scientific Corporation, Torrington, USA
FCSCanto II	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Fusion FX system	Vilber Lourmat, Eberhardzell, D

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

Gewebeinfiltrationsautomat TP1020	Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, DE
GlucoSmart® Swing 2-Messgerät	GlucoSmart, Bobingen, D
Inkubator	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA
Inkubator Heratherm	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA
Integra Biosciences™ Vacusafe™ Comfort Absaugsystem	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA
IVIS ® Spectrum in-vivo-Bildgebung	PerkinElmer, Massachusetts, USA
Leica TCS SP8	Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, D
Mikrotom RM2245	Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, D
NanoDrop Mikrovolumen Spektralphotometer	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA
Olympus BX51 Mikroskop	Olympus Corporation, Tokyo, JPN
Paraffinausgießstation EG 1150 H	Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, D
pH-Elektrode	VWR International, Radnor, PA, US
pH-Meter	Hanna Instruments, Woonsocket, USA
PowerPac™ Basic Power Supply	BioRad, Kalifornien, USA
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	BioRad, Kalifornien, USA
SpectraMax i3x	Molecular Devices, Kalifornien, USA
Sysmex Hämatologieanalysator KX-21N	Sysmex Corporation, Kōbe, JPN
Thermomixer comfort	ThermoFisher Scientific
Thermomixer comfort	Eppendorf SE, Hamburg, D
VEVO3100 high resolution imaging system	FUJIFILM VisualSonics, Toronto, CA
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Waage, Semi-Micro Lab Balances	Sartorius, Göttingen, D

*Tabelle 7: Geräte*

### 3.1.7 Software

<b>Beschreibung</b>	<b>Firma</b>
cellSens Dimension Desktop 2.3	Olympus Corporation, Tokyo, JPN
CODA PC software	Kent Scientific Corporation, Torrington, USA
Fusion software	Vilber Lourmat, Eberhardzell, D
Graph Pad Prism 9.1.0	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
Image-Pro Plus 7.0	Media Cybernetics Inc., Rockville, USA
LasX	Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, D
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
SoftMax Pro 6.5 software	Molecular Devices, Kalifornien, USA

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

Vevo LAB software

FUJIFILM VisualSonics, Toronto, CA

Tabella 8: Software

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Versuchstiere

In vorliegender Arbeit wurden hypercholesterinämie Mäuse verwendet, denen das Enzym Arginase-1 (Arg-1) in Erythrozyten (Ery) fehlte. Hierzu waren zuvor Mäuse, die das durch den Erythropoetin-Rezeptor Promotor kontrollierte Gen für die Cre recombinase exprimieren, für sieben Generationen in Mäuse mit dem C57BL/6J (Janvier) Hintergrund zurückgekreuzt. Dann wurden diese Tiere mit Mäusen gekreuzt, denen das Apolipoprotein E fehlt ( $apoE^{-/-}$ ). Anschließend wurden männliche  $apoE^{-/-}$  Mäuse mit weiblichen Mäusen gepaart, die loxP Stellen in Exon sieben und acht des Arg-1-Gens haben. Die nachfolgenden Generationen mit männlichen und weiblichen ErCre transgenen Mäusen ( $apoE^{-/-}$  RBC.Arg1-knockout, KO) und ErCre wildtyp Mäusen ( $apoE^{-/-}$  RBC.Arg1-wildtyp, WT)  $apoE^{-/-}$  Arg1 fl/fl wurden dann in vorliegender Arbeit verwendet.

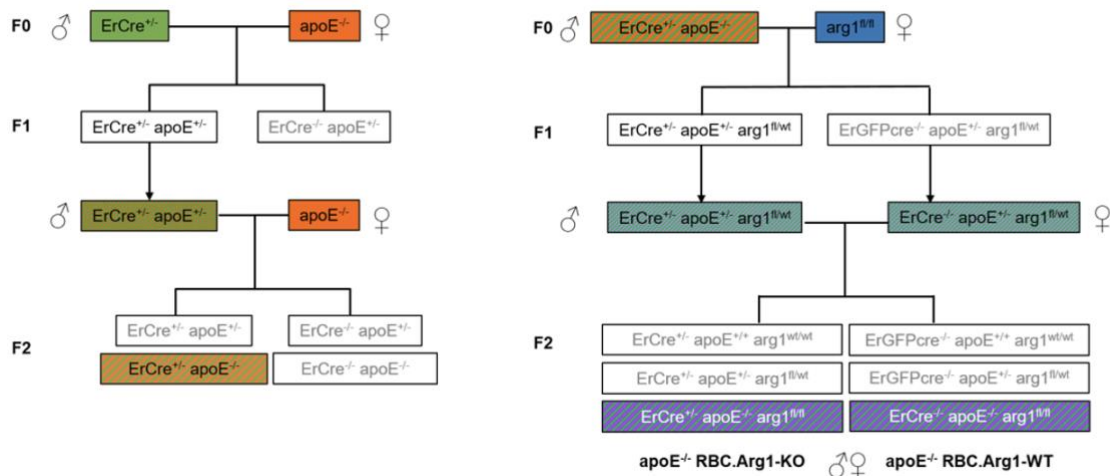


Abbildung 1: Mäuse mit Arginase-1 Knockout in Erythrozyten

Stammbaum-Erzeugung hypercholesterinämischer Mäuse mit Arginase-1 Knockout in Erythrozyten

Die Versuchstiere erhielten im Alter von fünf Wochen für 15 bzw. 20 Wochen eine, an die menschlichen westlichen Ernährungsgewohnheiten angepasste Diät mit 1,25% Cholesterin (Western type diet, ssniff-Spezialdiäten, TD88137). Die Wahl der Zeitpunkte beruht dabei auf Ergebnissen einer Studie von Nakashima et al., 1994 [125]. Alle Tierversuche wurden im Voraus vom hiesigen Tierethikkomitee sowie dem Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz im Rahmen des TVA G16-1-003

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

genehmigt und entsprachen den geltenden nationalen Richtlinien zum Umgang mit Versuchstieren.

### 3.2.1.1 Genotypisierung

Um eine verblindete Durchführung der Experimente zu gewährleisten, wurden Tiere im Alter von drei Wochen mittels Stanzmarkierungen am Ohr nummeriert. Zur Unterscheidung des genomischen Materials der apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT und apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäuse wurde das gewonnene Biopsiematerial über Nacht im DirectPCR® Ear Lysis Reagenz, das 0,2 mg/ml Proteinase K beinhaltet, im Thermomixer (EppendorfSE) bei 55°C und 350rpm (rounds per minute) lysiert. Eine Erhitzung auf 85°C für 60 min am Folgetag führte zur Inaktivierung der Proteinase K. Die anschließende Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgte über 40 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für insgesamt sechs Minuten, Hybridisierung für eine Minute bei 60°C und Elongation für eine Minute bei 72°C mit fünf Mikrolitern der 1:5 verdünnten Probe unter Verwendung folgender Primer:

Protein	Gen	5'-3' Richtung
Arginase-1	Arg-1	AGCCAGGGACTGACTACCTT (oIMR9556) TTGGGAGGAGAAGGCGTTTG (oIMR9557)
Apolipoprotein E	apoE <sup>-/-</sup>	GCCTAGCCGAGGGAGAGCCG (oIMR0180) (WT) TGTGACTTGGGAGCTCTGCAGC (oIMR0181) (KO) GCCGCCCGACTGCATCT (oIMR0182)
Erythropoetin-Rezeptor-Promotor	ErGFPCre	CAGGAATTCAAGCTCAACCTCA (ErCre <sup>-/-</sup> ) GGCAGCCTGGGCACCTTCAC (ErCre <sup>+/-</sup> ) GTGTGGCTGCCCCTTCTGCCA

Tabelle 9: Primer für Genotypisierung

Die Proben wurden dann auf ein 1,5%iges Agarose Gel gegeben. Es folgte die Gelelektrophorese (Elektrophoresesystem, ThermoFisher Scientific). Die Genotypisierung der Mäuse wurde von Marina Thielen, Medizinisch-Technische Angestellte der Arbeitsgruppe, durchgeführt.

### 3.2.1.2 Ultraschall

Eine Woche vor Tötung der Mäuse, respektive im Alter von 19 bzw. 24 Wochen, erhielten die Mäuse eine Ultraschalluntersuchung des Herzens und der Aa. carotides. Dabei wurde auf morphologische und kardiodynamische Veränderungen geachtet. Die

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

für die Untersuchung notwendige thorakale Rasur erfolgte am Vortag. Die Ultraschalluntersuchung erfolgte unter Inhalationsanästhesie. Die Anästhesieeinleitung geschah mit 2,5% Isofluran und die Narkose wurde mit 0,5%-1,5% Isofluran aufrecht gehalten. Das verwendete VEVO3100 System (Visual Sonics) ist ein hochauflösendes Mikro-Ultraschall-Bildgebungssystem, das mit seinem größengerechten 38MHz Schallkopf (Visual Sonics) für Mausuntersuchung geeignet ist. Der Schallkopf wurde sagittal parasternal aufgelegt. Die ermittelten Werte im M-Mode waren neben dem Puls die linksventrikuläre vordere Wanddicke systolisch (systolische LV AWT) und diastolisch (diastolische LV AWT) und die linksventrikuläre hintere Wanddicke systolisch (systolic LV PWT) und diastolisch (diastolische LV PWT). Weiter wurden das Gewicht des linken Ventrikels und die prozentuale systolische zirkumferentielle Verkürzungsfraction (FS-fractional shortening) nach Teichholz ( $\frac{LVEDD-LVESD}{LVEDD}$ , LVEDD=enddiastolischer linksventrikulärer Durchmesser, LVESD=endsystolischer linksventrikulärer Durchmesser, [%]) berechnet. Das Herzzeitvolumen wurde aus dem Produkt der Herzfrequenz mit dem Schlagvolumen errechnet und in der Einheit [l/min] angegeben. Im B-Mode wurden die Spitzengeschwindigkeit des Blutflusses über die Aortenklappe (AoV pv) und der Spitzendruck (AoV pg) über der Aortenklappe ermittelt. Die Ergebnisse wurden anhand der Vevo LAB software und Microsoft Excel 2016 ausgewertet. Die echokardiographischen Untersuchungen und Auswertungen wurden von Dr. Michael Molitor durchgeführt.

### *3.2.1.3 In-vivo Bildgebung*

Die Bestimmung der osteogenen Aktivität gelingt mit dem fluoreszierenden Bildgebungsmittel OsteoSense 750EX (PerkinElmer). Die Injektion von 4nM pro 25g Körpergewicht erfolgte beim wachen Tier in eine Schwanzvene. 24 Stunden nach Injektion wurde das Tier getötet und die entnommene Aorta im IVIS® Spectrum in-vivo-Bildgebung dargestellt. Die Auswertung erfolgte mit ImageProPlus 7.0.

## **3.2.2 Blut**

### *3.2.2.1 Blutentnahme*

Die Blutentnahme bei Tötung erfolgte beim anästhesierten Tier durch die präfinale Herzpunktion substernal mit einer 20G Nadel. Die Spritze enthielt 100µl 3,8%iges

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

antikoagulierendes Natriumcitrat. Das anschließende Schwenken verhinderte zusätzlich die Gerinnung.

### *3.2.2.2 Vollblut-Zellzählung*

Eine Vollblut-Zellzählung erfolgte mit Hilfe des Sysmex Hämatologieanalysator KX-21N. Dabei wurden folgende für uns relevante Parameter bestimmt:

Anzahl aller Leukozyten (WBC), Anzahl aller Erythrozyten (RBC), Hämoglobinkonzentration (HGB), Hämatokrit (HCT), mittleres Erythrozytenvolumen in der Gesamtprobe (MCV), mittleres Hämoglobinvolumen pro Erythrozyten (MCH), mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (MCHC), Anzahl aller Thrombozyten (PLT), rechnerische Verteilungsbreite des Erythrozyten-Variationskoeffizienten (RDW-CV), rechnerische Verteilungsbreite der Thrombozyten (PDW), mittleres Thrombozytenvolumen (MPV).

### *3.2.2.3 Blutausstrich*

Um das gewonnene Blut auf eventuelle morphologische Unterschiede zu prüfen, wurde ein Tropfen Blut auf ein mit 0,01% Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger ausgestrichen. Es folgte eine Pappenheimfärbung nach folgendem Schema:

- May-Grünwald Färbelösung für drei Minuten
- 1:1 verdünnte May-Grünwald Färbelösung für zwei Minuten
- 1:5 verdünnte Giemsa Färbelösung für 20 min
- Dreimaliges Waschen für je fünf Minuten
- Trocknen bei Raumluft für 15 Minuten

Ein Eindecken der Blutausstriche wurde nicht durchgeführt. Zur Verdünnung wurde der Sörensen Puffer (pH=7) genutzt. Dieser bestand aus 40ml 0,1M Kaliumhydrogenphosphat und 60ml 0,1M Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat.

### *3.2.2.4 Blutzuckermessung*

Die Blutzuckerwerte wurden mit dem GlucoSmart® Swing 2-Messgerät (GlucoSmart) in der Einheit mg/dl ermittelt. Hierzu wurden mindestens 0,5 µl Blut auf den Teststreifen mit kapillarer Einsaugtechnik gegeben. Die Mäuse hatten nicht gefastet.

### *3.2.2.5 Erythrozytenmembranisolation*

Die Erythrozytenmembranen gelten als Träger der Arginase-1 und endothelialen NO-Synthase. Um den Einfluss derer auf humane glatte Muskelzellen zu untersuchen,

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

wurden die Erythrozytenmembranen von Mäusen isoliert. Nach Blutentnahme (vgl. 3.2.2.1) und Plasmagewinnung (vgl. 3.2.2.8), wurden die verbleibenden Blutzellen mit 1X PBS (Phosphate-Buffered Saline) auf 1ml aufgefüllt. Die Mischung wurde vorsichtig auf 500µl Histopaque®-1119, eine Mischung aus Polysaccharose und Natriumdiatrizoat mit einer Dichte von 1,119 g/ml, gegeben. Die anschließende Zentrifugation (Centrifuge 5424 R, eppendorfSE) der Probe bei 700g für 30 Minuten garantierte die Trennung der Erythrozyten von übrigen Blutbestandteilen. Zur Lyse der Erythrozytenmembranen wurden die Erythrozyten im Verhältnis 1:140 für eine Stunde bei 4°C mit einem hypotonen Lysepuffer (1000 ml destilliertes Wasser, 10mM NaCl, 1mM TrisHCl, 1mM EDTA, pH=7,2 (pH-Meter, Hanna Instruments)) vermischt. Anschließendes Zentrifugieren (Avanti JXN-26 Centrifuge, Beckman Coulter) bei 13.000g für 15 min und Waschen mit 1X PBS endete in der Isolation der Erythrozytenmembranen. Diese wurden in flüssigen Stickstoff überführt und bei -80°C gelagert.

#### *3.2.2.6 Immunfluoreszenzfärbung der Erythrozyten*

Um die relevanten Enzyme in Erythrozyten darzustellen, erfolgte deren Immunfluoreszenzfärbung. Hierzu wurden die aufgereinigten Erythrozyten in 0,5%iges Acrolein in PBS für fünf Minuten unter Rotation fixiert. Anschließend wurden die fixierten Erythrozyten dreimal mit Spülpuffer, bestehend aus 1X PBS mit 0,1M Glycin, gewaschen. Wichtig war die ständige, sorgfältige Resuspension, die das Zusammenkleben der Blutzellen verhinderte. Es folgte die Permeabilisierung für fünf Minuten bei Rotation mit einem 0,1%igen TritonX-100 Spülpuffer. An folgendes, zweimaliges Waschen, schloss sich die Inkubationszeit von 15 Minuten im Spülpuffer an, die die Inaktivierung nicht reagierter Aldehyde sicherstellte. Dann wurden die Proben für 45 Minuten mit Sperrpuffer (PBS, 0,05mM Glycin, 0,2% Fischhautgelatine, 0,05% Natriumsäure) inkubiert. In ebendiesem Puffer wurden die primären Antikörper eNOS und Arg-1 1:1000 verdünnt. Die Inkubation der Proben mit den primären Antikörpern erfolgte über Nacht unter Rotation bei 4°C. Am Folgetag wurden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen entfernt. Dann wurde der Zweite Antikörper IgG Ziege anti-Maus, Alexa Fluor Plus 555 1:200 in PBS verdünnt und das an die erythrozytären Membranen bindende konjugierte WGA-555, Alexa Fluor 488 hinzugegeben. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach abschließendem gründlichem Waschen wurden die Proben mit einem Eindeckmedium

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

auf einen mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger aufgetragen. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Konfokal Laser-Scanning-Mikroskop Leica TCS SP8 (Leica), die Auswertungen mit der Leica Application Suite X Software (LAS X) durchgeführt.

#### *3.2.2.7 Arginase-Aktivitäts-Assay*

Um die Arginase Aktivität in Erythrozyten zu bestimmen, wurden aufgereinigte Erythrozyten mit einem Puffer lysiert, der 0,1% TritonX und Proteaseinhibitoren enthielt. Die hochwellige Beschallung mit einem Sonicator gewährleistete die Homogenisierung der Proben. Dann wurde zentrifugiert und Teile des Überstands mit TrisHCl inklusive 10mM Mangandichlorid versetzt. Grund für diesen Schritt ist das Wissen über Arginase als Mangan-haltiges Enzym. Zwecks Reaktionsinitiation folgte eine Erhitzung der Proben auf 56°C für zehn Minuten. Dann wurde jeweils eine Hälfte der Probe mit L-Arginin in TrisHCl und die andere Hälfte als Kontrolle nur mit TrisHCl (pH=9,7) vermischt. Für eine Stunde lief die Reaktion bei 37°C ab und wurde dann mit einer Säurelösung (1:3:7, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:H<sub>2</sub>O) unterbrochen. Dann wurde  $\alpha$ -Isopropiophenon in Ethanol hinzugegeben. Die Proben wurden für eine Stunde auf 100°C erhitzt und nach einer Dunkelinkubation von weiteren zehn Minuten konnten die Ergebnisse mit Spektralphotometrie (SpectraMax i3x, Molecular Devices) bei 550nm ermittelt werden.

#### *3.2.2.8 Plasmagewinnung*

Zur Plasmagewinnung wurde das Blut für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit 1500g zentrifugiert (Centrifuge 5424 R, eppendorfSE). Der Überstand, respektive das Plasma, wurde in ein neues Behältnis überführt und bei -80°C gelagert.

#### *3.2.2.9 Plasmaanalyse*

Die Proben wurden auf Raumtemperatur gebracht und Cholesterin-, HDL-/LDL- und Triacylglycerid-Werte quantitativ kolorimetrisch bestimmt (EnzyChrom™ BioAssay System). Die Auswertung erfolgte mit der SoftMax Pro 6.5 Software (Molecular Devices), Microsoft Excel 2016 und Graph Pad Prism.

##### *3.2.2.9.1 Cholesterin-Analyse*

Die Cholesterin-Analyse durch den EnzyChrom™ Cholesterol Assay Kit (BioAssay Systems, Kalifornien, USA, EECCH-100) beruht auf der Umwandlung von Cholesterinestern zu freiem Cholesterin durch die Cholesterolesterase und die

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

anschließende Umwandlung freien Cholesterins in Choles-4-ene-2-one durch die Cholesterolhydrogenase. Im letztgenannten Schritt wird NAD zu NADH reduziert. Dieses kann bei 340 nm kolorimetrisch quantitativ bestimmt werden und ist in seiner Konzentration proportional zu dem in der Probe enthaltenen Cholesterol. Zur Durchführung des Experiments wurden die Plasmaproben auf Raumtemperatur gebracht. Die im Kit enthaltene NAD-Lösung wurde zu den Proben und vorab erstellten Standards hinzugefügt. Nach fünf Minuten und einer Hintergrundmessung wurde der Enzymmix hinzugegeben. Nach weiteren 30 Minuten erfolgte die finale Messung mit dem SpectraMax i3x (Molecular Devices). Die Auswertung erfolgte mit der SoftMax Pro 6.5 Software (Molecular Devices), Microsoft Excel 2016 und Graph Pad Prism.

#### 3.2.2.9.2 HDL/LDL-Analyse

Das Low-Density-Lipoprotein (LDL), das nachweislich atherogen ist und das High-Density-Lipoprotein (HDL), das nachweislich antiatherogen ist, wurden mit Hilfe des EnzyChrom™ HDL and LDL/VLDL Assay Kit (BioAssay Systems, Kalifornien, USA, EHDL-100) quantitativ kolorimetrisch bestimmt. Die Messung beruht auf der Polyethylenglykol (PEG) – Fällung von Proteinen. Es werden HDL von LDL/VLDL getrennt. Anschließend kann der Cholesterol Gehalt bestimmt werden (vgl. 3.2.2.9.1). Hierfür wurde das Präzipitations-Reagenz zu den Proben hinzugefügt. Die Mischung wurde fünf Minuten bei 9500g zentrifugiert (Centrifuge 5424 R, eppendorfSE). Der Überstand (HDL) wurde vorsichtig vom Pellet (LDL) getrennt. Zu ebendiesen und einer Gesamtprobe wurde das Arbeitsreagenz mit enthaltenem Enzymmix und enthaltener NAD-Lösung zugegeben. Die Messung erfolgte nach 30 Minuten bei 340nm mit dem SpectraMax i3x (Molecular Devices). Die Auswertung erfolgte mit der SoftMax Pro 6.5 Software (Molecular Devices), Microsoft Excel 2016 und Graph Pad Prism.

#### 3.2.2.9.3 Triacylglycerid-Analyse

Ein hoher Spiegel von Triacylglyceriden im Körper wird mit einer Zunahme von Atherosklerose in Verbindung gebracht. Der EnzyChrom™ Triglyceride Assay Kit (BioAssay Systems, Kalifornien, USA, ETGA-200) nutzt die Triglycerid-Hydrolyse, die ein Farbstoffreagenz oxidiert. Dieses kann bei 570nm quantitativ kolorimetrisch bestimmt werden und verhält sich proportional zur Triacylglyceridmenge in der zu untersuchenden Probe. Zur Analyse wurden die Proben 1:5 verdünnt und einem Arbeitsreagenz, bestehend aus Assay-Puffer, Enzymmix, Lipase, ATP und dem

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

Farbstoffreagenz, ausgesetzt. 30 Minuten später erfolgte die Messung mit Hilfe des SpectraMax i3x (Molecular Devices) bei 570nm. Die Auswertung erfolgte mit der SoftMax Pro 6.5 Software (Molecular Devices), Microsoft Excel 2016 und Graph Pad Prism.

#### *3.2.2.1 Proteinquantifizierung*

Um von unterschiedlichen Proben die gleiche Menge an Proteinen in Experimenten zu verwenden, wurde vorab mit Hilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kits die enthaltene Proteinkonzentration kolorimetrisch bestimmt. Dieser Kit beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  und dem kolorimetrischen Nachweis der einfachen Kupferkationen ( $\text{Cu}^{1+}$ ) durch Bicinchoninsäure (BCA). Eine vorab angesetzte Standardreihe (3,9  $\mu\text{g/ml}$  bis 2000  $\mu\text{g/ml}$ ) und die 1:10 verdünnten Proben wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert. Eine 50:1 Mischung der mitgelieferten Reagenzien A und B wurden im Verhältnis 8:1 zugefügt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C (Inkubator Heratherm, ThermoFisher Scientific) erfolgte die Lesung bei 562nm unter Nutzung des SpectraMax i3x (Molecular Devices). Die Auswertung erfolgte mit der SoftMax Pro 6.5 Software (Molecular Devices) und Microsoft Excel 2016.

