

Experimentelle Studien zur Bedeutung von Vitamin D für das vaskuläre System

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Ernährungswissenschaften (Dr. troph.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät III
Agrar- und Ernährungswissenschaften,
Geowissenschaften und Informatik



der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Diplom-Ernährungswissenschaftlerin Nadine Schmidt

geboren am 31.05.1985 in Sangerhausen

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. G. I. Stangl
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. G. Rimbach

Verteidigungstermin: 18.07.2014

*"It would appear that even when the skies are grey,
sunshine does more than makes us happy."*

Christopher Torrens

Clinical and Experimental Cardiovascular Sciences, Unit of
Human Development and Health, Faculty of Medicine,
University of Southampton

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	10
2.1 Einfluss eines genetischen Vitamin D-Rezeptor-Mangels auf das vaskuläre System (Versuch 1)	10
2.1.1 Versuchsaufbau: Versuchstiere und Diäten	10
2.1.2 Probenahme	12
2.1.3 Analytik.....	12
2.1.4 Statistik.....	13
2.2 Einfluss eines alimentären Vitamin D-Mangels auf die Atherosklerose bei LDL-Rezeptor- <i>knockout</i> -Mäusen (Versuch 2)	13
2.2.1 Versuchsaufbau: Versuchstiere und Diäten	13
2.2.2 Probenahme	15
2.2.3 Analytik.....	16
2.2.4 Statistik.....	16
2.3 Einfluss eines alimentären Vitamin D-Mangels bei LDL-Rezeptor- <i>knockout</i> - und Wildtyp-Mäusen (Versuch 3)	16
2.3.1 Versuchsaufbau: Versuchstiere und Diäten	16
2.3.2 Probenahme	18
2.3.3 Analytik.....	18
2.3.4 Statistik.....	19
2.4 Analysemethoden	19
2.4.1 Bestimmung der Vitamin D-Metabolite im Plasma	19
2.4.2 Bestimmung der Konzentrationen von Calcium, Gesamtphosphor und anorganischem Phosphat im Plasma und im Femur	20
2.4.3 Bestimmung der Triglyzerid- und Cholesterinkonzentration im Plasma.....	21
2.4.4 Analyse der Plaqueszusammensetzung und Veränderungen im Bereich der Herzklappe	22
2.4.4.1 Präparation des Probematerials	22
2.4.4.2 Histologische Untersuchungen der Aortenwurzel und verschiedener Gefäße	25
2.4.4.3 Immunhistochemische Untersuchungen der Aortenwurzel und der Aorta.....	26

2.4.4.4	Immunhistochemische Untersuchung zur Osteoblastendifferenzierung im Knochen	27
2.4.4.5	Immunfluoreszenzanalysen der Aortenwurzel.....	27
2.4.5	Bestimmung der relativen mRNA-Konzentration des Vitamin D-abhängigen Calbindin D _{9k}	28
3	Ergebnisse	30
3.1	Einfluss eines genetischen Vitamin D-Rezeptor-Mangels auf das vaskuläre System (Versuch 1)	30
3.1.1	Futteraufnahme und Körpermasse	30
3.1.2	Histologische Quantifizierung vaskulärer Veränderungen in der Aortenwurzel.....	30
3.1.3	Immunhistochemische Analyse zur Expression von Osteoblastendifferenzierungsfaktoren in der Aortenwurzel	32
3.1.4	Konzentrationen an Calcium, Gesamtphosphor und anorganischem Phosphat im Plasma.....	33
3.2	Einfluss eines alimentären Vitamin D-Mangels auf die Atherosklerose bei LDL-Rezeptor- <i>knockout</i> -Mäusen (Versuch 2).....	33
3.2.1	Futteraufnahme und Körpermasse	33
3.2.2	Konzentration der Vitamin D-Metabolite im Plasma	34
3.2.3	Histologische Quantifizierung atherosklerotischer Veränderungen in der Aortenwurzel.....	35
3.2.4	Immunhistochemische Analyse der Plaquezusammensetzung und der Expression von Osteoblastendifferenzierungsfaktoren in der Aortenwurzel.....	36
3.2.5	Lipid- und Mineralstoffgehalte in Plasma und Knochen.....	38
3.2.6	Relative mRNA-Konzentration des Vitamin D-abhängigen Calbindin D _{9k}	39
3.3	Einfluss eines alimentären Vitamin D-Mangels bei LDL-Rezeptor- <i>knockout</i> - und Wildtyp-Mäusen (Versuch 3).....	40
3.3.1	Futteraufnahme und Körpermasse	40
3.3.2	Konzentration der Vitamin D-Metabolite im Plasma	41
3.3.3	Histologische Quantifizierung der Kalzifizierung der Aortenwurzel.....	43
3.3.4	Histologische Quantifizierung der Kalzifizierung weiterer Herzklappen	45
3.3.5	Immunhistochemische Analyse der Osteoblastendifferenzierungsfaktoren im Bereich der Aortenwurzel.....	46
3.3.6	Histologische und immunhistochemische Quantifizierung der Plaquezusammensetzung.....	47
3.3.7	Immunhistochemische Analyse der Bmp-2-Expression in den Femura der Mäuse	50
3.3.8	Immunfluoreszenzanalysen zu Expression von glatten Muskelzellen und alkalischer Phosphatase in der Aortenwurzel.....	51
3.3.9	Histologische Quantifizierung der Gefäße.....	53

3.3.9.1	Nachweis der Kalzifizierung in der Aorta.....	53
3.3.9.2	Nachweis der Kalzifizierung in der Arteria brachiocephalica	55
3.3.9.3	Nachweis der Kalzifizierung in der Arteria femoralis	57
3.3.10	Immunhistochemischer Nachweis der Expression von Osteoblastendifferenzierungsfaktoren in der Aorta	58
3.3.11	Konzentrationen an Calcium und anorganischem Phosphat im Plasma.....	59
4	Diskussion	61
4.1	Tiermodelle.....	61
4.1.1	Die VDR- <i>knockout</i> -Mäuse	61
4.1.2	Die LDL-Rezeptor- <i>knockout</i> -Mäuse.....	63
4.1.3	Die Wildtyp-Mäuse.....	64
4.2	Vitamin D Status.....	65
4.3	Wirkungen von Vitamin D auf das vaskuläre System	67
4.3.1	Experimentell nachgewiesene, Vitamin D-abhängige Gefäßver- änderungen	67
4.3.2	Verlauf der Atherosklerose und der vaskulären Kalzifizierung – allgemeiner Überblick	68
4.3.3	Einfluss von Vitamin D auf die vaskuläre Kalzifizierung	74
4.3.3.1	Mechanismen der vaskulären Kalzifizierung.....	79
4.3.3.2	Osteogene Differenzierung im vaskulären System	81
4.3.3.3	Inflammatorische Prozesse bei vaskulären pathologischen Veränderungen.....	85
4.3.3.4	Einfluss von Vitamin D auf die Plaquezusammensetzung.....	86
4.4	Fazit	89
5	Zusammenfassung	90
	Summary	94
6	Literaturverzeichnis.....	98

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
a.d.	aqua dest.
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AIN	<i>American Institute of Nutrition</i>
ALP	Alkalische Phosphatase
ApoE	Apolipoprotein E
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca	Calcium
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CKD	<i>chronic kidney disease</i> (chronische Nierenerkrankungen)
CVC	<i>calcifying vascular cells</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dlx	<i>distal-less homeobox</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GLM	<i>General linear model</i>
HCl	Salzsäure
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HNO ₃	Salpetersäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
ICP-OES	<i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
IDL	<i>intermediate density lipoprotein</i>
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IU	<i>international units</i>
KO	<i>knockout</i>
LacZ	bakterielle β -Galaktosidase
LC-MS/MS	<i>liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LDLR	<i>low density lipoprotein receptor</i>
MARRS	<i>membrane associated rapid response steroid binding protein</i>
MCP	<i>monocyte chemoattractant/chemotactic protein</i>
MGP	Matrix Gla Protein
MMP	Matrixmetalloproteinase
Msx	<i>muscle segment homeobox</i>

NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
ND	Normale Diät
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-Cells</i>
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NRC	<i>National Research Council</i>
OPG	Osteoprotegerin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
P _i	anorganisches Phosphat
Pit	anorganischer Phosphattransporter
PTAD	4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RANKL	<i>receptor activator of NF-κB ligand</i>
RD	<i>Rescue diet</i>
realtime RT-PCR	<i>realtime reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion</i>
rpm	<i>rounds/revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Runx	<i>runt-related transcription factor</i>
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
Smad	<i>small body size-mother against decapentaplegic</i>
SMC	<i>smooth muscle cell</i> (glatte Muskelzelle)
SRM	Standardreferenzmaterial
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
2WA	<i>Two-Way ANOVA</i>
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VDDR	<i>Vitamin D-dependent Rickets</i> (Vitamin D-abhängige Rachitis)
VDRE	<i>Vitamin D response elements</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell</i>
Wo	Wochen
WT	Wildtyp

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammensetzung der Diät aus Versuch 1.	11
Tabelle 2:	Vitaminmischung aus Versuch 1.	11
Tabelle 3:	Mineralstoffmischung aus Versuch 1.	12
Tabelle 4:	Zusammensetzung der Diät aus Versuch 2 und 3.	14
Tabelle 5:	Vitaminmischung aus Versuch 2 und 3.	14
Tabelle 6:	Mineralmischung aus Versuch 2 und 3.	15
Tabelle 7:	Vitamin D-Gehalt der Diäten und dazugehörige Gruppeneinteilung der Tiere aus Versuch 2.	15
Tabelle 8:	Übersicht über die Aortenschnitte aus Versuch 1 für die histologischen und immunhistochemischen Analysen.	24
Tabelle 9:	Übersicht über die Aortenschnitte aus Versuch 2 für die histologischen und immunhistochemischen Analysen.	24
Tabelle 10:	Übersicht über die Aortenschnitte aus Versuch 3 für die histologischen und immunhistochemischen Analysen.	24
Tabelle 11:	Übersicht über verwendete primäre Antikörper für immunhistochemische Analysen.	26
Tabelle 12:	Übersicht über verwendete sekundäre Antikörper für immunhistochemische Analysen.	27
Tabelle 13:	Körpergewichte und Futteraufnahme von $VDR^{-/-}$ und WT-Mäusen bei Fütterung einer <i>Rescue diet</i> (calcium- und phosphatreich; $VDR^{-/-}$, WT_{RD}) oder normalen Diät (normale Calcium- und Phosphatkonzentration, WT_{ND}) in einem 8-wöchigen Versuch.	30
Tabelle 14:	Körpergewichte und Futteraufnahme von $LDLR^{-/-}$ Mäusen, die über 16 Wochen mit einer <i>Western diet</i> gefüttert wurden, die unterschiedliche Konzentrationen an Vitamin D_3 enthielt.	34
Tabelle 15:	Relative Fläche an atherosklerotischen Plaques sowie dessen Kollagen- und Lipidanteil in den Gefrierschnitten im Bereich der Aortenwurzel von $LDLR^{-/-}$ Mäusen, die über 16 Wochen mit einer <i>Western diet</i> gefüttert wurden, die unterschiedliche Konzentrationen an Vitamin D_3 enthielt.	35
Tabelle 16:	Konzentrationen an Lipiden und Mineralstoffen von $LDLR^{-/-}$ Mäusen, die über 16 Wochen mit einer <i>Western diet</i> gefüttert wurden, die unterschiedliche Konzentrationen an Vitamin D_3 enthielt.	39
Tabelle 17:	Leistungsparameter von WT- und $LDLR^{-/-}$ Mäusen, die für 16 (A) bzw. 32 Wochen (B) mit einer <i>Western diet</i> mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.	40
Tabelle 18:	Histomorphometrische Klassifikation atherosklerotischer Läsionen nach H.C. Stary.	73
Tabelle 19:	Induktoren vaskulärer Kalzifizierung und deren Bedeutung.	79
Tabelle 20:	Inhibitoren vaskulärer Kalzifizierung und deren Bedeutung.	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Genomische und nicht-genomische Wirkungen von Vitamin D.	3
Abbildung 2:	Einfluss von Vitamin D auf verschiedene physiologische Systeme, deren 1,25(OH) ₂ D-induzierte biologische Antworten sowie Vitamin D-Mangel-assoziierte Erkrankungen in den jeweiligen Systemen.	4
Abbildung 3:	Studiendesign von Versuch 3.	17
Abbildung 4:	Nachweis vermehrter Kalzifizierung im Bereich der Aortenwurzel bei VDR ^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen nach 8-wöchiger Fütterung einer <i>Rescue diet</i> (RD) oder normalen Diät (ND).	31
Abbildung 5:	Nachweis einer vermehrten Expression von Osteoblastendifferenzierungsfaktoren im Bereich der Aortenwurzel bei VDR ^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen nach 8-wöchiger Fütterung einer <i>Rescue diet</i> (RD) oder normalen Diät (ND).	32
Abbildung 6:	Bestimmung des Vitamin D Status von LDLR ^{-/-} Mäusen in Abhängigkeit von der Vitamin D-Versorgung über die Diät.	34
Abbildung 7:	Nachweis einer vermehrten Kalzifizierung bei LDLR ^{-/-} Mäusen mit unzureichender Vitamin D-Versorgung über die Diät.	36
Abbildung 8:	Immunhistochemischer Nachweis von glatten Muskelzellen und Makrophagen bei LDLR ^{-/-} Mäusen mit unterschiedlicher Vitamin D-Versorgung über die Diät.	37
Abbildung 9:	Immunhistochemischer Nachweis einer vermehrten Expression von Osteoblastendifferenzierungsfaktoren bei LDLR ^{-/-} Mäusen mit unzureichender Vitamin D-Versorgung über die Diät.	38
Abbildung 10:	Relative mRNA-Konzentration von Calbindin D _{9k} von LDLR ^{-/-} Mäusen, die über 16 Wochen mit einer <i>Western diet</i> gefüttert wurden, die unterschiedliche Konzentrationen an Vitamin D ₃ enthielt.	39
Abbildung 11:	Bestimmung des Vitamin D Status von WT- und LDLR ^{-/-} Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer <i>Western diet</i> mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.	42
Abbildung 12:	Einfluss von Vitamin D auf die Kalzifizierung der Aortenklappe bei Wildtyp (WT)- und LDLR ^{-/-} Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer <i>Western diet</i> mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.	44
Abbildung 13:	Einfluss von Vitamin D auf die Kalzifizierung von Mitral- und Trikuspidal-klappe bei Wildtyp (WT)- und LDLR ^{-/-} Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer <i>Western diet</i> mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.	45
Abbildung 14:	Einfluss von Vitamin D auf die Expression von Osteoblastendifferenzierungsfaktoren bei Wildtyp (WT)- und LDLR ^{-/-} Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer <i>Western diet</i> mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.	47

Abbildung 15:	Einfluss von Vitamin D auf die Größe und Zusammensetzung der Plaques bei LDLR ^{-/-} Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer <i>Western diet</i> mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.	48
Abbildung 16:	Einfluss von Vitamin D auf Zusammensetzung der Plaques bei LDLR ^{-/-} Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer <i>Western diet</i> mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.	49
Abbildung 17:	Immunhistochemischer Nachweis von Bmp-2 in den Femura von LDLR ^{-/-} Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer <i>Western diet</i> mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.	50
Abbildung 18:	Einfluss von Vitamin D auf die Expression von glatten Muskelzellen (SMC- α -Aktin) und Alkalischer Phosphatase (ALP) in den Aortenklappen von Wildtyp- und LDLR ^{-/-} Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer <i>Western diet</i> mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.	52
Abbildung 19:	Einfluss von Vitamin D auf die Kalzifizierung und die Plaquegröße der Aorta von Wildtyp (WT)- und LDLR ^{-/-} Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer <i>Western diet</i> mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.	54
Abbildung 20:	Einfluss von Vitamin D auf die Kalzifizierung und die Plaquegröße der Arteria brachiocephalica von Wildtyp (WT)- und LDLR ^{-/-} Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer <i>Western diet</i> mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.	56
Abbildung 21:	Einfluss von Vitamin D auf die Kalzifizierung und die Plaquegröße der Arteria femoralis von Wildtyp (WT)- und LDLR ^{-/-} Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer <i>Western diet</i> mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.	58
Abbildung 22:	Einfluss von Vitamin D auf die Expression von Bmp-2 in der Aorta von Wildtyp (WT)- und LDLR ^{-/-} Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer <i>Western diet</i> mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.	59
Abbildung 23:	Einfluss von Vitamin D auf die Plasmakonzentrationen an Calcium und anorganischem Phosphat von Wildtyp (WT)- und LDLR ^{-/-} Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer <i>Western diet</i> mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.	60
Abbildung 24:	Pathogenese der Atherosklerose.	71
Abbildung 25:	Bedeutung der Inflammation im Rahmen der atherosklerotischen Kalzifizierung.	78
Abbildung 26:	Beeinflussung der vaskulären Kalzifizierung durch Inflammation und osteogener Differenzierung.	82

1 Einleitung

Vitamin D besitzt unter den Vitaminen eine Sonderstellung, da es nicht nur über die Nahrung aufgenommen wird, sondern auch mit Hilfe von UVB-Strahlung (290 – 315 nm) endogen synthetisiert werden kann (Zittermann 2010a; Biesalski 2011). Die zwei bedeutendsten Formen dieses fettlöslichen Steroidhormons sind Vitamin D₃ (Cholecalciferol) und Vitamin D₂ (Ergocalciferol). Vitamin D₃ kann sowohl über die Haut aus 7-Dehydrocholesterol gebildet als auch über tierische Lebensmittel wie fettreichen Fisch aufgenommen werden. Vitamin D₂ dagegen stammt aus pflanzlichen Nahrungsmitteln wie Pilzen. Nach der Aufnahme in den Körper erfolgt zunächst eine Hydroxylierung in der Leber zum 25(OH)D (25-Hydroxycholecalciferol, Calcidiol), dem wichtigsten Vitamin D-Metaboliten im Blut zur Bestimmung des Körper-Vitamin D-Status. Anschließend entsteht durch eine 2. Hydroxylierung in der Niere die biologisch aktive Form 1,25(OH)₂D (1,25-Dihydroxycholecalciferol, Calcitriol) (Holick 2007). Obwohl der Bedarf des Menschen überwiegend durch das kutan gebildete Vitamin D gedeckt werden kann, findet eine zu geringe endogene Synthese statt. Weiterhin fehlen adäquate Quellen, um ausreichend Vitamin D mit der Nahrung aufzunehmen. Aufgrund dessen besteht in Deutschland und weltweit eine hohe Prävalenz für einen Mangel bzw. eine insuffiziente Versorgung der Bevölkerung mit Vitamin D (Hintzpeter et al. 2008; Prentice 2008; Moyad 2009). Es wird geschätzt, dass eine Prävalenz für einen Vitamin D-Mangel in der Gesamtbevölkerung von circa 50 – 80% besteht (Holick et al. 2005; Ginde et al. 2009). Dabei ist jedoch die Definition eines unzureichenden Serum-25(OH)-Spiegels von der Festlegung eines normalen und somit optimalen Vitamin D-Status abhängig. Fraglich ist allerdings, wo sich dieses Optimum befindet, da keine Einigkeit bezüglich der Einteilung des Vitamin D-Status zwischen den verschiedenen medizinischen Fachgesellschaften besteht. Während das *Institute of Medicine* (IOM) einen Vitamin D-Mangel bei 25(OH)D-Werten unter 12 ng/ml und eine adäquate Versorgung bei 20 ng/ml festlegt, geben die *Endocrine Society Guidelines* vor, dass 25(OH)D-Spiegel < 20 ng/ml als Mangel und Spiegel von 30 ng/ml als adäquat zu bezeichnen sind (Slomski 2011; Holick 2012; Mithal et al. 2009). Diese Klassifizierungen und die damit verbundene Beurteilung der Vitamin D-Versorgung orientieren sich primär am Fraktur- und Sturzrisiko, da die verfügbaren Daten für Empfehlungen im Hinblick auf kardiovaskuläre oder andere Erkrankungen bisher nicht ausreichen. Es gibt zahlreiche Ursachen für eine unzureichende endogene Vitamin D-Synthese. Sie wird durch geographische Faktoren, klimatische Bedingungen, kulturelle und soziale Einflüsse bestimmt. Dazu zählen z.B. Breitengrad, Jahres- und Tageszeit, Sonnenscheindauer bzw. Bewölkungsgrad, Luftverschmutzung, Aufenthaltsdauer im Freien sowie Kleidung, Religion, körperliche Aktivität und Gesundheitszustand. Durch die Anwendung von Sonnenschutzmitteln, starke Pigmentierung und Dicke der Haut sowie

zunehmenden Lebensalter wird die Bildung von Vitamin D ebenfalls beeinflusst (Sinha et al. 2012; Holick 2008; Need et al. 1993; Holick 2007; Hagenau et al. 2009). In Europa ist eine ausreichende endogene Synthese zum Erreichen optimaler Serum-25(OH)₂D-Konzentrationen von mindestens 30 ng/ml (50 nmol/l) nur in den Sommermonaten möglich. Durch die saisonale Variation der UVB-Exposition, häufiges Arbeiten in Räumen sowie den bereits erwähnten Einflussfaktoren ist ein Vitamin D-Mangel ein weitverbreitetes Gesundheitsproblem. Menschen ohne ausreichende körpereigene Vitamin D-Synthese sind daher stark von diätetischen Vitamin D-Quellen abhängig. Dennoch ist die Prävalenz einer unzureichenden Vitamin D-Zufuhr in weiten Teilen Europas sehr hoch (Roman Vinas et al. 2011). Zahlreiche Studien geben Hinweise darauf, dass eine insuffiziente Versorgung mit Vitamin D mit dem erhöhten Risiko für Krebserkrankungen (Vanoirbeek et al. 2011), Diabetes mellitus (Wolden-Kirk et al. 2011), Stürze und Knochenfrakturen (Priemel et al. 2010; Cauley et al. 2008; Bischoff-Ferrari et al. 2009) sowie neurodegenerative (Nimitphong und Holick 2011), infektiöse (Lagishetty et al. 2011; Liu et al. 2006) und kardiovaskuläre Erkrankungen (Pilz et al. 2011) einhergeht.

Die meisten biologischen Effekte von 1,25(OH)₂D werden über die Interaktion mit einem intrazellulären Rezeptor vermittelt, was zur Demaskierung des Genoms im Nukleus führt (Zittermann 2010b). Der Vitamin D-Rezeptor (VDR) gehört zur Superfamilie der Steroidhormonrezeptoren und besitzt eine hohe Bindungsaffinität zum 1,25(OH)₂D (Haussler et al. 1997). Er fungiert als Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor (Brown et al. 1999) und übt im Komplex mit 1,25(OH)₂D Änderungen in der Gentranskription aus. Nach der Bindung der aktiven Vitamin D-Form an eine spezifische Liganden-Bindungs-Domäne, die durch ihren molekularen Aufbau die hohe Affinität von Hormon und Rezeptor bewirkt, erfolgt eine Heterodimerisierung mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR). Dieses Heterodimer kann anschließend an sogenannte „*Vitamin D response elements*“ (VDRE) binden, die in der Promoterregion verschiedener, 1,25(OH)₂D-regulierter Gene liegen. Nach der Bindung werden Co-Regulatoren, d.h. mit dem VDR interagierende Nukleoproteine, rekrutiert. Diese können die 1,25(OH)₂D-vermittelte Transkriptionsrate von Genen entweder erhöhen (Co-Aktivatoren) oder reduzieren (Co-Repressoren) (Brown et al. 1999; Ebert et al. 2006). Neben der Fähigkeit, die Transkription zu beeinflussen, löst Vitamin D, ähnlich wie andere Steroidhormone, auch schnelle und direkte Membranreaktionen aus. Diese sogenannten „nicht-genomischen“ Effekte erfolgen in so kurzer Zeit (Sekunden bis Minuten), dass sie nicht über die beschriebenen Genexpressionsänderungen hervorgerufen sein können, sondern vielmehr über Oberflächenrezeptoren vermittelt werden (Dusso et al. 2005). Die genaue Signalkaskade ist jedoch nur unzureichend beschrieben. Zu den „nicht-genomischen“ Wirkungen von 1,25(OH)₂D gehören z.B. rasch auftretende Anstiege der intrazellulären Calciumkonzentration (Morelli et al. 1993), Änderungen im Phosphatidylinositolzyklus

(Lieberherr et al. 1989), Stimulierung des intestinalen Calciumtransports (Brown et al. 1999) sowie von mitogen-aktivierten Proteinkinasen (Beno et al. 1995), Aktivierung der Proteinkinase C (Dusso et al. 2005), eine Erhöhung der Konzentration an zyklischem Guaninmonophosphat (Dusso et al. 2005) und das Öffnen von Chloridkanälen (Zanello und Norman 1996).

Bisher wurden zwei verschiedene Rezeptoren beschrieben, die bei diesen Reaktionen eine Rolle spielen. Dazu gehört einerseits ein „*membrane associated rapid response steroid binding protein*“ (1,25D₃-MARRS), das aus der intestinalen Basolateralmembran von Hühnern isoliert werden konnte, und andererseits der VDR, der vermutlich auch eine bedeutende Rolle bei diesen rasch eintretenden Vitamin D-Wirkungen spielt (Kochupillai 2008). Ein Überblick über die beschriebenen Vitamin D-Effekte ist in Abbildung 1 dargestellt.

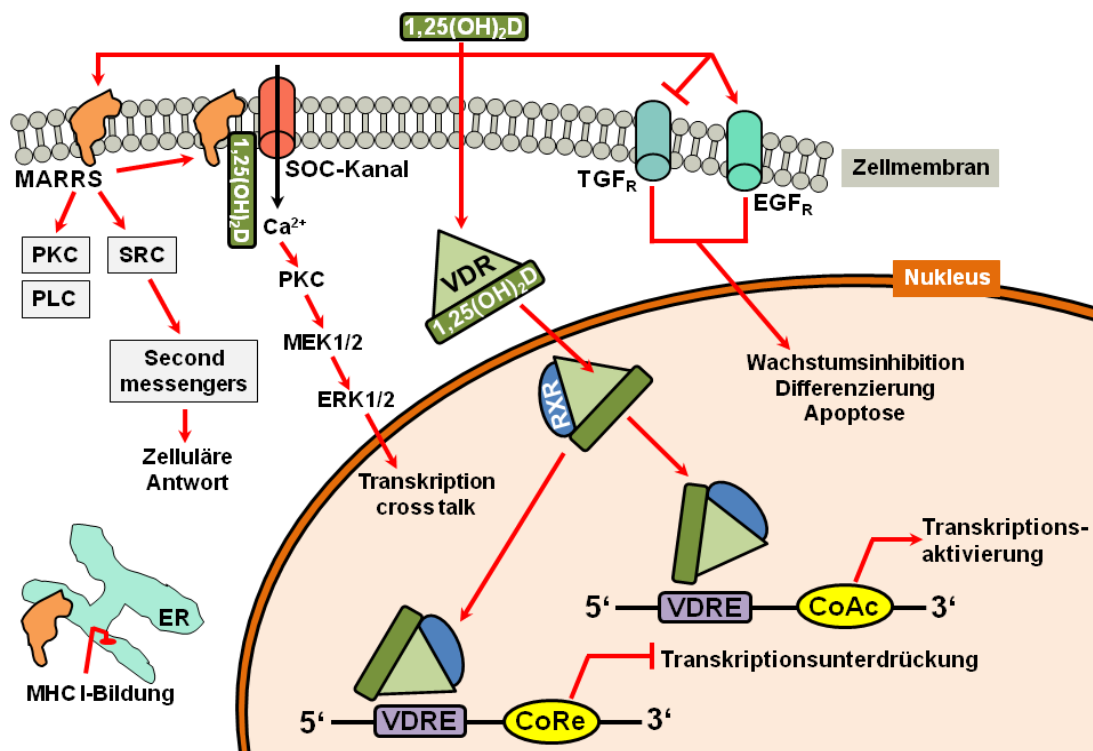


Abbildung 1: Genomische und nicht-genomische Wirkungen von Vitamin D [nach Fernandes de Abreu et al. 2009].