#### *3.2.2.1 Fluoreszenz-Durchflusszytometrie*

Zur Bestimmung der NO-Freisetzung aus den Erythrozyten, die aus den Mäusen mit veränderten Genotypen gewonnen wurden, mischte man zu Beginn  $1 \times 10^6$  aufgereinigte Zellen in PBS, welches mit Calcium und Magnesium versetzt war. Die Inkubation erfolgte dann initial entweder mit Nomega-Nitro-L-Arginin (L-NNA, 5 $\mu\text{M}$ , 45 Minuten, 37°C) zur Inhibierung der NO-Synthase oder direkt mit 4,5-Diaminofluoresceindiacetat (DAF-2-DA, 1-2  $\mu\text{M}$ , 45 Minuten, 37°C), einem fluoreszierenden, membrangängigen Substrat, das NO in lebenden Zellen detektieren kann. Ebenfalls von Interesse waren die in den Proben entstehenden Sauerstoffradikale und die damit verbundene Peroxidaseaktivität, die sich durch Zusatz des 2', 7'-dichlorofluorescein Diacetat (DCFDA/H2DCFDA, 20 $\mu\text{M}$ , 30 min, 37°C) ermitteln ließ. Nach Substratzugabe und einmaligem Waschen, wurden die Proben unverzüglich mit Hilfe des FACSCanto II (BD Biosciences) flusszytometrisch untersucht. Diese Analysen wurden gemeinsam mit Dr. Magdalena Bochenek, PostDoc der Arbeitsgruppe, durchgeführt.

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

### 3.2.3 Aorta

#### 3.2.3.1 *En face Methode*

Um Veränderungen in der Aorta zu untersuchen, wurde die Aorta nach der sogenannten „En face“-Methode entnommen. Hierbei wurde die Maus mit Hilfe einer Ketamin/Xylazin Mischung (25IE NaCl 0,9%, 25IE Xylazin 2%, 50IE Ketamin 5%; intraperitoneal injiziert, bei männlichen Mäusen 1IE=2,4g Körpergewicht, bei weiblichen Mäusen 1IE=3,2g Körpergewicht) in tiefe Narkose gelegt und nach präfinaler Herzpunktion zwecks Blutentnahme durch zervikale Dislokation getötet. Mit einem ventralen, medianen Schnitt wurde der Situs der Maus eröffnet. Zur vollständigen Freilegung des Situs wurden das Peritoneum, das Mediastinum und der Thoraxraum eröffnet. Nach Aufsuchen des Herzens und Inzision der Vena cava inferior subdiaphragmal wurde das Blutsystem mit 1X PBS vom linken Ventrikel ausgehend gespült. Anschließend wurden die Lungen, die Leber, die Nieren inklusive Harntrakt, die Milz, das viszerale Fett (VAT), der Verdauungstrakt und die Sexualorgane entnommen. Die im Retroperitoneum befindliche, auf der Wirbelsäule liegende Aorta wurde dann durch Orientierung an dem im Situs verbliebenen Herzen und dem Abgang der Nierenarterien beidseits vom Herzen bis zur iliakalen Bifurkation freigelegt und anschließend mitsamt Herz entnommen. Dann folgte die totale Eröffnung der Aorta entlang ihrer Längsachse. Zuletzt wurde die Aorta mit Minutien Pins auf einem Dissektionsgeschirr befestigt und über Nacht in Zink-Formalin fixiert. Diese Arbeiten wurden gemeinsam mit Univ.-Prof. Schäfer, Leiterin des Labors für Translationale und Vaskuläre Biologie, durchgeführt.

#### 3.2.3.2 *Oil Red O Färbung*

Die Quantifizierung der Lipidablagerungen in der Aorta gelang mit Oil Red O (ORO) Färbung nach Fixierung der Aorten über Nacht in Zinkformalin bei 4°C. Sie wurden zu Beginn dreimal mit 60%igem Isopropanol für jeweils 5 Minuten gewaschen. Die Färbung geschah für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer ORO-Arbeitslösung (10 ml 0,5%iges ORO (0,5g ORO + 100 ml Isopropanol) + 6ml destilliertes Wasser). Zum Schluss wurden die Aorten erneut mit 60%igem Isopropanol für je fünf Minuten gewaschen. So konnten nicht lipidreiche, gefärbte Areale entfärbt werden. Die Ergebnisse wurden mit dem Olympus BX51 Mikroskop (Olympus Corporation)

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

fotografiert und mit der Olympus cellSens Dimension Desktop 2.3 software und Image-Pro Plus 7.0 ausgewertet.

### 3.2.4 Histologie

#### 3.2.4.1 *Präparation Herz*

Nach Entnahme der Aorta wurde das Herz auf Ebene der Aortenklappe geschnitten. Die Aortenklappe wurde histologisch weiterverarbeitet. Diese Arbeiten wurden gemeinsam mit Univ.-Prof. Schäfer, Leiterin des Labors für Translationale und Vaskuläre Biologie, durchgeführt.

#### 3.2.4.2 *Gewebeeinbettung-Paraffin*

Entnommenes Gewebe wurde über Nacht bei 4°C in Zinkformalin fixiert und in 70% Ethanol überführt. In Einbettkapseln überführtes Gewebe wurde nach drei Stunden Wässerung in den Einbettautomaten (Gewebeinfiltrationsautomat TP1020 Leica Biosystems GmbH) gehängt, wo eine Paraffineinbettung nachstehenden Schritten folgend geschah:

- Destilliertes Wasser für fünf Minuten
- Destilliertes Wasser für 30 Minuten
- 70% Ethanol für zwei Stunden
- 80% Ethanol für zwei Stunden
- 96% Ethanol für zwei Stunden -zweimal
- 100% Ethanol für zwei Stunden -zweimal
- HistoClear für zwei Stunden -zweimal
- Paraffin für zwei Stunden
- Paraffin für vier Stunden

Die Ausblockung erfolgte an der Paraffinausgießstation (Leica Biosystems GmbH, EG 1150). Der Gewebeblock wurde anschließend am Mikrotom RM2245 (Leica Biosystems GmbH) in gewünschter Breite geschnitten. Diese Arbeiten wurden gemeinsam mit Marina Thielen, Medizinisch-Technische Angestellte der Arbeitsgruppe, durchgeführt.

#### 3.2.4.3 *Gewebeeinbettung-Kryo*

Für die Kryoeinbettung wurde entnommenes Gewebe in dafür vorgesehene Einbettformen auf eine Basis von Tissue Tek O.C.T. compound gelegt und von

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

ebendiesem bedeckt. Nach zehn Minuten Wartezeit, die der späteren luftfreien Einbettung dienen, wurde die Form mit Hilfe einer Pinzette in einen Behälter voll 2-Methylbutan gehalten, der wiederum in einem Behälter voll flüssigem Stickstoff stand. Dabei war das vollständige Eintauchen der Probe in das 2-Methylbutan zu vermeiden und auf die lückenlose Vereisung des Bodens des 2-Methylbutan-Behältnisses zu achten. Die Lagerung der Proben bis zum Schneiden erfolgte bei -80°C.

#### *3.2.4.4 Färbungen*

Die Paraffinschnitte mussten vor jeglicher Färbung unabhängig ihrer Art entparaffinisiert und gewässert werden. Hierfür wurden die Schnitte dreimal jeweils fünf Minuten in Xylol und anschließend zweimal jeweils zwei Minuten in 100%iges Ethanol getaucht. Anschließend wurden die Schnitte in absteigender Alkoholreihe nach folgendem Procedere gewässert:

- Zwei Mal jeweils zwei Minuten in 96%igem Ethanol
- Einmal zwei Minuten in 70%igem Ethanol
- Einmal zwei Minuten in 50%igem Ethanol
- Einmal fünf Minuten in destilliertem Wasser

Die Gefrierschnitte mussten vor Färbung aufgetaut und danach fünf Minuten in PBS und zehn Minuten in Aceton bei 20°C nachfixiert werden.

Das Fotografieren der Schnitte nach unten genannten Färbungen geschah mit dem Olympus BX51 Mikroskop (Olympus Corporation), die Auswertung mit der Olympus cellSens Dimension Desktop 2.3 software, Microsoft Excel 2016 und Graph Pad Prism.

##### *3.2.4.4.1 Alizarinrot-S-Färbung*

Das Anfärben mineralisierter Bereiche, um die Kalzifizierung in der Aortenklappe und dem Aortenbogen quantifizieren zu können, gelang mit der Alizarinrot-S-Färbung. Hierfür wurden die Schnitte nach Entparaffinisierung und Wässerung für zwei einhalb Minuten in 0,5%ige Alizarinrot-S Färbung getaucht. Die Färbelösung wurde hergestellt mit einem Gramm Alizarinrot-Pulver in 200 ml destilliertem Wasser und auf einen pH-Wert zwischen 4,1 und 4,3 gebracht. Es folgten das vierfache Eintauchen in Aceton und das vierfache Eintauchen in ein 1:1 Aceton-Xylol Gemisch. Dann wurden die Schnitte zweimal für je fünf Minuten in Xylol belassen, bevor sie mit Hilfe von Eukitt, einem Eindeckmittel, eingedeckt werden konnten.

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

#### 3.2.4.4.2 H&E Färbung

Für das Anfärben von Zellkernen (später dunkelblau), Zytoplasma (später rot-orange) und Kollagen, Elastin, Erythrozyten (gelb-orange) wurde die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) nach untenstehendem Protokoll durchgeführt:

- Kernfärbung mit Hämalaun sauer nach Mayer (5 min)
- Spülen mit 0,1% HCl- Lösung (3x kurz eintauchen)
- Bläuen unter fließendem Leitungswasser (15 min)
- Gegenfärben mit Eosin G-Lösung 0,5% (3 min)
- Spülen unter fließendem Leitungswasser (bis Spülwasser klar)
- 96% Ethanol (2 min)
- 100% Ethanol (2 min)
- Klären mit Roticlear (2x 5 min)
- Eindecken mit Eukitt

#### 3.2.4.4.3 Perl's Iron

Zum Nachweis von Eisen im Gewebe als Surrogatmarker für Einblutungen wurden Gewebe mit Perl's Iron gefärbt.

Nach Entparaffinisierung und Wässerung, wurde der Schnitt mit einer 10%igen Kaliumferrocyanidlösung für 30 Minuten gefärbt. Nach anschließendem Spülen erfolgt die Gegenfärbung mittels Kernechrot-Aluminiumsulfat-Lösung für fünf Minuten. Dann wird mit Leitungswasser gespült und die Probe vor dem Eindecken in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol geklärt.

#### 3.2.4.4.4 Siriusrot

Die Siriusrot Färbung diente dem Nachweis von Kollagen. Nach Entparaffinisierung und Wässern der Schnitte wurden diese mit 1%iger Picrosiriusrot-Lösung (1g Siriusrot + 100ml gesättigte Pikrinsäure) für 60 Minuten gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte zweimal je eine Minute in 30%iger Essigsäure gespült. Dann folgte das Entwässern mit 100%igem Ethanol und abschließend das Eindecken mit Eukitt.

#### 3.2.4.5 Immunhistochemie

Bei immunhistochemischen Färbungen werden spezielle Antikörper verwendet, um spezifische Proteine in Gewebeproben nachweisen und lokalisieren zu können.

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

Nach Entparaffinisierung mit der Besonderheit der Inkubation mit 3% Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) zur Inaktivierung endogener Peroxidase Aktivität vor der Wässerung wurden die Schnitte elf Minuten bei 800W in 0,01M Citratpuffer (pH=6,0) erhitzt. Dadurch kommt es zur hitzeinduzierten Antigendemaskierung, die für die spätere Bindung der Antikörper essenziell ist. Anschließend erlaubte man das Abkühlen der Schnitte im Puffer für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Da auf einem Objektträger zumeist zwei oder mehr Gewebeschnitte platziert wurden, wollte man auf einem Objektträger parallel verschiedene Färbungen durchführen. Um das zu ermöglichen, wurde eine hydrophobe, den Schnitt isolierende Grenze mit der Roti Liquid Barriere- Flüssigkeit gezeichnet. Zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit 10% normalem Ziegen Serum (NGS, in PBS) und weiterhin die jeweils 15-minütige Inkubation mit Avidin und Biotin mit anschließend je dreimal fünf minütigem Waschen in PBS. Letzteres blockiert endogene Avidin und Biotin Bindungsstellen. Dann folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (siehe Tabelle 4) über Nacht. Am zweiten Tag wurde nach dreimaligem fünf-minütigem Waschen mit 1X PBS der biotinylierte Sekundärantikörper hinzugegeben. Dieser bindet an die  $F_c$ -Region der gebundenen primären Antikörper. Nach 60 Minuten wurden die Schnitte erneut dreimal für je fünf Minuten in 1X PBS gewaschen. Dann wurde der Avidin/Biotin-Komplex (ABK) aufgetragen und 30 Minuten später abgewaschen (erneut 1x PBS, 3x5min). Hierbei konnte das an eine MPO konjugierte Avidin an die Biotinmoleküle der sekundären Antikörper binden. Das anschließend hinzugegebene Aminoethylcarbazol (AEC) oder 3,3' Diaminobenzidin (12-20 Minuten) wurde durch die MPO umgesetzt. Schlussendlich ergab sich dadurch eine Rotfärbung an Stellen der Zielstruktur. Nach fünf Minuten in destilliertem Wasser wurden die Schnitte mit Gill's Hämatoxylin gegengefärbt und anschließend eingedeckt mit ImmuMount.

### 3.2.5 Zellkultur

#### 3.2.5.1 Isolation und Kultivierung von aortalen glatten Muskelzellen der Maus

Wildtyp und Knockout Mäuse wurden durch eine zervikale Dislokation unter Anästhesie getötet (vgl. 3.2.3.1). Die Aorten wurden wie beschrieben entnommen und in zehn Millilitern DMEM/F12 Glutamax Medium mit 20% fetalem Kälberserum (FBS)), 100 U/ml Penicillin und 100  $\mu$ l/ml Streptomycin überführt. Dabei enthält das DMEM viel Glucose, Aminosäuren und Vitamine, was wichtig für das Überleben der Zellen ist. Das

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

fetale Kälberserum enthält viele Proteine, von denen vor allem die Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle spielen. Die Antibiotikakombination aus Penicillin und Streptomycin verhindert die bakterielle Kontamination der Proben. Vor weiterer Prozessierung wurden die Aorten von Fett und Bindegewebe befreit. Dann wurden die Aorten zerschnitten und einem Medium mit 10 mg/ml Kollagenase II für sechs Stunden bei 37°C zugeführt. Dabei konnte die Kollagenase II als Protease die Tripelhelix der nativen Kollagenfibrillen im Bindegewebe der Blutgefäße spalten und die Aorten so verdauen. Nach sechs Stunden wurde das Medium durch Zentrifugation (1000 g, 10 min) entfernt und die Zellen wurden auf mit 0,1% Gelatine bedeckten 6-Well-Platten ausgesetzt. Die Gelatine verbesserte dabei die Zellanhaftung. Das für das Wachstum verwendete Medium war Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium versetzt mit 10% FBS, 100 U/ml Penicillin und 100 µl/ml Streptomycin (vgl. 3.2.5.3). Diese und weitere Arbeiten in Abschnitt 3.2.5 wurden gemeinsam mit Dr. Rajinikanth Gogiraju, PostDoc der Arbeitsgruppe, durchgeführt.

#### *3.2.5.2 Kultivierung und osteoblastische Differenzierung menschlicher glatter Muskelzellen*

Es wurden humane aortale glatte Muskelzellen (PromoCell) verwendet, um den Einfluss von Erythrozytenmembranen, die aus Wildtyp und Knockout Mäusen wie beschrieben gewonnen wurden, auf die osteogene Differenzierung zu studieren. Sich in Kultur befindliche humane aortale glatte Muskelzellen wurden nach Absaugung des Mediums mit 1X PBS gewaschen. Dann wurden 1,5 ml Accutase hinzugefügt und gewartet, bis die Zellen unter mikroskopischer Kontrolle vollständig von der Platte gelöst waren. Anschließend wurden die Zellen mit Basismedium von der Platte gespült und nach Zentrifugation und Resuspension auf 6-Well-Platten verteilt. Die osteoblastische Differenzierung begann mit Zugabe von osteogenem Medium. Dieses enthielt DMEM mit 10% fetalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin sowie folgenden Zusätzen:

- β-Glycerophosphat (5 mM)
- L-Ascorbinsäure (50 µg/ml)
- Dexamethason (0,1 µM)
- Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>, 4mM)
- Insulin (1 µM)

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

Das  $\beta$ -Glycerophosphat liefert dabei das Phosphat, das relevant für das Hydroxylapatit-Mineral ist und die intrazelluläre Signalübertragung stärkt. Die L-Ascorbinsäure bewirkt einen Anstieg des Kollagen Typ I, das durch Col1/ $\alpha$ 2 $\beta$ 1-Integrine die intrazelluläre Signalübertragung steigert. Dexamethason induziert die Expression und Aktivität des Transkriptionsfaktors Runx2. Dieser ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die osteoblastische Differenzierung. Um den Einfluss von Erythrozytenmembranen, die aus RBC.Arg1-Wildtyp und RBC.Arg1-Knockout Mäusen wie beschrieben gewonnen wurden, auf die osteogene Differenzierung zu studieren, wurden diese zur Co-Kultivierung in gleicher Proteinmenge hinzugegeben. Um den Effekt von NO auf die osteogene Differenzierung zu untersuchen, erfolgte in ausgewählten Fällen eine Co-Inkubation mit dem NO Donor DETA-NO (100  $\mu$ M), dem NO-Radikalfänger 2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid (PTIO, 100  $\mu$ M), dem sGC-Inhibitor ODQ (100  $\mu$ M) oder mit dem GSNO-Reduktase(GSNOR)-Inhibitor N6022 (100 nM).

#### *3.2.5.3 Zellsplittung*

Für längerfristige Kultivierung mussten die Zellen bei hoher Zellkonfluenz gesplittet werden. Hierfür wurden das Medium abgesaugt (IntegraVacusafe, ThermoFisher Scientific) und die Zellen mit 1X PBS gewaschen. Anschließend wurde 0,05%iges Trypsin-EDTA hinzugegeben. Das zuvor zum Waschen verwendete PBS inaktiviert das verbliebene fetale Kälberserum (Teil des Trypsin-EDTA-Medium), weil dieses sonst die Funktion des Trypsin-EDTA unterbinden würde. Nach zwei bis fünf Minuten wurden die Zellen, vorausgesetzt die Zellen waren vollständig von der Platte gelöst (mikroskopische Kontrolle), mit DMEM (inhibiert Trypsin-EDTA) von der Platte gespült und in ein 10ml Falcon überführt. Es folgte die Zentrifugation (Centrifuge 5702 R, eppendorfSE) bei 1500 rpm für drei bis fünf Minuten. Das gewonnene Zellpellet wurde entsprechend verdünnt und auf neuen 10cm-Petrischalen verteilt. Dabei war auf eine gleichmäßige Verteilung durch regelmäßiges Schwenken in der ersten Stunde zu achten.

#### *3.2.5.4 Alizarinrot-S-Färbung menschlicher glatter Muskelzellen*

Um extrazelluläre Kalziumablagerungen zu visualisieren und quantifizieren, erfolgte eine Alizarinrot-S-Färbung. Hierfür wurden die Zellen mit 1X PBS (pH= 4,2) gewaschen und mit 10%iger Formalinlösung (4% Formaldehyd) für 30 Minuten bei

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

Raumtemperatur fixiert. Nach erneutem Waschvorgang wurde die Alizarinrot-S-Färbelösung (0,4 g in 100 ml destilliertem Wasser, gefiltert, pH=4,2) appliziert. Für 45 Minuten geschah die Färbung in abgedunkelter Kammer. Abschließend wurden die Zellen erneut gewaschen. Die Kalziumablagerungen stellten sich rot dar. Zur Quantifizierung wurde die Farbe mit Hilfe von 10 %iger Essigsäure gelöst (30 min, Raumtemperatur). Der Überstand wurde in ein Eppendorfer Reaktionsgefäß überführt, gut gemischt und für zehn Minuten auf 85°C erhitzt (Thermomixer comfort, ThermoFisher Scientific), danach für fünf Minuten auf Eis abgekühlt und dann bei 20000 g für 15 Minuten zentrifugiert (Centrifuge 5424 R, eppendorfSE). Anschließend wurde Ammoniaklösung im Verhältnis 1:2,5 zur Neutralisierung der Essigsäure hinzugegeben und die Proben in eine 96-Well-Platte pipettiert. Die Spektralphotometrie erfolgte bei einer Wellenlänge von 405 nm mit dem SpectraMax i3x (Molecular Devices). Die Auswertung erfolgte mit der SoftMax Pro 6.5 Software (Molecular Devices) und Microsoft Excel 2016.

### 3.2.6 Western Blot Analysen

Knochenmark, Milz, primäre Endothelzellen, primäre glatte Muskelzellen und Erythrozytenmembranen wurden von den Mäusen gewonnen. Anschließend wurden die Gewebe homogenisiert und in kaltem RIPA-Puffer versetzt mit 1 mM Polymethylsulfonylfluorid (PMSF) und Proteaseinhibitoren-Cocktail lysiert. Zunächst wurden das 10%ige Trenngel und 5%ige Sammelgel nach nachstehenden Rezepten vorbereitet. Diese und weitere Arbeiten in Abschnitt 3.2.6 wurden gemeinsam mit Dr. Rajinikanth Gogiraju, PostDoc der Arbeitsgruppe, durchgeführt.

Trenngel (10%):

- Destilliertes Wasser
- 30% Acrylamid
- 1,5 M TRIS (pH=8,8)
- 10% Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)
- 10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)
- N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis-(dimethylamino)-ethan (TEMED)

Sammelgel (5%):

- Destilliertes Wasser

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

- 30% Acrylamid
- 1,0 M TRIS (pH=6,8)
- 10% SDS
- 10% APS
- TEMED

Anschließend wurden die Proben vorbereitet. Hierzu wurden die Proteinkonzentrationen mit Hilfe des BCA-Assays wie oben beschrieben bestimmt und die Probenkonzentrationen entsprechend angepasst. Dann wurde der Tris-Glycin Puffer, auch Lämmli-Puffer genannt, hinzugegeben. Somit war die Ladung der Moleküle proportional zu deren Masse, die es als Charakteristikum der Proteine hier zu ermitteln galt. Die Proben wurden anschließend bei 4°C kurz zentrifugiert, für fünf Minuten bei 99°C erhitzt und für weitere fünf Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Beladung der Gele lief die Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese, kurz SDS-PAGE, für 15 Minuten bei 80 Volt und anschließend bei 100 Volt (PowerPac™ Basic, BioRad). Der Transfer erfolgte elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose Membran, die eine hohe Affinität zu Proteinen hat (PowerPac™ HC, BioRad). Der dabei verwendete Transferpuffer enthält Methanol, welches SDS von den Proteinen entfernt. Die Blockierung, um unspezifische Antikörperbindungen an die Membran zu vermeiden, erfolgte für 60 Minuten mit 5%igem Milchpulver (in TBS/0,1% Tween-20). Der TBS-Puffer besteht dabei aus 0,2M Tris-Base, 80g NaCl und destilliertem Wasser (pH=7,6). Es folgte die Inkubation mit primären Antikörpern (siehe Tabelle 4) in Konzentration 1:1000 in 1% BSA über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Membran gewaschen und der an eine Meerrettichperoxidase (MPO)-konjugierte sekundäre Antikörper (siehe Tabelle 4) in Blockierungslösung verdünnt. Die zu Anfang beabsichtigte gleichmäßige Proteinbeladung wurde durch Hinzufügen von Antikörpern gegen  $\alpha$ -Aktinin oder  $\beta$ -Aktin kontrolliert. Inkubation geschah bei Raumtemperatur für 90 Minuten. Dann wurde die Membran mehrmals gewaschen. Anschließend wurde das hochempfindliche, nicht-radioaktive Luminol-basierte Chemilumineszenz-Substrat (ECL) hinzugegeben, das die MPO erkennt. Die Detektion erfolgte mit dem Lourmat Fusion FX system (Vilber) und der Fusion software (Vilber), die Auswertung mit Hilfe der AlphaEaseFC 4.0 software. Die Methode des Strippens durch Behandlung der Membran mit TBS/0,1% Tween-20 für fünf Minuten,

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

0,2 M Natriumhydroxid (NaOH) für zehn Minuten, erneut TBS-T für fünf Minuten und erneute Blockierung mit 5% Milchpulver in 1x TBS/0,1% Tween-20 für eine Stunde ermöglichte es, durch Entfernung der primären und sekundären Antikörper, eine einzelne Membran für die Detektion mehrerer Proteine zu verwenden.