Co-Ac, Co-activator factor; Co-Re, Co-repressive factor; EGF, epidermal growth factor; MARRS, membrane associated rapid response steroid binding protein; MHC I, major histocompatibility complex class I; PKC, Proteinkinase C; PLC, Phospholipase C; RXR, Retinoid-X-Rezeptor; SOC, store operated channels; TGF, transforming growth factor; VDR, Vitamin D-Rezeptor. VDRE, Vitamin D response element.

Sowohl die genomischen als auch die nicht-genomischen Effekte von 1,25(OH)₂D verursachen eine Vielzahl von Reaktionen in einer großen Anzahl an Zielzellen. Zu den klassischen Funktionen des 1,25(OH)₂D gehören die Aufrechterhaltung der Calcium- und Phosphat-Homöostase sowie die Förderung einer optimalen Knochenmineralisation (Holick et al. 1980; Bouillon et al. 2008a; Holick 2007; Bergwitz und Juppner 2010). Es

beeinflusst aber auch eine Vielzahl anderer metabolischer Wege in verschiedenen Organen wie Herz, Blutgefäßen und Immunsystem (Valdivielso 2009). Dabei übt 1,25(OH)₂D zahlreiche biologischer Wirkungen aus, z.B. Induktion der Zelldifferenzierung, Hemmung des Zellwachstums, Immunmodulation und Kontrolle anderer Hormonsysteme (Dusso et al. 2005). Abbildung 2 zeigt einen Überblick über den Einfluss von Vitamin D auf verschiedene physiologische Systeme.

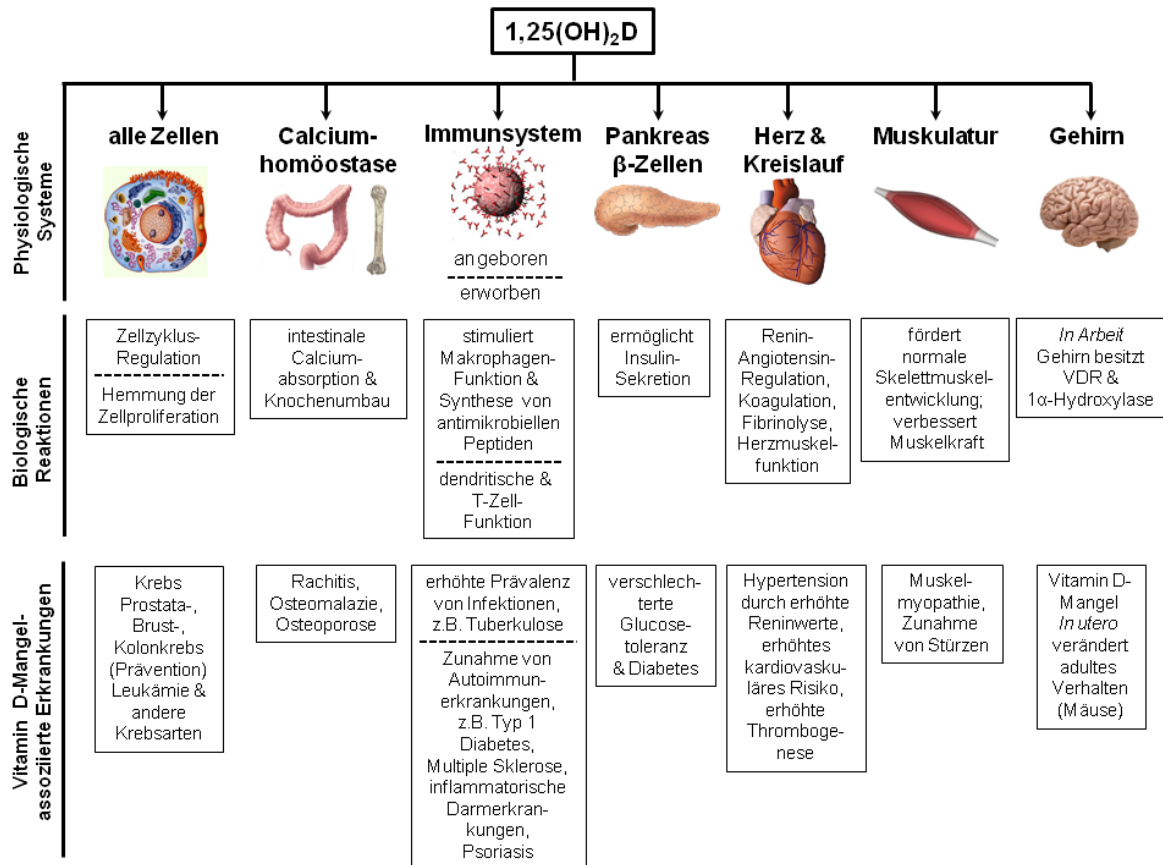


Abbildung 2: Einfluss von Vitamin D auf verschiedene physiologische Systeme, deren 1,25(OH)₂D-induzierte biologische Antworten sowie Vitamin D-Mangel-assoziierte Erkrankungen in den jeweiligen Systemen [modifiziert nach Norman und Bouillon 2010].

Vitamin D-Mangel ist laut großen prospektiven Studien ein unabhängiger Risikofaktor für ein vermehrtes Auftreten von kardiovaskulären und Herz-Kreislauf-Erkrankungen sowie der Gesamtsterblichkeit (Zittermann et al. 2012; Wang et al. 2012; Melamed et al. 2008; Dobnig et al. 2008; Schottker et al. 2013; Pilz et al. 2012; Gouni-Berthold et al. 2009). Dabei besteht eine inverse Beziehung zwischen dem Vitamin D-Status und der Prävalenz nachgewiesener kardiovaskulärer Risikofaktoren wie Alter, Bluthochdruck, Diabetes und Hypertriglyzeridämie. Ein geringerer Serum-25(OH)D-Spiegel wird für Frauen, bei Adipositas und Personen mit geringer körperlicher Aktivität beschrieben (Holick 2007; Judd et al. 2008). Wang et al. (2008) konnte eine mehr als 50%ige Risikoerhöhung für die Entstehung eines ersten Myokardinfarkts bei Probanden der *Framingham Offspring*

Kohorte mit unzureichender Vitamin D-Versorgung (< 15 ng/ml) im Vergleich zu denen mit 25(OH)D-Werten > 15 ng/ml nachweisen. Scragg et al. (2007) konnten zeigen, dass das Auftreten von fatalem und nicht-fatalem Myokardinfarkt, ischämischem Schlaganfall oder Herzversagen bei Erwachsenen ohne bisher beschriebene Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems mit 25(OH)D-Werten < 20 ng/ml 53 – 80% höher war als bei denen mit 25(OH)D-Werten > 20 ng/ml. Auch andere Arbeitsgruppen ermittelten ein erhöhtes Risiko für Schlaganfälle bei geringen Vitamin D-Spiegeln (Chowdhury et al. 2012; Pilz et al. 2010; Pilz et al. 2011). Eine kausale Beziehung zwischen Vitamin D-Mangel und dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen konnte jedoch bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden. Eine unzureichende Vitamin D-Versorgung scheint über verschiedene Mechanismen das kardiovaskuläre Risiko zu erhöhen, z.B. durch Entwicklung von Elektrolytimbalancen, Dysfunktion der pankreatischen β -Zelle und die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) (Motiwala und Wang 2012). Eine vaskuläre Dysfunktion und eine Insulinresistenz werden ebenfalls durch inflammatorische Prozesse gefördert, die aus einer Störung der adaptiven Immunantwort hervorgehen (Kempker et al. 2012).

Auch Personen mit chronischen Nierenerkrankungen (*chronic kidney disease*, CKD) haben ein erhöhtes Risiko an kardiovaskulären Ereignissen zu sterben. Ein Vitamin D-Mangel ist auch mit einer höheren Sterblichkeitsrate bei CKD-Patienten assoziiert (Drechsler et al. 2011; Boer 2011; Pilz et al. 2011), was durch eine Gabe von Calcitriol positiv beeinflusst werden kann (Shoben et al. 2008; Wolf et al. 2008). Eine Vitamin D-Supplementierung führt außerdem zur Senkung des Parathormon (PTH)-Spiegels. Dies ist ein bedeutender, positiver Effekt, da PTH als eigenständiger kardiovaskulärer Risikofaktor gilt und sekundärer Hyperparathyroidismus bei CKD-Patienten sehr häufig auftritt (Kovesdy et al. 2012). Die geringen Vitamin D-Spiegel bei Patienten mit CKD ergeben sich aus Morbiditäts-assoziiertes Einschränkung der Sonnenexposition, verschlechterter Vitamin D-Synthese in der Haut, Malnutrition und Störungen im Vitamin D-Stoffwechsel, z.B. durch den Verlust proteingebundener Vitamin D-Metabolite über den Urin bei Patienten mit Proteinurie (Doorenbos et al. 2009). Mehr als 70% dieser Patienten weisen 25(OH)D-Werte unter 20 ng/ml auf (Drechsler et al. 2010).

Vitamin D scheint auch direkte Effekte auf das kardiovaskuläre System zu haben, da Herz und Blutgefäße Zielgewebe von Vitamin D sind und sowohl den Vitamin D-Rezeptor (VDR) als auch die 1α -Hydroxylase exprimieren (Bouillon et al. 2008a; Brewer et al. 2011; Chen et al. 2008; Pilz et al. 2010; Somjen et al. 2005). Der VDR konnte in verschiedenen Zelltypen des Gefäßsystems, wie z.B. in glatten Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) (Merke et al. 1987; Carthy et al. 1989; Somjen et al. 2005), Endothelzellen (Merke et al. 1989), Kardiomyozyten (Xiang et al. 2005; Holick 2006;

Zittermann 2006) und Monozyten/Makrophagen (Mathieu et al. 2001), nachgewiesen werden. Dies führte zu einer vermehrten Ursachenforschung bezüglich der Rolle von Vitamin D in der Pathogenese der kardiovaskulären Erkrankungen sowie der vaskulären Kalzifizierung (Young et al. 2011; Zittermann und Koerfer 2008; Zittermann et al. 2007; Martins et al. 2007; Naves-Diaz et al. 2012). Es konnte bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen eine kausale Verbindung zwischen verminderter Aktivierung des VDR und dem schnelleren Fortschreiten von Kalzifizierung und Atherosklerose in den Blutgefäßen von Patienten mit CKD beobachtet werden (Andress 2006; Berl und Henrich 2006). Außerdem wurden zahlreiche in der Knochenmineralisierung involvierte Proteine auch im Rahmen der Kalzifizierung im Gefäßsystem nachgewiesen (Tintut und Demer 2001). Vitamin D hat einige vermeintlich protektive Effekte auf pathologische Gefäßveränderungen. Sowohl durch seine antioxidativen Wirkungen als auch durch Hemmung der Lipidperoxidation und Erhöhung der NO-Bildung kann es einer endothelialen Dysfunktion vorbeugen (Brewer et al. 2011; Husain et al. 2009; Molinari et al. 2011). Weiterhin schützt Vitamin D vermutlich vor Atherosklerose durch Hemmung der Cholesterinaufnahme durch Makrophagen und daraus resultierender Schaumzellbildung, Verringerung der VSMC-Proliferation sowie -Migration und Unterdrückung der inflammationsbedingten Endothelzellaktivierung verbunden mit der Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen (Brewer et al. 2011; Oh et al. 2009; Chen et al. 2010; Martinesi et al. 2006).

Bis dato existieren jedoch keine Studien an Mausmodellen, die zeigen, dass auch physiologische Vitamin D-Konzentrationen einen positiven Einfluss auf das vaskuläre System ausüben und somit pathologische Prozesse wie die Atherosklerose positiv beeinflussen könnten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Einfluss eines Rezeptor-*Knockouts* für Vitamin D sowie eines alimentären Vitamin D-Mangels auf die vaskuläre Integrität zu untersuchen. Dabei sollte geprüft werden, ob es durch den genetischen Mangel des Vitamin D-Rezeptors zu einer anatomischen Modifikation der Aortenklappe sowie des Gefäßes kommt und welche Komplikationen damit einhergehen. Des Weiteren sollten erstmals sowohl Aussagen zu möglichen Effekten physiologischer Vitamin D-Konzentrationen auf die Atherosklerose im Allgemeinen als auch auf spezielle pathologische Gefäßveränderungen wie die Kalzifizierung experimentell nachgeprüft werden. Außerdem sollte herausgefunden werden, welche Effekte ein prolongierter Vitamin D-Mangel hat, wie gesunde Tiere auf Vitamin D-Mangel reagieren und ob Vitamin D-Mangel-induzierte, vaskuläre, pathologische Prozesse durch Vitamin D-Gabe reversibel sein könnten. Es sollten auch mögliche molekulare Ursachen für die beobachteten Veränderungen charakterisiert werden. Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 3 Versuche an verschiedenen Mausmodellen durchgeführt. Es ist bereits aus Daten

epidemiologischen Studien bekannt, dass ein niedriger Vitamin D-Status mit dem Auftreten von Herz-Kreislaufkrankungen und dessen Risikofaktoren assoziiert zu sein scheint (Zittermann et al. 2012; Grandi et al. 2010a; Grandi et al. 2010b; Wang et al. 2012; Burgaz et al. 2011) Daher kann vermutet werden, dass ein Vitamin D-Mangel auch atherosklerotische Prozesse fördert. Ob es einen kausalen Zusammenhang zwischen Vitamin D-Status und pathologischen Gefäßveränderungen wie der Atherosklerose gibt, konnte bisher jedoch nicht geklärt werden und sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Der VDR wird in nahezu allen Zellen exprimiert. Dies bedeutet, dass diese Gewebe Vitamin D-responsiv sind. Circa 3% des menschlichen Genoms werden durch das endokrine Vitamin D-System reguliert, was über direkte oder indirekte Wirkungen vermittelt wird (Bouillon et al. 2008b). *VDR-knockout* ($VDR^{-/-}$) Mäuse stellen ein geeignetes Tiermodell dar, um Experimente hinsichtlich gesundheitlicher Folgen eines Vitamin D-Mangels durchzuführen, da bei ihnen aufgrund des fehlenden Rezeptors die Vitamin D-Wirkung in der Zelle fehlt. Somit eignet sich dieses Mausmodell zur Untersuchung metabolischer und pathophysiologischer Konsequenzen bei einem nahezu vollständigen Vitamin D-Mangel. Bisherige Studien am Mäuseherz konnten zeigen, dass sowohl Durchmesser als auch Länge der Herzmyofibrillen bei $VDR^{-/-}$ Mäusen signifikant höher waren als bei WT-Mäusen, was zu einer Herzhypertrophie und einem höheren Herzgewicht-/Körpergewicht-Ratio führte (Rahman et al. 2007; Simpson et al. 2007). Bis dato gibt es keine Untersuchungen zum Einfluss eines genetischen Mangels des VDR auf die Beschaffenheit von Gefäßen bzw. Herzklappen. In einer ersten Studie sollte daher geprüft werden, welche Rolle das genetisch bedingte Fehlen des VDR auf die Anatomie der Aortenklappe hat und ob sich die Zusammensetzung des Gefäßes dadurch verändert. Da der VDR in verschiedenen Zelltypen des Gefäßsystems exprimiert wird, könnte sein Fehlen mit pathologischen Veränderungen verbunden sein. Dazu sollten *VDR-knockout* ($VDR^{-/-}$) Mäuse im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Tieren bezüglich Auftreten und Ausmaß von Gefäßschädigungen untersucht werden und mögliche zugrundeliegende Mechanismen aufgeklärt werden.

Ein weit verbreitetes Versuchsmodell zur Untersuchung atherosklerotischer Prozesse sind LDL-Rezeptor-*knockout* ($LDLR^{-/-}$) Mäuse. Diese Tiere bilden unter cholesterin- und fettreicher Diät, entsprechend der menschlichen Ernährungsweise in westlichen Industrienationen, innerhalb von Wochen Atherosklerose und Verkalkung aus (Ishibashi et al. 1993; Knowles und Maeda 2000). Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen bewirkt der *Knockout* dieses Rezeptors in Kombination mit einer fettreichen Diät eine mehr als zehnfachen Erhöhung des Cholesterinspiegels (< 25 mmol/L), ohne dabei zu Veränderungen der Triglyzerid- oder HDL (*high density lipoprotein*)-Spiegel zu führen (Ishibashi et al. 1993), was pathologische Veränderungen der aortalen Gefäßwand zur

Folge hat (Zadelaar et al. 2007). In einer weiteren Studie sollte an diesen LDLR^{-/-}-Mäusen untersucht werden, ob ein alimentärer, häufig auch beim Menschen nachweisbarer Vitamin D-Mangel die Atherosklerose beeinflussen kann. Die Mehrzahl der Tierstudien zu Vitamin D und Atherosklerose konzentrierte sich auf Effekte von hochdosierten, pharmakologischen Dosen an Vitamin D und deren Effekte auf die atherosklerotischen Gefäßveränderungen (Bas et al. 2006; Al-Aly et al. 2007; Lopez et al. 2008; Mathew et al. 2008; Ivanovski et al. 2009; Henley et al. 2005). Es ist bereits hinreichend bekannt, dass sowohl Vitamin D-Mangel als auch eine Überversorgung das Risiko für Gefäßschädigungen und somit Herz-Kreislaufkrankungen erhöhen. Es wird von einer U- bzw. J-förmigen Beziehung (Durup et al. 2012; Drueke und Massy 2012; Zittermann et al. 2013) gesprochen, wobei es ein Optimum für Vitamin D und einer damit verbundenen Risikominderung zu geben scheint. Um verschiedene, physiologische Vitamin D-Stadien zu untersuchen, erhielten LDLR^{-/-} Mäuse unterschiedliche Vitamin D-Konzentrationen über die Diät. Dabei sollte bei fortgeschrittener Atherosklerose sowohl die Zusammensetzung der Aortenklappe als auch die möglichen, krankheitstypischen Änderungen der Expression glatter Muskelzellen sowie inflammatorischer und osteogener Marker als Reaktion auf eine unzureichende Vitamin D-Gabe im Vergleich zu einer adäquaten oder reichlichen Versorgung analysiert werden.

Aufgrund der in den ersten beiden Studien erzielten Ergebnisse sollten in einem weiteren Versuch folgende Fragen geklärt werden: (1) Bewirkt ein Vitamin D-Mangel auch bei Mäusen, die keine Atherosklerose entwickeln, Kalzifizierungen im Gefäßsystem? (2) Ist eine durch Vitamin D-Mangel induzierte vaskuläre Kalzifizierung durch Vitamin D-Gabe reversibel? (3) Welchen Einfluss hat ein prolongierter Vitamin D-Mangel auf die Plaquezusammensetzung der Aortenklappe und des Gefäßes? Im Rahmen eines 3. Studie an LDLR^{-/-} - und WT-Mäusen sollte dies nun untersucht werden. Die WT-Tiere dienten im Rahmen dieses Versuchs als Referenzgruppen zu den entsprechend versorgten LDLR^{-/-} Mäusen. Damit sollte ein möglicher Vergleich zwischen Genotypen erfolgen, die, bei Fütterung einer *Western diet*, entweder typischerweise Atherosklerose entwickeln oder nicht zur Ausbildung solcher pathologischer Gefäßveränderungen neigen. Die Tiere erhielten entweder eine Diät mit unzureichender oder adäquater Vitamin D-Konzentration für 16 Wochen. Ein Teil der LDLR^{-/-} Mäuse wurde für weitere 16 Wochen gefüttert, wobei die Diät bei der Hälfte der Tiere getauscht wurde, d.h. unzureichend mit Vitamin D-versorgte Mäuse erhielten nun adäquate Mengen und umgekehrt. Dadurch sollte eine mögliche Reversibilität der pathologischen Veränderungen im Gefäßsystem untersucht werden. Außerdem sollte herausgefunden werden, ob eine Transdifferenzierung vaskulärer Zellen eine Rolle bei unzureichendem Vitamin D-Versorgungsstatus spielt. Dazu wurde α -Aktin als Marker für VSMCs und Fibromyoblasten im Zusammenhang mit der Alkalischen Phosphatase (ALP) als Marker für kalzifizierende

chondrogene und osteogene Zellen analysiert. Des Weiteren sollte auch der Effekt von Vitamin D auf eine mögliche Kalzifizierung anderer Herzklappen geprüft werden.

Pathologische Veränderungen können auch in verschiedensten Gefäßarealen auftreten. Am meisten davon beeinflusst sind die Aorta sowie ihre Hauptverzweigungen, d.h. die Arteria brachiocephalica (Halsschlagader) und die Arteria femoralis (Oberschenkelarterie) (Teupser et al. 2003; Bastos Goncalves et al. 2012; Nakashima et al. 1994). In früheren Studien wurden atherosklerotische Prozesse, Bildung, Größe und zelluläre Zusammensetzung von Plaques, die Entstehung von Rupturen und Okklusionen sowie eine Abnahme des laminären Blutflusses vorwiegend im Bereich der Brachialarterie beschrieben (Rosenfeld et al. 2008; Bennett et al. 2009; Suo et al. 2007; Williams et al. 2002; Rosenfeld et al. 2000). Bisher ist jedoch nichts über einen Einfluss eines Vitamin D-Mangels auf die Atherosklerose und Kalzifizierung sowie der Effekt einer Vitamin D-Gabe nach bestehendem Mangel in den verschiedenen Gefäßarealen bekannt. Deshalb sollte im Rahmen der 3. Studie auch die Wirkung eines Vitamin D-Mangels bei verschiedenen Genotypen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf die Entstehung und das Ausmaß der Kalzifizierung in der Aorta und ihren wichtigsten, abzweigenden Arterien analysiert werden. Durch den bereits bekannten Zusammenhang zwischen osteogener Differenzierung und vaskulärer Kalzifizierung wurde in der Aorta als Hauptarterie des Körpers die Expression von Bmp-2 untersucht. Außerdem sollte bei den LDLR^{-/-} Mäusen eine mögliche Veränderung der Plaqueflächen nachgeprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Einfluss eines genetischen Vitamin D-Rezeptor-Mangels auf das vaskuläre System (Versuch 1)

2.1.1 Versuchsaufbau: Versuchstiere und Diäten

In diesem Versuch sollte der Einfluss eines fehlenden Vitamin D-Rezeptors auf die Kalzifizierung im Vergleich zu gesunden Mäusen untersucht werden. Dafür wurden 6 männliche, 5 Wochen alte VDR^{-/-} Mäuse (B6.129S4-Vdr^{tm1Mbd}/J; Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) mit einem mittleren Anfangsgewicht von $15,8 \pm 2,7$ g im Vergleich zu 17 WT-Mäusen (C57BL/6J; Charles River Laboratories; Sulzfeld, Deutschland) mit einem mittleren Anfangsgewicht von $14,6 \pm 1,0$ g in 3 Gruppen aufgeteilt und über 8 Wochen mit einer semisynthetischen *Western diet* mit 20% Saccharose, 20% Kokosfett und 0,15% Cholesterin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) gefüttert. Außerdem war der Diät zur Verbesserung der intestinalen Calciumaufnahme 20% Laktose zugesetzt. Die VDR^{-/-} Mäuse (n = 6) erhielten eine *Rescue diet* (RD), die reich an Calcium (2%) und Phosphor (1,25%) ist. Diese Diät vermeidet bei den Tieren eine VDR-Mangel-induzierte Hypocalcämie (Li et al. 1998). Eine der WT-Gruppen (n = 9) wurde ebenfalls mit dieser *Rescue diet* gefüttert, die andere WT-Gruppe (n = 8) erhielt eine normale Diät (ND) entsprechend den Empfehlungen des AIN (*American Institute of Nutrition*, 1980) mit normalen Calcium- und Phosphorgehalten (0,3% Calcium, 0,156% Phosphor). Die ausführliche Zusammensetzung der Diäten ist in Tabelle 1 dargestellt.

Die Tiere wurden einzeln in Makrolon-Käfigen bei einer mittleren Raumtemperatur von $23 \pm 1^\circ\text{C}$, einer Luftfeuchte von 50 – 60% und einem 12h-Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Da es sich bei den VDR^{-/-} Mäusen um gentechnisch veränderte Organismen handelte, wurden sie in den Versuchsterräumen der Sicherheitsstufe 1 (Biozentrum, Weinberg-Campus, Universität Halle-Wittenberg) untergebracht. Den Tieren standen Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Körpergewicht, Körpermasseentwicklung und Futteraufnahme wurden wöchentlich erfasst.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Diät aus Versuch 1.

Komponente	Western diet Menge (g/kg Diät)
Casein	200
DL-Methionin	2
Saccharose	200
Laktose	200
Stärke	49,5
Cellulose	50
Vitamin- und Mineralstoff-Mischung ¹	87
Cholesterin	1,5
Kokosfett	200
Sojaöl	10

¹ Die Vitamin- und Mineralstoffmischung ist in den Tabellen 2 und 3 dargestellt.

Rescue Diet: 2% Calcium, 1,25% Phosphor, Normale Diät: 0,3% Calcium, 0,156% Phosphor.

Tabelle 2: Vitaminmischung aus Versuch 1.

Vitamine	Menge (mg/kg Diät)
Vitamin A (500.000 IU/g)	10,00
Tocopherolacetat	150,00
Vitamin K	1,47
Thiamin-HCl	6,00
Riboflavin	6,12
Pyridoxin-HCl	7,00
Ca-Pantothenat	16,00
Folsäure	2,00
Nicotinsäure	30,00
Biotin	20,00
Cyanocobalamin	2,61
Vitamin D ₃	2,50
Cholinchlorid	2000,00

Tabelle 3: Mineralstoffmischung aus Versuch 1.

Mengenelemente	Verbindung	Anteil der Elemente	Menge (g/kg Diät)	Menge (g/kg Diät) (Rescue diet)
Ca	Calciumcarbonat	38% Ca	2,76	11,51
P	Dicalcium- phosphat	25% Ca 20% P	7,81	62,50
Mg	Magnesiumoxid	50% Mg	1,01	
K	Kaliumchlorid	52,4% K	6,87	
Na	Natriumchlorid	39,3% Na	2,59	
Cl		60,2% Cl		
Spurenelemente	Verbindung	Anteil der Elemente	Menge (mg/kg Diät)	
Fe	Eisensulfat	30% Fe	116,70	
Zn	Zinkoxid	79% Zn	37,90	
Mn	Manganoxid	62% Mn	16,13	
Cu	Kupfersulfat	25% Cu	24,00	
Se	Natriumselenit	45% Se	0,33	
Jod	Calciumjodat	62% J	0,32	
Schwefel	wird über andere Quellen abgedeckt			
Molybdän	Ammoniummolybat	54,3% Md	0,28	

2.1.2 Probenahme

Die zuvor über Nacht genücherten Mäuse wurden im Alter von 13 Wochen mit Ether betäubt, anschließend dekapitiert und das Vollblut in EDTA-Tubes aufgefangen. Das Blut wurde zur Plasmagewinnung für 20 min bei 1500 x g und 4°C zentrifugiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Im Rahmen dieses Versuchs wurde außerdem von allen Tieren das Herz mit dem aufsteigenden Teil des Aortenbogens freipräpariert. Das Herz wurde mit NaCl gespült, entfernt und im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde es bei -80°C bis zum Beginn der Analysen gelagert.

2.1.3 Analytik

Im Rahmen dieses Versuches sollten vorwiegend histologische und immunhistochemische Untersuchungen im Bereich der Aortenwurzel durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang wurden gemäß Kapitel 2.4.4.2 und 2.4.4.3 der Anteil der Kalzifizierungen, die Anzahl der Kalzifizierungsspotts sowie die Expression der Osteoblastendifferenzierungsfaktoren in den Aortenklappen der Tiere untersucht. Des Weiteren wurden die Plasmakonzentrationen an Calcium, Gesamtphosphor und anorganischem Phosphat entsprechend 2.4.2 bestimmt.