### 3.2.7 RNA-Isolierung und quantitative Echtzeit-PCR

Die RNA-Extraktion erfolgte aus primären pulmonalen Endothelzellen der Maus und menschlichen glatten Muskelzellen mit Hilfe des TRIzol™ Reagenz. Dieses isoliert RNA und hält sie dabei durch Inaktivierung der RNasen stabil. Dann wurde Chloroform hinzugegeben, welches die Trennung der Probe in 3 Schichten erlaubte. Die untere Phase bestand dabei aus DNA und Proteinen. Sie wurde von der mittleren, sogenannten Interphase-Schicht und von der oberen wässrigen Phase getrennt. Diese obere Schicht enthielt die RNA. Die RNA wurde zur Präzipitation mit Isopropanol versetzt. Nach zehn Minuten wurde die Probe zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Vor der Weiterverarbeitung der Proben ist die komplette Entfernung des Ethanols durch das Lufttrocknen sicherzustellen. Zur Weiterverarbeitung wurde RNase-freies Wasser hinzugefügt. Die Reinheit der gewonnenen RNA wurde durch Spektralphotometrie (NanoDrop Mikrovolumen Spektralphotometer, ThermoFisher Scientific) kontrolliert. Diese Methode nutzt die charakteristischen Absorptionsmaxima von Nukleinsäuren bei 260 und 280 nm. Die RNA gilt als rein, wenn das Verhältnis 260/280 ungefähr 2,0 beträgt. Bei einer Wellenlänge von 230nm lassen sich außerdem Kontaminationen detektieren. Man erwartet ein 260/230 Verhältnis von 2,0-2,2 bei reiner RNA. Zur kompletten Entfernung aller DNA aus der Probe wurde die DNase I, eine Endonuklease, gewonnen aus Rinderpankreas, die einzel- und doppelsträngige DNA spalten kann, hinzugegeben (1 u/µl). Nach 15 Minuten wurde die Reaktion durch Addition des Chelatbildners EDTA gestoppt. Hierdurch wurde auch einer späteren Hydrolyse durch Metallionen wie Calcium und Magnesium vorgebeugt. Die Inkubation der Probe bei 70°C für zehn Minuten führte zur Denaturierung der DNase sowie der RNA. Anschließend wurden die Proben direkt auf Eis gelagert, um die Bildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden. Nun wurde die komplementäre DNA (cDNA) hergestellt. Zuerst wurden die Primer (vgl. Tabelle 10, vgl. **Error! Reference source not found.**) hinzugegeben und die Hybridisierung bei 70°C für 5 Minuten ermöglicht. Danach wurden die Proben direkt auf Eis gelagert, um die Bildung von

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

Sekundärstrukturen zu vermeiden. Anschließend wurde die RNA-abhängige DNA Polymerase Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase (M-MLV RT) hinzugegeben. Dann wurde die quantitative Polymerase Ketten Reaktion (PCR) mit Echtzeit-Bewertung mit Hilfe von SYBR<sup>®</sup> Green, einem doppelsträngige DNA bindenden Farbstoff, und dem CFX Connect Real-Time PCR Detection System (BioRad) durchgeführt. Zuletzt erfolgte die Überprüfung der Primerspezifität durch eine Schmelztemperaturanalyse. Die Ergebnisse wurden über die delta delta C<sub>T</sub>-Methode berechnet und zum geometrischen Mittel der Hypoxanthin Phosphoribosyl Transferase 1 (HPRT1) und  $\beta$ -Actin mRNA normalisiert und als x-fache Veränderung zu RBC.Arg1-Wildtyp Mäusen oder kontrollbehandelten Zellen angegeben. Dabei steht C<sub>T</sub> für die Anzahl an Zyklen, die durchlaufen werden mussten, bis eine nachweisbare DNA-Menge erreicht war.

Protein	Gene	5'-3' Richtung	Größe (bp)
$\beta$ -Aktin	Actb	GCAGGAGTACGATGAGTCCG ACGCAGCTCAGTAACAGTCC	74
Arginase-1	Arg-1	AGCCAGGGACTGACTACCTT TTGGGAGGAGAAGGCGTTTG	114

Tabelle 10: Primer für Echtzeit PCR für Gewebe und Zellen der Maus

Die in Abschnitt 3.2.7 aufgeführten Arbeiten wurden gemeinsam mit Dr. Rajinikanth Gogiraju, PostDoc der Arbeitsgruppe, durchgeführt.

### 3.2.8 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen in dieser Arbeit wurden mit Hilfe der Datenanalysesoftware GraphPad Prism 9.1.0 durchgeführt. Nachstehende Tests fanden Anwendung:

Test	Anwendung
Shapiro-Wilk-Normalitätstest	Prüfung der Werte auf Normalverteilung
Bartlett- und Brown-Forsythe-Test	Prüfung der Werte auf gleiche Varianz
Student's-t-Test	Vergleich zweier Gruppen mit Normalverteilung
Mann-Whitney-U-Test	Vergleich zweier Gruppen ohne Normalverteilung oder Strichprobenumfang pro Gruppe $\leq 5$
Kruskal-Wallis-Test	Strichprobenumfang pro Gruppe $\leq 5$

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

Einfaktorielle ANOVA + Šidák-Mehrfachvergleichstest	Vergleich von >2 Gruppen mit Normalverteilung
Kruskal-Wallis-Test + Dunn-Mehrfachvergleichstest	Vergleich von >2 Gruppen ohne Normalverteilung
Pearson $\chi^2$ -Test	Untersuchung kategorialer Variablen
Spearman-Test	Einfache lineare Regressionsanalyse

*Tabelle 11: Auflistung statistischer Tests*

Die Ergebnisse wurden bei vorliegender Normalverteilung als Mittelwerte mit Standardabweichung, bei fehlender Normalverteilung als Median mit Interquartilsbereich angegeben.

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Erzeugung und Validierung einer genetisch veränderten Tierlinie

Um die Bedeutung der Arginase-1 in Erythrozyten und dem mit diesem Enzym verbundenen Stoffwechsel von NO für die vaskuläre Kalzifizierung der Maus zu studieren, wurde eine neue, genetisch veränderte Tierlinie erzeugt (vgl. 3.1.1). Den hypercholesterinämischen Mäusen ( $apoE^{-/-}$ ) fehlt die Arginase-1 (Arg-1) in den Erythrozyten ( $apoE^{-/-}$  RBC.Arg1-KO). Die Mauslinie lag bei Beginn der Arbeiten im Rahmen dieser Dissertation bereits vor.

#### 4.1.1 Überprüfung des Knockouts

Zur Unterscheidung des genomischen Materials der  $apoE^{-/-}$  RBC.Arg1-WT und  $apoE^{-/-}$  RBC.Arg1-KO Mäuse wurden Ohrbiopsien genotypisiert (vgl. 3.2.1.1). Ein exemplarisches Ergebnis zeigt **Error! Reference source not found..**

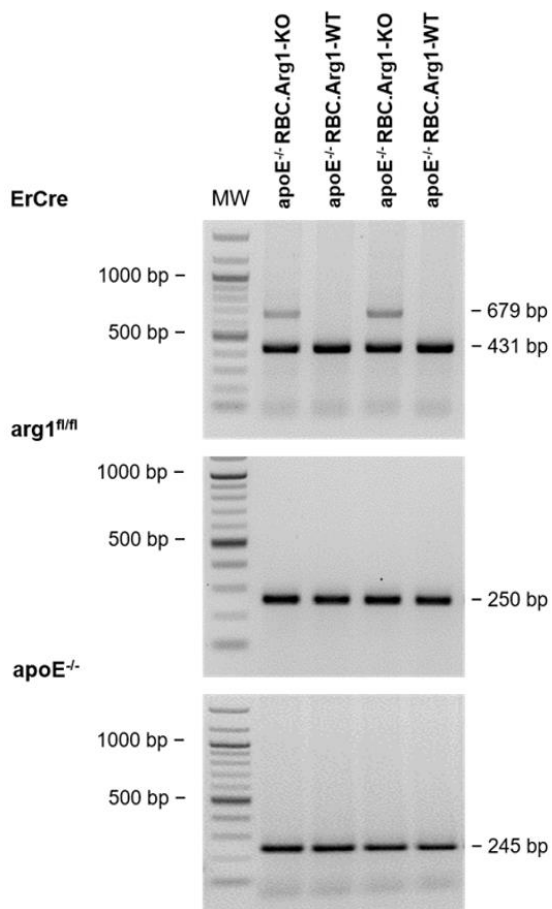


Abbildung 2: Genotypisierung

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

Repräsentative Ergebnisse der Genotypisierung von Ohrbiopsien der apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT und apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäuse

Die Umsetzung des genetischen Knockouts auf Proteinebene wurde mit dem Vergleich der mRNA-Konzentrationen erythrozytärer Arginase-1 (Arg-1) der apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäuse vs. apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Mäuse überprüft (vgl. **Error! Reference source not found.**).

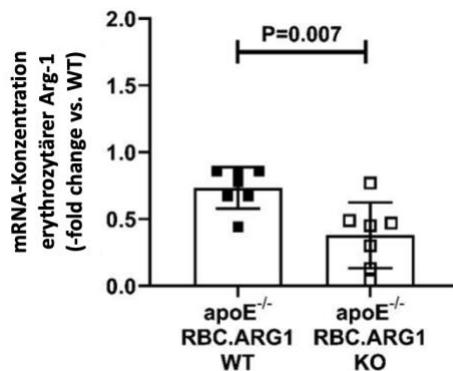


Abbildung 3: mRNA-Konzentration Arg-1

Ergebnisse der mRNA-Konzentration-Quantifizierung erythrozytärer Arg-1 die Werte sind dargestellt als absolute Veränderung gegenüber apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT und als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, statistische Analyse mit Hilfe des Student's-t-Tests

Immunfluoreszenzfärbung mit WGA zur Färbung der Erythrozytenmembranen und Arg-1 zeigt unter Anwendung konfokaler Mikroskopie die Lokalisation der Arg-1 in den Erythrozytenmembranen (vgl. 3.2.2.6). Es lässt sich außerdem die verminderte Arg-1 Expression in den Erythrozyten der apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO verglichen zu apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Mäusen beobachten (vgl. Abbildung 4).

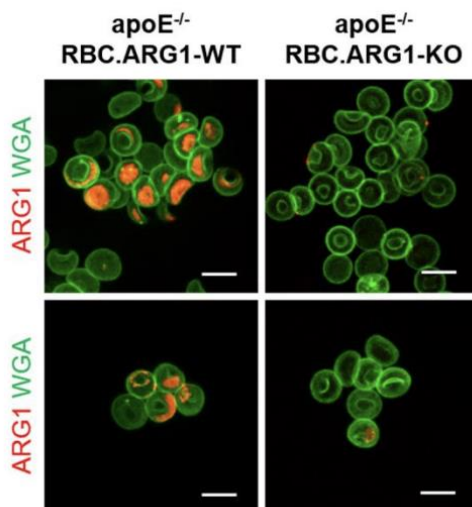


Abbildung 4: Konfokal-Mikroskopie Erythrozyten

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

*Konfokal-Mikroskopie von Erythrozyten nach Immunfluoreszenzfärbung, Erythrozytenmembran mit WGA-grün, Arg1-rot, Maßstabsbalken entspricht 5µm*

Die erythrozytäre Arginase Aktivität zeigt sich signifikant niedriger bei apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen als bei apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Mäusen, jedoch nicht vollständig unterdrückt (vgl. **Error! Reference source not found.**).

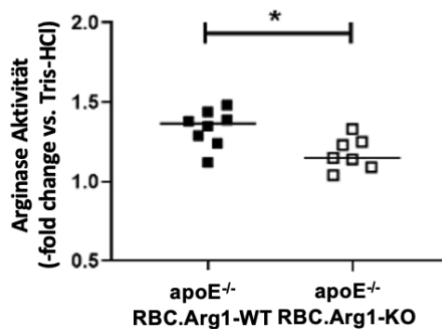


Abbildung 5: Arginase-Aktivitäts-Assay

*Ergebnisse des Arginase-Aktivitäts-Assay, die Werte sind dargestellt als absolute Veränderung zum Standardreagenz TRIS-HCl und als Mittelwert, WT n=8, KO n=7, statistische Analyse mit Hilfe des Student's-t-Tests, \*p<0,05*

#### 4.1.2 Bestimmung des erythrozytär freigegebenen Stickstoffmonoxids

Die Arg-1 gilt als kompetitiver Inhibitor der eNOS. Bei einem Knockout der Arg-1 steht der eNOS mehr Ausgangssubstrat (L-Arginin) zur Verfügung. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zeigen eine höhere Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus Erythrozyten der apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen als aus denen der apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Mäuse (vgl. Abbildung 6).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

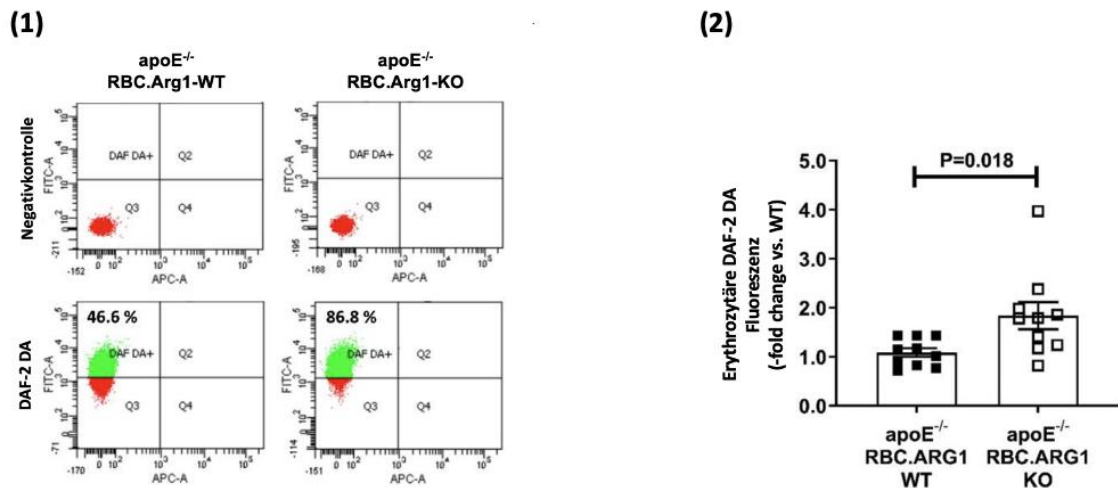


Abbildung 6: Durchflusszytometrie DAF-2 DA

(1) Repräsentative Ergebnisse der Durchflusszytometrie mit DAF-2 DA zur Bestimmung der NO-Konzentration, Negativkontrolle mit Zellen ohne DAF-2 DA (2) Quantitative Analyse der Durchflusszytometrie mit DAF-2-DA (n=10), die Werte sind dargestellt als absolute Veränderung gegenüber apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT und als Mittelwert ± Standardabweichung, statistische Analyse mit Hilfe des Student's-t-Tests

Bei Anwendung des NO-Synthase Inhibitors L-NNA kommt es zu einer deutlichen Reduktion der NO-Freisetzung. Diese Reduktion ist bei apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen relativ größer als bei apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Mäusen (vgl. Abbildung 7).

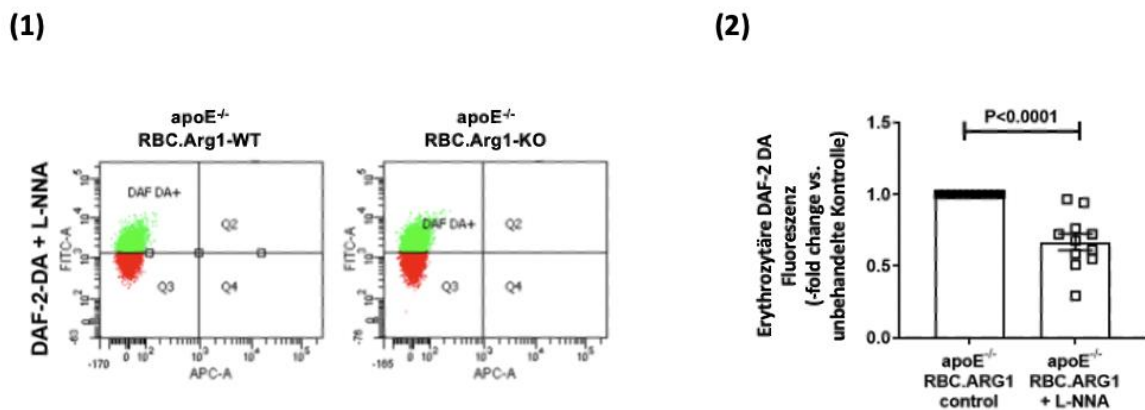


Abbildung 7: Durchflusszytometrie DAF-2-DA + L-NNA

(1) Repräsentative Ergebnisse der Durchflusszytometrie mit DAF-2 DA + L-NNA zur Bestimmung der Reduktion der NO-Freisetzung (2) Quantitative Analyse der Durchflusszytometrie mit DAF-2-DA + L-NNA, die Werte sind dargestellt als absolute Veränderung gegenüber den unhandelten Kontrollen (vgl. (1)) und als Mittelwert ± Standardabweichung, statistische Analyse mit Hilfe des Student's-t-Tests

### 4.1.3 Proteinexpression der Arg-1, Arg-2, eNOS in Knochenmark und Milz

Um die Spezifität des ErGFPCre abhängigen Knockouts zu untersuchen, werden Proben aus dem Knochenmark und der Milz gewonnen. Ergebnisse des Western Blot

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

zeigen keine signifikanten Unterschiede bei Arginase-1, Arginase-2, eNOS (NOS3) zwischen apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO und apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Mäusen. Die quantitative Analyse der Proteinexpression zeigt keine signifikante Änderung der Arg-1 Expression in Knochenmark und Milz der apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäuse verglichen zu apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Mäusen. Die Proteinexpression der Arg-2 und eNOS zeigen keine signifikanten Unterschiede (vgl. Abbildung 8).

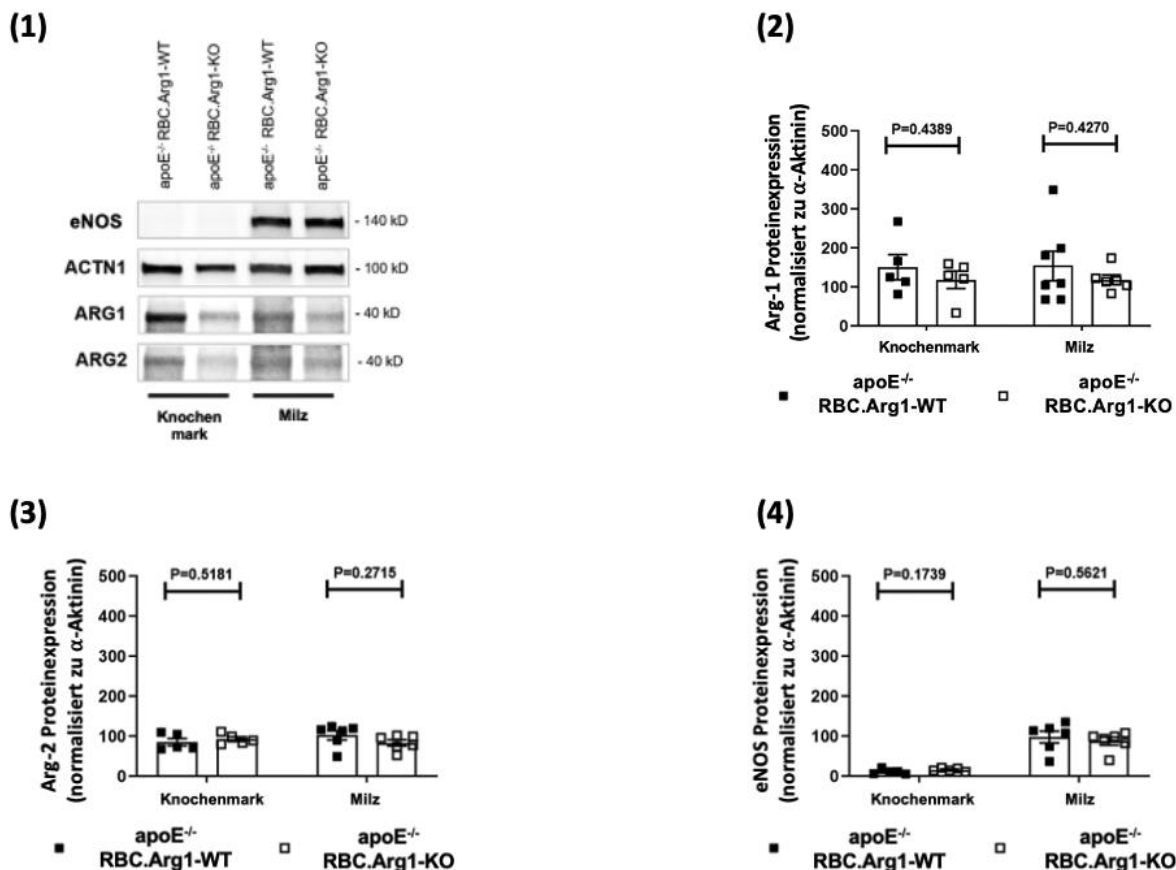


Abbildung 8: eNOS, Arg-1, Arg-2 in Knochenmark und Milz  
 (1) Repräsentative Ergebnisse des Western Blots zum Nachweis von eNOS, Arg-1 und Arg-2 in Knochenmark und Milz, Ladekontrolle mit ACTN1 (2) Arg-1 Proteinexpression in Knochenmark und Milz normalisiert zu alpha-Aktinin (3) Proteinexpression Arg-2 in Knochenmark und Milz normalisiert zu alpha-Aktinin (4) Proteinexpression eNOS in Knochenmark und Milz normalisiert zu alpha-Aktinin; die Werte sind dargestellt als Einzelwerte und als Mittelwert ± Standardabweichung, statistische Analyse mit Hilfe des Student's-t-Tests

#### 4.1.4 Einfluss des Knockouts auf die Blutbildung

Bei Veränderung der Enzymkonstellation in den Erythrozyten der apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO zeigen die blutbildenden Organe, respektive das Knochenmark und die Milz sowie die blutbildenden Zellen selbst keine morphologischen Unterschiede (vgl. Abbildung 9 und Abbildung 10).