2.1.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der MINITAB-Software (Minitab, State College, PA, USA). Die Daten wurden mittels One-Way ANOVA verrechnet und Werte als Mittelwerte \pm Standardabweichungen dargestellt. Bei statistisch signifikanten Unterschieden der Mittelwerte ($P \leq 0,05$) erfolgte ein multipler Mittelwertsvergleich mit dem *Fisher's*-Test.

2.2 Einfluss eines alimentären Vitamin D-Mangels auf die Atherosklerose bei LDL-Rezeptor-*knockout*-Mäusen (Versuch 2)

2.2.1 Versuchsaufbau: Versuchstiere und Diäten

Bei diesem Versuch sollte der potentielle Einfluss einer alimentären Vitamin D-Unterversorgung auf Entstehung und Verlauf der Atherosklerose im Vergleich zu einer adäquaten bzw. reichlichen Vitamin D-Zufuhr untersucht werden. Dafür wurden 36 männliche, 4 Wochen alte LDLR^{-/-} Mäuse (B6.129S7-Ldlr^{tm1Her}/J; Jackson Laboratory) mit einem Anfangsgewicht von $16,5 \pm 1,2$ g zufällig in 3 Gruppen à 12 Tiere eingeteilt und für 16 Wochen gefüttert. Sie erhielten eine semisynthetische *Western diet* mit 20% Saccharose, 21% gesättigtem Fett in Form von Schweineschmalz und 0,15% Cholesterin (Sigma-Aldrich) zur Beschleunigung der Atherosklerose-Entwicklung. Die ausführliche Zusammensetzung der Diäten ist in Tabelle 4 dargestellt. Die Diäten unterschieden sich zwischen den Gruppen nur in ihrem Vitamin D-Gehalt (Tabelle 7). Die anderen Vitamine und Mineralstoffe wurden entsprechend den Bedarfsempfehlungen des NRC (*National Research Council*, 1995) zugesetzt.

Die Tiere wurden paarweise in Makrolon-Käfigen bei einer mittleren Raumtemperatur von $23 \pm 1^\circ\text{C}$, einer Luftfeuchte von 50 – 60% und einem 12h-Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Da es sich bei den LDLR^{-/-} Mäusen um gentechnisch veränderte Organismen handelte, wurden sie in den Versuchsterräumen der Sicherheitsstufe 1 (Biozentrum, Weinberg-Campus, Universität Halle-Wittenberg) untergebracht. Den Tieren standen Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Körpergewicht, Körpermasseentwicklung und Futteraufnahme wurden wöchentlich erfasst.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Diät aus Versuch 2 und 3.

Komponente	<i>Western diet</i> Menge (g/kg Diät)
Casein	200
DL-Methionin	2
Zucker	200
Stärke	271,5
Vitamin- und Mineralstoff-Mischung ¹	60
Cellulose	50
Cholesterin	1,5
Schweineschmalz	210
Sojaöl	5

¹ Die Vitamin- und Mineralstoffmischung ist in den Tabellen 5 und 6 dargestellt.

Tabelle 5: Vitaminmischung aus Versuch 2 und 3.

Vitamine	Menge (mg/kg Diät)
Vitamin A (5000 IU/g)	480,00
Tocopherolacetat	65,56
Vitamin K	1,96
Thiamin-HCl	5,00
Riboflavin	7,14
Pyridoxin-HCl	8,00
Ca-Pantothenat	16,00
Folsäure	0,50
Nicotinsäure	15,15
Biotin	0,20
Cyanocobalamin	0,01
Cholinchlorid	4000,00

Tabelle 6: Mineralmischung aus Versuch 2 und 3.

Mengenelemente	Verbindung	Anteil der Elemente	Menge (g/kg Diät)
Ca	Calciumcarbonat	38% Ca	7,08
P	Dicalcium- phosphat	25% Ca 20% P	13,20
Mg	Magnesiumoxid	50% Mg	1,00
K	Kaliumchlorid	52,4% K	4,44
Na	Natriumchlorid	39,3% Na	1,27
Cl		60,2% Cl	
Spurenelemente	Verbindung	Anteil der Elemente	Menge (mg/kg Diät)
Fe	Eisensulfat	30% Fe	116,70
Zn	Zinkoxid	79% Zn	12,70
Mn	Manganoxid	62% Mn	16,13
Cu	Kupfersulfat	25% Cu	24,00
Se	Natriumselenit	45% Se	0,33
Jod	Calciumjodat	62% J	0,24
Schwefel	wird über andere Quellen abgedeckt		
Molybdän	Ammoniummolybat	54,3% Md	0,28

Tabelle 7: Vitamin D-Gehalt der Diäten und dazugehörige Gruppeneinteilung der Tiere aus Versuch 2.

Gruppe	Vitamin D (IU/kg Diät)	Vitamin D ($\mu\text{g D}_3/\text{kg}/\text{Diät}$)
Mangelgruppe	50	1,25
adäquat versorgte Gruppe	1.000	25
reichlich versorgte Gruppe	10.000	250

2.2.2 Probenahme

Die zuvor über Nacht genücherten Mäuse wurden im Alter von 20 Wochen mit Ether betäubt, anschließend dekapitiert und das Vollblut in EDTA-Tubes aufgefangen. Das Blut wurde zur Plasmagewinnung für 20 min bei 1500 x g und 4°C zentrifugiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Die Femura der Mäuse wurden entnommen, grob vorgereinigt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bis zur späteren Analyse bei -80°C. Für die spätere Untersuchung atherosklerotischer Prozesse wurde von allen Tieren das Herz mit dem aufsteigenden Teil des Aortenbogens sowie für weitere Messungen die Gesamtaorta freipräpariert. Herz und Aorta wurden mit NaCl gespült, von

anhaftendem Gewebe gereinigt, entfernt und im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Proben bei -80°C bis zum Beginn der Analysen gelagert.

2.2.3 Analytik

Im Rahmen dieses Versuchs sollten vorwiegend histologische und immunhistochemische Analysen der atherosklerotischen Plaques im Bereich der Aortenwurzel durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang erfolgte entsprechend Kapitel 2.4.4.2 die histologische Bestimmung der Größe der Ablagerungen sowie deren Zusammensetzung aus Kollagen, Fett, und Kalk. Außerdem sollten immunhistochemisch nach Kapitel 2.4.4.3 der Anteil an Makrophagen, glatten Muskelzellen sowie die Expression der Osteoblastendifferenzierungsfaktoren untersucht werden. Des Weiteren wurden verschiedene Vitamin D-Metabolite (2.4.1), die Konzentrationen an Cholesterin und Triglyzeriden (2.4.3) sowie an Calcium und anorganischem Phosphat (2.4.2) im Plasma bestimmt. Außerdem wurde eine Bestimmung von Calcium und Gesamtphosphor in den Femura durchgeführt (2.4.2). Die relative mRNA-Konzentration von Calbindin D_{9k} in der Aorta wurde mittels *realtime* RT-PCR (reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion) bestimmt (2.4.5).

2.2.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der MINITAB-Software (Minitab, State College, PA, USA). Die Daten wurden mittels One-Way ANOVA verrechnet und Werte als Mittelwerte \pm Standardabweichungen dargestellt. Bei statistisch signifikanten Unterschieden der Mittelwerte ($P \leq 0,05$) erfolgte ein multipler Mittelwertsvergleich mit dem *Fisher's*-Test.

2.3 Einfluss eines alimentären Vitamin D-Mangels bei LDL-Rezeptor-*knockout*- und Wildtyp-Mäusen (Versuch 3)

2.3.1 Versuchsaufbau: Versuchstiere und Diäten

Bei diesem Versuchsmodell sollte der potentielle Einfluss einer alimentären Vitamin D-Versorgung auf Entstehung und Verlauf der Atherosklerose im Allgemeinen und auf die Kalzifizierung im Besonderen untersucht werden. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob eine Vitamin D-Gabe nach bestehendem Mangel einen Effekt auf verschiedene Atheroskleroseparameter ausüben kann. Außerdem sollte an Mäusen, die normalerweise keine atherosklerotischen Veränderungen entwickeln, der Effekt unterschiedlicher Vitamin D-Gaben auf die Kalzifizierung ermittelt werden. Dafür wurden 72 männliche, 4 Wochen alte LDLR^{-/-} Mäuse (B6.129S7-Ldlr^{tm1Her}/J; Jackson Laboratory) mit einem

Anfangsgewicht von $16,3 \pm 1,4$ g und 24 männliche, gleichaltrigen WT-Mäuse (C57BL/6J) mit einem Anfangsgewicht von $16,2 \pm 0,8$ g zufällig in je 2 Gruppen à 36 bzw. 12 Tiere eingeteilt und für 16 Wochen gefüttert. Sie erhielten eine semisynthetische *Western diet* mit 20% Saccharose, 21% gesättigtem Fett in Form von Schweineschmalz und 0,15% Cholesterin (Sigma-Aldrich), die bei den LDLR^{-/-} Mäusen zur Beschleunigung der Atherosklerosenentwicklung beiträgt. Die ausführliche Zusammensetzung der Diäten ist in Tabelle 4 dargestellt. Die Diäten unterschieden sich zwischen den Gruppen nur in ihrem Vitamin D-Gehalt. Es gab jeweils eine Gruppe von jedem Genotyp mit einer adäquaten Vitamin D-Gabe über die Diät (1.000 IU/kg Diät (+D)) oder einer unzureichenden Vitamin D-Versorgung (50 IU/kg Diät (-D)). Die anderen Vitamine und Mineralstoffe wurden entsprechend den Bedarfsempfehlungen des NRC (1995) zugesetzt.

Nach 16 Wochen wurden alle 24 WT-Mäuse und 12 LDLR^{-/-} Mäuse jeder Gruppe durch Dekapitierung zur Probenahme getötet. Die übrigen 24 LDLR^{-/-} Mäuse der Gruppe mit adäquater Vitamin D-Versorgung in den ersten 16 Wochen (Zeitraum/Phase 1) wurden zufällig in 2 neue Gruppen mit je 12 Tieren eingeteilt. Eine Gruppe erhielt dabei weiterhin eine adäquate Vitamin D-Gabe über die Diät (+D). Die andere Gruppe wurde nun unzureichend mit Vitamin D versorgt (+D/-D). Das gleiche Vorgehen galt für die 24 LDLR^{-/-} Mäuse, die im Zeitraum 1 eine unzureichende Vitamin D-Gabe über die Diät erhielten. Eine Gruppe wurde weiterhin mit dieser Diät gefüttert (-D), während die andere Gruppe im nun folgenden Zeitraum 2 eine adäquate Vitamin D-Zufuhr über die Diät erhielt (-D/+D). Die insgesamt 48 LDLR^{-/-} Mäuse in den 4 Gruppen wurden für weitere 16 Wochen (Zeitraum/Phase 2) gefüttert. Einen Überblick über das Studiendesign ist in Abbildung 3 dargestellt.

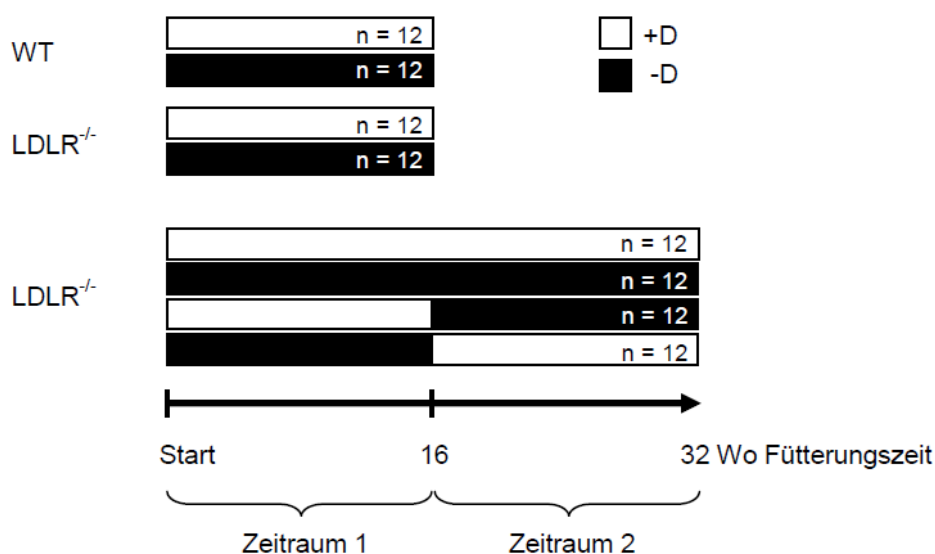


Abbildung 3: Studiendesign von Versuch 3.

+D, Diät mit adäquater Vitamin D-Versorgung (1.000 IU/kg); -D, Diät mit unzureichender Vitamin D-Versorgung (50 IU/kg); LDLR^{-/-}, LDLR-knockout-Mäuse; WT, Wildtyp-Mäuse.

Die Tiere wurden paarweise in Makrolon-Käfigen bei einer mittleren Raumtemperatur von $23 \pm 1^\circ\text{C}$, einer Luftfeuchte von 50 – 60% und einem 12h-Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Da es sich bei den LDLR^{-/-} Mäusen um gentechnisch veränderte Organismen handelte, wurden sie in den Versuchsterräumen der Sicherheitsstufe 1 (Biozentrum, Weinberg-Campus, Universität Halle-Wittenberg) untergebracht. Den Tieren standen Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Körpergewicht, Körpermasseentwicklung und Futteraufnahme wurden wöchentlich erfasst.

2.3.2 Probenahme

Die zuvor über Nacht genücherten Mäuse wurden im Alter von 20 bzw. 36 Wochen mit Ether betäubt, anschließend dekapitiert und das Vollblut in EDTA-Tubes aufgefangen. Das Blut wurde zur Plasmagewinnung für 20 min bei $1500 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C . Für die spätere Untersuchung atherosklerotischer Prozesse wurde von allen Tieren das Herz mit dem aufsteigenden Teil des Aortenbogens, die Arteria brachiocephalica sowie Arteria femoralis freipräpariert. Das Herz wurde mit NaCl gespült, das Organ sowie die Gefäße nach Reinigung von anhaftendem Gewebe entfernt und im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Weiterhin wurden die Femura der Tiere entnommen und gereinigt. Anschließend wurden alle Proben bei -80°C bis zum Beginn der Analysen gelagert.

2.3.3 Analytik

Im Rahmen dieses Versuchs sollten vorwiegend histologische und immunhistochemische Analysen im Bereich der Aortenwurzel durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang erfolgte entsprechend Kapitel 2.4.4.2 sowohl die histologische Bestimmung der Größe der Plaqueablagerungen bei LDLR^{-/-} Mäusen sowie deren Zusammensetzung aus Kollagen, Fett, und Kalk als auch eine Untersuchung vaskulärer Veränderungen bei WT-Tieren. Des Weiteren wurde in Aorta, Arteria brachiocephalica und Arteria femoralis ebenfalls der Kalkanteil analysiert. Außerdem sollten nach Kapitel 2.4.4.3 im Bereich der Aortenwurzel immunhistochemisch inflammatorische Parameter sowie die Expression der Osteoblastendifferenzierungsfaktoren untersucht werden. In der Aorta sowie im Knochen (2.4.4.4) wurde ebenfalls ein Osteoblastendifferenzierungsfaktor untersucht. Zur Analyse möglicher Koloalationen von glatten Muskelzellen und der Alkalischen Phosphatase erfolgten im Bereich der Aortenwurzel Immunfluoreszenzmessungen (2.4.4.5). Weiterhin wurden auch im Bereich anderer Herzklappen Bestimmungen bezüglich der Kalzifizierung durchgeführt. Verschiedene Vitamin D-Metabolite (2.4.1) sowie die Konzentrationen an Calcium und anorganischem Phosphat (2.4.2) im Plasma wurden ebenfalls ermittelt.

2.3.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der MINITAB-Software (Minitab, State College, PA, USA) und mit SPSS 20 (IBM, Armonk, NY, USA). Die Daten wurden mittels Two-Way ANOVA bezüglich Vitamin D-Effekte (+D vs. -D), Genotyp (WT vs. LDLR^{-/-} Mäuse) und deren Interaktion bei den 16 Wochen gefütterten Tieren verrechnet. Two-Way ANOVA wurde außerdem bei der Ermittlung der Vitamin D-Effekte (+D vs. -D) in Verbindung mit der Fütterungsdauer (16 vs. 32 Wochen) bei den LDLR^{-/-} Mäusen verwendet. Auch die statistische Analyse der Vitamin D-Effekte im ersten und zweiten Fütterungszeitraum sowie deren Interaktion wurde mittels Two-Way ANOVA bei den 32 Wochen gefütterten Tieren durchgeführt. Die Werte wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichungen dargestellt. Wenn die Two-Way ANOVA signifikante Effekte ergab, erfolgte ein Posthoc-Vergleich. In Fall einer Varianzhomogenität wurden die Mittelwerte der 4 Gruppen mit dem *Fisher's*-Test zum multiplen Mittelwertsvergleich, im Fall von Varianzheterogenität mit dem *Games-Howell*-Test verglichen. Der Vergleich der zwei 16 Wochen gefütterten WT- bzw. LDLR^{-/-} Gruppen erfolgte jeweils mit dem *Student's* t-Test. Mittelwerte galten als signifikant unterschiedlich bei $P \leq 0,05$.

2.4 Analysemethoden

2.4.1 Bestimmung der Vitamin D-Metabolite im Plasma

25(OH)D₃ und 24,25(OH)₂D₃

Die Analyse der 25(OH)D₃- und 24,25(OH)₂D₃-Konzentration erfolgte mittels LC-MS/MS (*liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*). Dazu wurde das EDTA-Plasma zunächst bei 8°C im Thermomixer langsam aufgetaut, 50 µl Plasma anschließend mit 50 µl deuteriertem, internen Standard (25 µg/L, 25(OH)D₃-d₆, Chemaphor Inc., Ottawa, Kanada) in Acetonitril (ACN) versetzt und 30 sec gevortext. Durch die Zugabe von ACN erfolgte eine Denaturierung der Proteine. Nach einer Zugabe von 400 µl n-Hexan zur Extraktion wurden die Proben mit Hilfe des Tissue Lyser bei 15 Hz zwei Minuten gut durchmischt, 5 min bei 13 000 x g zentrifugiert und die obere, organische Phase abpipettiert. Die Extraktion wurde ein weiteres Mal wiederholt, die Überstände vereinigt und abschließend in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockene eingengt. Durch Zugabe von 50 µl einer PTAD (4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion)-Lösung (0,15 g/L ACN) wurden die Rückstände derivatisiert. Danach erfolgte eine Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln und anschließend bei 4°C über Nacht. Nach der Derivatisierungszeit wurden alle Proben mit 20 µl Ethanol versetzt, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockene eingengt. Die Rückstände wurden mit 32 µl Methanol gelöst und in ein Insert überführt,

in dem bereits 8 µl Laufmittel (1 mM Methylamin in Methanol + 10 mM Ammoniumformiat (60 + 40)) vorgelegt waren. Nachdem die Proben gemischt waren, erfolgte die Messung mit dem HPLC-System (Agilent 1100, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland), ausgerüstet mit einer Hypersil ODS-Säule 100 x 2 mm², 5 µm (Agilent Technologies), gekoppelt mit einem MS-System (API 2000, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Als Standard für die 24,25(OH)₂D₃-Bestimmung wurden versetzte Plasmaproben verwendet. Zur Qualitätskontrolle der 25(OH)D₃-Quantifizierung wurde das 3Plus1^R Multilevel-Serum-Kalibratorset 25-OHD₃/D₂ (Chromsystems, München, Deutschland) eingesetzt, das vom *National Institute of Standards and Technology* (NIST) als Standardreferenzmaterial (SRM) 972 für Vitamin D entwickelt wurde. Der Variationskoeffizient innerhalb der Untersuchung lag für 25(OH)D₃ unter 5%, basierend auf 2 Plasmakontrollen (16,7 und 38,4 µg/L, n = 4) und für 24,25(OH)₂D₃ bei 8,8% und 5,6% (5 und 10 µg/L, n = 5).

1,25(OH)₂D₃

Die Plasmakonzentration an 1,25(OH)₂D₃ wurde mittels kommerziellem ELISA-Kit (IDS, Boldon, UK) nach Herstellervorgaben ermittelt.

Zunächst werden 120 µl der gepoolten Proben mit 12 µl Delipidationsmittel entfettet. Anschließend erfolgt ein Immunextraktionsverfahren, um immungereinigte Proben (100 µl) zu erhalten. Zur Bestimmung von 1,25(OH)₂D₃ werden 100 µl primärer Antikörper zu den Proben zugegeben und über Nacht (16 – 20h) bei 4°C inkubiert. Anschließend werden 150 µl dieser Lösung in eine antikörperbeschichtete Platte überführt und 90 min bei RT im Kreisschüttler (500 – 750 Umdrehungen) inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl 1,25D-Biotinlösung wiederholt sich dieser Inkubationsschritt für weitere 60 min. Nach einem Waschschrift wird 200 µl Enzymkonjugat zugegeben und die Platte bei RT für 30 min inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift werden 200 µl TMB-Substrat zugegeben und wiederum 30 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 100 µl Stopplösung und die Absorptionsmessung am Plattenreader (SpectraFluor Plus, TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland) bei 450 nm.

2.4.2 Bestimmung der Konzentrationen von Calcium, Gesamtphosphor und anorganischem Phosphat im Plasma und im Femur

Calcium und Gesamtphosphor

Die Konzentration an Calcium im Plasma und in den Femura sowie an Gesamtphosphor (organisch und anorganisch) in den Femura wurde mittels ICP-OES (*inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, Varian 715-ES ICP Optical Emission Spectrometer, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA; ICP Expert II Varian

715-ES Instrument Software, Version 1.1.3) unter Verwendung von Argon als Trägergas bestimmt. Vor der Analyse der Calcium- und Phosphorkonzentration bei festgelegten Wellenlängen (Calcium: 317,933 + 315,877 nm; Phosphor: 213,618 + 214,914 nm) wurden die Knochen im Muffelofen bei 550°C verascht und in HCl und HNO₃ entsprechend der VDLUFA-Methode (Bassler und Buchholz 1993) gelöst. Nach dem Eindampfen wurden die Mineralstoffe in destilliertem Wasser gelöst, filtriert und in das ICP-OES-System injiziert.

Anorganisches Phosphat

Die Plasmakonzentration an anorganischem Phosphat wurde spektrophotometrisch mittels Fluitest PHOS® (Analyticon Biotechnologies AG, Lichtenfels, Deutschland) bestimmt. Dabei erfolgt eine Reaktion des anorganischen Phosphats mit Ammoniummolybdat zu Ammoniumphosphomolybdat in schwefelsaurer Lösung. Dieser Ammoniumphosphomolybdat-Komplex kann im ultravioletten Licht (340 nm) gemessen werden. Zur Bestimmung werden 7,5 µl Probe bzw. Standard (= R4; Phosphatstandard) mit 750 µl Reagenzlösung aus den Bestandteilen R1 und R2 (Verhältnis 1:1) vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt die spektrometrische Messung (Spektrophotometer: Ultrospec 2000, Pharmacia, Cambridge, England) gegen den Reagenzienleerwert bei 340 nm. Die Konzentration an anorganischem Phosphat der Proben wurde mithilfe folgender Formel berechnet.

$$\text{Konzentration [mmol/L]} = (\Delta E \text{ Probe} / \Delta E \text{ Standard}) * \text{Konzentration Standard [mmol/L]}$$

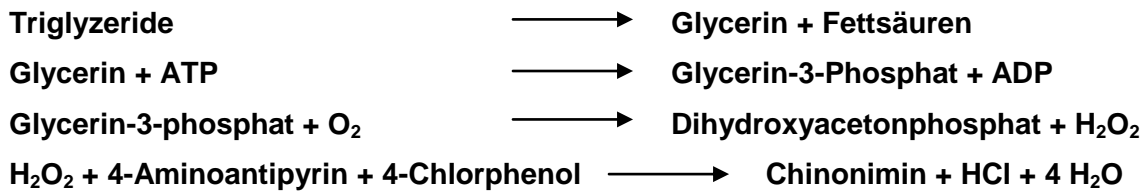
2.4.3 Bestimmung der Triglyzerid- und Cholesterinkonzentration im Plasma

Zur Messung der Triglyzerid- und Cholesterinkonzentrationen im Plasma wurden kommerzielle enzymatische Testkits (DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim, Deutschland) eingesetzt.

Triglyzeride

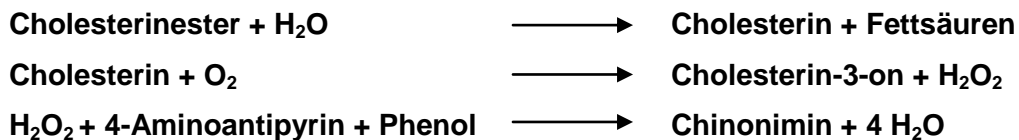
Die Bestimmung der Triglyzeridkonzentration erfolgte nach der „CPO-PAP“-Methode, einem enzymatischen, photometrischen Test unter Verwendung von Glycerin-3-Phosphat-Oxidase, mithilfe des Testkits Ecoline®S+. Hierbei wurden zuerst die in der Probe vorhandenen Triglyzeride durch die Lipoproteinlipase einer enzymatischen Hydrolyse unterzogen. Das entstandene Glycerin wurde dann mithilfe der Glycerokinase unter ATP-Verbrauch zu Glycerin-3-Phosphat phosphoryliert und im nächsten Reaktionsschritt einer Oxidation durch die Glycerin-3-Phosphat-Oxidase unterzogen. Hierbei entsteht neben Dihydroxyacetonphosphat Wasserstoffperoxid, welches nun mit 4-Aminoantipyrin und 4-Chlorphenol mithilfe der katalytischen Wirkung der Peroxidase zu Chinonimin,

Salzsäure und Wasser reagiert. Das Chinonimin ist auch bei dieser Reaktion der kolorimetrische Indikator, welcher die spätere photometrische Bestimmung ermöglicht.



Cholesterin

Die Bestimmung der Cholesterinkonzentration in den Zellen erfolgte nach der „CHOD-PAP“-Methode, einem enzymatischen, photometrischen Test, mithilfe des Testkits Ecoline®S+. Hierbei wurden zuerst die in der Probe vorhandenen Cholesterinester durch die Cholesterinesterase einer enzymatischen Hydrolyse unterzogen. Das entstandene Cholesterin oxidiert mithilfe der Cholesterinoxidase im nächsten Reaktionsschritt zu Cholesterin-3-on. Als weiteres Reaktionsprodukt entsteht Wasserstoffperoxid, welches anschließend mit 4-Aminoantipyrin und Phenol durch die katalytische Wirkung der Peroxidase zu Chinonimin und Wasser reagiert (Trinder-Reaktion). Das Chinonimin ist bei dieser Reaktion der kolorimetrische Indikator, welcher die spätere photometrische Bestimmung ermöglicht.



Zur Triglyzerid- und Cholesterinbestimmung wurden 7,5 µl Plasma mit 750 µl Reagenzlösung versetzt. Nach dem Mischen und einer Inkubationszeit von 10 bzw. 20 min bei RT wurde die Extinktion bei 500 nm gegen den Reagenzienleerwert spektrometrisch (Spektrophotometer: Ultrospec 2000, Pharmacia, Cambridge, England) gemessen. Zur Quantifizierung wurden spezifische Kalibratoren für das Plasma (HV-Kalibrator, DiaSys, Holzheim, Deutschland) verwendet. Die Konzentration an Triglyzeriden bzw. Cholesterin der Proben wurde mithilfe folgender Formel berechnet.

$\text{Konzentration [mmol/L]} = (\Delta E \text{ Probe} / \Delta E \text{ Kalibrator}) * \text{Konzentration Kalibrator [mmol/L]}$

2.4.4 Analyse der Plaqueszusammensetzung und Veränderungen im Bereich der Herzklappe

2.4.4.1 Präparation des Probematerials

Nach der Tötung der Tiere erfolgte eine Inzision der oberen Hohlvene mit nachfolgender Injektion einer 0,9%igen NaCl-Lösung über den linken Ventrikel, um den Blutkreislauf zu

spülen. Mithilfe eines Stereomikroskops (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) wurde das Herz freipräpariert und mit einem Schnitt zwischen Aortenwurzel und Brachiozephalarterie herausgetrennt. Nachdem die Herzen in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden, erfolgte eine Lagerung bei -80°C. Im Rahmen des 3. Versuchs wurden zusätzlich Arteriae brachiocephalica und femoralis freipräpariert, entnommen, im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Charakterisierung und Quantifizierung des Kalzifizierungsprozesses sowie atherosklerotischer Läsionen wurden 7 µm dicke Gefrierschnitte (CM 1850 UV Mikrotom, Jung, Leica) von der Aorta, der Aortenwurzel, den Arteriae brachiocephalica und femoralis sowie in der Ebene des linken Ventrikels mit Anschnitten der Mitral- und Trikuspidalklappe angefertigt. Hierfür wurde der kaudale Teil des Herzens sowie die Gefäße in Einbettmedium (*tissue freezing medium*®, Jung; Leica Instruments, Nussloch, Deutschland) platziert und bei -25°C an einem Stempel angefroren. Die Platzierung des Herzens erfolgte so, dass von kranial her mit der Abnahme der Schnitte begonnen werden konnte. Als Nullpunkt für die Quantifizierung wurde das erstmalige Erscheinen aller 3 Aortenklappen der Aortenwurzel definiert. Für jede Färbung wurden 4 aufeinanderfolgende Schnitte auf einen Objektträger gezogen, fixiert und anschließend gefärbt bzw. für immunhistologische Untersuchungen verwendet. Die Tabellen 8, 9 und 10 zeigen eine Übersicht über die Verwendung der Gefrierschnitte im Bereich der Aortenwurzel der einzelnen Versuche. Eine nähere Beschreibung über die Färbemethoden und die immunhistochemischen Untersuchungen folgt auf den nächsten Seiten. Die histomorphologische Charakterisierung und Auswertung der Schnitte erfolgte mittels computergesteuerter Videotechnik am Mikroskop (Axiovert 200 Mikroskop; AxioCamMRc Kamera; Aviovision Rel. 4.8.2 Software; Carl Zeiss, Jena, Deutschland). Zur Auswertung wurden die Mittelwerte von je 4 Schnitten pro Färbung bzw. immunhistochemischer Bestimmung ermittelt.

Tabelle 8: Übersicht über die Aortenschnitte aus Versuch 1 für die histologischen und immunhistochemischen Analysen.

Entfernung vom Nullpunkt [μm]	Histologie/Immunhistochemie (IHC)	Nachweis von
0 - 28	von Kossa-Silberfärbung	Verkalkung
28 - 56	Bmp-2 (IHC)	Osteoblastendifferenzierung
56 - 84	Runx2 (IHC)	Osteoblastendifferenzierung
84 - 112	Msx2 (IHC)	Osteoblastendifferenzierung

Als Nullpunkt wurde das erstmalige Erscheinen aller 3 Aortenklappen der Aortenwurzel festgelegt.
Bmp, *bone morphogenetic protein*; Msx, *muscle segment homeobox*; Runx, *runt-related transcription factor*.

Tabelle 9: Übersicht über die Aortenschnitte aus Versuch 2 für die histologischen und immunhistochemischen Analysen.

Entfernung vom Nullpunkt [μm]	Histologie/Immunhistochemie (IHC)	Nachweis von
0 - 28	Hämalaun-Eosin	Übersichtsfärbung
28 - 56	CD68+ (IHC)	Plaquemakrophagen
56 - 84	SMC- α -Aktin (IHC)	glatte Muskelzellen
84 - 112	Bmp-2 (IHC)	Osteoblastendifferenzierung
112 - 140	Trichrom nach Mallory-Cason	Kollagen
140 - 154	Runx2 (IHC)	Osteoblastendifferenzierung
154 - 182	von Kossa-Silberfärbung	Verkalkung
182 - 196	Msx2 (IHC)	Osteoblastendifferenzierung
196 - 224	Ölrot-O	neutralen Lipide

Als Nullpunkt wurde das erstmalige Erscheinen aller 3 Aortenklappen der Aortenwurzel festgelegt.
Bmp, *bone morphogenetic protein*; CD, *cluster of differentiation*; Msx, *muscle segment homeobox*; Runx, *runt-related transcription factor*; SMC, *smooth muscle cell*.

Tabelle 10: Übersicht über die Aortenschnitte aus Versuch 3 für die histologischen und immunhistochemischen Analysen.

Entfernung vom Nullpunkt [μm]	Histologie/Immunhistochemie (IHC)/Immunfluoreszenz (IF)	Nachweis von
0 - 28	Hämalaun-Eosin	Übersichtsfärbung
28 - 42	SMC- α -Aktin/ALP (IF)	glatte Muskelzellen/Alkalische Phosphatase
42 - 70	von Kossa-Silberfärbung	Verkalkung
70 - 84	CD68+ (IHC)	Plaquemakrophagen
84 - 112	Trichrom nach Mallory-Cason	Kollagen
112 - 126	TNF- α (IHC)	Entzündung
126 - 154	Ölrot-O	neutralen Lipide
154 - 182	Bmp-2 (IHC)	Osteoblastendifferenzierung
182 - 210	Msx2 (IHC)	Osteoblastendifferenzierung
210 - 238	Runx2 (IHC)	Osteoblastendifferenzierung

Als Nullpunkt wurde das erstmalige Erscheinen aller 3 Aortenklappen der Aortenwurzel festgelegt.
ALP, *Alkalische Phosphatase*; Bmp, *bone morphogenetic protein*; CD, *cluster of differentiation*; Msx, *muscle segment homeobox*; Runx, *runt-related transcription factor*; TNF, *Tumornekrosefaktor*; SMC, *smooth muscle cell*.

2.4.4.2 Histologische Untersuchungen der Aortenwurzel und verschiedener Gefäße

Die Gefrierschnitte wurden vor der eigentlichen Färbung mit 10% Formol in Ethanol bzw. 10% Formol in destilliertem Wasser (a.d.) (für Ölrot-O) fixiert und 3mal in a.d. gespült.

Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung

Die klassische HE-Färbung wurde als Übersichtsfärbung durchgeführt. Dazu wurden die Zellkerne mit saurem Hämalaun 15 min nach Harris (Dr. K. Hollborn & Söhne GmbH & Co. KG, Leipzig, Deutschland) angefärbt. Zur anschließenden Differenzierung erfolgte ein Waschschrift für 10 min unter indirekt laufendem Leitungswasser. Nach dem Spülen in a.d. wurde das Plasma mit einer 0,1%igen Eosinlösung (Eosin: Dr. Hollborn & Söhne GmbH & Co.KG) 2 min gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte ein weiteres Mal in a.d. gespült und nach kurzem Trocknen mit Eukit (Eukit® *quick-hardening mounting medium*, Sigma-Aldrich) unter dem Abzug eingedeckt.

<p><u>Färbeergebnis:</u> Kerne: blau Zellplasma: hellrot</p>

Ölrot-O-Färbung

Zur Sichtbarmachung neutraler Lipide (Cholesterinester und Triglyzeride) wurden die Schnitte mit Ölrot-O (Sigma-Aldrich; Stammlösung: 0,5% in Isopropanol; Gebrauchslösung: 60%ig in a.d.) für 15 min gefärbt. Anschließend wurde die Färbelösung 3mal in a.d. abgespült und die Schnitte für 3 – 5 min in a.d. gewässert. Nach Lufttrocknung erfolgte das Eindecken mit Gelatine (Glycerin-Gelatine: Dr. Hollborn & Söhne GmbH & Co.KG).

<p><u>Färbeergebnis:</u> Lipide: kräftig rot</p>

Trichromfärbung nach Mallory-Cason

Für eine charakteristische Färbung der Kollagenstrukturen wurde eine Trichromfärbung durchgeführt. Nach einer Inkubation der Schnitte für einige Sekunden in der Färbelösung (in 100 ml a.d.: 0,5 g Phosphorwolframsäure (Sigma-Aldrich), 1 g Orange G (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland), 0,5 g Anilinblau (Carl Roth GmbH & Co. KG), 1,5 g Säurefuchsin (VWR International GmbH)) wurden die Schnitte gründlich in a.d. gespült. Nachdem die Schnitte luftgetrocknet waren, wurden sie mit Eukit unter dem Abzug eingedeckt.

<p><u>Färbeergebnis:</u> kollagenes + retikuläres Bindegewebe: scharf blau saure Mukossubstanzen: blau Erythrozyten: rot-orange Muskelgewebe: leuchtend orange Chromatin: rot bis gelblich bräunlich</p>

Von-Kossa-Silberfärbung

Zum Nachweis verkalkter Anteile in den Plaques wurde eine Silberfärbung der Schnitte durchgeführt. Hierzu wurden die Schnitte zunächst für 1h im Dunkeln in einer 5%igen wässrigen Silbernitrat-Lösung inkubiert. Nach 3-maligem Spülen in a.d. wurde das Silber mit einer Na₂CO₃-Formaldehyd-Lösung (5 g Na₂CO₃ in 75 ml a.d. und 25 ml Formaldehyd (37%)) für 2 min reduziert. Anschließend wurden die Schnitte 10 min unter indirekt fließendem Leitungswasser gespült. Zur Fixierung wurde danach eine 5%ige wässrige Natriumthiosulfat-Lösung für 5 min aufgetragen. Nach einem letzten Waschschriff für 10 min unter indirekt laufendem Wasser und kurzem Tauchen in a.d. wurden die Schnitte mit Säurefuchsin-Ponceau (= Goldner 1) 1 min gegengefärbt. Nach dem Lufttrocknen der Schnitte wurden sie unter dem Abzug mit Eukit eingedeckt.

Färbeergebnis: mineralisiertes Knorpel- + Knochengewebe: schwarz
Mineralisationsfronten: schwarz granuliert

2.4.4.3 Immunhistochemische Untersuchungen der Aortenwurzel und der Aorta

Zur immunhistochemischen Analyse der Aortenwurzel und der Aorta wurden die 7 µm dicken Gefrierschnitte zunächst für 10 min in -20°C kaltem Aceton fixiert. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Inkubation in 0,3% H₂O₂ in Methanol zur Blockade der endogenen Peroxidase. Nach einem Waschschriff wurden die Schnitte für 20 min bei Raumtemperatur mit 5% Blockierungsserum in PBS (*phosphate buffered saline*) blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem der in Tabelle 11 aufgeführten primären Antikörpern über Nacht bei 4°C. Nach einem weiteren Waschschriff am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit einem der in Tabelle 12 aufgeführten sekundären Antikörpern für 30 min bzw. 1h. Die Visualisierung des Immunokomplexes erfolgte mittels Diaminobenzidin-Chromogen (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland). Anschließend wurden die Schnitte mit der Hämatoxylin-Lösung nach Harris gegengefärbt und mit Aquatex (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt. Mit Hilfe der Axiovision Rel. 4.8.2 Software wurden die gefärbten Schnitte bezüglich Vorhandenseins und Intensität einer positiven Reaktion beurteilt.

Tabelle 11: Übersicht über verwendete primäre Antikörper für immunhistochemische Analysen.

Protein	Antikörper	Firma	Verdünnung
CD68+	rat anti mouse, monoclonal	AbD Serotec (Oxford, UK)	1:100
Bmp-2	rabbit polyclonal	Abcam (Cambridge, UK)	1:100
Msx2	rabbit polyclonal	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)	1:50
Runx2	rabbit polyclonal	Antibodies-online GmbH (Aachen, Deutschland)	1:50
SMC-α-Aktin	Monoclonal Anti-Actin, α-Smooth Muscle antibody produced in mouse	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)	1:200
TNF-α	rabbit polyclonal	Abcam (Cambridge, UK)	1:50

Bmp, *bone morphogenetic protein*; CD, *cluster of differentiation*; Msx, *muscle segment homeobox*; Runx, *runt-related transcription factor*; TNF, *Tumornekrosefaktor*; SMC, *smooth muscle cell*.

Tabelle 12: Übersicht über verwendete sekundäre Antikörper für immunhistochemische Analysen.

Antikörper	Firma	Verdünnung	Inkubationszeit
goat anti-rabbit, HRP	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, UK)	1:500	1 h
goat anti-rat IgG, HRP	AbD Serotec (Oxford; UK)	1:50	30 min
polyclonal rabbit anti mouse IgG, HRP	Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)	1:300	1 h

2.4.4.4 Immunhistochemische Untersuchung zur Osteoblastendifferenzierung im Knochen

Die Analyse der Femura der Mäuse des 3. Versuchs erfolgte durch Herrn Dr. Martin Schicht vom Institut für Anatomie, Abteilung II der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg in Erlangen, Deutschland. Es wurden 6 µm dicke Schnitte der Paraffin-eingebetteten Knochen hergestellt und unter den bereits beschriebenen Bedingungen (Claassen et al. 2011) präpariert. Die Inkubation der Schnitte erfolgte mittels spezifischen Antikörpern für Bmp-2 (primärer Antikörper: rabbit anti BMP2; Verdünnung 1:200 (Novus Biologicals, Cambridge, UK); sekundärer Antikörper: goat anti rabbit; Verdünnung 1:200 (Dako)). Zur Entwicklung wurde das AEC Substrat-Chromogen (Dako) verwendet. Rötlich gefärbte Areale zeigen eine positive Antikörperreaktion. Nach einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin wurden die Schnitte mit Aquatex eingedeckt. Mit Hilfe des Keyence Biorevo BZ9000 Mikroskop (Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) erfolgte die Visualisierung und histomorphometrische Charakterisierung der Schnitte.

2.4.4.5 Immunfluoreszenzanalysen der Aortenwurzel

Zur Untersuchung einer möglichen Kolo-kalisation verschiedener Proteine wurden die Schnitte der Aortenwurzel mit Hilfe doppelter Immunfluoreszenzfärbemethoden analysiert. Dazu wurden die 7 µm dicken Gefrierschnitte zunächst in 2% Paraformaldehyd (Carl Roth) in PBS fixiert und mit 5% BSA (bovines Serumalbumin, Sigma-Aldrich) in PBS blockiert. Anschließend folgte eine über Nacht Inkubation mit dem primären Antikörper gegen Alkalische Phosphatase (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) bei 4°C. Am nächsten Tag erfolgte eine 1-stündige Inkubation mit dem sekundären CY3TM-konjugierten donkey anti-goat IgG (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) sowie dem direkt fluoreszierenden anti-Aktin, α-smooth muscle-FITC Antikörper (Sigma-Aldrich). Die Schnitte wurden mit FluoromountTM Aqueous Mounting Medium (Sigma-Aldrich) eingedeckt. Alle Antikörper wurden in PBS-Puffer bestehend aus 1% BSA, 1% Eserserum (Dianova GmbH) und 0,3% Triton X-100 (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) gelöst. Mit Hilfe der Axiovision Rel. 4.8.2 Software wurden die Schnitte bezüglich Vorhandensein und Intensität einer positiven Reaktion beurteilt.

2.4.5 Bestimmung der relativen mRNA-Konzentration des Vitamin D-abhängigen Calbindin D_{9k}

Zur Analyse der relativen mRNA-Konzentration von Calbindin D_{9k} in der Aorta wurden die gespülten und von äußeren Anhaftungen befreiten Gesamtaorten eingesetzt. Die Gesamt-RNA wurde mit 200 µl Trizol™-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gemäß den Herstelleranweisungen isoliert. Das Gewebe wurde über 3 min im Tissue Lyser (Qiagen Retsch, Deutschland) bei 17,5 Hz homogenisiert. Nach Zugabe von 40 µl Chloroform wurde das Homogenat 15 sec gemischt und für 2 – 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 13 000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Die wässrige, obere, RNA-haltige Phase wurde abgenommen und mit 100 µl Isopropanol versetzt. Nach kurzem Mischen und 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 13 000 rpm und 4°C für 10 min. Vom resultierenden Pellet wurde der restliche Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen. Anschließend wurde die RNA mit 200 µl Ethanol (75% in DEPC (Diethylpyrrocarbonat, Sigma-Aldrich)-Wasser gewaschen. Dies erfolgte durch kurzes Vortexen der Proben und anschließender Zentrifugation bei 13 000 rpm und 4°C für 5 min. Danach wurden die Proben ca. 15 – 20 min getrocknet. Das RNA-Pellet wurde mit 20 µl DEPC-Wasser für 10 min im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 900 rpm und 60°C gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -80°C bis zur Konzentrationsbestimmung.

Die RNA-Konzentration wurde in einer 1:100 Verdünnung in DEPC-Wasser bei 260 nm photometrisch bestimmt (Spektrophotometer, Ultrospec 2000). Zur Bestimmung des Reinheitsgrades wurde der Quotient der Extinktionen bei 260 und 280 nm ermittelt.

Für die Einstrang-cDNA-Synthese (Mastercycler Personal, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 42°C für 60 min wurden 1,2 µg der isolierten Gesamt-RNA, Oligo-dT18-Primer (Operon Biotechnologies, Köln, Deutschland) und RevertAid M-MuLV reverse Transkriptase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) eingesetzt. Mittels *realtime* RT-PCR im Rotor Gene 2000 System (Corbett Research, Mortlake, Australien) wurde die mRNA-Konzentration von Calbindin D_{9k} in der Aorta bestimmt. Die *realtime* Detektion erfolgte mittels SYBR® Green I (Sigma-Aldrich), 1,25 U Taq DNA Polymerase (Promega, Mannheim, Deutschland), 500 µM dNTP und 26,7 pmol des spezifischen Primers für Calbindin D_{9k} (NM_009789.2; forward: 5' TCA CCT GCT GTT CCT GTC TG 3'; reverse: 5' TCG CCA TTC TTA TCC AGC TC 3'). Jeder PCR-Zyklus durchlief nach folgenden Schritten: (1) Denaturierung für 20 sec bei 95°C, (2) Annealing für 30 sec bei 60°C und (3) Elongation für 55 sec bei 72°C. Am Ende des Elongationsschrittes erfolgte die Intensitätsmessung des Fluoreszenzsignals bei allen Proben. Mittels RotorGene 4.6 Software (Corbett Research) wurde *threshold cycle* (Ct) und Amplifikationseffizienz aus der jeweiligen Amplifikationskurve ermittelt und die relative mRNA-Konzentration der Proben

berechnet, Zur Identifizierung der entstandenen PCR-Produkte wurde eine Schmelzkurve erzeugt und eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Zur Normalisierung und Quantifizierung von Calbindin D_{9k} wurde als Referenzgen β -Aktin (NM_007393.2; forward: 5' ACG GCC AGG TCA TCA CTA TTG 3'; reverse: 5' CAC AGG ATT CCA TAC CCA AGA AG 3') verwendet.

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde in der Gelelektrophorese-Apparatur (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) zur Überprüfung des PCR-Produktes hinsichtlich Spezifität, d.h. Qualität und Größe, durchgeführt. Zur Herstellung eines 1,5%igen Agarosegels wurden 1,5 g Agarose (Carl Roth) mit 100 ml des 1 x TAE-Laufpuffers (50 x TAE: 242 g Tris Base, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA; auf 1 L auffüllen, pH 8,0) versetzt und unter vorsichtigem Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen auf 65°C wurden zur Visualisierung 10 μ l Ethidiumbromid zugegeben. Nach wiederholtem vorsichtigem Schwenken wurde das Gel in die Gelkammer gegossen. Nach einer 30-minütigen Aushärtezeit wurde das Gel in den Laufpuffer getaucht und für weitere 30 min äquilibriert. Anschließend wurde jede Probe mit 5 μ l Gelladepuffer (5-fach konzentriert) versetzt und auf das Gel aufgetragen. 3,5 μ l einer 100 bp-DNA-Leiter diente als Größenmarker. Die Elektrophorese wurde bei einer angelegten Spannung von 80 – 100 V für 30 - 45 min durchgeführt. Durch die Einlagerung des Ethidiumbromids zwischen den DNA-Doppelstrang kommt es zum Leuchten im UV-Licht, welches nach erfolgter Auftrennung der Proben mittels einer Fotoeinrichtung (SynGene Gene Genius, Synoptics Inc., USA) photometrisch erfasst und durch die zugehörige Software GeneSnap ausgewertet wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss eines genetischen Vitamin D-Rezeptor-Mangels auf das vaskuläre System (Versuch 1)

3.1.1 Futteraufnahme und Körpermasse

Die Daten sind in Tabelle 13 dargestellt. Die Tiere wiesen beim Versuchsstart keinen Unterschied im Körpergewicht auf. Am Ende des Versuchs hatten die VDR^{-/-} Mäuse jedoch ein signifikant geringeres Körpergewicht ($P < 0,05$) als die WT-Tiere, unabhängig von der Diät. Die VDR^{-/-} Mäuse wiesen eine signifikant geringere Körpermassezunahme im Vergleich zu den beiden WT-Gruppen auf ($P = 0,001$), die nicht unterschiedlich zueinander waren. Die WT-Gruppe, die die *Rescue diet* erhielt hatte die höchste Futteraufnahme pro Tag im Vergleich zu den anderen Gruppen ($P < 0,05$), während sich die VDR^{-/-} Mäuse und die WT-Mäuse mit der normalen Diät nicht voneinander unterschieden.

Tabelle 13: Körpergewichte und Futteraufnahme von VDR^{-/-} und WT-Mäusen bei Fütterung einer *Rescue diet* (calcium- und phosphatreich; VDR^{-/-}, WT_{RD}) oder normalen Diät (normale Calcium- und Phosphatkonzentration, WT_{ND}) in einem 8-wöchigen Versuch.

	VDR ^{-/-}	WT _{RD}	WT _{ND}	P-Wert
Körpergewicht Start (g)	15,8 ± 2,7	14,6 ± 1,2	14,7 ± 1,0	0,327
Körpergewicht Ende (g)	22,9 ± 3,3 ^b	26,1 ± 1,5 ^a	25,2 ± 1,5 ^a	0,023
Körpermassezunahme (g/Tier/d)	0,14 ± 0,05 ^b	0,22 ± 0,02 ^a	0,21 ± 0,02 ^a	0,001
Futteraufnahme (g/Tier/d)	2,66 ± 0,18 ^b	2,86 ± 0,14 ^a	2,66 ± 0,17 ^b	0,037

Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichungen dargestellt, n = 6 – 9 pro Gruppe.

ND, normale Diät; RD, *Rescue diet*; VDR^{-/-}, Vitamin D-Rezeptor-*knockout*; WT, Wildtyp.

^{a,b} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ($P < 0,05$, Fisher's Test).

3.1.2 Histologische Quantifizierung vaskulärer Veränderungen in der Aortenwurzel

Bei der Präparation und Bearbeitung der Aortenwurzel und der Anfertigung der histologischen Schnitte konnte bereits festgestellt werden, dass die Aortenproben der VDR^{-/-} Mäuse viel instabiler und damit fragiler waren als die der WT-Tiere. Bei allen Tieren dieses Versuchs konnten keine atherosklerotischen Veränderungen in den Querschnittsproben der Aortenwurzel festgestellt werden. Bei der histologischen Untersuchung der Kalzifizierung der Aortenklappe mittels von Kossa-Silberfärbung zeigte sich, dass die VDR^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen signifikant mehr Verkalkung aufwiesen (Abbildung 4). Im Vergleich zu den WT_{RD}-Tieren hatten die VDR^{-/-} Mäuse dabei eine um das 4,7-fach und im Vergleich zu den WT_{ND}-Mäusen eine um das 2,6-fach erhöhte Kalzifizierung ($P = 0,001$; Abbildung 4A und B), bevorzugt in den Klappenarealen. Die beiden WT-Gruppen unterschieden sich dabei nicht signifikant voneinander. Bei der

Untersuchung der Anzahl an Kalzifizierungsspots konnte des Weiteren nachgewiesen werden, dass bei $VDR^{-/-}$ Mäusen die Spotzahl in den Schnitten der Aortenwurzel im Vergleich zu den WT-Mäusen deutlich erhöht war (Abbildung 4C). Diese vermehrte Spotanzahl bei den $VDR^{-/-}$ Mäuse setzt sich zusammen aus einer höheren Zahl an kleinen ($< 10 \mu\text{m}^2$), mittleren ($10 - 100 \mu\text{m}^2$) und großen ($> 100 \mu\text{m}^2$) Spots im Vergleich zu den beiden WT-Gruppen.

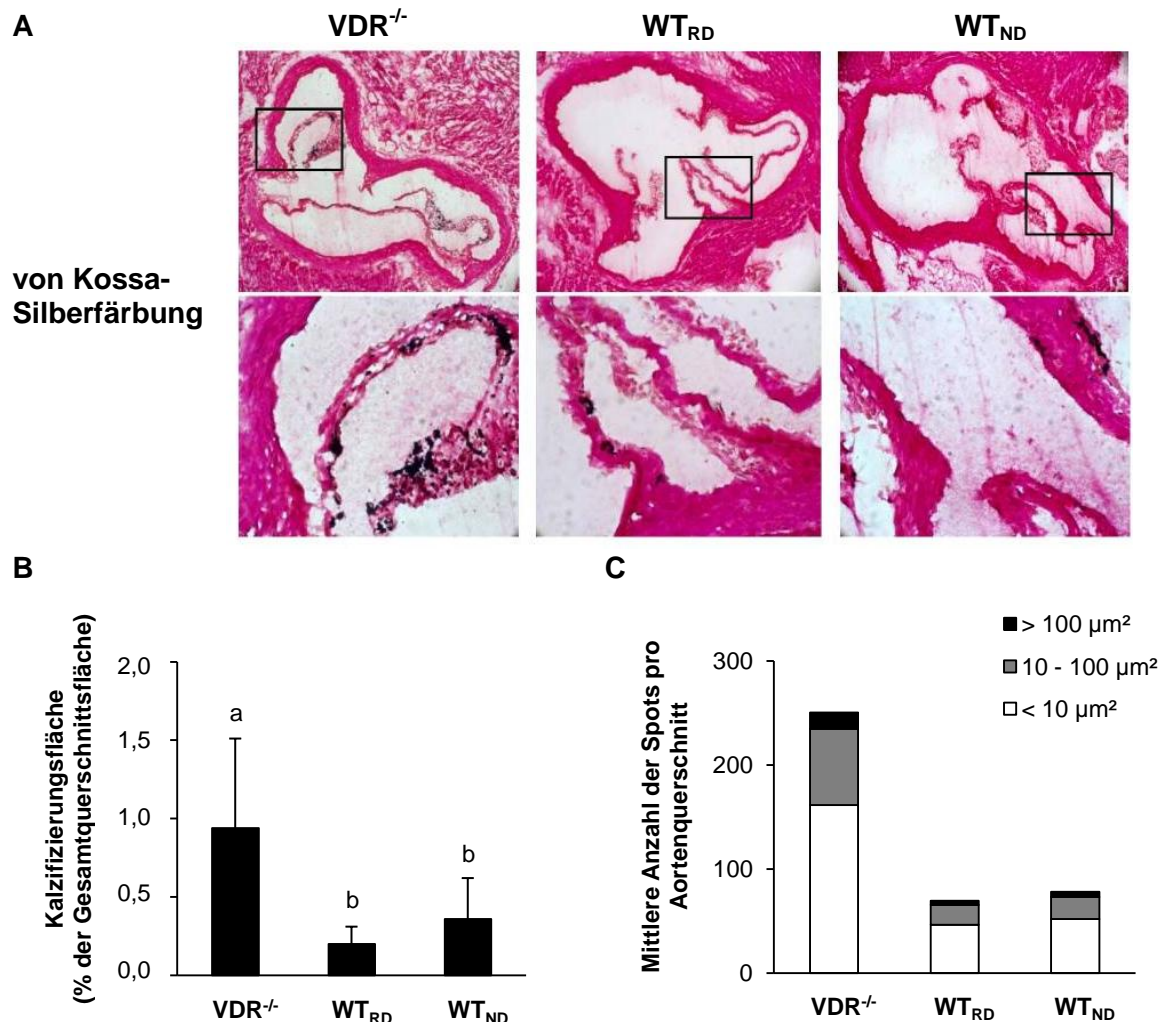


Abbildung 4: Nachweis vermehrter Kalzifizierung im Bereich der Aortenwurzel bei $VDR^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen nach 8-wöchiger Fütterung einer *Rescue diet* (RD) oder normalen Diät (ND).