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

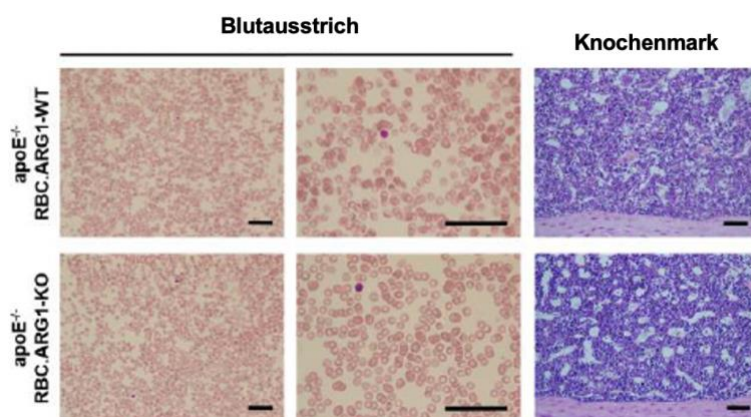


Abbildung 9: Morphologie der blutbildenden Zellen und des Knochenmarks  
 Repräsentative Ergebnisse zum Einfluss des genetischen Knockouts auf die Morphologie der blutbildenden Zellen und des Knochenmarks, linke Spalte – Blutausstrich, Papanicolaou Färbung, Maßstabsbalken entspricht 5µm  
 mittlere Spalte – Blutausstrich, Papanicolaou Färbung, Maßstabsbalken entspricht 25 µm  
 rechte Spalte – Querschnitt durch Tibia mit Knochenmark, Papanicolaou Färbung, Maßstabsbalken entspricht 5µm

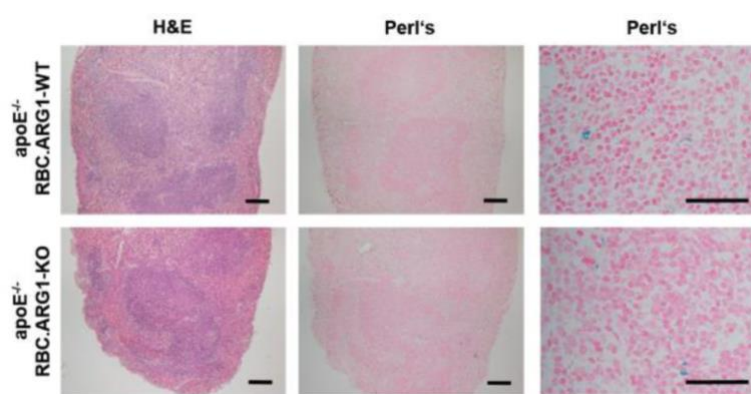


Abbildung 10: Morphologie der Milz  
 Repräsentative Ergebnisse zum Einfluss des genetischen Knockouts auf die Morphologie der Milz  
 linke Spalte – Querschnitt durch Milz, H&E Färbung, Maßstabsbalken entspricht 9 µm  
 mittlere Spalte – Querschnitt durch Milz, Perl's Iron Färbung, Maßstabsbalken entspricht 9 µm  
 rechte Spalte – Querschnitt durch Milz, Perl's Iron Färbung, Maßstabsbalken entspricht 25 µm  
 Perl's Iron Färbung: Eisen-blau, Hämosiderin-gelb

## 4.2 Eigenschaften der apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Maus

Die Eigenschaften der Maus, wie das Körpergewicht, das Gewicht des Herzens, der Leber und der Milz, sowie das Blutbild und die metabolischen Plasmaparameter zeigten -getrennt nach Geschlecht- zum Zeitpunkt der Tötung keinen signifikanten Unterschied zwischen apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT und apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen (vgl. Tabelle 12).

### 4.2.1 Körper- und Organgewichte

	<b>männlich</b>	<b>weiblich</b>
--	-----------------	-----------------

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

	apoE <sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT	apoE <sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO	apoE <sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT	apoE <sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO
<b>Anzahl</b>	13	18	12	28
<b>Alter</b> [Wochen]	25,8 ± 0,23	25,8 ± 0,25	26,0 ± 0,21	26,1 ± 0,19
<b>Körpergewicht</b> [g]	28,7 ± 1,7	28,9 ± 0,78	28,9 ± 0,78 ***	28,5 ± 0,56 ***
<b>Herzgewicht</b> [mg]	170 ± 5,8	171 ± 5,4	126 ± 3,4 ***	131 ± 2,2 ***
<b>Lebergewicht</b> [mg]	2.691 ± 237	2.512 ± 209	1.819 ± 80 **	1.870 ± 72 **
<b>Milzgewicht</b> [mg]	149 ± 13	143 ± 8,0	163 ± 15	156 ± 7,9

Tabelle 12: Körper- und Organgewichte

Körper- und Organgewichte zum Zeitpunkt der Tötung aufgeteilt nach apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT und apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen und Geschlecht, die Werte sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 jeweils mit gleichem Genotyp des männlichen Geschlechts verglichen, statistische Analyse mit einfaktoriellem ANOVA + Šidák- Mehrfachvergleichstest

#### 4.2.2 Vollblut-Zellzählung

	männlich		weiblich	
	apoE <sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT	apoE <sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO	apoE <sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT	apoE <sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO
<b>Anzahl</b>	11	18	10	24
<b>Erythrozyten</b> [x 10 <sup>6</sup> per µl]	7,4 ± 0,20	7,3 ± 0,24	7,4 ± 0,22	7,1 ± 0,19
<b>Leukozyten</b> [x 10 <sup>6</sup> per µl]	5,7 ± 0,48	5,9 ± 0,46	4,7 ± 0,64	4,4 ± 0,30 *
<b>Thrombozyten</b> [x 10 <sup>6</sup> per µl]	931 ± 45	1.108 ± 49	724 ± 79	722 ± 47 ***
<b>Hämatokrit</b> [%]	38,7 ± 1,1	38,1 ± 1,3	37,7 ± 1,2	36,4 ± 1,1
<b>Hämoglobin</b> [g/dl]	11,4 ± 0,33	11,1 ± 0,29	11,2 ± 0,35	10,7 ± 0,25

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

<b>Erythrozyten- verteilungsbreite [%]</b>	13,3 ± 0,54	13,1 ± 0,35	12,9 ± 0,41	12,9 ± 0,27
--	-------------	-------------	-------------	-------------

Tabelle 13: Vollblut-Zellzählung

Vollblut-Zellzählung zum Zeitpunkt der Tötung aufgeteilt nach apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT und apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen und Geschlecht, die Werte sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung, \*p<0,05, \*\*\*p<0,001 jeweils mit gleichem Genotyp des männlichen Geschlechts verglichen, statistische Analyse mit einfaktoriellem ANOVA + Šidák- Mehrfachvergleichstest

#### 4.2.3 Plasmalipidspiegel

	männlich		weiblich	
	apoE <sup>-/-</sup> RBC.Arg1- WT	apoE <sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO	apoE <sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT	apoE <sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO
<b>Anzahl</b>	10	10	12	19
<b>Gesamtcholesterin [mg/dl]</b>	553 ± 38	568 ± 38	505 ± 26	478 ± 19
<b>LDL Cholesterin [mg/dl]</b>	445 ± 27	491 ± 30	376 ± 23	419 ± 26
<b>HDL Cholesterin [mg/dl]</b>	67,2 ± 5,6	80,0 ± 8,2	30,2 ± 5,6 **	42,0 ± 5,1 **
<b>Triglyzeride [mg/dl]</b>	149 ± 22	141 ± 23	115 ± 10	112 ± 9,3

Tabelle 14: Plasmalipidspiegel

Plasmalipidspiegel zum Zeitpunkt der Tötung aufgeteilt nach apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT und apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen und Geschlecht, die Werte sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung, \*\*p<0,01, jeweils mit gleichem Genotyp des männlichen Geschlechts verglichen, statistische Analyse mit einfaktoriellem ANOVA + Šidák- Mehrfachvergleichstest

### 4.3 Vaskuläre Kalzifizierung in vivo

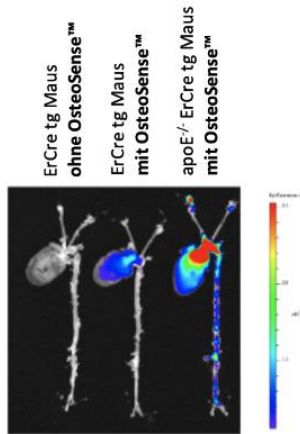
#### 4.3.1 Osteogene Aktivität in vivo

Die in-vivo Bildgebung mit dem fluoreszierenden Bildgebungsmittel OsteoSense 750EX zeigte mehr Aktivität in den apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen als in den apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Mäusen. Dabei wurden die Geschlechter getrennt betrachtet. Die Stellen mit der meisten osteogenen Aktivität waren die Aortenklappe, der Aortenbogen und die Abgänge großer Arterien aus der Aorta, allen voran die Aa. renales. Die Spezifität des Bildgebungsmittels bewies die fehlende Fluoreszenz der Aorta einer Maus, der PBS anstelle von OsteoSense 750EX verabreicht wurde. Die

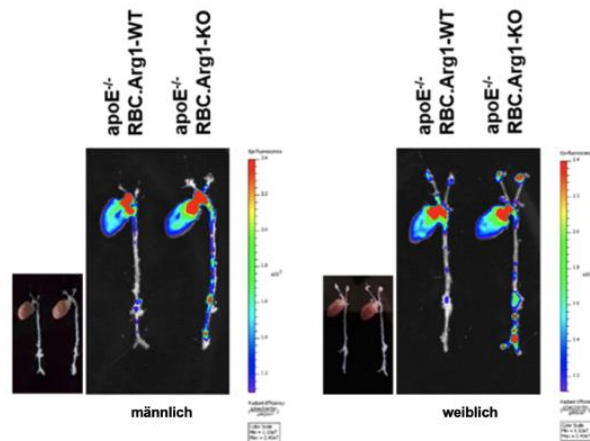
**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

Quantifizierung zeigte geschlechterabhängig signifikante Erhöhungen der osteogenen Aktivität bei apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen verglichen zu apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Mäusen (vgl. Abbildung 11).

(1)



(2)



(3)

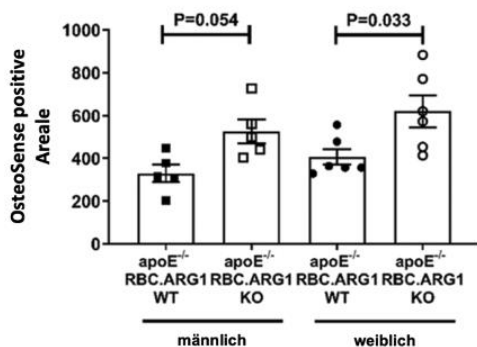


Abbildung 11: OsteoSense  
 Repräsentative Bilder nach Applikation von OsteoSense™, die Injektion von OsteoSense™ 4nM pro 25g Körpergewicht bzw. von 100µl 1X PBS zur Negativkontrolle erfolgte beim wachen Tier in eine Schwanzvene. 24

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

Stunden nach Injektion wurde das Tier getötet und die entnommene Aorta im IVIS® Spectrum in-vivo-Bildgebungssystem dargestellt (1) Repräsentative Darstellung von Positiv- und Negativkontrolle des Fluoreszenzmittels OsteoSense in Mäusen mit und ohne Apolipoprotein E (2) Repräsentative Darstellung Geschlechter-getrennt und je eine apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Maus und eine apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Maus, kleine Bilder Weißlichtfotografie (3) Quantifizierung der positiven, fluoreszierenden Areale, die Werte sind dargestellt als Einzelwerte und als Mittelwert ± Standardabweichung, statistische Analyse mit Hilfe des einfaktorielle ANOVA + Sidák-Mehrfachvergleichstest

### 4.3.2 Histologischer Nachweis der vaskulären Kalzifizierung

Histologische Untersuchungen von Kalziumablagerungen mit Alizarinrot-S-Färbungen der Aortenklappen zeigen signifikant erhöhte Kalzifizierung in apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen verglichen mit apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Mäusen bei geschlechtergetrennter Beobachtung (vgl. Abbildung 12).

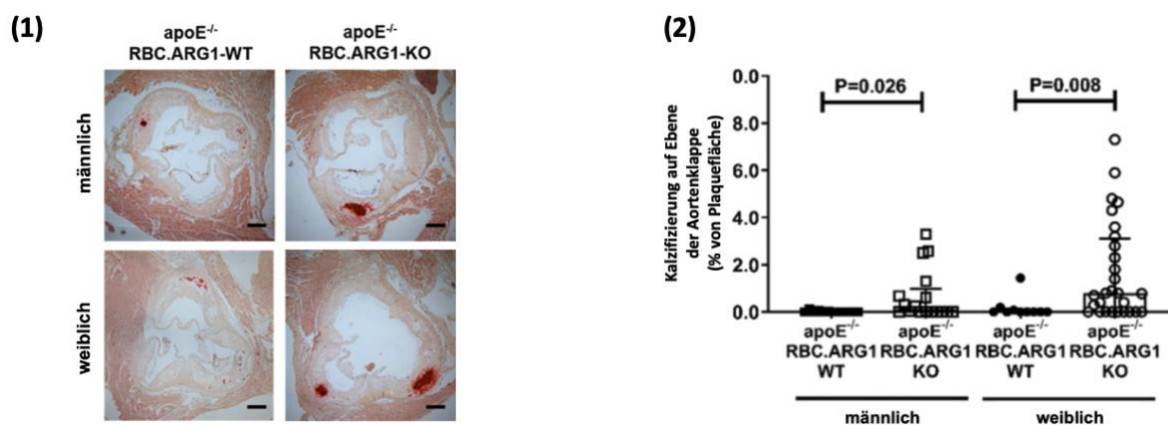


Abbildung 12: Kalzifizierung der Aortenklappe

(1) Alizarinrot-S-Färbung von Aortenklappen von apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT und apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen getrennt nach Geschlecht, Maßstabsbalken entspricht 150 µm (2) Quantifizierung der Kalzifizierung auf Ebene der Aortenklappe von apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT und apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen getrennt nach Geschlecht (männlich n=12 und n=17, weiblich n=10 und n=28), prozentual bezogen auf die gesamte atherosklerotische Plaquefläche des gleichen Schnittes angegeben, die Werte sind dargestellt als Einzelwerte und als Mittelwert ± Standardabweichung, statistische Analyse mit Hilfe des Mann-Whitney Tests

Da sich in vorherigen Untersuchungen der Aortenbogen als für Kalzifizierungen prädestinierte Stellen zeigte, wurden Aortenbögen im Längsschnitt histologisch dargestellt. Dabei zeigt sich in der Alizarinrot-S-Färbung eine verstärkte Kalzifizierung der Aortenbögen der apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäuse verglichen zu apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Mäuse (vgl. Abbildung 13).

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

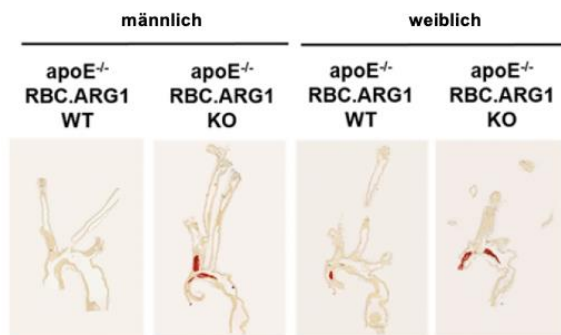


Abbildung 13: Kalzifizierung des Aortenbogens  
Alizarinrot-S-Färbung von Längsschnitten durch den Aortenbogen von apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT und apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen getrennt nach Geschlecht

Eine einfache lineare Regressionsanalyse ergab eine signifikante Korrelation zwischen der Fläche der Kalzifizierung und der Fläche der atherosklerotischen Plaque (vgl. Abbildung 14).

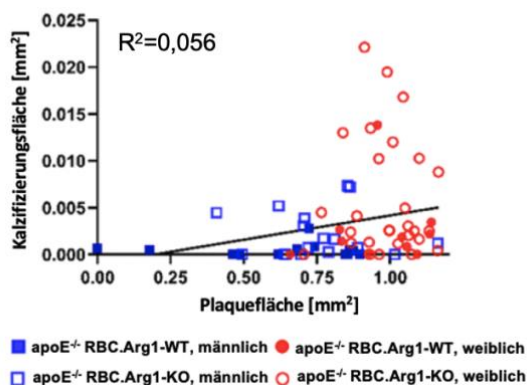


Abbildung 14: Korrelation von Kalzifizierungs- und Plaquefläche  
Darstellung einer einfachen linearen Regressionsanalyse der Fläche der Kalzifizierung und der Fläche der atherosklerotischen Plaque, die statistische Analyse mit Spearman-Test zeigt eine signifikante Korrelation der Variablen ( $p=0,019$ )

Es zeigte sich kein Einfluss des Arginase-1 Knockouts auf die Fläche der atherosklerotischen Plaque im Vergleich zu apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Mäusen weder

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

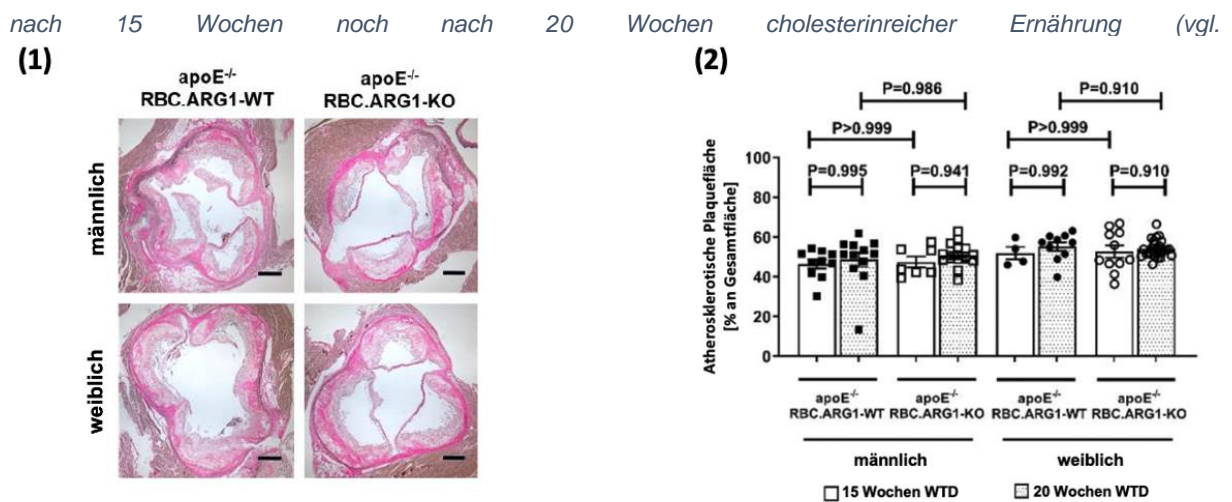


Abbildung 15).

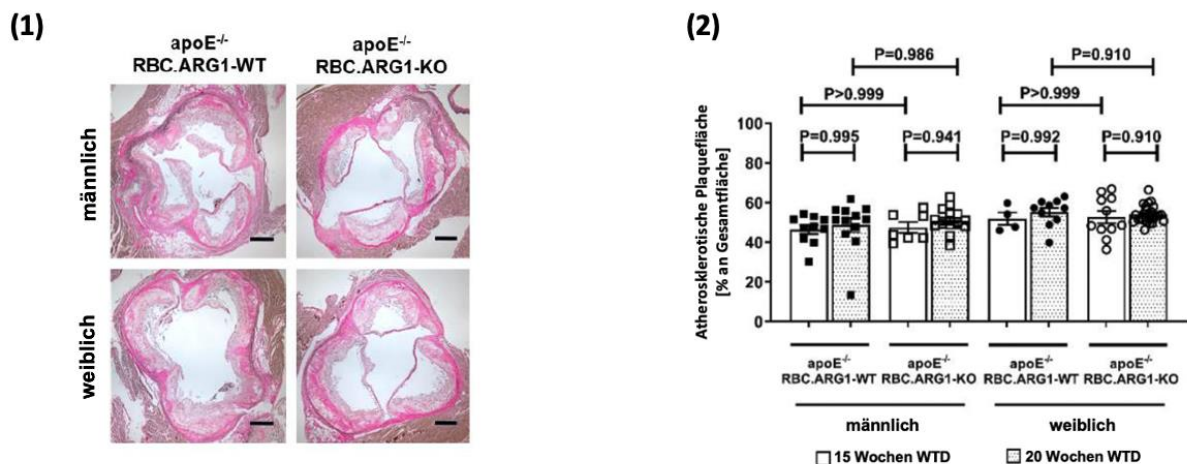


Abbildung 15: Atherosklerose der Aortenklappe  
 (1) Verhoeff's Elastica Färbung von Aortenklappen von apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT und apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen getrennt nach Geschlecht, Maßstabsbalken entspricht 150  $\mu$ m (2) Quantifizierung der atherosklerotischen Plaquerfläche von apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT und apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen getrennt nach Geschlecht nach 15 und 20 Wochen WTD (modifizierte Nahrung), die Werte sind dargestellt als Einzelwerte und als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, statistische Analyse mit Hilfe des einfaktorielle ANOVA + Šidák-Mehrfachvergleichstes

Um die Bedeutung des Lipidstoffwechsels für die beobachteten Veränderungen der Kalzifizierungsfläche und der Fläche der atherosklerotischen Plaque zu überprüfen, untersuchten wir Mäuse, die Apolipoprotein E exprimieren. Nach 20 Wochen Standarddiät zeigten sich keine atherosklerotischen Plaques und keine Kalzifizierung an den Aortenklappen und im Längsschnitt des Aortenbogens, unabhängig von der Anwesenheit des Enzyms Arginase-1 (vgl. Abbildung 16).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

---

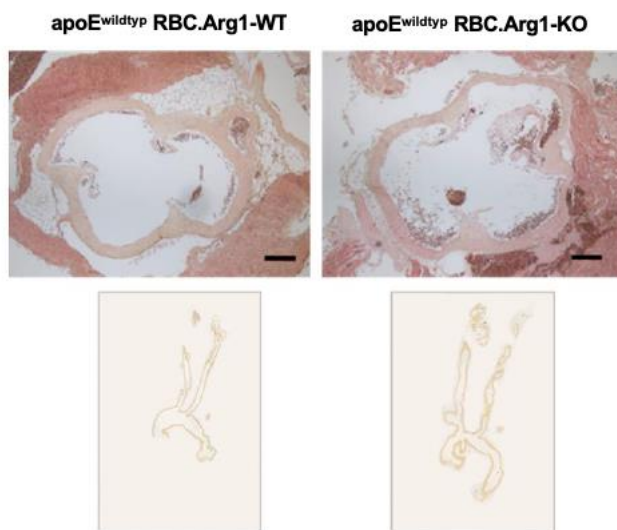


Abbildung 16: Aortenklappe und Aortenbogen in apoE-Wildtyp Mäusen  
Alizarinrot-S-Färbung von Aortenklappen (oben) und Aortenbögen (unten) von apoE<sup>wildtyp</sup> RBC.Arg1-WT und apoE<sup>wildtyp</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen nach Standardnahrung, Maßstabsbalken entspricht 150µm

### 4.3.3 Hämodynamische Relevanz der vaskulären Kalzifizierung

Die echokardiographische Untersuchung eine Woche vor Tötung der Maus zeigte in männlichen apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen eine relevante, in weiblichen apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen eine signifikante Flussbeschleunigung des Blutes über der Aortenklappe während der Systole verglichen mit apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Mäusen. Außerdem ließ sich ein signifikanter Unterschied im Gewicht des linken Ventrikels bei weiblichen Mäusen im Vergleich zu männlichen Mäusen des jeweils gleichen Genotyps beobachten (vgl. Abbildung 17, Tabelle 15).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

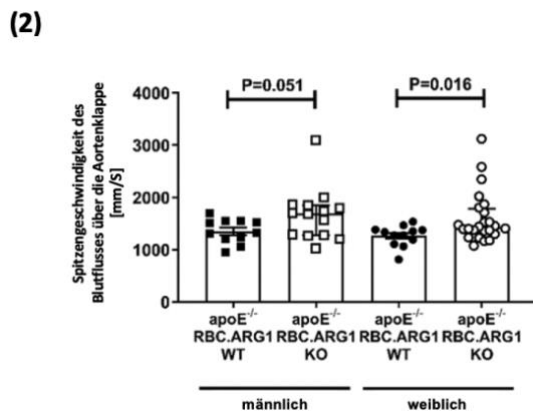
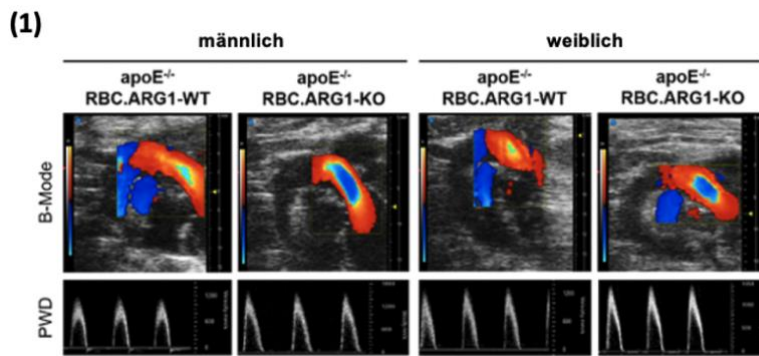


Abbildung 17: Echokardiographie

(1) Repräsentative Ultraschallbilder eine Woche vor der Tötung aufgeteilt nach apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT und apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen und Geschlecht obere Zeile – B-Mode mit Doppler Darstellung der Geschwindigkeit des Blutflusses über der Aortenklappe untere Zeile – PWD=Pulse Wave Doppler, Aufzeichnung der Blutflussgeschwindigkeit (y-Achse) an einem ausgewählten Punkt über die Zeit (x-Achse) (2) quantitative Analyse der Spitzengeschwindigkeit des Blutflusses über die Aortenklappe aufgeteilt nach apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT und apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen und Geschlecht (männlich n=11 und n=14, weiblich n=12 und n=24), statistische Analyse mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests

	Männlich		weiblich	
	apoE <sup>-/-</sup> RBC.Arg1- WT	apoE <sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO	apoE <sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT	apoE <sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO
<b>Anzahl</b>	11	14	9	25
<b>M-MODE</b>				
<b>Puls [1/min]</b>	468 ± 13	449 ± 14	442 ± 9,8	464 ± 8,3
<b>Systolische LV AWT [mm]</b>	1,40 ± 0,04	1,29 ± 0,04	1,31 ± 0,75	1,24 ± 0,04
<b>Diastolische LV AWT [mm]</b>	0,87 ± 0,04	0,82 ± 0,03	0,81 ± 0,04	0,80 ± 0,03
<b>Systolische LV PWT</b>	1,13 ± 0,06	1,13 ± 0,05	1,03 ± 0,04	1,10 ± 0,03

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

[mm]				
<b>Diastolische LV PWT [mm]</b>	0,86 ± 0,04	0,92 ± 0,04	0,78 ± 0,03	0,82 ± 0,03
<b>LV Gewicht [mg]</b>	148 ± 8,2	139 ± 8,7	116 ± 4,6 *	113 ± 3,5 **
<b>FS [%]</b>	31,2 ± 1,6	28,5 ± 1,0	31,5 ± 1,0	31,5 ± 0,9
<b>B-MODE</b>				
<b>AoV pv [mm/s]</b>	1.353 ± 70	1.669 ± 135 p=0,051	1.264 ± 57	1.559 ± 100 #
<b>AoV pg [mmHg]</b>	7,5 ± 0,74	12,1 ± 2,2 p=0,051	6,3 ± 0,60	10,1 ± 1,6

Tabelle 15: Echokardiographie

Echokardiographie Ergebnisse eine Woche vor der Tötung aufgeteilt nach apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT und apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen und Geschlecht, die Werte sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung, \*p<0,05, \*\*p<0,01, jeweils mit gleichem Genotyp des männlichen Geschlechts verglichen, #p<0,05 jeweils mit apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT des gleichen Geschlechts verglichen, statistische Analyse mit einfaktoriellem ANOVA + Šidák-Mehrfachvergleichstest; Abkürzungen: LV= Linker Ventrikel AWT=Vorderwanddicke PWT=Hinterwanddicke FS=Fractional Shortening AoV pv= Spitzengeschwindigkeit des Blutflusses über die Aortenklappe AoV pg=Spitzengradient über der Aortenklappe

#### 4.4 Veränderungen in atherosklerotischen Plaques der Aortenklappe auf zellulärer Ebene

Die immunhistochemische Färbung mit TER-119 Antikörpern, zur Färbung erythrozytärer Membranen, an zuvor durch Alizarinrot-S-Färbung charakterisierten Stellen zeigt das Vorkommen von Erythrozytenmembranen an Orten der vaskulären Kalzifizierungen (vgl. Abbildung 18).

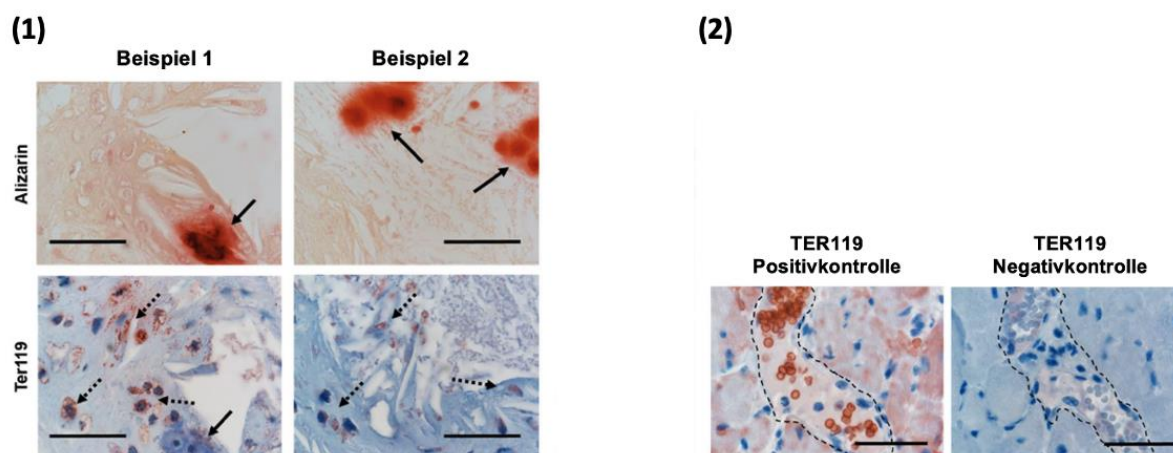


Abbildung 18: Kolokalisation Erythrozytenmembranen und vaskuläre Kalzifizierung

Repräsentative Bilder von Alizarinrot-S-Färbung und TER-119-Färbung von Aortenklappen (1) obere Zeile – Nachweis von Kalzifizierungen (rot, schwarze Pfeile) in atherosklerotischen Plaques untere Zeile – Nachweis von

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

*Erythrozytenmembranen (rotbraun, gestrichelte Pfeile) in der Nähe der Kalzifizierungen (2) TER119 Positiv- und Negativkontrolle, Maßstabsbalken entspricht 25 µm*

Immunhistochemische Färbungen zeigten eine signifikante Mehranreicherung des Markerproteins für glatte Muskelzellen SMA und des Zellproliferationsmarkers PCNA in apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen verglichen zu apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT (vgl. Abbildung 19).

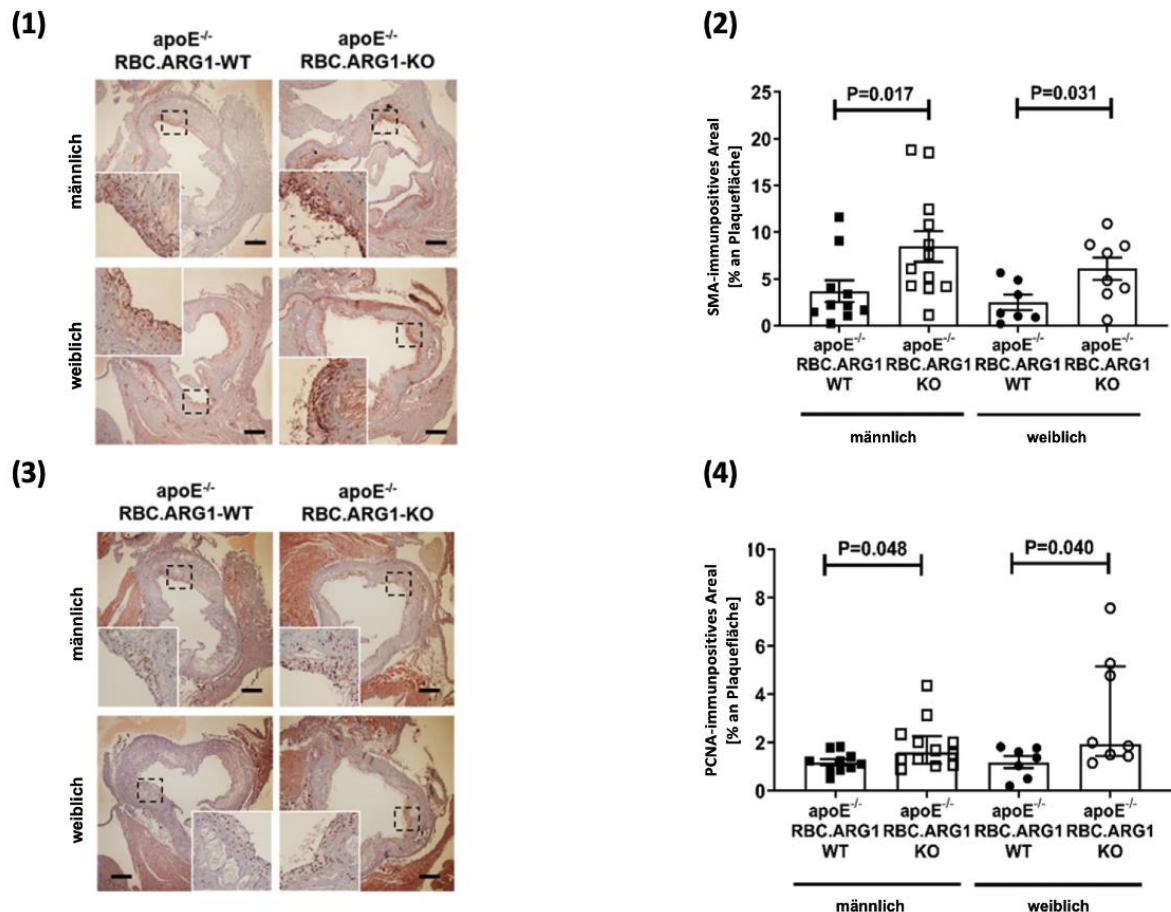


Abbildung 19: Immunhistochemie der Aortenklappe mit SMA und PCNA

Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung auf Ebene der Aortenklappe von apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT und apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen, getrennt nach Geschlecht, mit monoklonalen Antikörpern (1) gegen SMA (3) gegen PCNA, Maßstabsbalken entspricht 150 µm; Quantifizierung der (2) SMA-immunpositiven Fläche und (4) PCNA-immunpositiven Fläche auf Ebene der Aortenklappe von apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT und apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen, getrennt nach Geschlecht (männlich n=10 und n=12, weiblich n=7 und n=8), Einzelwerte prozentual bezogen auf die gesamte atherosklerotische Plaqueläche des gleichen Schnittes angegeben, Werte außerdem als Mittelwert ± Standardabweichung bzw. als Median mit Interquartilsbreite angegeben, statistische Analyse mit Hilfe des Mann-Whitney Tests und des Student's-t-Tests (je nach Normalverteilung)

Der Makrophagenmarker MAC2, das Leukozytenantigen CD45 und die Matrix-Metalloproteinase 9 zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT und apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen (vgl. Abbildung 20).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

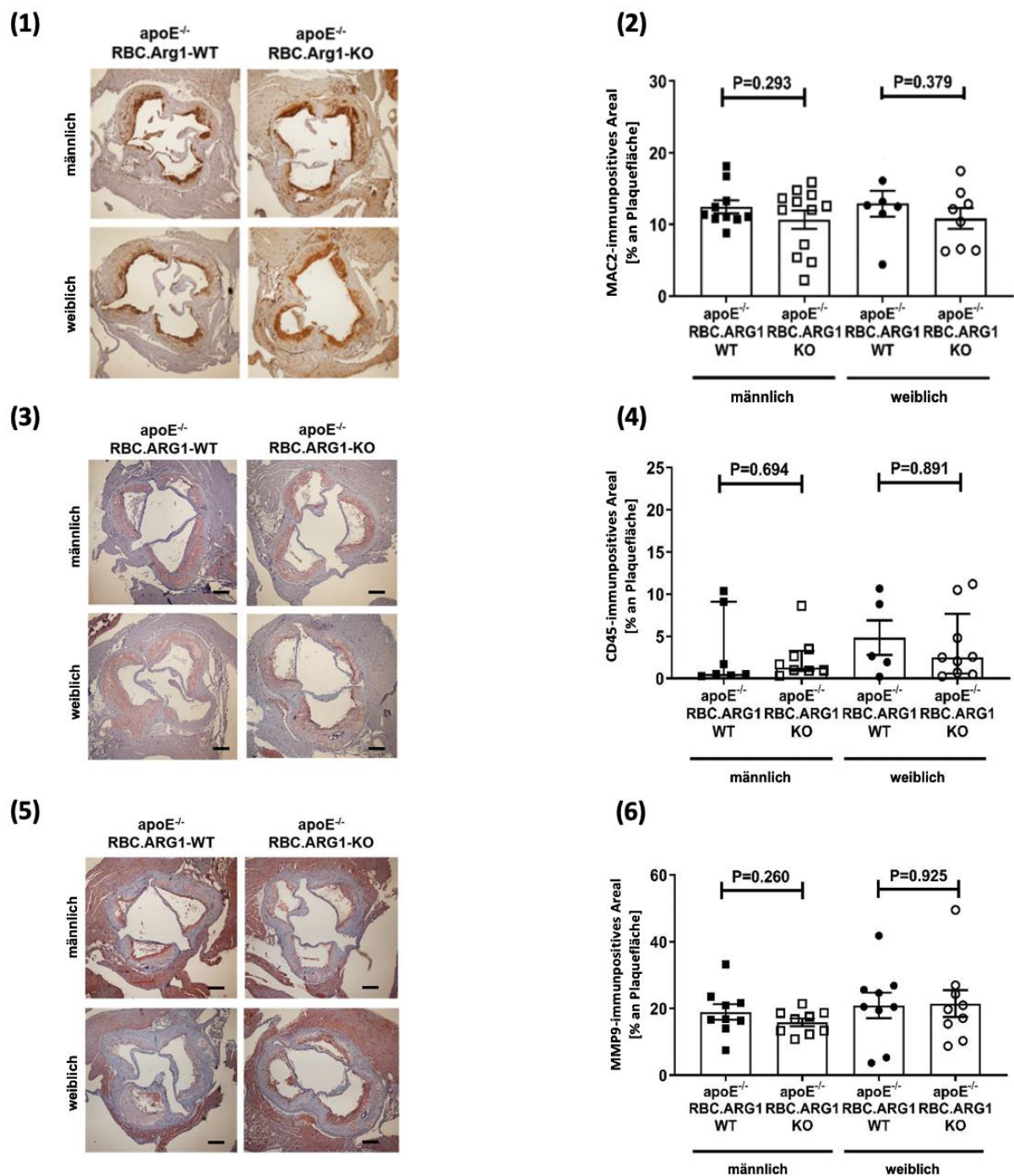


Abbildung 20: Immunhistochemie der Aortenklappe mit MAC2, CD45, MMP9  
 Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung auf Ebene der Aortenklappe von *apoE*<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT und *apoE*<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen, getrennt nach Geschlecht, mit monoklonalen Antikörpern (1) gegen MAC2 (3) gegen CD45 (5) gegen MMP9, Maßstabsbalken entspricht 150 µm; Quantifizierung der (2) MAC2-immunpositiven Fläche, (4) CD45-immunpositiven Fläche und (6) PCNA-immunpositiven Fläche auf Ebene der Aortenklappe von *apoE*<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT und *apoE*<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen, getrennt nach Geschlecht (männlich n=7-10 und n=8-12, weiblich n=5-9 und n=8-9), Einzelwerte prozentual bezogen auf die gesamte atherosklerotische Plaquefläche des gleichen Schnittes angegeben, Werte außerdem als Mittelwert ± Standardabweichung bzw. als Median mit Interquartilsbreite angegeben, statistische Analyse mit Hilfe des Mann-Whitney Tests und des Student's-t-Tests (je nach Normalverteilung)

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

Die Menge an interstitiellem Kollagen auf Ebene der Aortenklappe war bei apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen verglichen apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Mäusen signifikant erhöht (vgl. Abbildung 21).

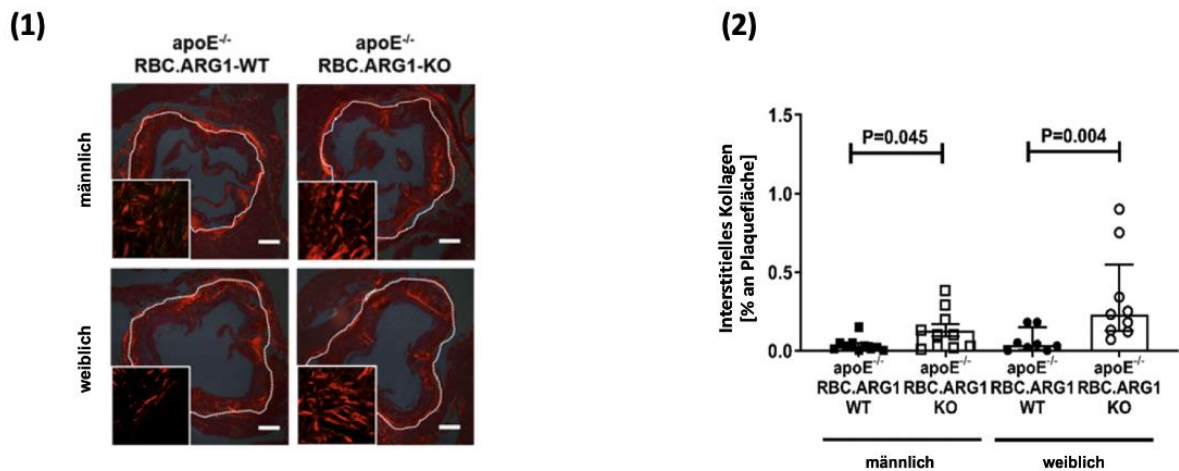


Abbildung 21: interstitielles Kollagen in der Aortenklappe

(1) Repräsentative Darstellung einer Siriusrot Färbung auf Ebene der Aortenklappe von apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT und apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen getrennt nach Geschlecht, Maßstabsbalken entspricht 150  $\mu$ m (2) Quantifizierung des interstitiellen Kollagens auf Ebene der Aortenklappe von apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT und apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen getrennt nach Geschlecht (männlich n=10 und n=10, weiblich n=8 und n=9), Einzelwerte prozentual bezogen auf die gesamte atherosklerotische Plaquerfläche des gleichen Schnittes angegeben, Werte außerdem als Median mit Interquartilsbreite angegeben, statistische Analyse mit Hilfe des Mann-Whitney Tests und des Student's-t-Tests (je nach Normalverteilung)

#### 4.5 Osteogene Aktivität in vitro

Die zunehmende Kalzifizierung bei Mäusen mit fehlender Arginase-1 in den Erythrozyten lässt sich auch in der Zellkultur mit humanen aortalen glatten Muskelzellen nach Zugabe von Erythrozytenmembranen von apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen beobachten. Nach Inkubation der humanen glatten Muskelzellen mit den Erythrozytenmembranen bei osteogenen Bedingungen über mehrere Tage, anschließender Alizarinrot-Färbung und photometrischer Farbbestimmung, stellt sich eine signifikant höhere Kalzifizierung in Zellkulturen mit Erythrozytenmembranen von apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen verglichen mit Erythrozytenmembranen von apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Mäusen dar (vgl. Abbildung 22). Bei Abwesenheit der Erythrozytenmembranen zeigt sich nur nach sehr langer Zeit eine leichte Kalzifizierung (nicht gezeigt).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

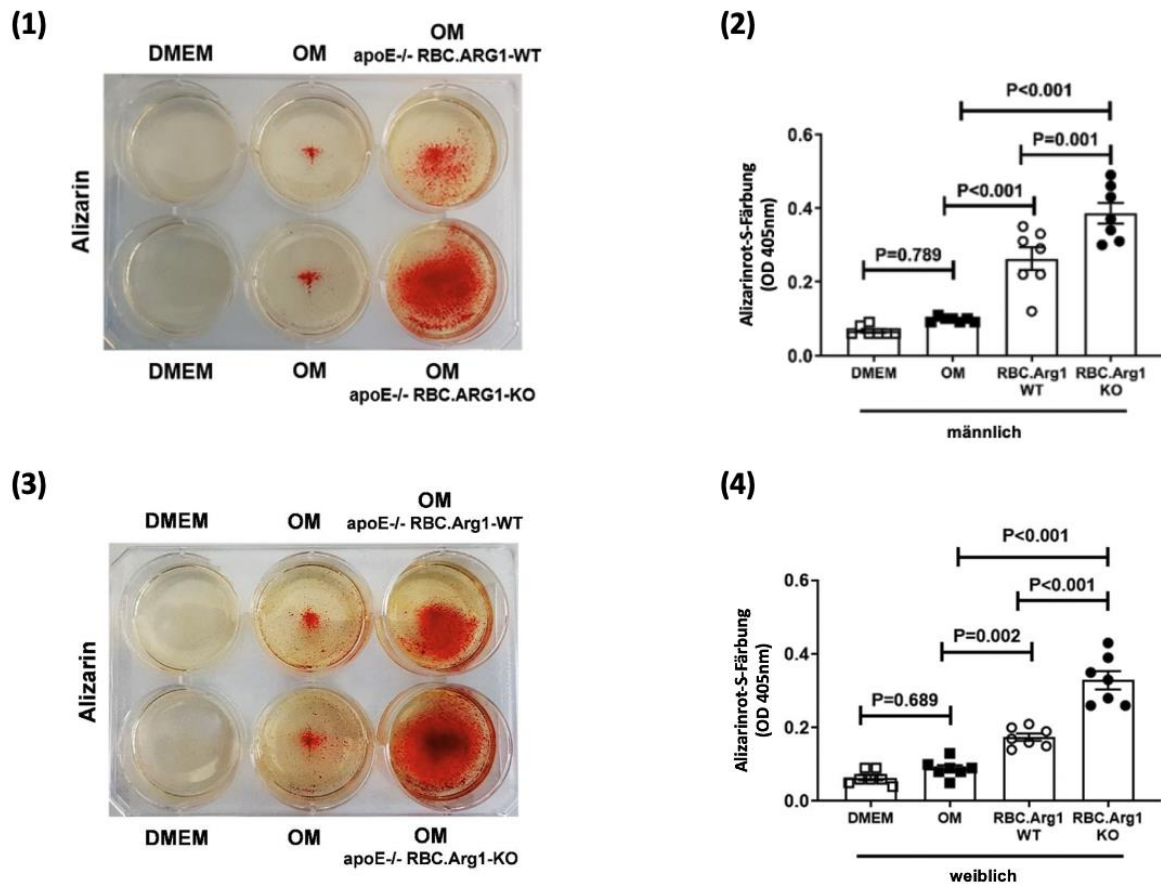


Abbildung 22: Kalzifizierung in vitro

(1)/(3) Repräsentative Bilder einer Alizarinrot-S-Färbung in Zellkultur, humane aortale glatte Muskelzellen links mit DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Serum), mittig mit OM (Osteogenes Medium) und rechts mit Zugabe von Erythrozytenmembranen von entweder männlichen/weiblichen apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Mäusen oder männlichen/weiblichen apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen, gleiche Proteinbeladung mit je 35µg nach vorheriger Proteinquantifizierung, Inkubationszeit für 3-5 Tage, anschließend Alizarinrot-S-Färbung (2)/(4) spektralphotometrische Quantifizierung der Alizarinrot-S-Färbung getrennt nach Wachstumsbedingungen, Erythrozytenmembranen nur des männlichen Geschlechts/nur des weiblichen Geschlechts (n=7 WT n=7 KO), die Werte sind dargestellt als Einzelwerte und als Mittelwert ± Standardabweichung, statistische Analyse mit Hilfe des einfaktorielle ANOVA + Šidák-Mehrfachvergleichstest