(A) Repräsentative, von Kossa gefärbte Gefrierschnitte der Aortenwurzel von Vitamin D-Rezeptor-*knockout* ($VDR^{-/-}$)- und Wildtyp (WT)-Mäusen nach 8-wöchiger Fütterung einer *Rescue diet* (RD, calcium- und phosphatreich) und von Wildtyp-Mäusen nach Fütterung einer normalen Diät (ND, normale Calcium- und Phosphatkonzentration) (10fache Vergrößerung). Die unteren Abbildungen zeigen eine Vergrößerung der in den oberen Darstellungen markierten Bereiche. (B) Relative Kalzifizierungsfläche (% der Gesamtquerschnittsfläche) der Aortenwurzelquerschnitte. (C) Mittlere Anzahl an kleinen, mittleren und großen Kalzifizierungsspots in den Aortenwurzelquerschnitten. Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen dargestellt, $n = 6-9$ pro Gruppe. ^{a,b} Balken mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ($P = 0,001$).

3.1.3 Immunhistochemische Analyse zur Expression von Osteoblastendifferenzierungsfaktoren in der Aortenwurzel

Zur Untersuchung möglicher, zugrundeliegender Mechanismen der Vitamin D-Mangel-induzierten Kalzifizierung erfolgte eine immunhistochemische Charakterisierung der Osteoblastendifferenzierungsfaktoren. Wie in Abbildung 5 dargestellt, wiesen $VDR^{-/-}$ Mäuse im Vergleich zu den WT-Gruppen eine 3- bis 6-fach höhere Expression von Bmp-2 ($P < 0,001$), Msx2 ($P < 0,001$) und Runx2 ($P < 0,001$) auf. Zwischen den beiden WT-Gruppen WT_{RD} und WT_{ND} konnte bezüglich der Proteinspiegel dieser drei Osteoblastendifferenzierungsfaktoren kein Unterschied nachgewiesen werden.

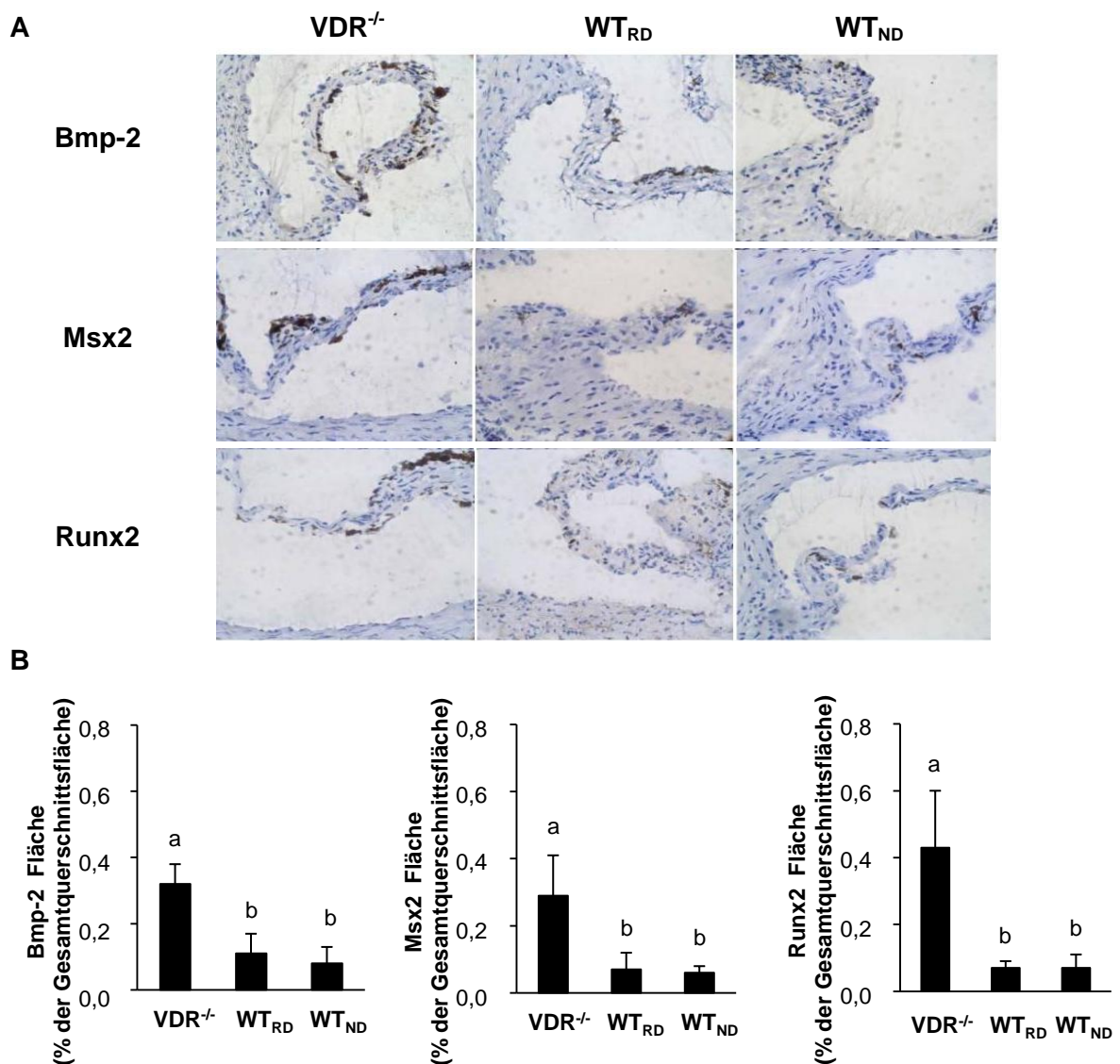


Abbildung 5: Nachweis einer vermehrten Expression von Osteoblastendifferenzierungsfaktoren im Bereich der Aortenwurzel bei $VDR^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen nach 8-wöchiger Fütterung einer *Rescue diet* (RD) oder normalen Diät (ND).

(A) Repräsentative, immunhistochemisch für Bmp-2, Msx2 und Runx2 gefärbte Gefrierschnitte der Aortenwurzel von Vitamin D-Rezeptor-*knockout* ($VDR^{-/-}$)- und Wildtyp (WT)-Mäusen nach 8-wöchiger Fütterung einer *Rescue diet* (RD, calcium- und phosphatreich) und von Wildtyp-Mäusen nach Fütterung einer normalen Diät (ND, normale Calcium- und Phosphatkonzentration) (10fache Vergrößerung). (B) Relative Fläche der immunhistochemisch positiv markierten Areale (% der Gesamtquerschnittsfläche) der Aortenwurzelsschnitte. Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen dargestellt, $n = 6 - 9$ pro Gruppe. ^{a,b} Balken mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ($P < 0,001$). Bmp, *bone morphogenetic protein*; Msx, *muscle segment homeobox*; Runx, *runt-related transcription factor*.

3.1.4 Konzentrationen an Calcium, Gesamtphosphor und anorganischem Phosphat im Plasma

Im Rahmen dieses Versuchs sollten außerdem wichtige, mit der Verkalkung assoziierte Plasmaparameter untersucht werden. Dazu wurden die zirkulierenden Plasmaspiegel an Calcium, Gesamtphosphor und anorganischem Phosphat bestimmt. Die Plasmakonzentration an Calcium war bei den VDR^{-/-} Mäusen signifikant geringer als bei den WT-Tieren (VDR^{-/-}: $1,77 \pm 0,24$ mmol/L; WT_{RD}: $2,28 \pm 0,04$ mmol/L; WT_{ND}: $2,30 \pm 0,07$ mmol/L; P<0,001). Die Plasmaspiegel an Calcium waren zwischen den beiden WT-Gruppen nicht unterschiedlich. Die Konzentration an Gesamtphosphor, bestehend aus organischem und anorganischem Anteil, war bei den VDR^{-/-} Mäusen signifikant höher als bei den WT-Mäusen mit normaler Calciumdiät (ND), jedoch nicht unterschiedlich zur WT-Gruppe mit der *Rescue diet* (RD) (VDR^{-/-}: $6,37 \pm 0,25$ mmol/L; WT_{RD}: $6,12 \pm 0,44$ mmol/L; WT_{ND}: $5,62 \pm 0,67$ mmol/L; P<0,05). Die Plasmakonzentration an anorganischem Phosphat, als einen der wichtigsten Kalzifizierungs-relevanten Plasmamarkern, war im Gegensatz zum Gesamtphosphor nicht unterschiedlich zwischen den drei Gruppen (VDR^{-/-}: $1,69 \pm 0,26$ mmol/L; WT_{RD}: $1,63 \pm 0,32$ mmol/L; WT_{ND}: $1,69 \pm 0,19$ mmol/L).

3.2 Einfluss eines alimentären Vitamin D-Mangels auf die Atherosklerose bei LDL-Rezeptor-*knockout*-Mäusen (Versuch 2)

3.2.1 Futteraufnahme und Körpermasse

Der Vergleich der Daten zu Körpergewichten und Futteraufnahme der LDLR^{-/-} Mäuse im Rahmen eines 16-wöchigen Fütterungsversuches ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den 3 Behandlungsgruppen, die unterschiedliche Vitamin D-Konzentrationen über ihre Diät erhielten (Tabelle 14). Lediglich bei der Körpermassezunahme ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (P<0,05), wobei die Tiere mit unzureichender Vitamin D-Versorgung die stärkste Zunahme aufwiesen, sich aber nur zur reichlich, jedoch nicht zur adäquat mit Vitamin D-versorgten Gruppe unterschieden. Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen den 3 Gruppen bezüglich des Endgewichts der Tiere.

Tabelle 14: Körpergewichte und Futtermittelaufnahme von LDLR^{-/-} Mäusen, die über 16 Wochen mit einer *Western diet* gefüttert wurden, die unterschiedliche Konzentrationen an Vitamin D₃ enthielt.

	alimentäre Vitamin D-Versorgung (IU/kg Diät)			P-Wert
	50	1.000	10.000	
Körpergewicht Start (g)	16,5 ± 1,5	16,5 ± 1,0	16,5 ± 1,0	1,000
Körpergewicht Ende (g)	28,9 ± 1,7	27,9 ± 2,9	26,8 ± 2,2	0,124
Körpermassenzunahme (g/Tier/d)	0,13 ± 0,02 ^a	0,12 ± 0,03 ^{ab}	0,10 ± 0,02 ^b	0,021
Futtermittelaufnahme (g/Tier/d)	2,31 ± 0,16	2,18 ± 0,18	2,13 ± 0,14	0,146

Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichungen dargestellt, n = 6 – 9 pro Gruppe.

^{a,b} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander (P < 0,05, Fisher's Test).

3.2.2 Konzentration der Vitamin D-Metabolite im Plasma

Zur Untersuchung des Vitamin D-Status wurden die Plasmakonzentrationen an 25(OH)D₃, 24,25(OH)₂D₃ und 1,25(OH)₂D₃ bestimmt (Abbildung 6). Wie erwartet, wurden die Parameter stark durch die Vitamin D-Konzentrationen der Diäten beeinflusst (P < 0,001). Die geringsten Konzentrationen an 25(OH)D₃ und 24,25(OH)₂D₃ wiesen die Mäuse mit der unzureichenden Vitamin D-Versorgung über die Diät auf, gefolgt von den Mäusen mit adäquater Vitamin D-Versorgung. Die höchsten Plasmaspiegel beider Metabolite konnten in der reichlich mit Vitamin D-versorgten Gruppe nachgewiesen werden. Die höchsten zirkulierenden Spiegel an 1,25(OH)₂D₃ wiesen die adäquat mit Vitamin D-versorgten Tiere auf, während, im Vergleich dazu, eine unzureichende sowie eine reichliche Vitamin D-Zufuhr mit signifikant geringeren 1,25(OH)₂D₃-Plasmakonzentrationen verbunden war (P < 0,05).

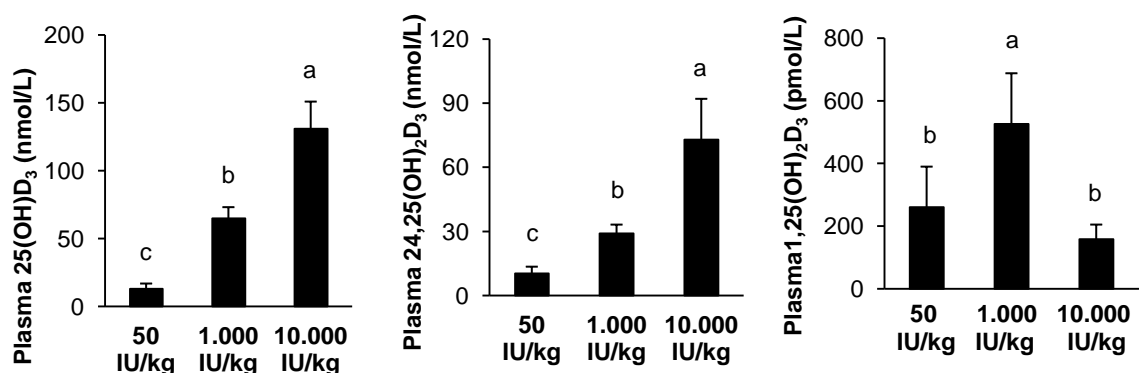


Abbildung 6: Bestimmung des Vitamin D Status von LDLR^{-/-} Mäusen in Abhängigkeit von der Vitamin D-Versorgung über die Diät.

Plasmakonzentrationen an 25(OH)D₃, 24,25(OH)₂D₃ und 1,25(OH)₂D₃ von LDLR^{-/-} Mäusen, die über 16 Wochen mit einer *Western diet* gefüttert wurden, die entweder geringe (50 IU/kg), adäquate (1.000 IU/kg) oder reichliche (10.000 IU/kg) Mengen an Vitamin D₃ enthielt. Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichungen von 4 Proben pro Gruppe (Pool aus 3 Einzelproben) für die Bestimmung von 1,25(OH)₂D₃ und 12 Mäusen pro Gruppe für alle anderen Analysen dargestellt. ^{a,b,c} Balken mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander (P < 0,05).

3.2.3 Histologische Quantifizierung atherosklerotischer Veränderungen in der Aortenwurzel

Bei der Untersuchung der Atherosklerose-Entwicklung bei den LDLR^{-/-} Mäusen konnte bei allen Gruppen eine fortgeschrittene, schwere atherosklerotische Läsion festgestellt werden. Dabei waren 35 – 38% des Querschnitts der Aortenwurzel von Plaques befallen (Tabelle 15). Die Vitamin D-Konzentrationen der Diäten hatten dabei keinen Einfluss auf die Plauegrößen. Auch der Kollagen- und Lipidanteil in den Plaques war von der Vitamin D-Versorgung der Tiere unbeeinflusst.

Tabelle 15: Relative Fläche an atherosklerotischen Plaques sowie dessen Kollagen- und Lipidanteil in den Gefrierschnitten im Bereich der Aortenwurzel von LDLR^{-/-} Mäusen, die über 16 Wochen mit einer *Western diet* gefüttert wurden, die unterschiedliche Konzentrationen an Vitamin D₃ enthielt.

	alimentäre Vitamin D-Versorgung (IU/kg Diät)			P-Wert
	50	1.000	10.000	
atherosklerotische Plaques				
Fläche (%)	34,8 ± 7,5	36,1 ± 8,5	37,6 ± 6,0	0,687
Kollagenanteil (%)	59,9 ± 5,0	57,8 ± 12,9	55,8 ± 6,4	0,559
Lipidanteil (%)	11,3 ± 2,3	11,4 ± 1,8	11,5 ± 2,4	0,987

Dagegen konnten signifikante Unterschiede bezüglich der Kalzifizierung zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt werden (Abbildung 7A - C). LDLR^{-/-} Mäuse mit unzureichender Vitamin D-Versorgung über die Diät wiesen signifikant größere kalzifizierte Areale im Vergleich zu adäquater oder reichlicher Vitamin D-Gabe (+ 58% bzw. 120%; P<0,001; Abbildung 7B) auf. Mäuse mit reichlicher Vitamin D-Gabe zeigten eine tendenziell, um 28% geringere Kalzifizierung als Mäuse mit adäquater Vitamin D-Zufuhr (P<0,10). Bei der Bestimmung der Anzahl an Kalzifizierungssots konnten deutlich mehr dieser Spots bei unzureichender Vitamin D-Versorgung über die Diät im Vergleich zu adäquater oder reichlicher Vitamin D-Gabe festgestellt werden. Dabei waren sowohl die kleinen (< 10 µm²) als auch die mittleren (10 – 100 µm²), jedoch nicht die großen (> 100 µm²) Spots vermehrt nachweisbar (Abbildung 7C).

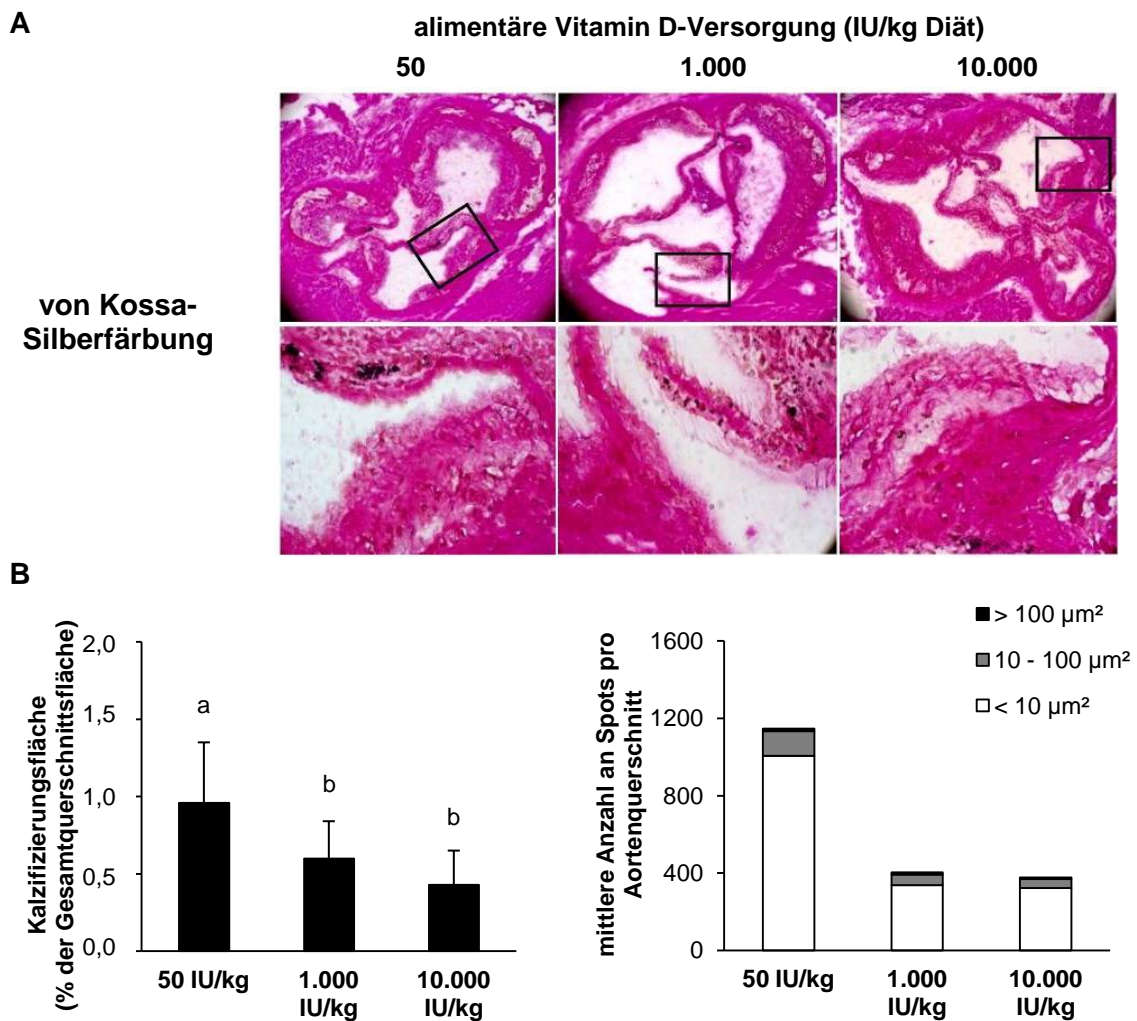


Abbildung 7: Nachweis einer vermehrten Kalzifizierung bei LDLR^{-/-} Mäusen mit unzureichender Vitamin D-Versorgung über die Diät.

(A) Repräsentative, von Kossa gefärbte Gefrierschnitte der Aortenwurzel von LDLR^{-/-} Mäusen, die über 16 Wochen mit einer *Western diet* gefüttert wurden, die entweder geringe (50 IU/kg), adäquate (1.000 IU/kg) oder reichliche (10.000 IU/kg) Mengen an Vitamin D₃ enthielt (10fache Vergrößerung). Untere Abbildungen zeigen eine Vergrößerung der in den oberen Darstellungen markierten Bereiche. (B) Relative Kalzifizierungsfläche (% der Gesamtquerschnittsfläche) der Aortenwurzelschnitte. (C) Mittlere Anzahl an kleinen, mittleren und großen Kalzifizierungsspoten in den Aortenwurzelschnitten. Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichungen dargestellt, n = 12 pro Gruppe. ^{a,b} Balken mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander (P = 0,001).

3.2.4 Immunhistochemische Analyse der Plaquezusammensetzung und der Expression von Osteoblastendifferenzierungsfaktoren in der Aortenwurzel

Im Rahmen der Untersuchung der Plaquezusammensetzung im Zusammenhang mit der Vitamin D-Versorgung der LDLR^{-/-} Mäuse wurden die Anteile an glatten Muskelzellen und Makrophagen bestimmt (Abbildung 8A). Bei beiden Plaquemarkern konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen und somit kein Einfluss der Vitamin D-Konzentrationen der Diäten festgestellt werden (Abbildung 8B und C).

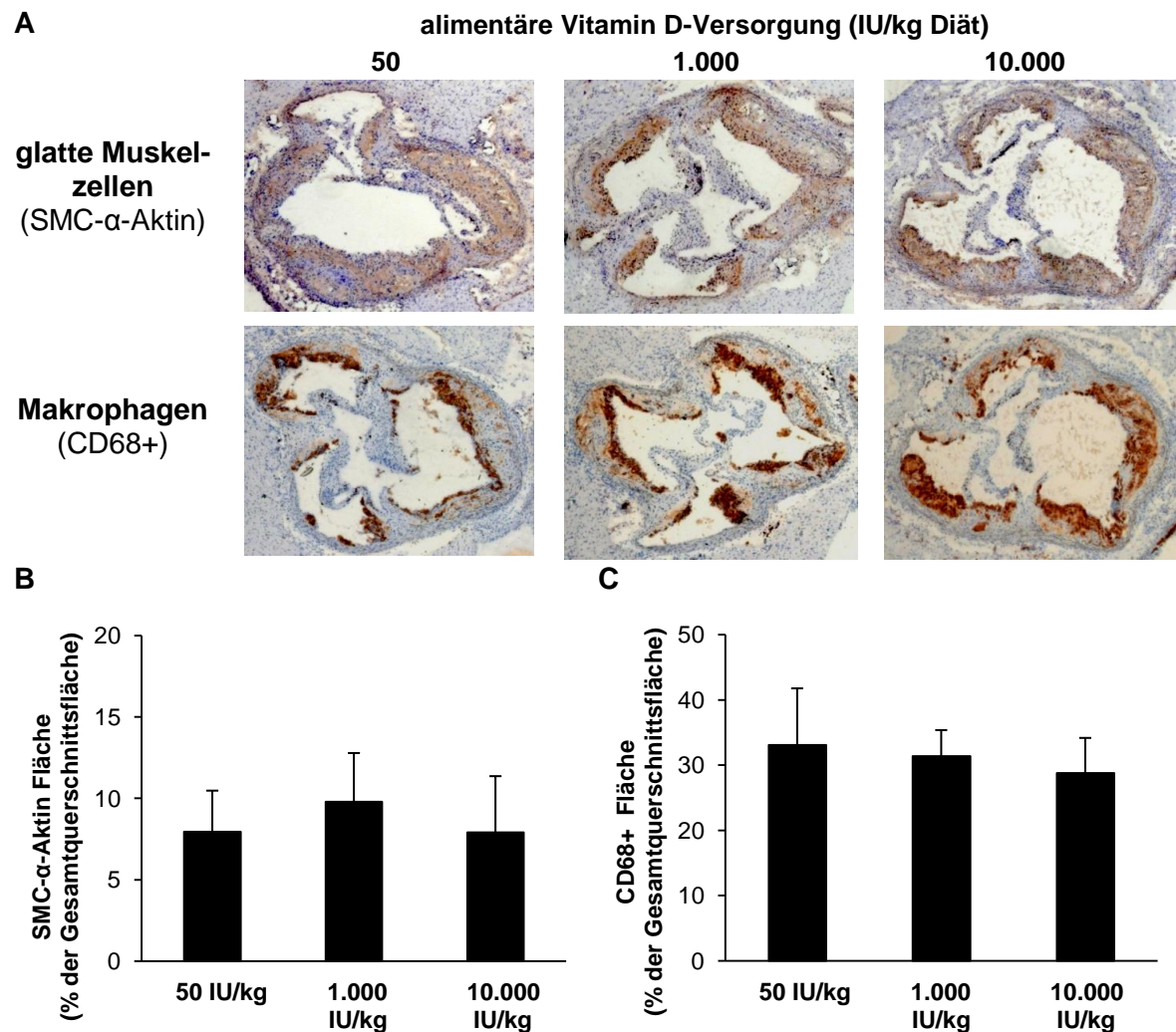


Abbildung 8: Immunhistochemischer Nachweis von glatten Muskelzellen und Makrophagen bei LDLR^{-/-} Mäusen mit unterschiedlicher Vitamin D-Versorgung über die Diät.

(A) Repräsentative, immunhistochemisch für glatte Muskelzellen (SMC- α -Aktin) und Makrophagen (CD68+) gefärbte Gefrierschnitte der Aortenwurzel von LDLR^{-/-} Mäusen, die über 16 Wochen mit einer *Western diet* gefüttert wurden, die entweder geringe (50 IU/kg), adäquate (1.000 IU/kg) oder reichliche (10.000 IU/kg) Mengen an Vitamin D₃ enthielt (10fache Vergrößerung). (B) Relative Fläche der glatten Muskelzellen und (C) der Makrophagen (jeweils in % der Gesamtquerschnittsfläche) der Aortenwurzel. Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen dargestellt, n = 12 pro Gruppe. CD, *cluster of differentiation*; SMC, *smooth muscle cells*.

Da bereits bei den VDR^{-/-} Mäusen ein Zusammenhang zwischen vermehrter Kalzifizierung und erhöhter Expression von Osteoblastendifferenzierungsfaktoren nachgewiesen werden konnte, wurden diese osteogenen Marker auch bei den LDLR^{-/-} Mäusen untersucht. Auch hier zeigte sich, dass eine vermehrte Kalzifizierung bei unzureichender Vitamin D-Versorgung über die Diät mit einer gesteigerten Expression von Bmp-2, Msx2 und Runx2 im Vergleich zu adäquater oder reichlicher Vitamin D-Gabe assoziiert ist (P<0,01; Abbildung 9). Während Bmp-2 bei gesteigerter Vitamin D-Zufuhr abnahm und somit auch ein signifikanter Unterschied zwischen adäquater und reichlicher Vitamin D-Versorgung über die Diät bestand (P<0,001), gab es bei Msx2 und Runx2 keine signifikanten Unterschiede zwischen LDLR^{-/-} Mäusen mit adäquater und reichlicher Vitamin D-Gabe.

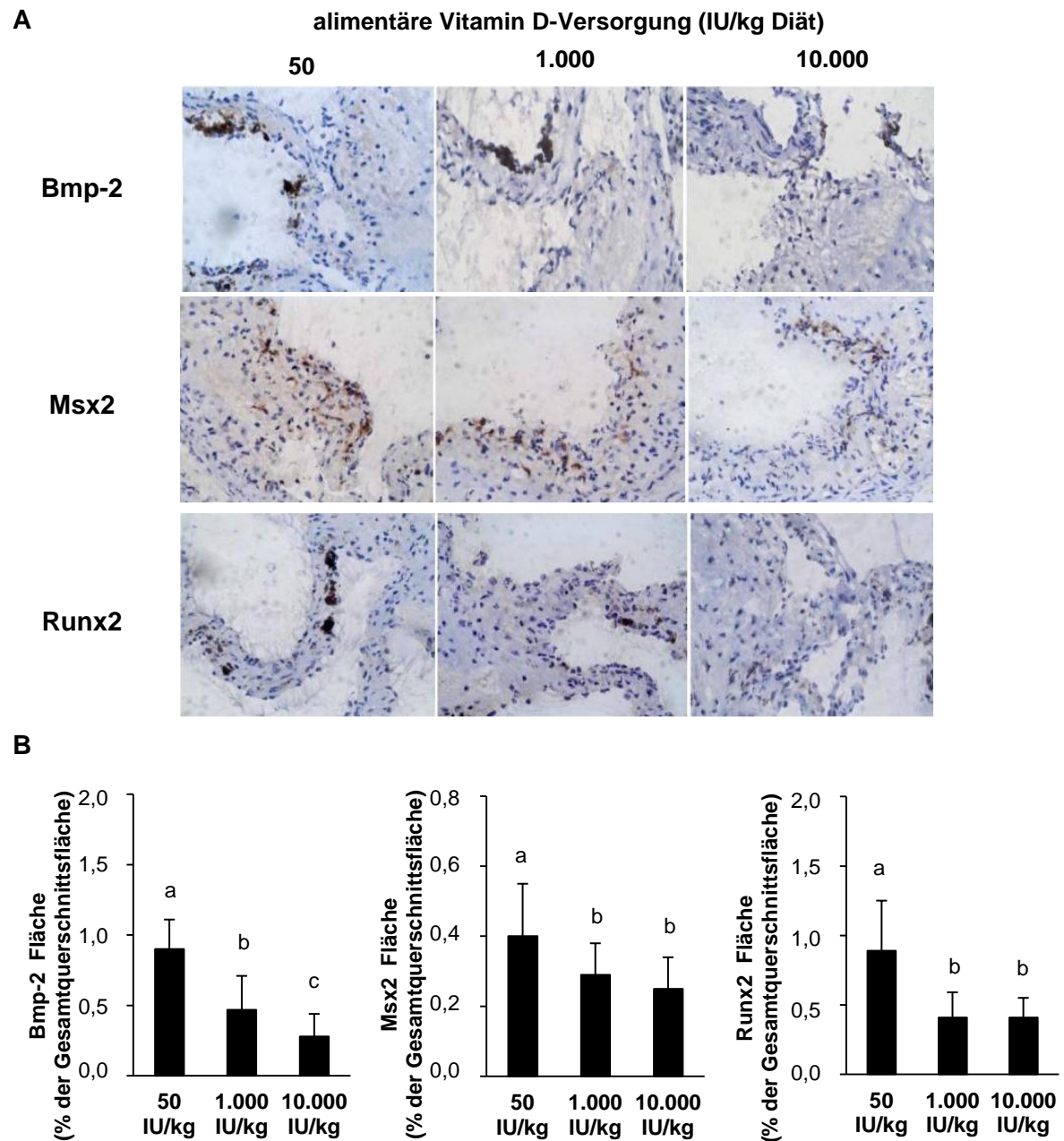


Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis einer vermehrten Expression von Osteoblastendifferenzierungsfaktoren bei LDLR^{-/-} Mäusen mit unzureichender Vitamin D-Versorgung über die Diät.

(A) Repräsentative, immunhistochemisch für Bmp-2, Msx2 und Runx2 gefärbte Gefrierschnitte der Aortenwurzel von LDLR^{-/-} Mäusen, die über 16 Wochen mit einer *Western diet* gefüttert wurden, die entweder geringe (50 IU/kg), adäquate (1.000 IU/kg) oder reichliche (10.000 IU/kg) Mengen an Vitamin D₃ enthielt (10fache Vergrößerung). (B) Relative Fläche der immunhistochemisch positiv markierten Areale (% der Gesamtquerschnittsfläche) der Aortenwurzelschnitte. Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichungen dargestellt, n = 12 pro Gruppe. ^{a,b,c} Balken mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander (P < 0,01). Bmp, *bone morphogenetic protein*; Msx, *muscle segment homeobox*; Runx, *runt-related transcription factor*.

3.2.5 Lipid- und Mineralstoffgehalte in Plasma und Knochen

Die Konzentrationen an Lipiden und Mineralstoffen in Plasma und Knochen sind in Tabelle 16 dargestellt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich Triglyzerid- und Cholesterinkonzentration im Plasma. Auch die

Spiegel an anorganischem Phosphat im Plasma sowie Calcium und Phosphor in Plasma und Knochen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Somit waren die Änderungen im Vitamin D-Status (Abbildung 6) nicht mit einer Änderung dieser Atherosklerose-assoziierten Parameter verbunden.

Tabelle 16: Konzentrationen an Lipiden und Mineralstoffen von LDLR^{-/-} Mäusen, die über 16 Wochen mit einer *Western diet* gefüttert wurden, die unterschiedliche Konzentrationen an Vitamin D₃ enthielt.

	alimentäre Vitamin D-Versorgung (IU/kg Diät)			P-Wert
	50	1.000	10.000	
Plasma				
Triglyzeride (mmol/L)	1,83 ± 0,68	2,00 ± 0,70	1,85 ± 0,86	0,830
Cholesterin (mmol/L)	29,3 ± 4,6	28,3 ± 4,7	28,1 ± 7,0	0,835
Calcium (mmol/L)	1,93 ± 0,20	1,99 ± 0,21	1,85 ± 0,26	0,305
Phosphor (mmol/L)	11,5 ± 1,1	11,8 ± 1,4	11,9 ± 2,0	0,830
anorganisches Phosphat (mmol/L)	4,20 ± 1,00	4,56 ± 1,38	4,38 ± 1,59	0,877
Femur				
Calcium (g/kg TM)	235 ± 12	237 ± 5	236 ± 5	0,802
Phosphor (g/kg TM)	114 ± 6	115 ± 2	114 ± 2	0,855

Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichungen; n = 12; TM, Trockenmasse

3.2.6 Relative mRNA-Konzentration des Vitamin D-abhängigen Calbindin D_{9k}

Um Informationen über intrazelluläre Effekte von Vitamin D nach Gabe der verschiedenen Vitamin D-Diäten zu erhalten, wurde die mRNA-Konzentration von Calbindin D_{9k} in der Aorta bestimmt. Calbindin D_{9k} ist ein Calcium-bindendes Protein und stellt ein klassisches Zielgen des bioaktiven Vitamin D dar. Wie in Abbildung 10 gezeigt, nimmt die mRNA-Konzentration von Calbindin D_{9k} mit Steigerung der Vitamin D-Zufuhr signifikant zu (P<0,05).

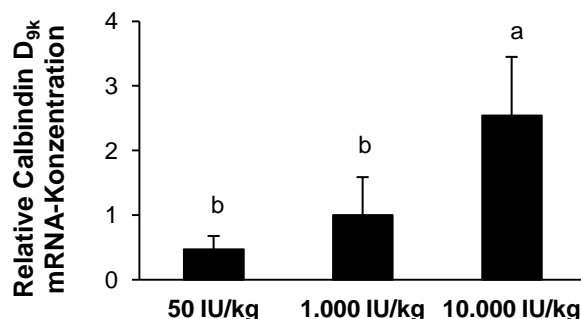


Abbildung 10: Relative mRNA-Konzentration von Calbindin D_{9k} von LDLR^{-/-} Mäusen, die über 16 Wochen mit einer *Western diet* gefüttert wurden, die unterschiedliche Konzentrationen an Vitamin D₃ enthielt.

Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichungen dargestellt, n = 12 pro Gruppe. ^{a,b} Balken mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander (P < 0,05).

3.3 Einfluss eines alimentären Vitamin D-Mangels bei LDL-Rezeptor-*knockout*- und Wildtyp-Mäusen (Versuch 3)

3.3.1 Futteraufnahme und Körpermasse

Bei der Fütterung von LDLR^{-/-} und WT-Mäusen über 16 Wochen konnte kein signifikanter Unterschied der Leistungsparameter zwischen den Vitamin D-Behandlungsgruppen der jeweiligen Genotypen festgestellt werden. Nach 32-wöchiger Fütterung wiesen die LDLR^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den 16 Wochen gefütterten Tieren eine zu erwartende, signifikante Gewichtszunahme und dadurch bedingte erhöhte Futteraufnahme mit resultierendem, höheren Endgewicht auf (P<0,05, Two-Way ANOVA). Zwischen den 4 Gruppen der 32 Wochen gefütterten LDLR^{-/-} Mäuse ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied hinsichtlich Körpergewicht, Körpergewichtszunahme oder Futteraufnahme. Vitamin D zeigte somit keinerlei Einfluss auf die gesamten Leistungsparameter der LDLR^{-/-} und WT-Mäuse (Tabelle 17).

Tabelle 17: Leistungsparameter von WT- und LDLR^{-/-} Mäusen, die für 16 (A) bzw. 32 Wochen (B) mit einer *Western diet* mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.

(A)

	16 Wochen			
	WT-Mäuse		LDLR ^{-/-} Mäuse	
	+D	-D	+D	-D
Körpergewicht Start (g)	16,2 ± 0,7	16,2 ± 0,8	16,3 ± 1,4	16,3 ± 1,9
Körpergewicht Ende (g)	29,7 ± 1,6	32,0 ± 4,8	27,6 ± 2,7	29,1 ± 1,6
Körpermassezunahme (g/Tier/d)	0,12 ± 0,02	0,14 ± 0,04	0,12 ± 0,02	0,12 ± 0,02
Futteraufnahme (g/Tier/d)	2,11 ± 0,09	2,06 ± 0,04	2,00 ± 0,14	2,02 ± 0,10

(B)

	32 Wochen				Two-Way ANOVA
	LDLR ^{-/-} Mäuse				
	+D	-D	+D/-D	-D/+D	
Körpergewicht Start (g)	16,3 ± 1,4	16,3 ± 1,1	16,3 ± 1,5	16,1 ± 1,5	—
Körpergewicht Ende (g)	36,3 ± 4,3	36,1 ± 4,1	36,1 ± 4,1	33,8 ± 4,7	Dauer
Körpermassezunahme (g/Tier/d)	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,08 ± 0,02	Dauer
Futteraufnahme (g/Tier/d)	2,13 ± 0,14	2,21 ± 0,11	2,22 ± 0,14	2,24 ± 0,14	Dauer

Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben, n = 12.

+D, Diät mit adäquater Vitamin D-Versorgung (1.000 IU/kg); -D, Diät mit unzureichender Vitamin D-Versorgung (50 IU/kg), LDLR^{-/-}, LDLR-*knockout*-Mäuse; WT, Wildtyp-Mäuse.

3.3.2 Konzentration der Vitamin D-Metabolite im Plasma

Zur Bestimmung des Vitamin D-Status der Mäuse wurden die Plasmakonzentrationen an $25(\text{OH})\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bestimmt (Abbildung 11).

Die Plasmakonzentrationen an $25(\text{OH})\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ waren bei den 16 Wochen gefütterten Mäusen mit der unzureichenden Vitamin D-Versorgung über die Diät (-D) signifikant geringer im Vergleich zu denen mit adäquater Vitamin D-Gabe (+D) ($P < 0,05$; Abbildung 11A und B). Der Genotyp hatte auf die $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Spiegel keinen Einfluss, während der $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegel bei den $\text{LDLR}^{-/-}$ Mäusen signifikant geringer war im Vergleich zu den WT-Tieren ($P < 0,05$). Beim Vergleich der 16 und 32 Wochen gefütterten $\text{LDLR}^{-/-}$ Mäuse konnte festgestellt werden, dass der Plasmaspiegel an $25(\text{OH})\text{D}_3$ der 32 Wochen gefütterten Gruppen signifikant geringer war als bei den entsprechenden 16 Wochen gefütterten Mäusen ($P < 0,001$), wobei diese Abnahme bei den -D Mäusen signifikant stärker im Vergleich zu den +D Mäusen stattfand ($P < 0,05$; Abbildung 11A). Die Plasmakonzentration an $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ unterschied sich zwischen den 16 und 32 Wochen adäquat mit Vitamin D versorgten Tieren (+D) nicht, während die Mäuse mit 32-wöchiger unzureichender Vitamin D-Gabe (-D) signifikant geringere $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Plasmaspiegel im Vergleich zu den 16 Wochen unzureichend versorgten Tieren aufwiesen ($P < 0,001$; Abbildung 11B). Nach 32-wöchiger Fütterungsphase wiesen Mäuse, die nach 16-wöchiger, adäquater Vitamin D-Versorgung eine Diät mit unzureichender Vitamin D-Gabe für weitere 16 Wochen erhielten (+D/-D), ähnliche Spiegel an $25(\text{OH})\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf wie die 32 Wochen -D gefütterten Tiere. Mäuse, denen nach 16-wöchiger -D Diät für weitere 16 Wochen die +D Diät verabreicht wurde (-D/+D), hatten ähnliche $25(\text{OH})\text{D}_3$ - und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegel im Plasma wie die 32 Wochen +D gefütterten Mäuse. Die Plasmakonzentration an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ der WT- und $\text{LDLR}^{-/-}$ Mäuse nach 16-wöchiger -D Diät unterschied sich nicht von denen mit der +D Diät (Abbildung 11C). Die 32 Wochen adäquat mit Vitamin D versorgten $\text{LDLR}^{-/-}$ Mäuse wiesen signifikant höhere $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Plasmaspiegel auf als die entsprechenden 16 Wochen behandelten Mäuse ($P < 0,05$), während kein Zeiteffekt zwischen den -D Gruppen nachweisbar war. $\text{LDLR}^{-/-}$ Mäuse, die 32 Wochen die +D Diät erhielten, wiesen signifikant höheren Plasmakonzentrationen an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf als Tiere, denen 32 Wochen die -D Diät gefüttert wurde ($P < 0,001$; Abbildung 11C). Die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegel der +D/-D und -D/+D Mäuse unterschied sich nicht von denen, die die -D Diät für 32 Wochen erhielten.

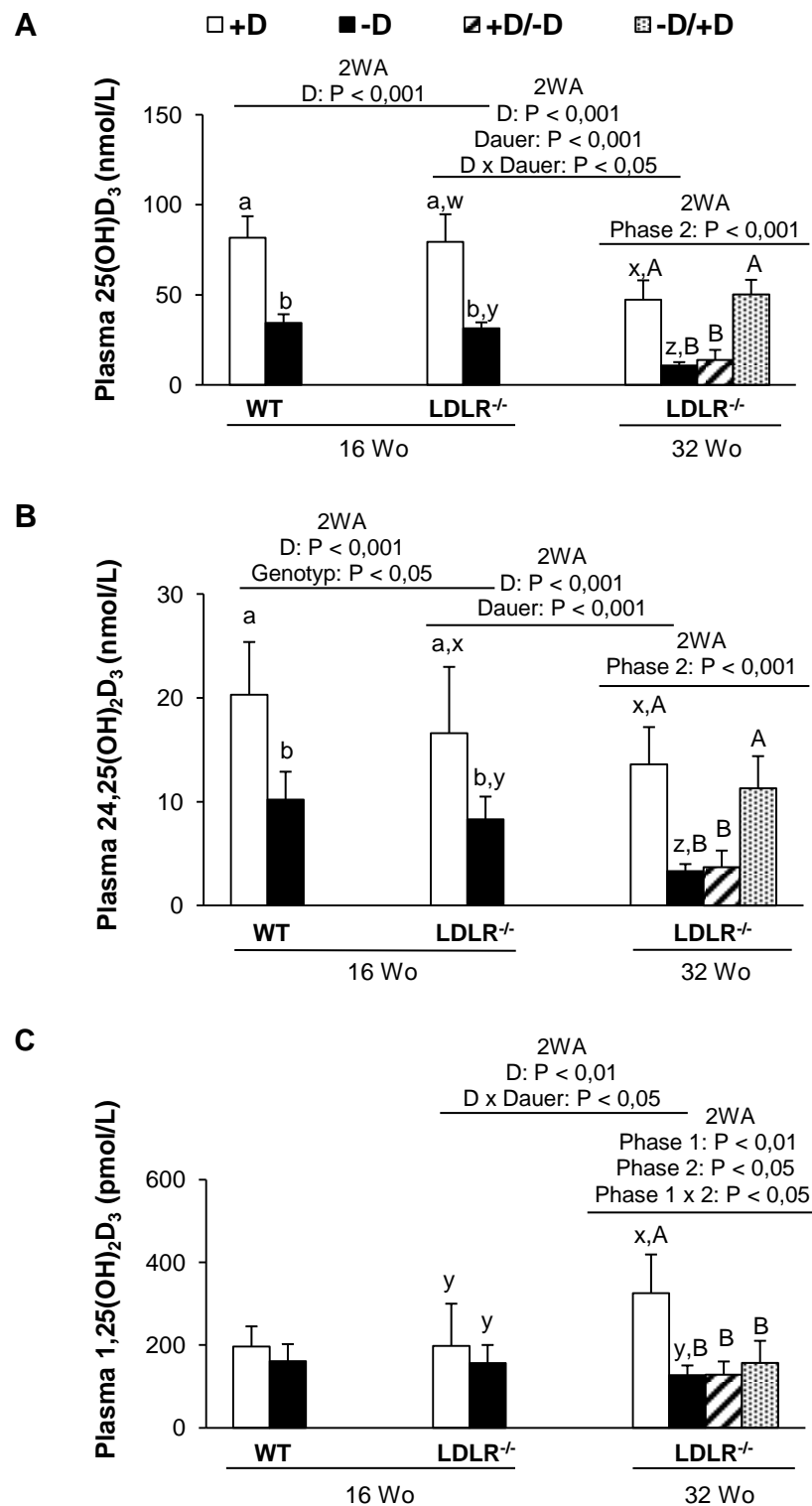


Abbildung 11: Bestimmung des Vitamin D Status von WT- und LDLR^{-/-} Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer *Western diet* mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.

Plasmakonzentrationen an (A) 25(OH)D₃, (B) 24,25(OH)₂D₃ und (C) 1,25(OH)₂D₃ von Wildtyp (WT) und LDLR^{-/-} Mäusen. Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichungen dargestellt mit n = 12 pro Gruppe bei 25(OH)D₃ und 24,25(OH)₂D₃ bzw. n = 4 pro Gruppe bei 1,25(OH)₂D₃ (Probenpool). Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Two-Way-ANOVA (2WA) unterscheiden sich signifikant voneinander, P < 0,05.

3.3.3 Histologische Quantifizierung der Kalzifizierung der Aortenwurzel

Zur Charakterisierung und Quantifizierung pathologischer, vaskulärer Veränderungen durch unzureichende Vitamin D-Versorgung über die Diät wurden verschiedene histologische Färbungen von Gefrierschnitten im Bereich der Aortenwurzel der WT- und LDLR^{-/-} Mäuse durchgeführt und ausgewertet.

Abbildung 12 zeigt die Effekte von Vitamin D auf die Verkalkung im Bereich der Aortenwurzel. Dabei konnte sowohl bei WT-Mäusen im Klappenbereich als auch bei LDLR^{-/-} Mäusen im Klappen- und Plaquebereich kalzifizierte Regionen aufgezeigt werden (Abbildung 12A und C). Bei unzureichender Vitamin D-Versorgung über die Diät (-D) entwickelten beide Genotypen nach 16-wöchiger Fütterung größere Kalzifizierungsareale im Bereich der Aortenklappe als Mäuse mit adäquater Vitamin D-Gabe (+D) ($P < 0,05$; Abbildung 12C). Bei den LDLR^{-/-} Mäusen war dieser Unterschied signifikant ($P < 0,05$), bei den WT-Mäusen gab es eine tendenziell höhere Kalzifizierungsfläche der -D im Vergleich zur +D Gruppe ($P < 0,10$). Beim Vergleich der 16 und 32 Wochen gefütterten LDLR^{-/-} Mäuse konnte eine Interaktion zwischen Vitamin D und dem Fütterungszeitraum bezogen auf die Kalzifizierung festgestellt werden ($P < 0,05$). Die kalzifizierten Areale bei den Mäusen, die 32 Wochen die -D Diät erhielten, waren signifikant größer als bei den entsprechenden Tieren nach 16-wöchiger Fütterungszeit ($P < 0,001$), während kein Zeiteffekt zwischen den +D Gruppen festgestellt werden konnte. Der größte Anteil an Kalzifizierungen konnte bei den 32 Wochen unzureichend mit Vitamin D über die Diät versorgten LDLR^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden. Das Fortschreiten einer Vitamin D-induzierten Kalzifizierung konnte durch adäquate Vitamin D-Gabe (-D/+D Gruppe) gestoppt bzw. rückgängig gemacht werden. Die -D/+D und +D/-D Gruppen wiesen nach 32-wöchiger Fütterung ähnliche Verkalkungsflächen wie die 32 Wochen adäquat mit Vitamin D versorgten LDLR^{-/-} Mäuse auf.

Neben der Fläche der Kalzifizierung wurde noch die Anzahl und Größe der Verkalkungsspot in den Gefrierschnitten der Aortenwurzelareale untersucht (Abbildung 12B). LDLR^{-/-} Mäuse mit der -D Diät wiesen nach 16 Wochen eine deutlich höhere Zahl an Kalzifizierungsspot auf als die Tiere mit der +D Diät. Dieser Unterschied verstärkte sich nach 32 Wochen Fütterungszeit. Die -D Tiere wiesen dann mehr als viermal so viele, kleine Kalzifizierungsspot ($< 250 \mu\text{m}^2$) auf als die +D Mäuse. Die beiden Gruppen zeigten somit die größten Unterschiede in der Kalzifizierungsfläche entsprechend der beobachteten deutlichsten Differenzen in deren Vitamin D-Status, wie die Plasmaspiegel an $25(\text{OH})\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zeigen. Die -D/+D und +D/-D Tiere waren bezüglich der Spotzahl vergleichbar zu den 32 Wochen +D Mäusen.

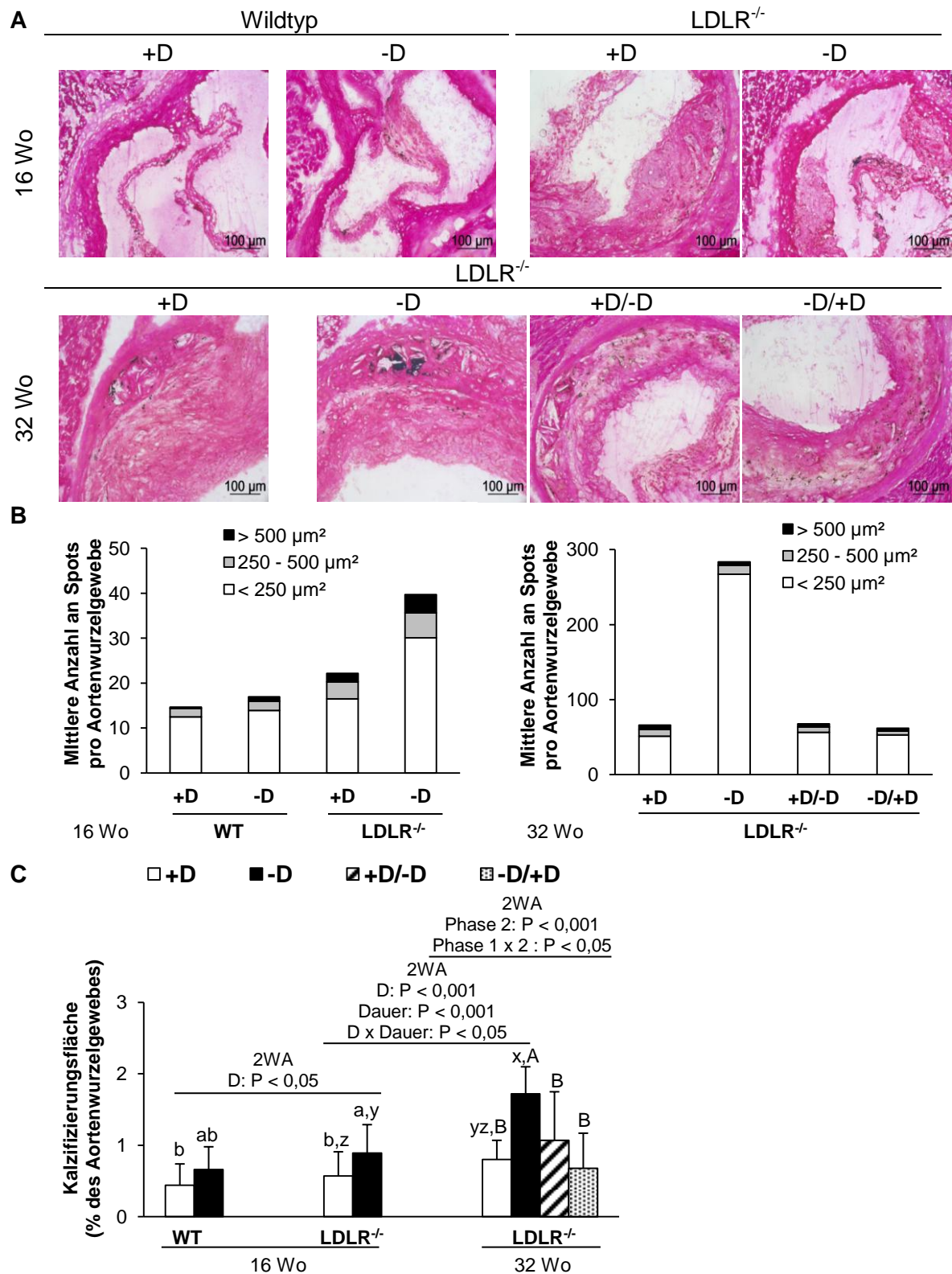


Abbildung 12: Einfluss von Vitamin D auf die Kalzifizierung der Aortenklappe bei Wildtyp (WT)- und LDLR^{-/-} Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer *Western diet* mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.

(A) Ausschnitte repräsentativer, mit von Kossa gefärbter Gefrierschnitte. (B) Mittlere Anzahl an Kalzifizierungsspot pro Aortenwurzelgewebe. (C) Relative Kalzifizierungsfläche (% vom Aortenwurzelgewebe). Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichungen von 12 Mäusen pro Gruppe dargestellt. Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Two-Way-ANOVA (2WA) unterscheiden sich signifikant voneinander, P < 0,05.