Mikroskopische Untersuchungen der Zellkultur nach Alizarinrot-S-Färbung und Immunfluoreszenzfärbung mit dem monoklonalen Antikörper gegen den Transkriptionsfaktor Runx2 (und DAPI zur Färbung der Zellkerne) zeigt eine erhöhte Kalzifizierung und eine signifikant höhere Dichte an Runx2 positiven Zellen in Zellkulturen nach Zugabe von Erythrozytenmembranen von apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen verglichen mit apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Mäusen (vgl. Abbildung 23).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

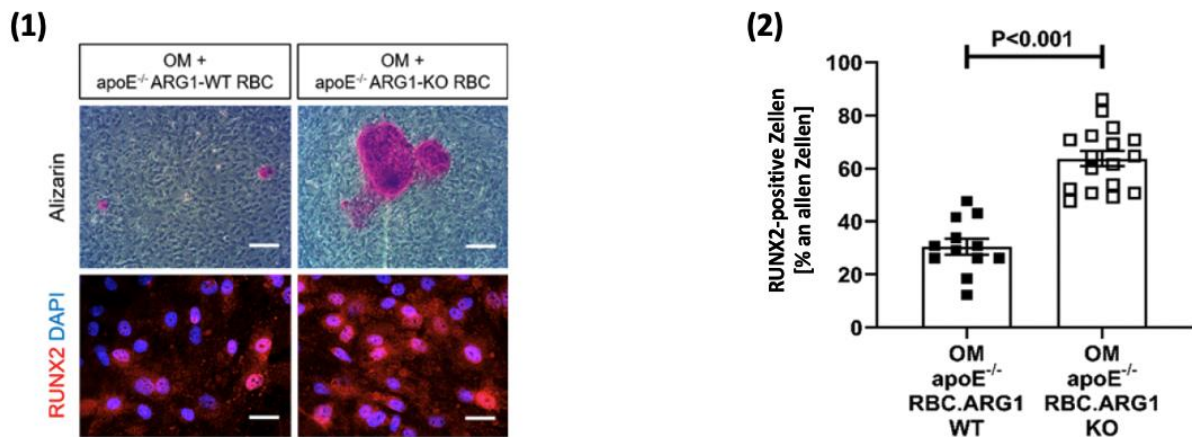


Abbildung 23: Runx2 in Kalzifizierungen in vitro

(1) Repräsentative Bilder einer Alizarinrot-S-Färbung (oben) und Immunfluoreszenzfärbung von Runx2 (rot) und DAPI (blau) (unten) von humanen aortalen glatten Muskelzellen nach Inkubation mit Erythrozytenmembranen entweder von apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT oder apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen (2) Quantifizierung der Runx2-immunpositiven Fläche von humanen aortalen glatten Muskelzellen nach Inkubation mit Erythrozytenmembranen entweder von apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT (n=12) oder apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO (n=17) Mäusen, Werte angegeben prozentual an Gesamtzahl aller Zellen, die Werte sind dargestellt als Einzelwerte und als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, statistische Analyse mit Hilfe des Student's-t-Tests

#### 4.5.1 Einflussfaktoren auf die vaskuläre Kalzifizierung in vitro

Zur Untersuchung der Einflussfaktoren auf die vaskuläre Kalzifizierung wurde dem Osteogenen Medium neben den Erythrozytenmembranen der unterschiedlichen Genotypen einmal L-Arginin und einmal der NO-Radikalfänger 2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid (PTIO) hinzugegeben. Nach Zugabe von L-Arginin zeigt sich keine Zu- oder Abnahme der Kalzifizierung der humanen aortalen glatten Muskelzellen. Andererseits zeigt sich nach Zugabe von PTIO eine starke Reduktion der osteogenen Aktivität (vgl. Abbildung 24).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

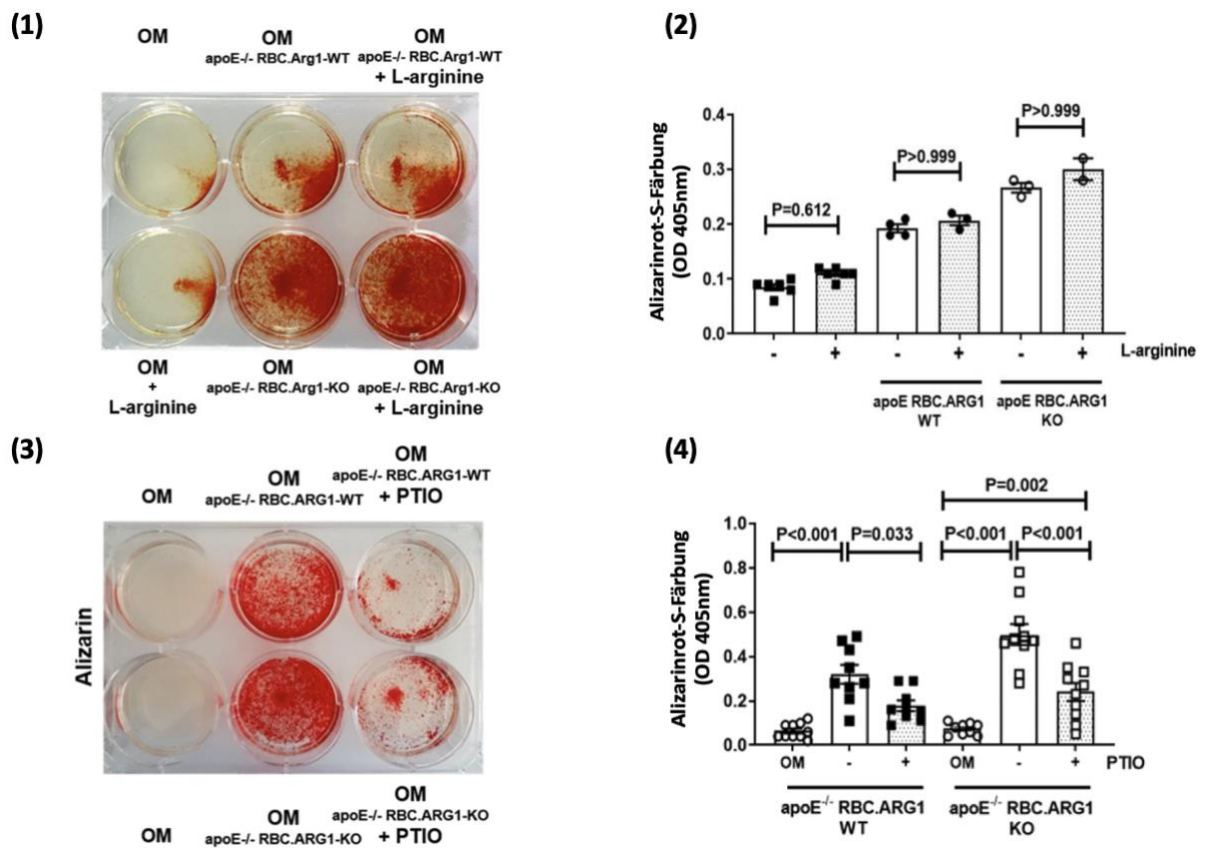


Abbildung 24: Kalzifizierung in vitro unter Zugabe von L-Arginin oder PTIO  
 Repräsentative Bilder einer Alizarinrot-S-Färbung in Zellkultur, humane aortale glatte Muskelzellen (1) links oben mit osteogenem Medium (OM) allein, links unten mit OM + 100µM L-Arginin, mittig oben OM mit Erythrozytenmembranen einer apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Maus, rechts oben zusätzlich L-Arginin 100µM, mittig unten OM mit Erythrozytenmembranen einer apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Maus, rechts unten zusätzlich L-Arginin 100µM (3) links mit osteogenem Medium (OM) allein, mittig oben OM mit Erythrozytenmembranen einer apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Maus, rechts oben zusätzlich PTIO 100µM, mittig unten OM mit Erythrozytenmembranen einer apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Maus, rechts unten zusätzlich PTIO 100µM; spektralphotometrische Quantifizierung der Kalzifizierung mit Alizarinrot-S-Färbung von humanen aortalen glatten Muskelzellen unter Einfluss von Erythrozytenmembranen von entweder apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT oder apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen (2) jeweils mit und ohne L-Arginin (100µM) (4) mit und ohne PTIO, die Werte sind dargestellt als Einzelwerte und als Median mit Interquartilsbreite ((2)) oder Mittelwert ± Standardabweichung((4)), statistische Analyse bei (2) mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Test + Dunn-Mehrfachvergleichstest bei (4) mit Hilfe des einfaktorielle ANOVA + Šidák- Mehrfachvergleichstest

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

Auch die Zugabe des sGC-Inhibitors ODQ und des GSNOR-Inhibitors N6022 zeigte jeweils eine starke Reduktion der osteogenen Aktivität (vgl. Abbildung 25).

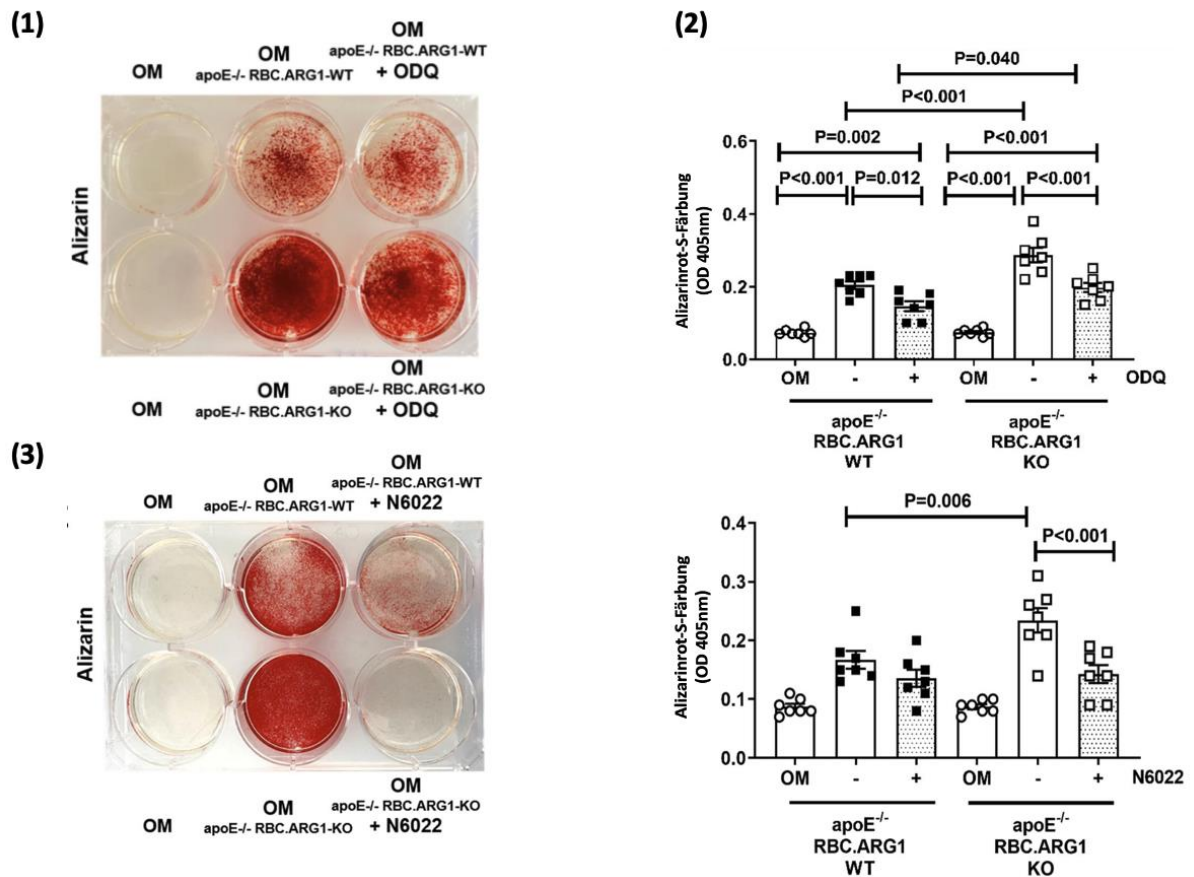


Abbildung 25: Kalzifizierung in vitro unter Zugabe von ODQ oder N6022  
 Repräsentative Bilder einer Alizarinrot-S-Färbung in Zellkultur, humane aortale glatte Muskelzellen Alizarinrot-S-Färbung in Zellkultur, humane aortale glatte Muskelzellen links mit osteogenem Medium (OM) allein, mittig oben OM mit Erythrozytenmembranen einer *apoE*<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Maus, mittig unten OM mit Erythrozytenmembranen einer *apoE*<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Maus, (1) rechts zusätzlich ODQ 100µM (3) rechts zusätzlich N6022, spektralphotometrische Quantifizierung der Alizarinrot-S-Färbung getrennt nach Wachstumsbedingungen (2) mit ODQ, (4) mit N6022 (n=7 (WT) n=7 (KO)), die Werte sind dargestellt als Einzelwerte und als Mittelwert ± Standardabweichung, statistische Analyse mit Hilfe des einfaktorielle ANOVA + Šidák-Mehrfachvergleichstest

Diese Ergebnisse lassen sich in Zellkulturen mit primären glatten Muskelzellen – isoliert aus Aorten der *apoE*<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT und *apoE*<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäuse – replizieren. Auch hier zeigen sich vermehrt Kalzifizierungen nach Zugabe von Erythrozytenmembranen der *apoE*<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäuse verglichen zu Erythrozytenmembranen der *apoE*<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Mäuse und eine signifikante Reduktion nach Zugabe des NO-Radikalfängers PTIO (vgl. Abbildung 26).

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

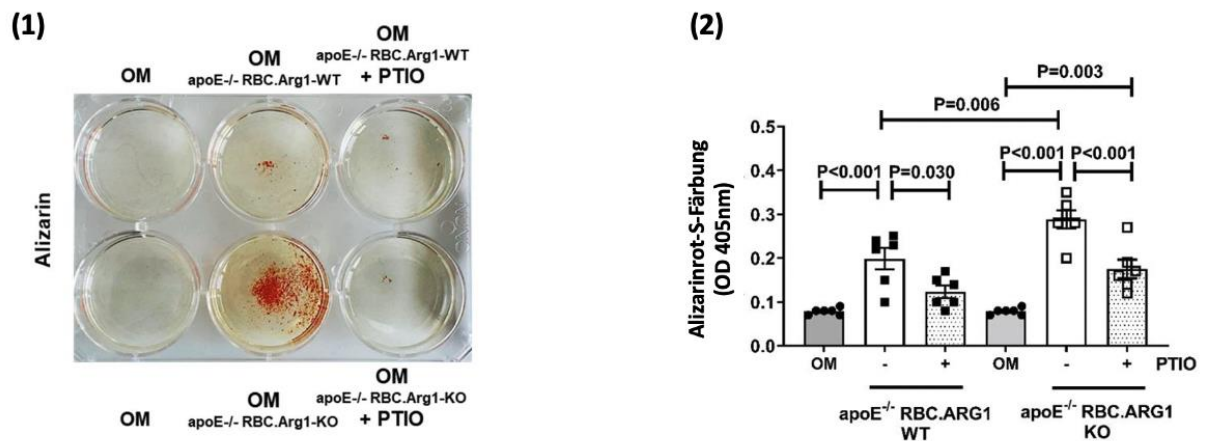


Abbildung 26: Kalzifizierung *in vitro* (primäre glatte Muskelzellen der Maus)

(1) Repräsentatives Bild einer Alizarinrot-S-Färbung in Zellkultur, primäre aortale glatte Muskelzellen der Maus, links mit osteogenem Medium (OM) allein, mittig oben OM mit Erythrozytenmembranen einer apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Maus, rechts oben zusätzlich PTIO 100µM, mittig unten OM mit Erythrozytenmembranen einer apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Maus, rechts unten zusätzlich PTIO 100µM (2) spektralphotometrische Quantifizierung der Alizarinrot-S-Färbung getrennt nach Wachstumsbedingungen, (n=6 (WT) n=6 (KO)), die Werte sind dargestellt als Einzelwerte und als Mittelwert ± Standardabweichung, statistische Analyse mit Hilfe des einfaktorielle ANOVA + Šidák- Mehrfachvergleichstest

#### 4.5.2 Osteogene Marker *in vitro*

In Zellkulturen humaner glatter Muskelzellen waren die folgenden osteogenen Marker nach Zugabe von Erythrozytenmembranen von apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen signifikant erhöht (verglichen mit Zugabe von Erythrozytenmembranen von apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Mäusen):

- Osteopontin (OPN)
- Osteocalcin (OCN)
- Alkalische Phosphatase (ALP)

Die mRNA-Expression von OPN, OCN und ALP zeigt sich nach Zugabe des NO-Radikalfängers PTIO jeweils signifikant erniedrigt (vgl. Abbildung 27).

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

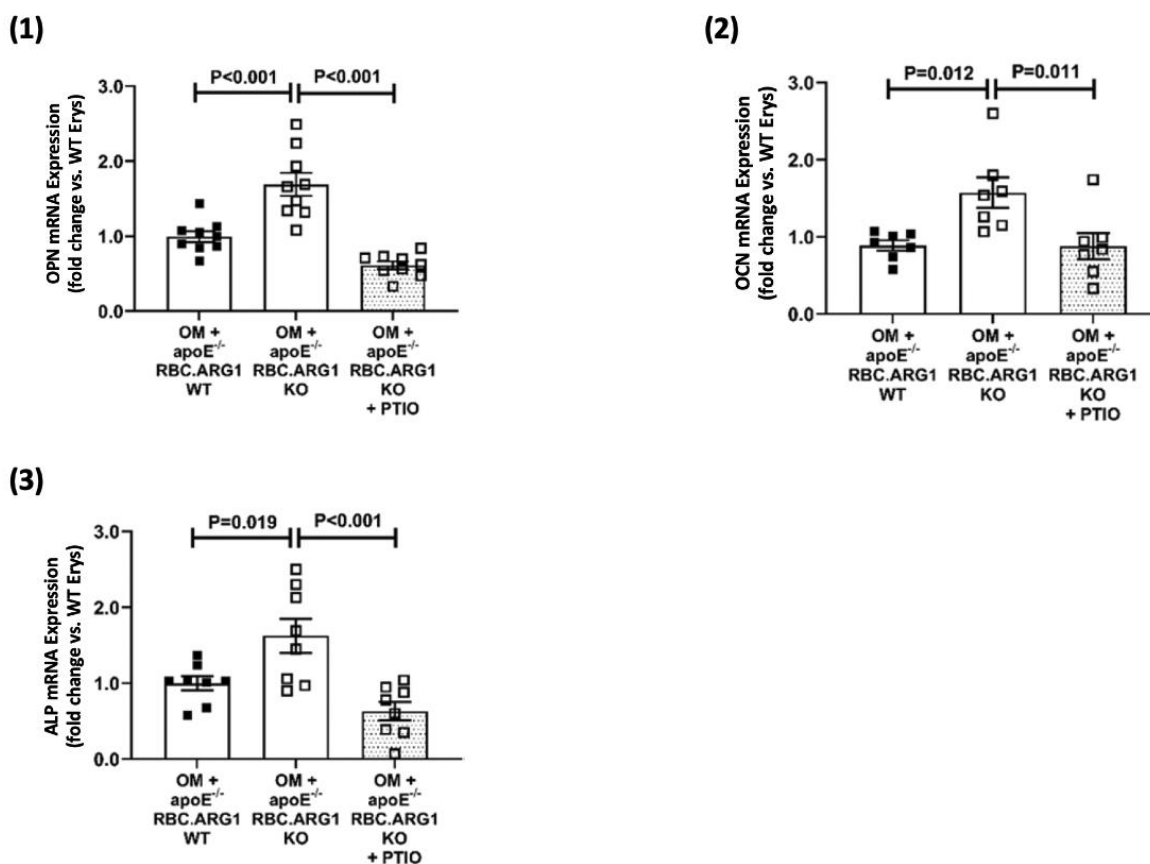


Abbildung 27: osteogene Marker in vitro

(1) Quantitative Echtzeit PCR Analyse der osteogenen Marker (1) Osteopontin (OPN) (2) Osteocalcin (OCN) (3) Alkalische Phosphatase (ALP) in humanen aortalen glatten Muskelzellen nach Inkubation in Osteogenem Medium (OM) mit Erythrozytenmembranen entweder von apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT (n=9) oder von apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO (n=7-9) Mäusen und nach Zugabe von PTIO zu Zellkulturen mit Erythrozytenmembranen von apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen, Werte sind angegeben als Veränderung bezogen auf die Erythrozyten (Erys) der apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Mäuse, die Werte sind dargestellt als Einzelwerte und als Mittelwert ± Standardabweichung, statistische Analyse mit Hilfe des einfaktorielle ANOVA + Šidák- Mehrfachvergleichstest

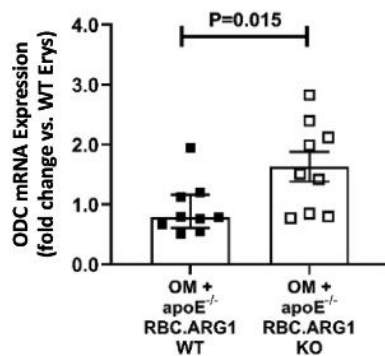
#### 4.5.1 mRNA-Expression von Enzymen aus dem Stoffwechsel der Arginase-1 und der Differenzierung glatter Muskelzellen in vaskulärer Kalzifizierung

In quantitativen Echtzeit PCR Analysen von Zellkulturen mit humanen aortalen glatten Muskelzellen zeigt sich unter Einfluss von Erythrozytenmembranen von apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen eine signifikant erhöhte mRNA-Expression des in den L-Arginin-Metabolismus involvierten Enzyms Ornithin Decarboxylase (ODC) verglichen mit dem Einfluss von Erythrozytenmembranen von apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Mäusen. Außerdem zeigte sich ein gesteigerter Stoffwechsel von Cyclin D1 (CCDN1) und  $\alpha$ -Aktin (ACTA 2), beide stellvertretend für die Proliferation und Differenzierung der glatten Muskelzellen, essenziell für die Entstehung vaskulärer Kalzifizierung. Die mRNA-Konzentrationen von Kollagen Typ1- $\alpha$ 1 zeigten sich ebenfalls signifikant

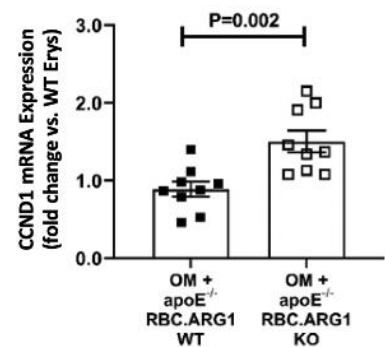
Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

erhöht. Dahingegen zeigten sich die mRNA-Konzentrationen der für die Kollagensynthese notwendigen Ornithin Aminotransferase (OAT) und des Markerproteins für glatte Muskelzellen, SM22 $\alpha$  (=TAGLN) nicht signifikant erhöht (vgl. Abbildung 28). Hinzugabe von L-Arginin (100 $\mu$ M) zu den Zellkulturen zeigte einen weiteren jeweils signifikanten Anstieg der CCND1 (p=0,028), ODC (p=0,018) und OAT (p=0,056) mRNA-Konzentration (nicht gezeigt).