3.3.4 Histologische Quantifizierung der Kalzifizierung weiterer Herzklappen

Um zu untersuchen, ob es neben dem Einfluss von Vitamin D auf die Kalzifizierung der Aortenklappe auch einen Effekt auf andere Herzklappen gibt, wurden die Mitral- und Trikuspidalklappe analysiert (Abbildung 13).

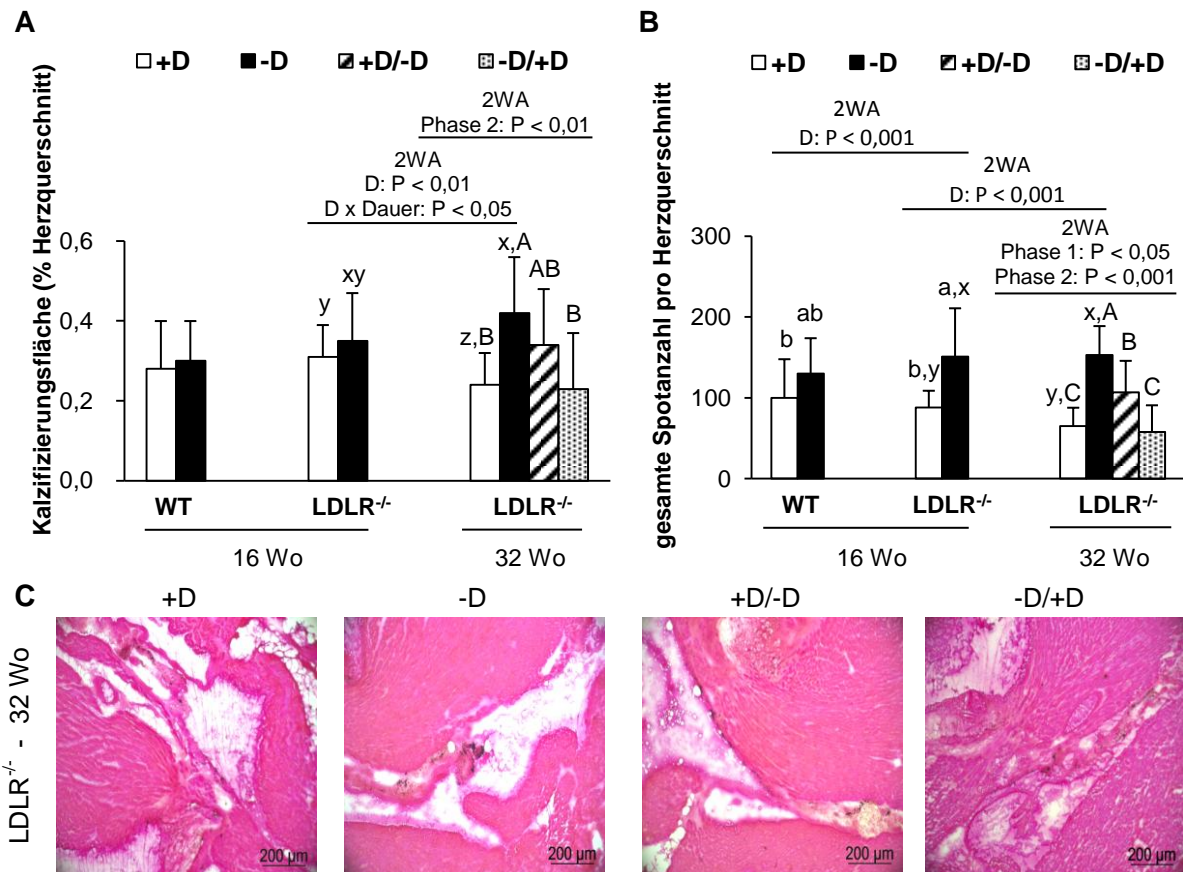


Abbildung 13: Einfluss von Vitamin D auf die Kalzifizierung von Mitral- und Trikuspidalklappe bei Wildtyp (WT)- und LDLR^{-/-} Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer Western diet mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.

(A) Relative Kalzifizierungsfläche (% vom gesamten Herzquerschnitt) (B) Gesamte Anzahl an Kalzifizierungsspot pro Herzquerschnitt (C) Ausschnitte repräsentativer, mit von Kossa gefärbter Gefrierschnitte. Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 12 Mäusen pro Gruppe dargestellt. Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Two-Way-ANOVA (2WA) unterscheiden sich signifikant voneinander, P < 0,05.

Nach 16-wöchiger Fütterung konnte kein Unterschied bezüglich der Verkalkung zwischen den Vitamin D-Behandlungsgruppen festgestellt werden. Beim Vergleich der 16 zu 32 Wochen gefütterten Tiere zeigte sich, dass die +D Diät mit einer Abnahme der Kalzifizierungsfläche über die Zeit verbunden war (P<0,05), während sich kein Unterschied bei Fütterung der -D Diät ergab (Abbildung 13A). Eine 32-wöchige, unzureichende Vitamin D-Versorgung (-D) war mit einer Zunahme kalzifizierter Areale im Vergleich zur adäquat mit Vitamin D-versorgten Gruppe assoziiert (P<0,01; Abbildung 13A und C). Nach 32-wöchiger Fütterung wiesen die -D/+D Mäuse ein vergleichbares Ausmaß an Kalzifizierung auf wie die dauerhaft mit der +D Diät versorgten Mäuse auf, während die +D/-D Tiere Werte zwischen denen der dauerhaft -D und +D gefütterten Mäuse hatten. Vitamin D beeinflusste außerdem die Anzahl der Kalzifizierungsspot. Der

deutlichste Vitamin D-Effekt war beim Vergleich der -D Tiere mit den +D Tieren nach 32-wöchiger Fütterung nachweisbar ($P < 0,001$; Abbildung 13B). Die Mäuse, die nach 16-wöchiger -D Diät nun die +D Diät erhielten (-D/+D Gruppe) wiesen; ähnlich zu den Daten der Aortenklappe, eine vergleichbar geringe Ausprägung kalzifizierter Areale auf wie die dauerhaft +D versorgten Mäuse.

3.3.5 Immunhistochemische Analyse der Osteoblastendifferenzierungsfaktoren im Bereich der Aortenwurzel

Im Rahmen der vaskulären Kalzifizierung kommt es zu einer vermehrten Expression von Osteoblastendifferenzierungsfaktoren als Schlüsselregulatoren der osteogenen Umwandlung vaskulärer Zellen. Daher wurden die Expression der osteogenen Faktoren Bmp-2, Msx2 und Runx2 im Zusammenhang mit der Verkalkung der Aortenklappe bei unzureichender Vitamin D-Versorgung von WT und LDLR^{-/-} Mäusen immunhistochemisch untersucht (Abbildung 14A - C). Es konnte ein signifikanter Effekt von Vitamin D auf die Expression von Bmp-2, Msx2 und Runx2 ermittelt werden, wobei die Expression dieser osteogenen Faktoren in der -D Gruppe höher als in der +D Gruppe war ($P < 0,05$, Abbildung 14). Des Weiteren ergaben sich Unterschiede im Expressionsschema zwischen den einzelnen Faktoren im Zusammenhang mit Genotyp und Fütterungszeitraum. Bei den 16 Wochen gefütterten Mäusen konnte eine signifikante Interaktion zwischen Vitamin D und Genotyp bezüglich der Bmp-2-Expression im Bereich der Aortenwurzel nachgewiesen werden ($P < 0,001$; Abbildung 14A). Während die WT-Tiere, die die -D Diät erhielten, eine signifikant höhere Expression an Bmp-2 im Vergleich zu den entsprechenden +D Mäusen aufwiesen ($P < 0,05$), konnte bei den LDLR^{-/-} Mäusen kein Unterschied nach 16-wöchiger Fütterung gezeigt werden. Eine solche Interaktion zwischen der Vitamin D-Gabe und dem Genotyp konnte nicht für die Expression von Msx2 und Runx2 festgestellt werden (Abbildung 14B und C). Die 32 Wochen unzureichend mit Vitamin D versorgten LDLR^{-/-} Mäuse wiesen eine höhere Bmp-2-, Msx2- und Runx2-Expression auf als die mit prolongierter adäquater Vitamin D-Gabe ($P < 0,05$; Abbildung 14). Tiere, die nach 16-wöchiger unzureichender Vitamin D-Versorgung eine adäquate Zufuhr erhielten (-D/+D), wiesen eine geringere Expression dieser osteogenen Faktoren auf und entsprachen damit den Konzentrationen der 32 Wochen +D Gruppe. Bei Mäusen, die nach der 16-wöchigen adäquaten Vitamin D-Zufuhr anschließend die -D Diät erhielten (+D/-D) konnten Expressionsspiegel zwischen denen der 32 Wochen -D und +D Gruppen ermittelt werden.

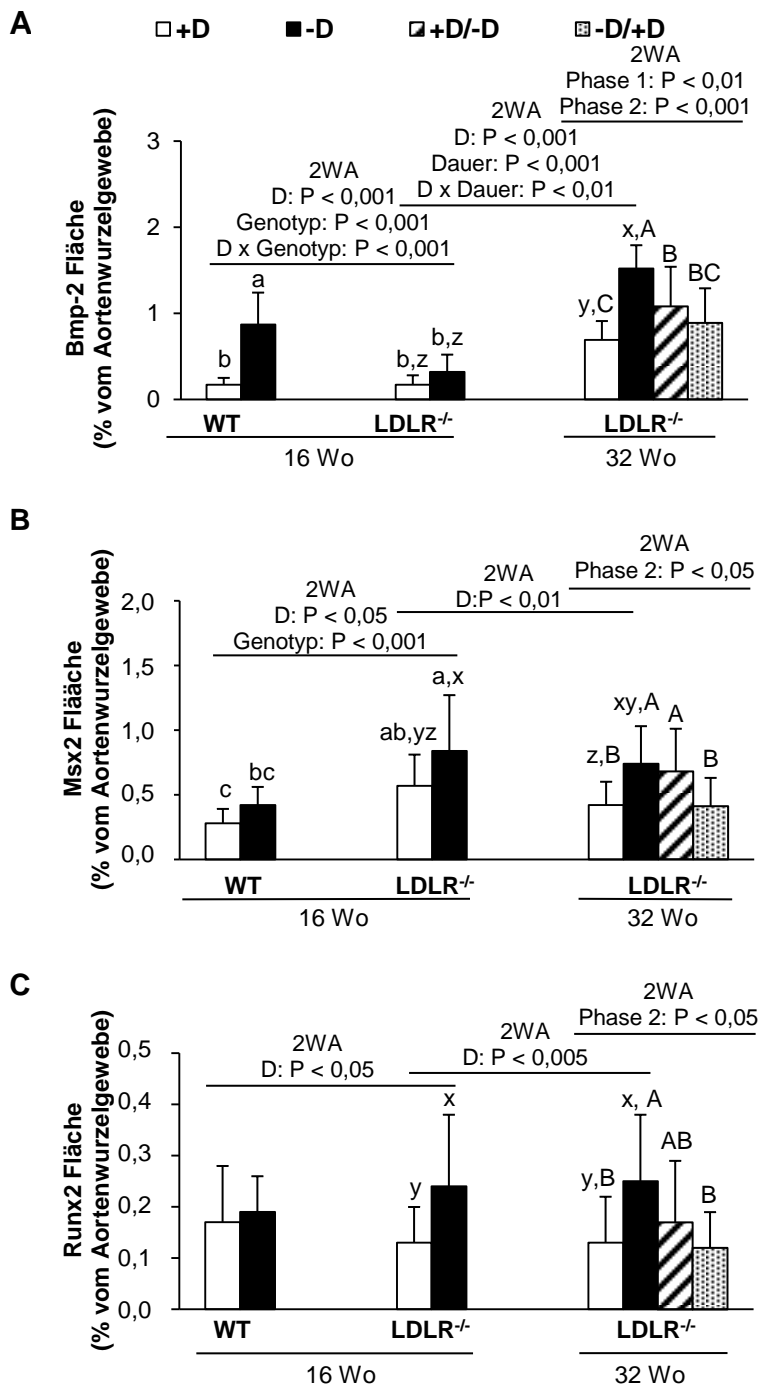


Abbildung 14: Einfluss von Vitamin D auf die Expression von Osteoblastendifferenzierungsfaktoren bei Wildtyp (WT)- und LDLR^{-/-} Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer *Western diet* mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.

Relativer Anteil an (A) Bmp-2, (B) Msx2 und (C) Runx2 (jeweils in % vom Aortenwurzelgewebe). Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 12 Mäusen pro Gruppe dargestellt. Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Two-Way-ANOVA (2WA) unterscheiden sich signifikant voneinander, $P < 0,05$. Bmp, *bone morphogenetic protein*; Msx, *muscle segment homeobox*; Runx, *runt-related transcription factor*.

3.3.6 Histologische und immunhistochemische Quantifizierung der Plaquezusammensetzung

Während bei den WT-Mäusen keine atherosklerotischen Veränderungen festgestellt worden, entwickelten die LDLR^{-/-} Mäuse deutliche atherosklerotische Läsionen mit Plaques, Kollagen- und Lipidablagerungen, die mittels Trichromfärbung nach Mallory-

Cason bzw. Ölrot-O-Färbung nachgewiesen werden konnten (Abbildung 15). Alle LDLR^{-/-} Mäuse entwickelten eine schwere, fortgeschrittene Atherosklerose, die sich durch eine starke Plaqueentwicklung kennzeichnet und zur Lumeneinengung führt. Bei den Mäusen konnte dabei eine altersabhängige Zunahme der Plaquefläche (P<0,001; Abbildung 15A), jedoch eine Abnahme Plaque-assoziiierter Kollagen- und Lipidanteile (P<0,05; Abbildung 15B und C) im Bereich der Aortenwurzel nach 32 Wochen im Vergleich zu 16 Wochen aufgezeigt werden. Dabei hatte Vitamin D keinen Einfluss auf die Plaquegröße (Abbildung 15A) und nur einen geringfügigen Effekt auf den Anteil an Kollagen im Plaque. Der Plaque-assoziierte Lipidanteil war nach 16-wöchiger Fütterung nicht unterschiedlich zwischen den Behandlungsgruppen, dagegen bei den -D Mäusen nach 32-wöchiger Fütterung signifikant höher (+ 48%) als bei den +D Mäusen (P<0,05; Abbildung 15C). Die -D/+D und +D/-D Mäuse hatten vergleichbare Lipidablagerungen in den Plaques wie die +D Tiere. Somit scheint nur ein prolongierter Vitamin D-Mangel mit Veränderungen des Plaque-Lipidgehalts assoziiert zu sein.

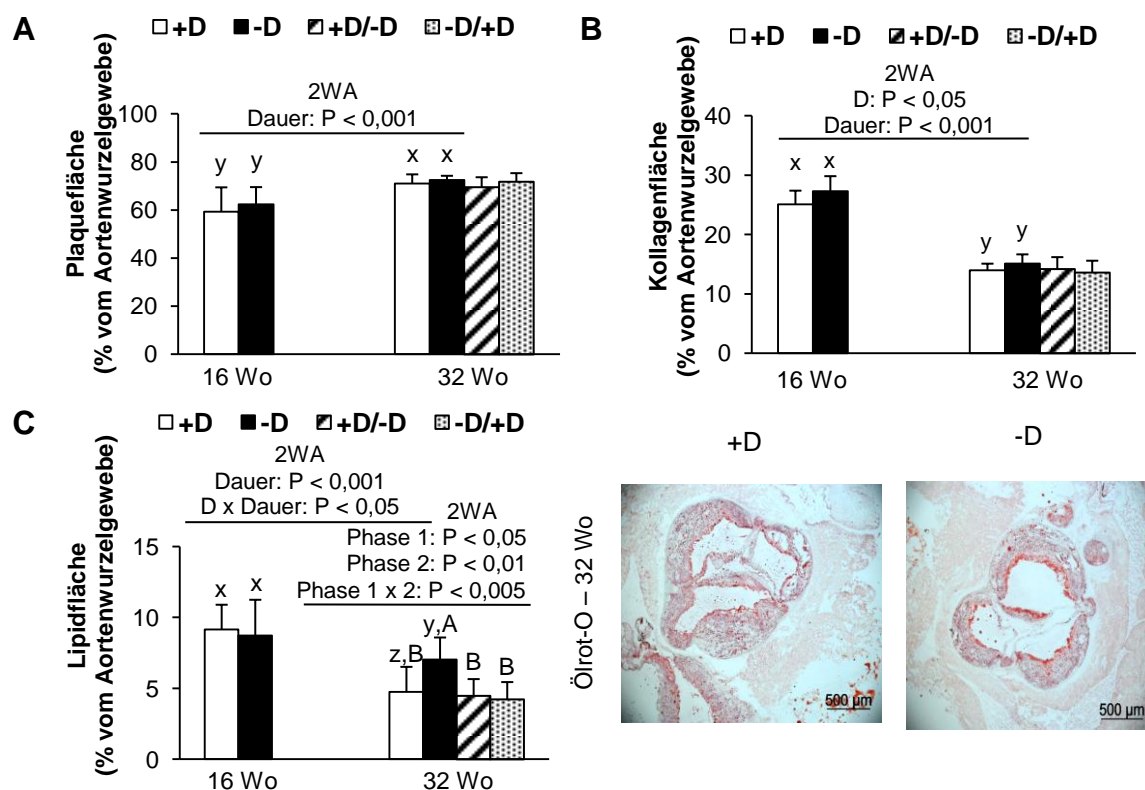


Abbildung 15: Einfluss von Vitamin D auf die Größe und Zusammensetzung der Plaques bei LDLR^{-/-} Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer *Western diet* mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.

Histologisch gefärbte Gefrierschnitte aus dem Bereich der Aortenwurzel wurden quantifiziert bezüglich (A) Plaquegröße (% vom Aortenwurzelgewebe), (B) Kollagenanteil (Trichromfärbung nach Mallory Cason) (% vom Aortenwurzelgewebe) und (C) Lipidanteil (Ölrot-O-Färbung) (% vom Aortenwurzelgewebe). Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 12 Mäusen pro Gruppe dargestellt. Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Two-Way-ANOVA (2WA) unterscheiden sich signifikant voneinander, P < 0,05.

Im Rahmen atherosklerotischer Prozesse kommt es auch zu inflammatorischen Ereignissen. Daher sollte in den Aortenklappen und Plaques der LDLR^{-/-} Mäuse die Entzündungsmarker CD68+ und TNF- α untersucht werden (Abbildung 16). Die Expression beider Parameter war bei den Mäusen mit der -D Diät für 32 Wochen signifikant höher als bei den +D Mäusen (CD68+: + 31%, $P < 0,05$; TNF- α : + 134%, $P < 0,001$). Die Vitamin D-Versorgung der letzten 16 Wochen hatte einen entscheidenden Einfluss auf die CD68+ Expression ($P < 0,01$; Abbildung 16A), während die Vitamin D-Behandlung der 1. Phase von geringerer Bedeutung war. Somit scheint eine Vitamin D-Gabe nach bestehender, unzureichender Vitamin D-Versorgung mit einer verringerten CD68+ Expression einherzugehen. Dagegen war die Expression von TNF- α hauptsächlich von der 1. Fütterungsphase beeinflusst ($P < 0,01$). Die CD68+ Expression bei den -D/+D Mäusen war vergleichbar mit der der 32 Wochen adäquat versorgten Tiere (+D), während die TNF- α -Expression bei den Tieren mit der -D/+D Diät höher als bei den dauerhaft mit +D gefütterten Tieren war (Abbildung 16A und B).

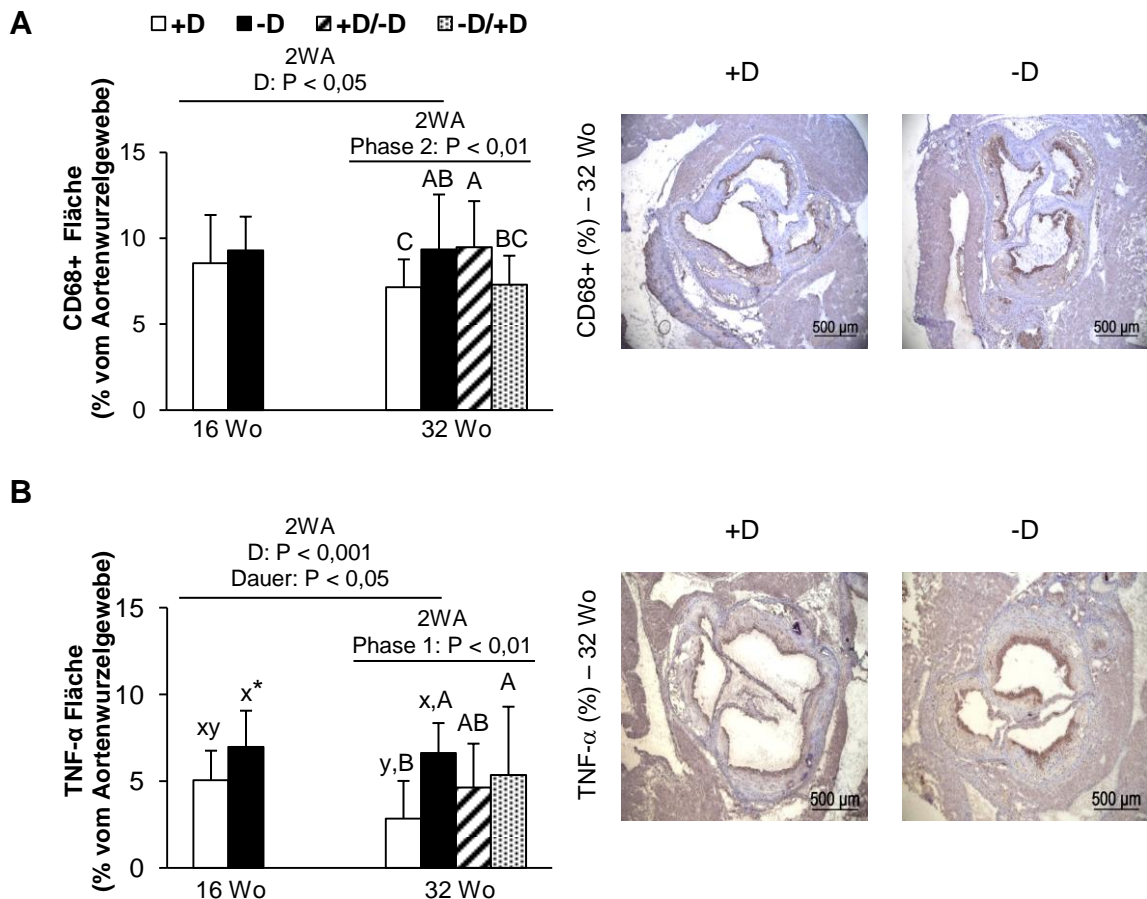


Abbildung 16: Einfluss von Vitamin D auf Zusammensetzung der Plaques bei LDLR^{-/-} Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer *Western diet* mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.

Immunohistochemisch gefärbte Gefrierschnitte aus dem Bereich der Aortenwurzel wurden quantifiziert bezüglich (A) Anteil an Makrophagen (CD68+) (B) Anteil an Entzündungsmarker TNF- α (jeweils in % vom Aortenwurzeltgewebe). Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 12 Mäusen pro Gruppe dargestellt. Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Two-Way-ANOVA (2WA) unterscheiden sich signifikant voneinander, $P < 0,05$. * signifikant unterschiedlich von der 16 Wo +D Gruppe, $P < 0,05$. CD, *cluster of differentiation*; TNF, Tumornekrosefaktor.

3.3.7 Immunhistochemische Analyse der Bmp-2-Expression in den Femura der Mäuse

Um zu untersuchen, wie sich die Bmp-2-Expression im Knochen im Vergleich zur Expression im Gefäßsystem verhält, wurden Schnitte der Femura der Mäuse immunhistochemisch analysiert. Sowohl einige Chondrozyten als auch Osteozyten zeigten einen positiven Nachweis für Bmp-2. Die Zellen waren vorwiegend in der Wachstumszone des Knochens lokalisiert. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Vitamin D-Behandlungsgruppen in den jeweiligen Behandlungszeiträumen festgestellt werden (Abbildung 17). Es scheint bei 32-wöchiger Fütterung entsprechend der Knochenreifung zur Abnahme der Bmp-2-Expression in den Zellen zu kommen.

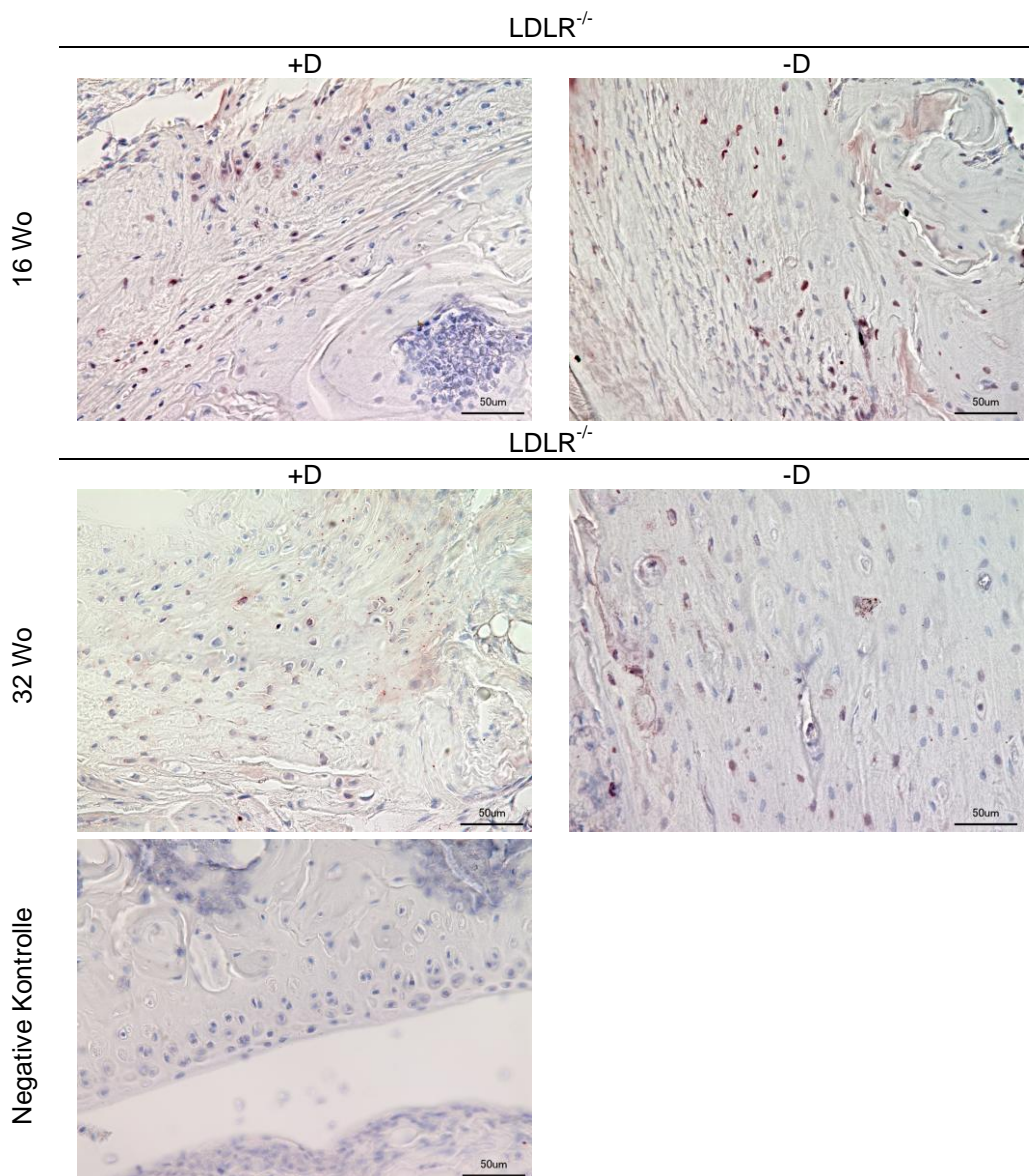


Abbildung 17: Immunhistochemischer Nachweis von Bmp-2 in den Femura von $LDLR^{-/-}$ Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer *Western diet* mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.