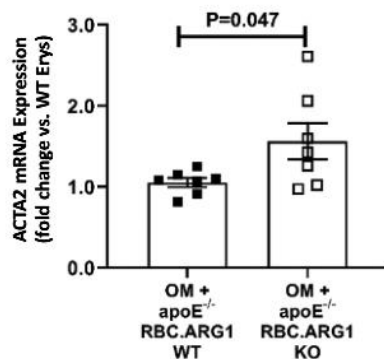
(1)



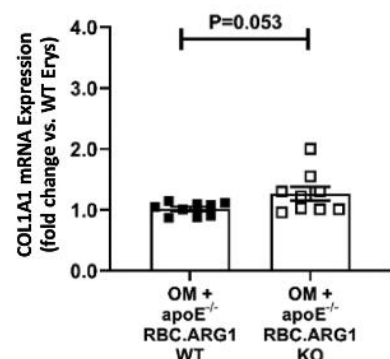
(2)



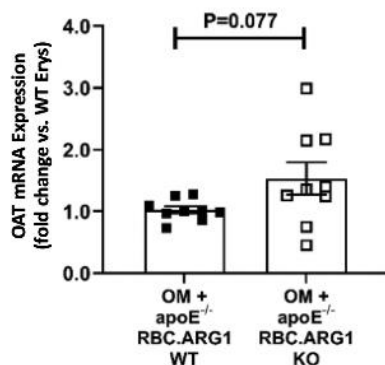
(3)



(4)



(5)



(6)

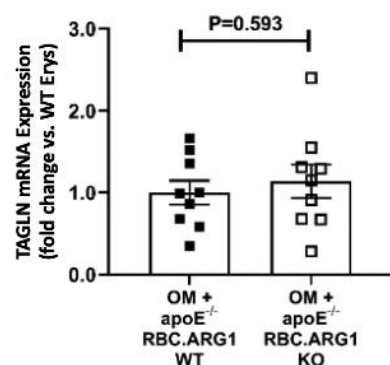


Abbildung 28: mRNA-Konzentration von relevanten Enzymen

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

*Quantitative Echtzeit PCR Analyse des Markerproteins (1) Ornithin Decarboxylase (ODC) (2) Cyclin D1 (CCND1) (3)  $\alpha$ -Aktin (ACTA 2) (4) Kollagen Typ 1- $\alpha$ 1 (COL1A1) (5) Ornithin Aminotransferase (OAT) (6) SM22 $\alpha$  (TAGLN) in humanen aortalen glatten Muskelzellen nach Inkubation in Osteogenem Medium (OM) mit Erythrozytenmembranen entweder von apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT (n=7-9) oder von apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen (n=7-9), die Werte sind dargestellt als Einzelwerte und als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, statistische Analyse mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests ((1)) oder des Student's-t-Tests ((2)-(6)).*



**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

Menge an Erythrozyten ausreichend sein, um die Bedeutung der Arg-1 für die vaskuläre Kalzifizierung in der Maus zu untersuchen.

Die Arginase-2 ist ein Isoenzym der Arg-1 und vor allem in Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen zu finden, jedoch nicht in Erythrozyten, da diese keine Mitochondrien besitzen. Eine gesteigerte Arginase-Aktivität, wie sie bei Rauchern [127] und Diabetikern [128] beobachtet wird, führt zu einer verminderten Freisetzung von NO, da hier das Substrat der eNOS verbraucht wird [114]. Hypertonie [129] und Atherosklerose [130] sind mögliche Folgen. Eine verminderte NO-Freisetzung zeigt sich auch in symptomatischen koronaren Herzkrankheiten [131]. Eine Hemmung der Arginase führt zu einer Verbesserung der endothelialen Funktion [132, 133]. Die in dieser Arbeit verwendete Mauslinie zeigt keine Unterschiede in der Arginase-2 Expression (nicht gezeigt).

Es ist gut belegt, dass ein ApoE-Mangel bei Mäusen und eine zusätzliche cholesterinreiche Ernährung die Bildung von atherosklerotischen Plaques fördert [134]. Die Plaquebildung hängt dabei nicht von der erythrozytären Arg-1 oder der eNOS und der daraus resultierenden NO-Bildung aus Erythrozyten ab (vgl. **Error! Reference source not found.**), wohl aber von der Arginase-2-Aktivität [130]. Der Hauptrisikofaktor für die atherosklerotische Plaquebildung ist eine erhöhte LDL-Konzentration. In apoE-defizienten Mäusen sind im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen stark erhöhte Konzentrationen des atherogenen LDLs und des Gesamtcholesterins sowie eine leichte Verminderung des antiatherogenen HDLs zu beobachten. Die Triglyzeride hingegen zeigen sich trotz ApoE-Defizienz im Normbereich (Referenzwerte vgl. [135], Umrechnung mit Hilfe von [omnicalculator.com](http://omnicalculator.com)). Die Ausschaltung der Arg-1 hat keinen Einfluss auf die genannten Lipidwerte im Plasma. Diese Ergebnisse bestätigen den atherogenen Effekt der Hypercholesterinämie und Hyperlipoproteinämie und ermöglichen eine Betrachtung der Arg-1-Defizienz unabhängig davon.

Ein weiterer Einflussfaktor der Atherosklerose ist die Einwirkung von Scherkräften auf die Gefäßwand [31]. Die Aortenklappe versteift durch zunehmende Kalzifizierung, was zu einer beschleunigten Flussgeschwindigkeit des Blutes über die Ebene der Herzklappe in die Aorta ascendens führt. In einem Zeitraum von 20 Wochen wurde

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

keine konzentrische Hypertrophie beobachtet. Es ist jedoch anzunehmen, dass diese bei einer längeren Beobachtungsdauer anhand des Herzgewichts und der sonographisch bestimmten Herzwanddicke erkennbar gewesen wäre. Die Scherkräfte und die hämodynamischen Turbulenzen, die u.a. durch die zunehmende Aortenklappensklerosierung und resultierende kleinere Klappenöffnungsfläche in apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen verursacht werden (vgl. [136]), führen zu vermehrter Lipidablagerung am Aortenbogen. Vermehrte Kalzifizierung und Plaquebildung finden sich hämodynamisch bedingt auch an Abzweigungen großer Arterien wie den Aa. carotides und Aa. renales sowie auf Ebene der Iliakalbifurkation.

Die Kalzifizierung der Intima entsteht auf dem Grund von atherosklerotischen Plaques [37]. Mit zunehmender Atherosklerose tritt vermehrt Kalzifizierung auf. Der Prozess der Kalzifizierung wird unmittelbar vom Vorhandensein von Erythrozyten in atherosklerotischen Läsionen beeinflusst. Die Anzahl der Erythrozyten und anderer Blutzellen ist dabei nicht durch das Vorhandensein der Arg-1 beeinflusst. Die Reduktion der Arg-1 hat keinen messbaren Effekt auf die Lebensdauer oder die Bildung von Erythrozyten (vgl. 4.1.4).

In Abwesenheit von Arg-1 produzieren Erythrozyten über die eNOS mehr NO durch ein erhöhtes Angebot an L-Arginin. Die NO-Produktion wird durch die Kapazität von eNOS begrenzt, nicht jedoch durch die Verfügbarkeit von L-Arginin. Eine erhöhte NO-Konzentration führt zu vermehrter Kalzifizierung und osteogener Differenzierung der glatten Muskelzellen. Eine Hemmung der NO-Signalgebung reduziert die Verfügbarkeit von NO und somit auch die kalzifizierenden Effekte, wie in vitro gezeigt wurde. Eine Hemmung der NO-Signalgebung ist bei apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen aufgrund höherer NO-Konzentrationen wirkungsvoller. Eine Zugabe von L-Arginin beeinflusst die osteogene Differenzierung glatter Muskelzellen nicht, was darauf hinweist, dass die eNOS schon gesättigt ist.

Atherosklerotische Plaques verändern unter vermehrtem Einfluss von NO ihre zelluläre Konstitution und scheinen im Vergleich weiter fortgeschritten zu sein. Die Größe der atherosklerotischen Plaques hängt nicht von der NO-Bioverfügbarkeit ab. Unter Arg-1-defizienten Bedingungen finden sich jedoch mehr Myofibroblasten und somit auch mehr interstitielles Kollagen. Diese Ergebnisse werden durch die erhöhten Konzentrationen der OAT und ODC unterstützt, welche die Kollagensynthese fördern.

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

Obwohl keine Hinweise auf größere atherosklerotische Plaqueformationen bei höheren NO-Spiegeln vorliegen, scheint ein Arginase-1 Mangel in Erythrozyten zu einer Zellproliferation zu führen. Allerdings geht diese Proliferation nicht mit einer erhöhten Dichte von Makrophagen und/oder Leukozyten einher. NO wirkt abhängig von seiner Konzentration hemmend oder fördernd auf die Zellproliferation. Niedrige NO-Konzentrationen fördern die Zellproliferation, während hohe NO-Konzentrationen diese hemmen. Der Mechanismus der Zellproliferation bei Arginase-1-Mangel scheint also NO-unabhängig zu sein. Ob die Arginase-1 ihre proliferierende Funktion über den im Blut zirkulierenden Wachstumsfaktor GM-CSF vermittelt, wie es von Vietinghoff et al. (2022) in pathologischem Nierengewebe nachgewiesen wurden, wurde hier nicht untersucht [137].

Exogenes NO unterstützt die vaskuläre Regeneration und reduziert gleichzeitig die Intimahyperplasie und Gefäßverkalkung in u.a. Mausmodellen. Dabei reguliert NO die vaskulären Stamm- und Vorläuferzellen [138].

Die reduzierte erythrozytäre Arg-1 Expression und konsekutiv erythrozytär bedingte erhöhte NO-Bioverfügbarkeit (endogenes NO) führen zu einer vermehrten Kalzifizierung. In diesen Kalzifizierungen zeigt sich der frühe osteogene Marker Runx2, ein Transkriptionsfaktor, der weiterhin die Konzentration von Osteocalcin und der Alkalischen Phosphatase - beide als Aktivatoren der Kalzifizierung bekannt - erhöht. Die ALP dephosphoryliert das OPN, welches dann nicht mehr als Inhibitor der vaskulären Kalzifizierung entgegenwirken kann [92].

Die Bedeutung des NO-Stoffwechsels für die Pathophysiologie zeigt sich bei Hemmung des intrazellulären NO-Rezeptors und der GSNOR, die NO aus der Verbindung mit Glutathion freisetzen kann. Nach der Bindung an die sGC führt NO zur Erhöhung der cGMP-Konzentration. Dadurch werden vermehrt cGMP-abhängige Proteinkinasen aktiviert, die neben dem Gefäßtonus auch die Proliferation glatter Muskelzellen beeinflussen [29]. Diese wiederum unterlaufen die osteoblastische Differenzierung und führen zur vermehrten Kalzifizierung [18].

GSNOR reguliert als wichtige Denitrosylase im Metabolismus die S-Nitrosylierung von Cysteinresten an Proteinen. Dies gilt als wichtige posttranslationale Modifikation [139]. Eine Dysregulation von GSNOR wird mit zahlreichen Krankheitszuständen in Verbindung gebracht, einschließlich kardiovaskulärer Erkrankungen [140]. In weiteren

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

Ergebnissen der oben aufgeführten Versuchsreihe konnten Gogiraju et al. eine erhöhte GSNOR Expression in apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-KO Mäusen im Vergleich zu apoE<sup>-/-</sup> RBC.Arg1-WT Mäusen feststellen. Dies führte zu einer konsekutiven Verminderung der S-Nitrosylierung der glatten Muskelzellen in vitro sowie in vivo in atherosklerotischen Läsionen. Dieser Effekt zeigte sich abhängig von der NO-Bioverfügbarkeit [141].

Das Hitzeschockprotein (HSP) 70 besitzt eine wichtige Schutzfunktion gegen Proteinfehlfaltung und Proteinabbau. Es wird in vaskulären glatten Muskelzellen durch NO-Induktion erhöht [142]. Harris et al. haben unter Hitzeeinwirkung eine erhöhte Produktion von eNOS und folglich eine erhöhte NO-Konzentration in Endothelzellen festgestellt [143]. Krepuska et al. haben gezeigt, dass HSP70 mit vaskulärer Verkalkung korreliert [144] und auch Tziakas et al. beobachteten nach der Hitzebehandlung von Erythrozyten einen osteoinduktiven Effekt [4]. Die Arbeitsgruppe von Frau Professor Schäfer konnte zeigen, dass Hitze, ausgeübt auf Erythrozyten, eine verstärkte Kalzifizierung von vaskulären glatten Muskelzellen provoziert. Diese konnte mit der denitrosylierten, also funktionslosen Form des HSP70 korreliert werden [141].

Eine Arbeitsgruppe hat 2021 gezeigt, dass ektopische Kalzifizierungen in Mäusen mit Nierenschäden unter systemischem Knockout der eNOS zunehmen. Die eNOS kommt nicht nur in den Endothelzellen, sondern auch in den Erythrozyten und glatten Muskelzellen vor. Der in dieser Studie verwendete systemische Knockout ermöglicht keine Unterscheidung der Einflüsse der eNOS verschiedener Lokalisationen, von der der Effekt in Gegenüberstellung der Studien abzuhängen scheint. Ein weiterer Grund der abweichenden Ergebnisse kann der Ort der Kalzifizierung einmal in der Niere und einmal, in dieser Arbeit gesehen, in den großen Gefäßen sein [145].

Eine andere Arbeitsgruppe hat im gleichen Jahr (2021) gezeigt, dass NO vor Kalzifizierung schützt. Der Signalweg läuft hier ebenfalls über die S-Nitrosylierung, wobei die Ubiquitin-spezifische Peptidase 9 X-linked und der nachgeschaltete NOTCH-Signalweg im Mittelpunkt stehen. Der antikalzifizierende Effekt von NO scheint dabei unabhängig von der sGC und der über cGMP aktivierten Proteinkinasen zu sein. Diese Experimente wurden an Schweinezellen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen - insbesondere im Vergleich zu hiesiger Arbeit - nahe, dass

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

unterschiedliche Zellen und die Herkunft von NO (erythrozytär vs. exogen) sowie die vielseitige S-Nitrosylierung den Prozess der vaskulären Kalzifizierung beeinflussen [146].

Es ist wichtig, den Einfluss von Arginase-1 und endothelialer NO-Synthase weiter zu untersuchen. Dabei sind S-Nitrosylierung und NO-Bioverfügbarkeit jeweils ein spannender Fokus. Es kann der Frage nachgegangen werden, inwiefern die Arg-1-Defizienz in Erythrozyten zu einer konstitutionellen Veränderung in den mit ihnen in Kontakt stehenden Endothelzellen führt. Ein weiteres Ziel sollte sein, die neu gewonnenen Erkenntnisse zu der Bedeutung von erythrozytärer Arginase-1 und erythrozytär freigesetztem NO auf die Endothelzellen zu übertragen. Diese tragen ebenfalls die Arginase und die eNOS. Es ist wichtig, die Interaktion der Endothelzellen mit den Erythrozyten zu beobachten.

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde eine neue Mauslinie untersucht, welche das Enzym Arginase-1 nicht mehr in Erythrozyten exprimiert. Durch die Reduktion kam es zu einem Mehrangebot an L-Arginin, welches über die erythrozytäre eNOS vermehrt in NO umgesetzt wurde.

Die erhöhte Bioverfügbarkeit von NO führte zu vermehrter vaskulärer Kalzifizierung. Die meisten Kalzifizierungen traten in den Aortenklappen, im Aortenbogen und an Abzweigungen großer Arterien wie den Aa. renales auf. Wir konnten zeigen, dass Erythrozyten in vaskulären Kalzifizierungen vorhanden sind und NO-abhängig treibende Effekte auf die Kalzifizierung haben. Änderungen konnten über Bindung des Gases (NO) direkt an die intrazelluläre sGC mit konsekutiver osteoblastischer Differenzierung der glatten Muskelzellen, vermehrter Kollagensynthese und Zellproliferation nachvollzogen werden. Eine Hemmung der NO-Signalgebung reduzierte die kalzifizierenden Effekte.

Im weiteren Verlauf konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass in KO-Tieren eine Erhöhung der GSNO-Reduktase vorliegt, die eine Denitrosylierung von Proteinen von glatten Muskelzellen katalysiert. Das HSP70, das durch die GSNOR denitrosyliert wird, zeigte sich als ein wichtiger Parameter der vaskulären Kalzifizierung.

Diese Ergebnisse können als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen. Sie definieren langfristig mögliche Angriffspunkte für neue Therapien bei Patienten mit Risikofaktoren für Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Hypertonie, Hypercholesterinämie und Hyperglykämie. Eine Hemmung von GSNOR oder die gezielte S-Nitrosylierung bestimmter Proteine könnte möglicherweise das Potential haben, die osteoblastische Differenzierung glatter Muskelzellen zu reduzieren oder sogar zu verhindern. Dies könnte auch die Bildung von vaskulären Kalzifizierungen auf Grundlage atherosklerotischer Plaques reduzieren.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Pasterkamp, G. and R. Virmani, *The erythrocyte: a new player in atheromatous core formation*. 2002, BMJ Publishing Group Ltd. p. 115-116.
  2. Tziakas, D.N., et al., *Independent and additive predictive value of total cholesterol content of erythrocyte membranes with regard to coronary artery disease clinical presentation*. International journal of cardiology, 2011. **150**(1): p. 22-27.
  3. Tziakas, D., et al., *Erythrocyte membrane cholesterol and lipid core growth in a rabbit model of atherosclerosis: modulatory effects of rosuvastatin*. International journal of cardiology, 2013. **170**(2): p. 173-181.
  4. Tziakas, D.N., et al., *Lysed Erythrocyte Membranes Promote Vascular Calcification*. Circulation, 2019. **139**(17): p. 2032-2048.
  5. Chennupati, R., et al., *Deletion of endothelial arginase 1 does not improve vasomotor function in diabetic mice*. Physiological Reports, 2018. **6**(11): p. e13717.
  6. Schünke, M., Schulte, Erik, Schumacher, Udo, *PROMETHEUS Innere Organe: LernAtlas Anatomie*. Vol. 4. Auflage. 2014, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
  7. Kumar, V.R., Stanley L. (Begr.); Cotran, Ramzi S. (Begr.), *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. Vol. 8. Auflage. 2010, Philadelphia: Saunders Elsevier. 1450.
  8. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
  9. Willerson, J.T. and D.J. Kereiakos, *Endothelial dysfunction*. Circulation, 2003. **108**(17): p. 2060-1.
  10. Li, L., et al., *SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis*. Circ Res, 1996. **78**(2): p. 188-95.
  11. Iyemere, V.P., et al., *Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification*. J Intern Med, 2006. **260**(3): p. 192-210.
  12. Shanahan, C.M., et al., *Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Mönckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification*. Circulation, 1999. **100**(21): p. 2168-76.
  13. Lee, S.J., I.K. Lee, and J.H. Jeon, *Vascular Calcification-New Insights Into Its Mechanism*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(8).
  14. Reinherz, E.L. and S.F. Schlossman, *The differentiation and function of human T lymphocytes*. Cell, 1980. **19**(4): p. 821-7.
  15. Falk, E., *Pathogenesis of atherosclerosis*. J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(8 Suppl): p. C7-12.
  16. Feingold, K.R., *Introduction to Lipids and Lipoproteins*, in *Endotext*, K.R. Feingold, et al., Editors. 2000, MDText.com, Inc.
- Copyright © 2000-2024, MDText.com, Inc.: South Dartmouth (MA).
17. Grundy, S.M., *Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(6): p. 2595-600.
  18. Gordon, T., et al., *High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study*. Am J Med, 1977. **62**(5): p. 707-14.

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

19. Ballard-Hernandez, J. and J. Sall, *Dyslipidemia Update*. Nurs Clin North Am, 2023. **58**(3): p. 295-308.
20. Chait, A., *Hypertriglyceridemia*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2022. **51**(3): p. 539-555.
21. Horlick, L., *Hypercholesterolemia*. Cmaj, 1989. **140**(2): p. 176.
22. Michel, J.B., [*Role of endothelial nitric oxide in the regulation of the vasomotor system*]. Pathol Biol (Paris), 1998. **46**(3): p. 181-9.
23. Broniowska, K.A., A.R. Diers, and N. Hogg, *S-nitrosoglutathione*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(5): p. 3173-81.
24. Bian, K., M.F. Doursout, and F. Murad, *Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases*. J Clin Hypertens (Greenwich), 2008. **10**(4): p. 304-10.
25. Ozaki, M., et al., *Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice*. J Clin Invest, 2002. **110**(3): p. 331-40.
26. Ghimire, K., et al., *Nitric oxide: what's new to NO?* Am J Physiol Cell Physiol, 2017. **312**(3): p. C254-c262.
27. Ridnour, L.A., et al., *Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(37): p. 13147-52.
28. Fan, J. and T. Watanabe, *Atherosclerosis: Known and unknown*. Pathol Int, 2022. **72**(3): p. 151-160.
29. Wang, Z., et al., *Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease*. Nature, 2011. **472**(7341): p. 57-63.
30. Roy, P., M. Orecchioni, and K. Ley, *How the immune system shapes atherosclerosis: roles of innate and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2022. **22**(4): p. 251-265.
31. Cunningham, K.S. and A.I. Gotlieb, *The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis*. Lab Invest, 2005. **85**(1): p. 9-23.
32. Nakashima, Y., et al., *Distributions of diffuse intimal thickening in human arteries: preferential expression in atherosclerosis-prone arteries from an early age*. Virchows Arch, 2002. **441**(3): p. 279-88.
33. Koole, D., et al., *Intraplaque neovascularization and hemorrhage: markers for cardiovascular risk stratification and therapeutic monitoring*. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2012. **13**(10): p. 635-9.
34. Renneberg, R.J., et al., *Vascular calcifications as a marker of increased cardiovascular risk: a meta-analysis*. Vasc Health Risk Manag, 2009. **5**(1): p. 185-97.
35. Iribarren, C., et al., *Calcification of the aortic arch: risk factors and association with coronary heart disease, stroke, and peripheral vascular disease*. Jama, 2000. **283**(21): p. 2810-5.
36. Abedin, M., Y. Tintut, and L.L. Demer, *Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(7): p. 1161-70.
37. Lanzer, P., et al., *Medial vascular calcification revisited: review and perspectives*. Eur Heart J, 2014. **35**(23): p. 1515-25.
38. Wu, M., C. Rementer, and C.M. Giachelli, *Vascular calcification: an update on mechanisms and challenges in treatment*. Calcif Tissue Int, 2013. **93**(4): p. 365-73.
39. Izquierdo-Gómez, M.M., et al., *Valve Calcification in Aortic Stenosis: Etiology and Diagnostic Imaging Techniques*. Biomed Res Int, 2017. **2017**: p. 5178631.

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

40. Leopold, J.A., *Vascular calcification: Mechanisms of vascular smooth muscle cell calcification*. Trends Cardiovasc Med, 2015. **25**(4): p. 267-74.
41. Cozzolino, M., et al., *The Key Role of Phosphate on Vascular Calcification*. Toxins (Basel), 2019. **11**(4).
42. Voelkl, J., et al., *Signaling pathways involved in vascular smooth muscle cell calcification during hyperphosphatemia*. Cell Mol Life Sci, 2019. **76**(11): p. 2077-2091.
43. Alesutan, I., et al., *Involvement Of Vascular Aldosterone Synthase In Phosphate-Induced Osteogenic Transformation Of Vascular Smooth Muscle Cells*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 2059.
44. Voelkl, J., et al., *Zinc Inhibits Phosphate-Induced Vascular Calcification through TNFAIP3-Mediated Suppression of NF- $\kappa$ B*. J Am Soc Nephrol, 2018. **29**(6): p. 1636-1648.
45. Chavkin, N.W., et al., *Phosphate uptake-independent signaling functions of the type III sodium-dependent phosphate transporter, PiT-1, in vascular smooth muscle cells*. Exp Cell Res, 2015. **333**(1): p. 39-48.
46. Silaghi, C.N., et al., *Calciprotein Particles and Serum Calcification Propensity: Hallmarks of Vascular Calcifications in Patients with Chronic Kidney Disease*. J Clin Med, 2020. **9**(5).
47. Kapustin, A.N., et al., *Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion*. Circ Res, 2015. **116**(8): p. 1312-23.
48. Blaser, M.C. and E. Aikawa, *Roles and Regulation of Extracellular Vesicles in Cardiovascular Mineral Metabolism*. Front Cardiovasc Med, 2018. **5**: p. 187.
49. Nishimura, R., et al., *Osterix regulates calcification and degradation of chondrogenic matrices through matrix metalloproteinase 13 (MMP13) expression in association with transcription factor Runx2 during endochondral ossification*. J Biol Chem, 2012. **287**(40): p. 33179-90.
50. Bakhshian Nik, A., J.D. Hutcheson, and E. Aikawa, *Extracellular Vesicles As Mediators of Cardiovascular Calcification*. Front Cardiovasc Med, 2017. **4**: p. 78.
51. Proudfoot, D., et al., *Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies*. Circ Res, 2000. **87**(11): p. 1055-62.
52. Fiorentino, T.V., et al., *Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases*. Curr Pharm Des, 2013. **19**(32): p. 5695-703.
53. Zhu, Y., et al., *Lactate accelerates calcification in VSMCs through suppression of BNIP3-mediated mitophagy*. Cell Signal, 2019. **58**: p. 53-64.
54. Chen, N.X., et al., *Activation of arterial matrix metalloproteinases leads to vascular calcification in chronic kidney disease*. Am J Nephrol, 2011. **34**(3): p. 211-9.
55. Pai, A., et al., *Elastin degradation and vascular smooth muscle cell phenotype change precede cell loss and arterial medial calcification in a uremic mouse model of chronic kidney disease*. Am J Pathol, 2011. **178**(2): p. 764-73.
56. Durante, W., et al., *Transforming growth factor-beta(1) stimulates L-arginine transport and metabolism in vascular smooth muscle cells: role in polyamine and collagen synthesis*. Circulation, 2001. **103**(8): p. 1121-7.
57. Li, X., et al., *COL1A1: A novel oncogenic gene and therapeutic target in malignancies*. Pathol Res Pract, 2022. **236**: p. 154013.

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

58. Chen, C., et al., *Identification of potential biomarkers of vascular calcification using bioinformatics analysis and validation in vivo*. PeerJ, 2022. **10**: p. e13138.
59. Ceneri, N., et al., *Rac2 Modulates Atherosclerotic Calcification by Regulating Macrophage Interleukin-1 $\beta$  Production*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017. **37**(2): p. 328-340.
60. Kurozumi, A., et al., *IL-6 and sIL-6R induces STAT3-dependent differentiation of human VSMCs into osteoblast-like cells through JMJD2B-mediated histone demethylation of RUNX2*. Bone, 2019. **124**: p. 53-61.
61. Grootaert, M.O., et al., *Defective autophagy in vascular smooth muscle cells accelerates senescence and promotes neointima formation and atherogenesis*. Autophagy, 2015. **11**(11): p. 2014-2032.
62. Vion, A.C., et al., *Autophagy is required for endothelial cell alignment and atheroprotection under physiological blood flow*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(41): p. E8675-e8684.
63. Liberman, M., et al., *Bone morphogenetic protein-2 activates NADPH oxidase to increase endoplasmic reticulum stress and human coronary artery smooth muscle cell calcification*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **413**(3): p. 436-41.
64. Singh, R. and A.M. Cuervo, *Autophagy in the cellular energetic balance*. Cell Metab, 2011. **13**(5): p. 495-504.
65. Shanahan, C.M., *Autophagy and matrix vesicles: new partners in vascular calcification*. Kidney Int, 2013. **83**(6): p. 984-6.
66. Braakman, I. and D.N. Hebert, *Protein folding in the endoplasmic reticulum*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(5): p. a013201.
67. Peters, A.S., et al., *Epidemiology of Valvular Heart Disease*. Surg Clin North Am, 2022. **102**(3): p. 517-528.
68. Mohler, E.R., et al., *Development and progression of aortic valve stenosis: atherosclerosis risk factors--a causal relationship? A clinical morphologic study*. Clin Cardiol, 1991. **14**(12): p. 995-9.
69. Zeng, Y.I., et al., *Pathophysiology of valvular heart disease*. Exp Ther Med, 2016. **11**(4): p. 1184-1188.
70. Zheng, K.H., et al., *Lipoprotein(a) and Oxidized Phospholipids Promote Valve Calcification in Patients With Aortic Stenosis*. J Am Coll Cardiol, 2019. **73**(17): p. 2150-2162.
71. Stacey, D.W., *Cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(2): p. 158-63.
72. Lee, J., et al., *Glucagon-Like Peptide Receptor Agonist Inhibits Angiotensin II-Induced Proliferation and Migration in Vascular Smooth Muscle Cells and Ameliorates Phosphate-Induced Vascular Smooth Muscle Cells Calcification*. Diabetes Metab J, 2024. **48**(1): p. 83-96.
73. Roumeliotis, S., et al., *Biomarkers of vascular calcification in serum*. Adv Clin Chem, 2020. **98**: p. 91-147.
74. Wei, X., et al., *Bone Morphogenetic Proteins 2/4 Are Upregulated during the Early Development of Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease*. Biomed Res Int, 2018. **2018**: p. 8371604.
75. Li, X., H.Y. Yang, and C.M. Giachelli, *BMP-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells*. Atherosclerosis, 2008. **199**(2): p. 271-7.

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

76. Zhou, N., et al., *BMP2 induces chondrogenic differentiation, osteogenic differentiation and endochondral ossification in stem cells*. Cell Tissue Res, 2016. **366**(1): p. 101-11.
77. Hruska, K.A., S. Mathew, and G. Saab, *Bone morphogenetic proteins in vascular calcification*. Circ Res, 2005. **97**(2): p. 105-14.
78. Phimphilai, M., et al., *BMP signaling is required for RUNX2-dependent induction of the osteoblast phenotype*. J Bone Miner Res, 2006. **21**(4): p. 637-46.
79. Agharazii, M., et al., *Inflammatory Cytokines and Reactive Oxygen Species as Mediators of Chronic Kidney Disease-Related Vascular Calcification*. American Journal of Hypertension, 2014. **28**(6): p. 746-755.
80. Bardeesi, A.S.A., et al., *A novel role of cellular interactions in vascular calcification*. J Transl Med, 2017. **15**(1): p. 95.
81. Azpiazu, D., S. Gonzalo, and R. Villa-Bellosta, *Tissue Non-Specific Alkaline Phosphatase and Vascular Calcification: A Potential Therapeutic Target*. Curr Cardiol Rev, 2019. **15**(2): p. 91-95.
82. Lin, M.E., et al., *Runx2 Expression in Smooth Muscle Cells Is Required for Arterial Medial Calcification in Mice*. Am J Pathol, 2015. **185**(7): p. 1958-69.
83. Teplyuk, N.M., et al., *The osteogenic transcription factor Runx2 regulates components of the fibroblast growth factor/proteoglycan signaling axis in osteoblasts*. J Cell Biochem, 2009. **107**(1): p. 144-54.
84. 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, 2003. **23**(3): p. 489-94.
85. Boyce, B.F. and L. Xing, *Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin*. Arthritis Res Ther, 2007. **9 Suppl 1**(Suppl 1): p. S1.
86. Bucay, N., et al., *osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification*. Genes Dev, 1998. **12**(9): p. 1260-8.
87. Van Campenhout, A. and J. Golledge, *Osteoprotegerin, vascular calcification and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2009. **204**(2): p. 321-9.
88. Tousoulis, D., et al., *Serum osteoprotegerin and osteopontin levels are associated with arterial stiffness and the presence and severity of coronary artery disease*. Int J Cardiol, 2013. **167**(5): p. 1924-8.
89. Pérez de Ciriza, C., et al., *Circulating osteoprotegerin is increased in the metabolic syndrome and associates with subclinical atherosclerosis and coronary arterial calcification*. Clin Biochem, 2014. **47**(18): p. 272-8.
90. Scatena, M., L. Liaw, and C.M. Giachelli, *Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(11): p. 2302-9.
91. Jono, S., C. Peinado, and C.M. Giachelli, *Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification*. J Biol Chem, 2000. **275**(26): p. 20197-203.
92. Giachelli, C.M., et al., *Osteopontin expression in cardiovascular diseases*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1995. **760**: p. 109-126.
93. Liu, H., et al., *Downregulation of miR-542-3p promotes osteogenic transition of vascular smooth muscle cells in the aging rat by targeting BMP7*. Hum Genomics, 2019. **13**(1): p. 67.
94. Lund, R.J., et al., *Successful treatment of an adynamic bone disorder with bone morphogenetic protein-7 in a renal ablation model*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(2): p. 359-69.

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

95. Davies, M.R., R.J. Lund, and K.A. Hruska, *BMP-7 is an efficacious treatment of vascular calcification in a murine model of atherosclerosis and chronic renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(6): p. 1559-67.
96. Gravesen, E., et al., *Exogenous BMP7 in aortae of rats with chronic uremia ameliorates expression of profibrotic genes, but does not reverse established vascular calcification*. PLoS One, 2018. **13**(1): p. e0190820.
97. Kelly, R.P., R. Tunin, and D.A. Kass, *Effect of reduced aortic compliance on cardiac efficiency and contractile function of in situ canine left ventricle*. Circ Res, 1992. **71**(3): p. 490-502.
98. Ohtsuka, S., et al., *Chronically decreased aortic distensibility causes deterioration of coronary perfusion during increased left ventricular contraction*. J Am Coll Cardiol, 1994. **24**(5): p. 1406-14.
99. Watanabe, H., et al., *Decreased aortic compliance aggravates subendocardial ischaemia in dogs with stenosed coronary artery*. Cardiovasc Res, 1992. **26**(12): p. 1212-8.
100. Peeters, F., et al., *Calcific aortic valve stenosis: hard disease in the heart: A biomolecular approach towards diagnosis and treatment*. Eur Heart J, 2018. **39**(28): p. 2618-2624.
101. Kuhn, V., et al., *Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia*. Antioxid Redox Signal, 2017. **26**(13): p. 718-742.
102. Yang, J., et al., *Red Blood Cells in Type 2 Diabetes Impair Cardiac Post-Ischemic Recovery Through an Arginase-Dependent Modulation of Nitric Oxide Synthase and Reactive Oxygen Species*. JACC Basic Transl Sci, 2018. **3**(4): p. 450-463.
103. Zhou, Z., et al., *Erythrocytes From Patients With Type 2 Diabetes Induce Endothelial Dysfunction Via Arginase I*. J Am Coll Cardiol, 2018. **72**(7): p. 769-780.
104. Wennmalm, A., G. Benthin, and A.S. Petersson, *Dependence of the metabolism of nitric oxide (NO) in healthy human whole blood on the oxygenation of its red cell haemoglobin*. Br J Pharmacol, 1992. **106**(3): p. 507-8.
105. Owusu, B.Y., R. Stapley, and R.P. Patel, *Nitric oxide formation versus scavenging: the red blood cell balancing act*. J Physiol, 2012. **590**(20): p. 4993-5000.
106. Kleinbongard, P., et al., *Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase*. Blood, 2006. **107**(7): p. 2943-51.
107. Yang, J., et al., *Arginase regulates red blood cell nitric oxide synthase and export of cardioprotective nitric oxide bioactivity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(37): p. 15049-54.
108. Pernow, J. and C. Jung, *Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal?* Cardiovasc Res, 2013. **98**(3): p. 334-43.
109. Pawloski, J.R., D.T. Hess, and J.S. Stamler, *Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity*. Nature, 2001. **409**(6820): p. 622-6.
110. Doctor, A. and J.S. Stamler, *Nitric oxide transport in blood: a third gas in the respiratory cycle*. Compr Physiol, 2011. **1**(1): p. 541-68.
111. Crawford, J.H., et al., *Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation*. Blood, 2006. **107**(2): p. 566-74.

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

112. Cortese-Krott, M.M., et al., *Identification of a soluble guanylate cyclase in RBCs: preserved activity in patients with coronary artery disease*. Redox Biol, 2018. **14**: p. 328-337.
113. Eigenthaler, M., et al., *Signal transduction by cGMP-dependent protein kinases and their emerging roles in the regulation of cell adhesion and gene expression*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 1999. **135**: p. 173-209.
114. Lohman, A.W., M. Billaud, and B.E. Isakson, *Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall*. Cardiovasc Res, 2012. **95**(3): p. 269-80.
115. Sridharan, M., et al., *Pannexin 1 is the conduit for low oxygen tension-induced ATP release from human erythrocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(4): p. H1146-52.
116. Ellsworth, M.L., C.G. Ellis, and R.S. Sprague, *Role of erythrocyte-released ATP in the regulation of microvascular oxygen supply in skeletal muscle*. Acta Physiol (Oxf), 2016. **216**(3): p. 265-76.
117. Zhou, Z., et al., *Uridine adenosine tetraphosphate and purinergic signaling in cardiovascular system: An update*. Pharmacol Res, 2019. **141**: p. 32-45.
118. Wautier, J.L., et al., *Increased adhesion of erythrocytes to endothelial cells in diabetes mellitus and its relation to vascular complications*. N Engl J Med, 1981. **305**(5): p. 237-42.
119. Wautier, J.L., et al., *Erythrocyte adhesion to cultured endothelium and glycaemic control in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients*. Diabetologia, 1986. **29**(3): p. 151-5.
120. Romero, M.J., et al., *Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity*. Circ Res, 2008. **102**(1): p. 95-102.
121. Stuehr, D., S. Pou, and G.M. Rosen, *Oxygen reduction by nitric-oxide synthases*. J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 14533-6.
122. Daiber, A., et al., *New Therapeutic Implications of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Function/Dysfunction in Cardiovascular Disease*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(1).
123. Kövamees, O., et al., *Arginase Inhibition Improves Microvascular Endothelial Function in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 2016. **101**(11): p. 3952-3958.
124. Shemyakin, A., et al., *Arginase inhibition improves endothelial function in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus*. Circulation, 2012. **126**(25): p. 2943-50.
125. Nakashima, Y., et al., *ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree*. Arterioscler Thromb, 1994. **14**(1): p. 133-40.
126. Ren, B., et al., *Hematopoietic arginase 1 deficiency results in decreased leukocytosis and increased foam cell formation but does not affect atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2017. **256**: p. 35-46.
127. Chakraborty, P., et al., *Failure in the compensatory mechanism in red blood cells due to sustained smoking during pregnancy*. Chemico-Biological Interactions, 2019. **313**: p. 108821.
128. Zhou, Z., et al., *Erythrocytes from patients with type 2 diabetes induce endothelial dysfunction via arginase I*. Journal of the American College of Cardiology, 2018. **72**(7): p. 769-780.
129. Johnson, F.K., et al., *Arginase inhibition restores arteriolar endothelial function in Dahl rats with salt-induced hypertension*. American Journal of Physiology-

**Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.**

---

- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2005. **288**(4): p. R1057-R1062.
130. Ryoo, S., et al., *Endothelial arginase II: a novel target for the treatment of atherosclerosis*. Circulation research, 2008. **102**(8): p. 923-932.
  131. Eligini, S., et al., *Nitric oxide synthetic pathway in red blood cells is impaired in coronary artery disease*. PloS one, 2013. **8**(8): p. e66945.
  132. Kovamees, O., et al., *Arginase inhibition improves endothelial function in patients with familial hypercholesterolaemia irrespective of their cholesterol levels*. Journal of internal Medicine, 2016. **279**(5): p. 477-484.
  133. Mahdi, A., et al., *Arginase inhibition improves endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus despite intensive glucose-lowering therapy*. Journal of Internal Medicine, 2018. **284**(4): p. 388-398.
  134. Imaizumi, K., *Diet and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Biosci Biotechnol Biochem, 2011. **75**(6): p. 1023-35.
  135. Stein, C., *Klinische Labordiagnostik und Pharmakokinetik humanisierter therapeutischer Antikörper in human FcRn transgenen Mäusen*. 2011, Imu.
  136. Grimard, B.H., R.E. Safford, and E.L. Burns, *Aortic Stenosis: Diagnosis and Treatment*. Am Fam Physician, 2016. **93**(5): p. 371-8.
  137. von Vietinghoff, S. and R. Schmitt, *More than a Marker: Arginase-1 in Kidney Repair*. J Am Soc Nephrol, 2022. **33**(6): p. 1051-1053.
  138. Wang, F., et al., *Nitric oxide improves regeneration and prevents calcification in bio-hybrid vascular grafts via regulation of vascular stem/progenitor cells*. Cell Rep, 2022. **39**(12): p. 110981.
  139. Thomas, D.D. and D. Jourdain, *S-nitrosation: current concepts and new developments*. Antioxid Redox Signal, 2012. **17**(7): p. 934-6.
  140. Barnett, S.D. and I.L. Buxton, *The role of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in human disease and therapy*. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 2017. **52**(3): p. 340-354.
  141. Gogiraju, R., et al., *Arginase-1 Deletion in Erythrocytes Promotes Vascular Calcification via Enhanced GSNOR (S-Nitrosoglutathione Reductase) Expression and NO Signaling in Smooth Muscle Cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2022. **42**(12): p. e291-e310.
  142. Xu, Q., et al., *Nitric oxide induces heat-shock protein 70 expression in vascular smooth muscle cells via activation of heat shock factor 1*. The Journal of clinical investigation, 1997. **100**(5): p. 1089-1097.
  143. Harris, M.B., et al., *Heat-induced increases in endothelial NO synthase expression and activity and endothelial NO release*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2003. **285**(1): p. H333-H340.
  144. Krepuska, M., et al., *Serum level of soluble Hsp70 is associated with vascular calcification*. Cell stress and chaperones, 2011. **16**: p. 257-265.
  145. Oe, Y., et al., *Lack of Endothelial Nitric Oxide Synthase Accelerates Ectopic Calcification in Uremic Mice Fed an Adenine and High Phosphorus Diet*. Am J Pathol, 2021. **191**(2): p. 283-293.
  146. Majumdar, U., et al., *Nitric oxide prevents aortic valve calcification by S-nitrosylation of USP9X to activate NOTCH signaling*. Sci Adv, 2021. **7**(6).

## DANKSAGUNG

Ich möchte meinen Dank allen aussprechen, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin, Univ.-Prof. Katrin Schäfer, deren Unterstützung und Anleitung für mich von hohem Wert waren. Ein weiterer ausdrücklicher Dank gilt Dr. Rajinikanth Gogiraju, PostDoc der Arbeitsgruppe, dessen Wissen und Erfahrung meine Arbeit stark geprägt haben.

Mein Dank gilt darüber hinaus den Kolleginnen und Kollegen im Labor für Translationale Vaskuläre Biologie und Dr. Michael Molitor, deren Zusammenarbeit und Freundschaft das Forschungsumfeld bereichert haben. Ein Dankeschön geht an Marina Thielen für die technische Unterstützung und die vielen Stunden der Hilfe im Labor.

Nicht zuletzt danke ich dem Deutschen Zentrum für Herz- und Kreislaufforschung für die finanzielle und ideelle Förderung im Rahmen meines Promotionsstipendiums.

Ich bin auch meinem Partner, meiner Familie und meinen Freunden unendlich dankbar für ihre Liebe, Motivation und ständige Unterstützung.

# Luisa Vivienne Renner

Name Luisa Vivienne Renner  
geb. 12.12.1998 Heilbronn Neckargartach

## Ausbildung

---

Seit Juli 2024 Assistenzärztin in der Klinik für Urologie und Urochirurgie an der Universitätsmedizin Mannheim

2019-2024 Experimentelle Doktorarbeit „Die Bedeutung der Arginase-1 in Erythrozyten für die vaskuläre Kalzifizierung in der Maus“  
Universitätsmedizin Mainz  
Labor für translationale vaskuläre Biologie, AG Schäfer

2016-2023 Humanmedizinstudiums an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
1. Staatsexamen 2018, 2. Staatsexamen 2022, 3. Staatsexamen 2023

2008-2016 Ganerben Gymnasium Künzelsau  
Abschluss: Abitur 2016

2004-2008 Bildungszentrum Niedernhall  
Grundschule

## Publikationen

---

2022; Gogiraju R., *Renner L.* et al.; Arginase-1 Deletion in Erythrocytes Promotes Vascular Calcification via Enhanced GSNOR (S-Nitrosoglutathione Reductase) Expression and NO Signaling in Smooth Muscle Cells; Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology

## Stipendien

---

21.09.2022 - 25.09.2022 Stipendium "die Besten der Urologie"  
Reisestipendium der Deutschen Gesellschaft für Urologie für den 74. DGU-Kongress

01.03.2019 - 29.02.2020 Promotionsstipendium der Young-DZHK (Deutsches Zentrum für Herz- und Kreislaufforschung)

Januar 2017 - heute	<p>Studienstiftung des deutschen Volkes</p> <p>Sommer 2018: Sprecherin der Hochschulgruppe Mainz/Wiesbaden mit Wiederwahl im Sommer 2019</p> <p>2017-2020: Botschafterin</p> <p>Organisation von Akademien und weiteren Veranstaltungen im Rahmen des SmP Programms</p> <p>Teilnahme am SmP Programm</p>
18.07-24.07.2015	<p>Stipendium des Deutschen Zentrums für Luft- und Raumfahrt</p> <p>2-wöchige internationale Woche im Space and Rocket Center in Huntsville, Alabama, USA</p>

## Praxiserfahrung

---

16.05.2022-16.04.2023	<p>Praktisches Jahr</p> <p><u>1. Terial</u>: Chirurgie an den Helios Dr. Horst Schmidt Kliniken Wiesbaden</p> <p><u>2. Terial</u>: Urologie an der Universitätsklinik Mannheim</p> <p><u>3. Terial</u>: Innere Medizin an den Helios Dr. Horst Schmidt Kliniken Wiesbaden</p>
01.08.2022-21.08.2022	<p>Praktikum Adelaide, South Australia, Australien</p> <p>Traumatologie</p> <p>Royal Adelaide Hospital</p>
02.10.2021-31.10.2021	<p>4. Famulatur</p> <p>Gynäkologie</p> <p>Marienhaus Mainz</p>
22.02.2021-23.03.2021	<p>3. Famulatur</p> <p>Urologie</p> <p>Gemeinschaftspraxis Künzelsau</p>
28.08.2020-26.09.2020	<p>2. Famulatur</p> <p>Urologie</p> <p>Marienkrankenhaus Hamburg</p>
11.09.2019-11.10.2019	<p>1. Famulatur</p> <p>pädiatrische Allgemeinmedizin Praxis Dr. Theobald und Koffler mit Spezialisierung auf pädiatrische Endokrinologie und pädiatrische Pneumologie</p>
2016-2017	<p>3 4-wöchige Pflegepraktika</p> <p>Hohenloher Krankenhaus Innere Medizin</p>

## Kenntnisse & Fähigkeiten

---

Fremdsprachen            Englisch: sehr gut in Wort und Schrift  
                                  Spanisch: gut in Wort und Schrift  
                                  Arabisch: A1+

## Sonstiges

---

Soziales Engagement    Mitglied im Rotaract Club Mainz  
                                  Präsidentin im Clubjahr 2022/2023  
                                  Sozialbeauftragte im Clubjahr 2021/2022

Lizenzen                    Fitness-Trainer-B-Lizenz  
                                  Segel- und Motorboot Führerschein Binnen  
                                  Katamaran Schein

Trainerin                    Kampfsport (Shotokan Karate, Point Fighting, Boxen)