Rötlich-braun gefärbte Areale zeigen eine positive Antikörperreaktion. +D, Diät mit adäquater Vitamin D-Versorgung (1.000 IU/kg); -D, Diät mit unzureichender Vitamin D-Versorgung (50 IU/kg), $LDLR^{-/-}$, $LDLR$ -knockout-Mäuse. Bmp, *bone morphogenetic protein*.

3.3.8 Immunfluoreszenzanalysen zu Expression von glatten Muskelzellen und alkalischer Phosphatase in der Aortenwurzel

Da im Rahmen der vaskulären Kalzifizierung eine osteogene Differenzierung von vaskulären Zellen stattfindet, sollte außerdem die Expression eines typischen Markers für glatte Muskelzellen und Fibromyoblasten (SMC α -Aktin) und für bereits transdifferenzierte Zellen (ALP) sowie deren mögliche Kolokalisation untersucht werden. Abbildung 18 zeigt ausgewählte Schnitte aus dem Bereich der Aortenwurzel und die Änderungen der SMC α -Aktin- und ALP-Expression in Abhängigkeit von der Vitamin D-Versorgung über die Diät. Bei den 16 Wochen gefütterten WT-Tieren konnte gezeigt werden, dass eine unzureichende Vitamin D-Versorgung mit einer erhöhten Expression von ALP (rot-gefärbte Areale) und einer verminderten Expression von SMC α -Aktin (grün-gefärbte Areale) im Vergleich zu adäquater Vitamin D-Gabe assoziiert ist. Da beide Parameter nur in wenigen Arealen kolokalisiert sind, scheint die -D Gruppe eine Zunahme an ALP auf Kosten der SMC α -Aktin-Expression zu entwickeln, was auf eine Transdifferenzierung von VSMCs und Fibromyoblasten zu Osteoblasten-ähnlichen Zellen schließen lässt. Die geringe Anzahl an Zellen, die sowohl SMC α -Aktin als auch ALP exprimiert, deutet an, dass ein Zelltyp nicht gleichzeitig beide Proteine exprimiert. Ähnliche Vitamin D-Effekte konnte bei den 32 Wochen gefütterten LDLR^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden (Abbildung 18). LDLR^{-/-} Mäuse, die die +D Diät nach 16-wöchiger -D Diät (-D/+D) erhielten, wiesen vergleichbare SMC α -Aktin- und ALP-Muster auf wie die dauerhaft mit der +D Diät versorgten Tiere.

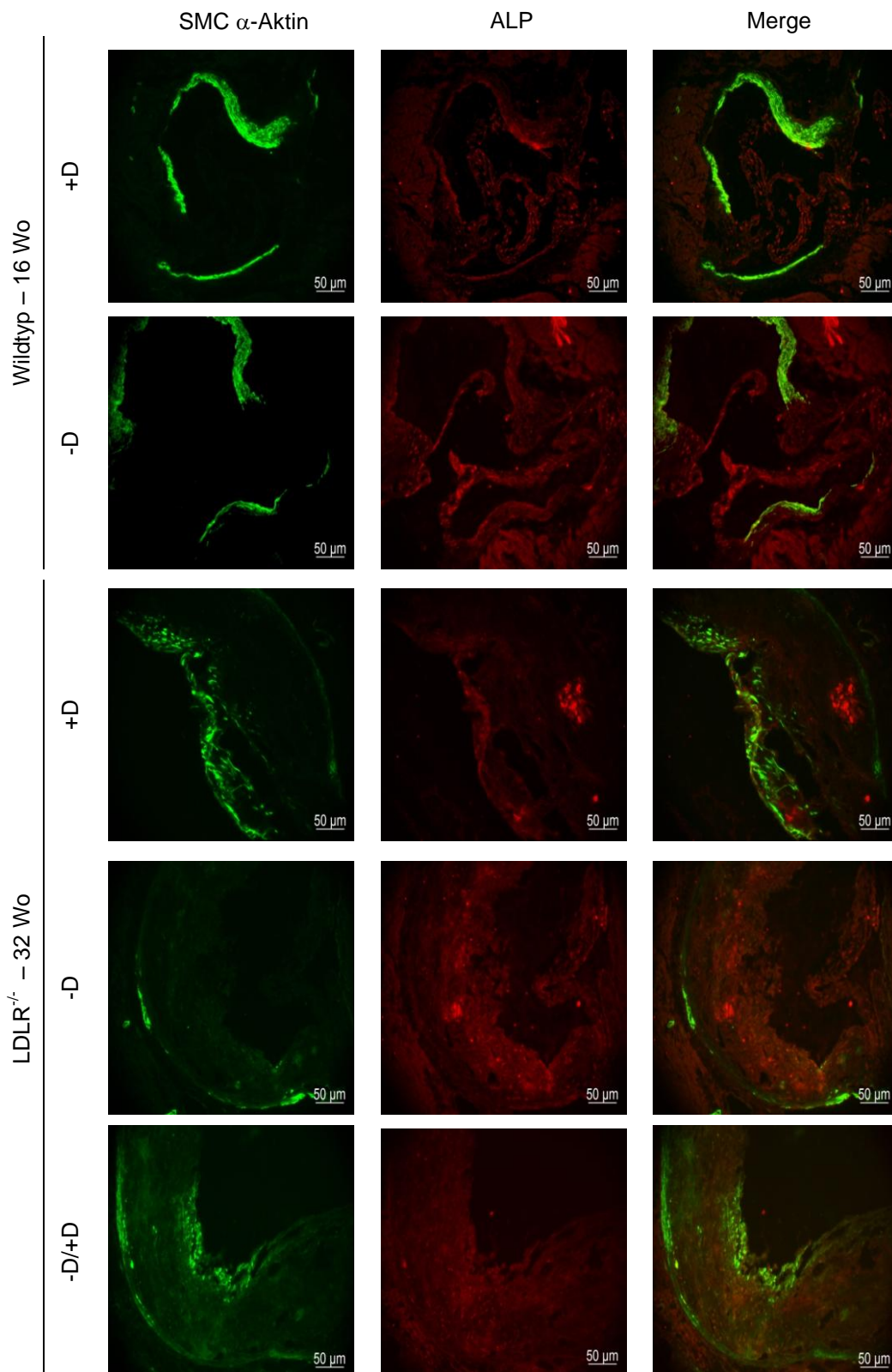


Abbildung 18: Einfluss von Vitamin D auf die Expression von glatten Muskelzellen (SMC- α -Aktin) und Alkalischer Phosphatase (ALP) in den Aortenklappen von Wildtyp- und LDLR^{-/-} Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer *Western diet* mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.

Die Gefrierschnitte wurden mit anti-actin, α -SMC-FITC (grün) und goat anti-mouse ALP Antikörper, gefolgt von Cy3TM-konjugiertem donkey anti-goat IgG (rot) immungefärbt. In der 3. Spalte sind die überlagerten Bilder beider Antikörper zur Analyse einer möglichen Kolo-kalisation dargestellt. SMC, *smooth muscle cell*.

3.3.9 Histologische Quantifizierung der Gefäße

3.3.9.1 Nachweis der Kalzifizierung in der Aorta

Bei der Untersuchung des wichtigsten, den Körper mit Blut versorgenden Gefäßes bezüglich möglicher pathologischer Veränderungen konnte gezeigt werden, dass auch die Aorta von einer Kalzifizierung betroffen ist (Abbildung 19). Mäuse beider Genotypen wiesen bei unzureichender Vitamin D-Versorgung über die Diät größere kalzifizierte Areale im Vergleich zu den Tieren mit adäquater Vitamin D-Zufuhr auf ($P < 0,001$). Verkalkungen waren dabei abhängig vom Genotyp ($P < 0,05$) und vorwiegend in Lumennähe lokalisiert (Abbildung 19A und C). Zusätzlich konnten bei den LDLR^{-/-} Mäusen Verkalkungssots in den Plaques nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte mittels Two-Way ANOVA gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Kalzifizierungsfläche bei 32-wöchiger -D Diät im Vergleich zu 16 Wochen -D Diät bei LDLR^{-/-} Mäusen auftrat ($P < 0,001$; Abbildung 19C). Die +D Mäuse unterschieden sich nicht zwischen den beiden Zeiträumen. Die größten kalzifizierten Areale konnten bei der -D Gruppe nach 32-wöchiger Fütterung ermittelt werden. Es ergaben sich jedoch, aufgrund der hohen Standardabweichungen, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Die mittlere Anzahl an Kalzifizierungssots in der Aorta sind in Abbildung 19B im Zusammenhang mit Vitamin D-Gabe, Genotyp und Fütterungsdauer dargestellt. Nach 16-wöchiger Fütterung wiesen LDLR^{-/-} Mäuse mit der -D Diät eine deutlich höhere Anzahl an Verkalkungssots auf als LDLR^{-/-} Mäuse mit der +D Diät oder WT-Mäuse. Dies war vorwiegend auf eine größere Anzahl an kleinen Spots ($< 50 \mu\text{m}^2$) zurückzuführen. Bei den 32 Wochen gefütterten LDLR^{-/-} Mäusen konnte bei denen mit der -D Diät dreimal mehr kleine ($< 100 \mu\text{m}^2$) und mittlere ($100 - 500 \mu\text{m}^2$) Spots ermittelt werden als bei Mäusen mit der +D Diät. Bei allen Gruppen nahm die Anzahl großer Spots ($> 500 \mu\text{m}^2$) bei längerer Fütterung zu, aber im Vergleich zu den unzureichend mit Vitamin D-versorgten LDLR^{-/-} Mäusen war bei den anderen 3 Gruppen die gesamte Spotzahl deutlich geringer. Die +D/-D sowie -D/+D Gruppen wiesen mehr, vorwiegend kleine und mittlere Verkalkungssots als die +D Gruppe auf, die gesamte Anzahl und Größe der Kalzifizierungssots war jedoch wesentlich geringer als bei den LDLR^{-/-} Mäusen mit der -D Diät. Die Plaquetfläche als typischer Atherosklerose-Parameter nahm bei LDLR^{-/-} Mäusen nach 32 Wochen Fütterung im Vergleich zur 16-wöchigen Fütterung signifikant zu ($P < 0,001$; Abbildung 19D). Es konnte aber kein Unterschied und somit kein Vitamin D-Effekt zwischen den Behandlungsgruppen in beiden Fütterungszeiträumen festgestellt werden.

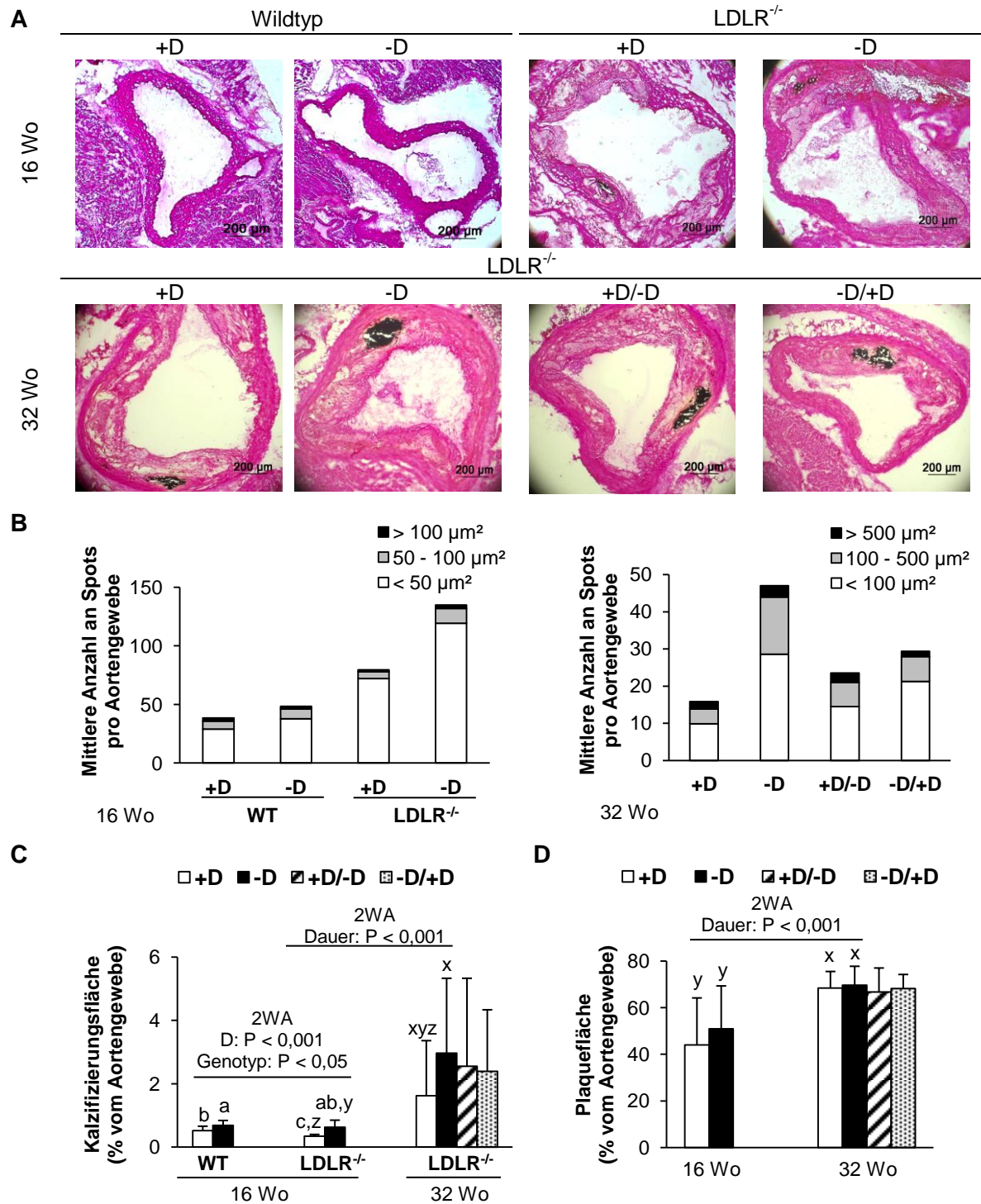


Abbildung 19: Einfluss von Vitamin D auf die Kalzifizierung und die Plauegröße der Aorta von Wildtyp (WT)- und LDLR^{-/-} Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer *Western diet* mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.

(A) Repräsentative, mit von Kossa gefärbte Gefrierschnitte der Aorta. Kalzifizierungen sind als schwarz gefärbte Areale erkennbar. (B) Mittlere Anzahl an Kalzifizierungssots pro Aortengewebe. (C) Relative Kalzifizierungsfläche (% vom Aortengewebe). (D) Relative Plauefläche (% vom Aortengewebe). Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichungen von 12 Mäusen pro Gruppe dargestellt. Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Two-Way-ANOVA (2WA) unterscheiden sich signifikant voneinander, P < 0,05.

3.3.9.2 Nachweis der Kalzifizierung in der Arteria brachiocephalica

Auch die Arteria brachiocephalica, als wichtigstes, das Gehirn mit Blut versorgende Gefäß, wurde hinsichtlich möglicher Verkalkungen untersucht. Dabei zeigte sich nach 16-wöchiger Fütterung, dass die -D Diät bei WT-Mäusen zu einer signifikanten Erhöhung der Kalzifizierungsfläche im Vergleich zu WT-Mäusen mit adäquater Vitamin D-Versorgung ($P < 0,001$; Abbildung 20A und C) führte. Bei LDLR^{-/-} Mäusen war nach diesem Fütterungszeitraum kein Unterschied zwischen den Gruppen nachweisbar. Somit konnte ein Genotyp-Effekt ($P < 0,001$) sowie eine Interaktion zwischen Vitamin D und Genotyp ($P = 0,001$) festgestellt werden. Verkalkungen waren auch in diesem Gefäß vorwiegend in Lumennähe und bei den LDLR^{-/-} Mäusen zusätzlich in den Plaques lokalisiert. Sowohl ein Vitamin D-Effekt ($P < 0,01$) als auch eine Interaktion von Vitamin D und der Fütterungsdauer ($P < 0,05$) konnte ermittelt werden, wobei die Kalzifizierungsfläche bei den LDLR^{-/-} Mäusen mit der -D Diät nach 32 Wochen signifikant höher war als bei der -D Diät nach 16-wöchiger Fütterung. Mäuse mit der +D Diät zeigten nach 32 Wochen einen Trend zu einer Verminderung der Kalzifizierungsfläche im Vergleich zu denen nach 16 Wochen ($P < 0,10$). Nach 32-wöchiger Fütterung konnten bei den LDLR^{-/-} Mäusen mit unzureichender Vitamin D-Versorgung die größten Verkalkungsflächen im Vergleich zu den Mäusen mit adäquater Versorgung nachgewiesen werden ($P < 0,01$). Die +D/-D Gruppe zeigte keine Unterschiede zu allen anderen Gruppen. Die -D/+D Gruppe war vergleichbar mit der +D Gruppe. Die Vitamin D-Versorgung der 2. Fütterungsphase hatte einen großen Einfluss auf die Verkalkung ($P < 0,001$), während die Vitamin D-Gabe der ersten 16 Wochen weniger bedeutend war. In Abbildung 20B ist sowohl Anzahl als auch Größe der Verkalkungssots in der Arteria brachiocephalica im Zusammenhang mit Vitamin D-Gabe, Genotyp und Fütterungsdauer dargestellt. Nach 16-wöchiger Fütterung wiesen WT-Mäuse mit der -D Diät die meisten Kalzifizierungssots im Vergleich zu den WT-Mäusen mit der +D Diät und den LDLR^{-/-} Mäusen auf, wobei die kleinen ($< 25 \mu\text{m}^2$) Sots den größten Anteil ausmachten. Nach 32-wöchiger Fütterung der LDLR^{-/-} Mäuse nahm die Zahl an mittleren ($25 - 50 \mu\text{m}^2$) und großen ($> 50 \mu\text{m}^2$) Sots zu. Mäuse mit der -D Diät verdoppelten ihre Spotzahl im Vergleich zu den 16 Wochen -D Mäusen und wiesen nach 32-wöchiger Fütterung die meisten Sots im Vergleich zu den anderen Gruppen auf. Die Verkalkung der 16 und 32 Wochen gefütterten +D Mäuse war nahezu unverändert. Die -D/+D Tiere hatten weniger Sots als die +D/-D Gruppe. Beide Gruppen wiesen eine größere Anzahl an kalzifizierten kleine und mittleren Sots als die +D Mäuse, aber geringfügig weniger als die -D Tiere. Die Plaquefläche war nach 32-wöchiger Fütterung der -D Diät im Vergleich zu den -D Tieren nach 16 Wochen signifikant erhöht ($P < 0,001$; Abbildung 20D), unterschied sich jedoch nicht zwischen den +D Gruppen der beiden Zeiträume sowie zwischen den Behandlungsgruppen nach 32 Wochen Fütterung. Der 2. Fütterungszeitraum hatte bei der Plaquefläche einen entscheidenden Einfluss

($P < 0,05$), während die 1. Fütterungsphase eher von untergeordneter Rolle war. Nach 32 Wochen nahm bei allen Gruppen das Risiko für das Auftreten einer Okklusion des Gefäßes zu (Abbildung 20A, 32 Wo).

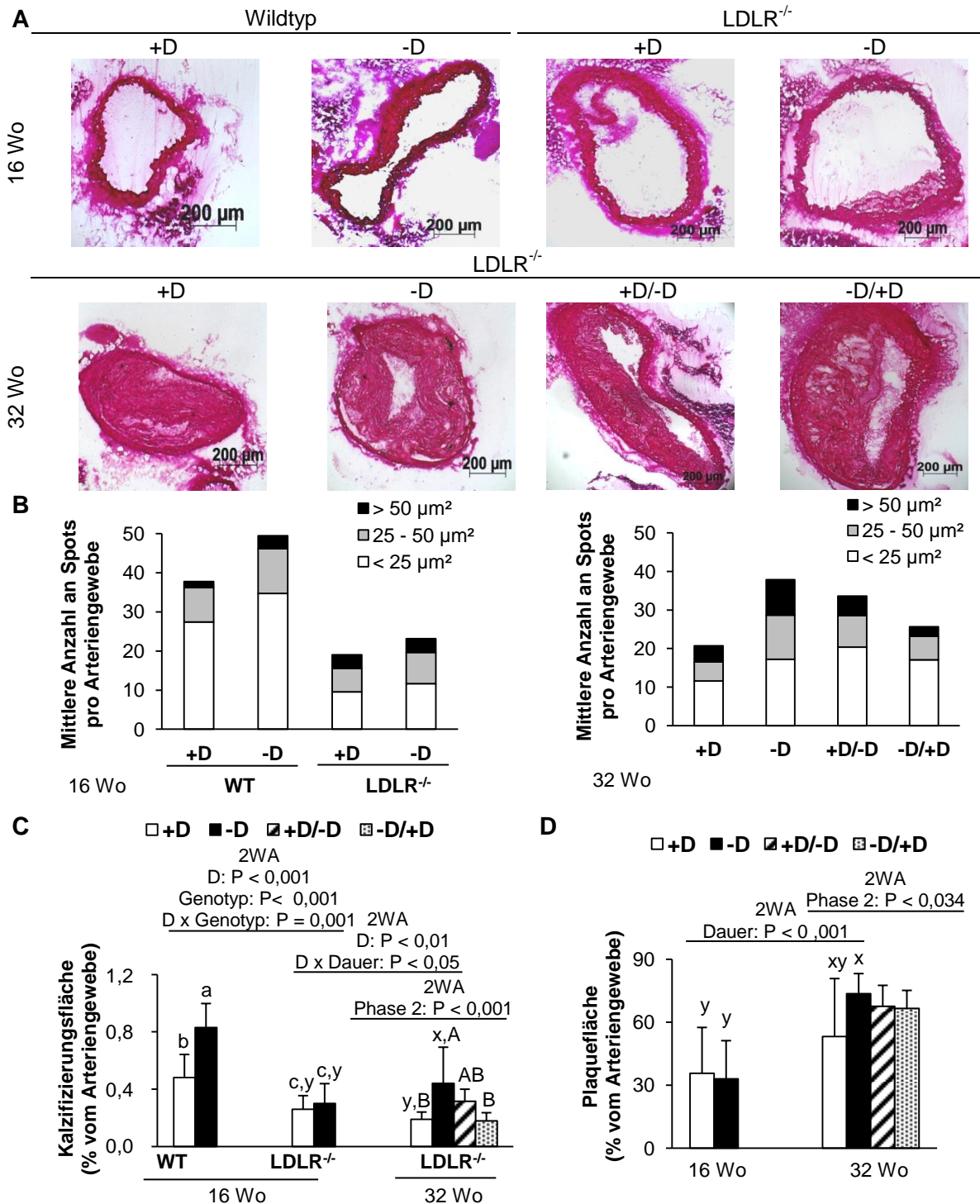


Abbildung 20: Einfluss von Vitamin D auf die Kalzifizierung und die Plauegröße der Arteria brachiocephalica von Wildtyp (WT)- und LDLR^{-/-} Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer Western diet mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.

(A) Repräsentative, mit von Kossa gefärbte Gefrierschnitte der Arteria brachiocephalica. Kalzifizierungen sind als schwarz gefärbte Areale erkennbar. (B) Mittlere Anzahl an Kalzifizierungssspots pro Gewebe der Arteria brachiocephalica. (C) Relative Kalzifizierungsfläche (% vom Arterienewebe). (D) Relative Plauefläche (% vom Arterienewebe). Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 12 Mäusen pro Gruppe dargestellt. Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Two-Way-ANOVA (2WA) unterscheiden sich signifikant voneinander, $P < 0,05$.

3.3.9.3 Nachweis der Kalzifizierung in der Arteria femoralis

Auch die Oberschenkelarterie sollte hinsichtlich des Einflusses von Vitamin D auf die Kalzifizierung untersucht werden. Nach 16-wöchiger Fütterung gab es keine signifikanten Unterschiede bei den Verkalkungsflächen zwischen den Genotypen und der Vitamin D-Behandlung der Gruppen (Abbildung 21A und C). Es konnte nur eine Tendenz für eine vermehrte Kalzifizierung bei LDLR^{-/-} Mäusen mit unzureichender Vitamin D-Versorgung im Vergleich zu denen mit adäquater Vitamin D-Zufuhr nachgewiesen werden ($P < 0,10$). Eine 32-wöchige Fütterung der LDLR^{-/-} Mäuse mit einer adäquaten Vitamin D-Menge war mit einer signifikanten Verringerung der Kalzifizierungsfläche ($P < 0,01$) im Vergleich zu 16-wöchiger +D Fütterung assoziiert, während sich die Kalzifizierung zwischen den -D Gruppen der beiden Zeiträume nicht veränderte. Die Two-Way ANOVA ergab somit einen Vitamin D-Effekt auf die Verkalkung ($P = 0,01$). Nach 32-wöchiger Fütterung konnten die größten Verkalkungsareale bei den -D Mäusen ermittelt werden. Aufgrund der hohen Standardabweichung konnten jedoch keine Unterschiede zu den anderen 3 Gruppen festgestellt werden. Die +D/-D Tiere hatten eine signifikant höhere Kalzifizierungsfläche als die +D Tiere ($P = 0,01$), unterschied sich aber nicht von den -D/+D und -D Mäusen. Die 2. Fütterungsphase und die damit verbundene Vitamin D-Versorgung war von größerer Bedeutung ($P < 0,05$) als des ersten Behandlungszeitraums. Die Anzahl und Größe der Spots ist in Abbildung 21B dargestellt. Nach 16-wöchiger Fütterung wiesen die -D Mäuse die meisten Spots im Vergleich zu den +D Tieren und den WT-Tieren auf, die sich nicht voneinander unterschieden. Nach 32 Wochen zeigten auch die LDLR^{-/-} Mäuse mit unzureichender Vitamin D-Versorgung die größte Spotzahl, wobei eine Zunahme an mittleren ($10 - 20 \mu\text{m}^2$) und großen ($> 20 \mu\text{m}^2$) Spots erkennbar war. Die +D und -D/+D Mäuse waren bezüglich Spotzahl vergleichbar, wobei die -D/+D Gruppe eine höhere Zahl kleiner ($< 10 \mu\text{m}^2$) Spots und die +D Mäuse einen größeren Anteil großer Spots aufwies. Die +D/-D Mäuse hatten einen ähnlichen Anteil an kleinen und mittleren Verkalkungsspot, jedoch weniger große Spots im Vergleich zu der -D Gruppe. Die Plaquefläche war nach 32 Wochen im Vergleich zu 16 Wochen bei den -D Tieren signifikant erhöht ($P < 0,001$) und das Risiko für eine Gefäßokklusion nahm, v. a. in der -D und +D/-D Gruppe, deutlich zu (Abbildung 21D). Die Plaquefläche der +D Mäuse war zwischen den beiden Zeiträumen nicht unterschiedlich. Es konnte mittels Two-Way ANOVA ein signifikanter Effekt von Vitamin D ($P < 0,05$) und der Fütterungsdauer ($P < 0,001$) sowie eine Interaktion beider Parameter ($P < 0,001$) festgestellt werden. Die Vitamin D-Versorgung in den zweiten 16 Wochen hatten einen bedeutenden Einfluss auf die Plaquefläche ($P < 0,001$), während die erste Fütterungsphase eine untergeordnete Rolle hatte.

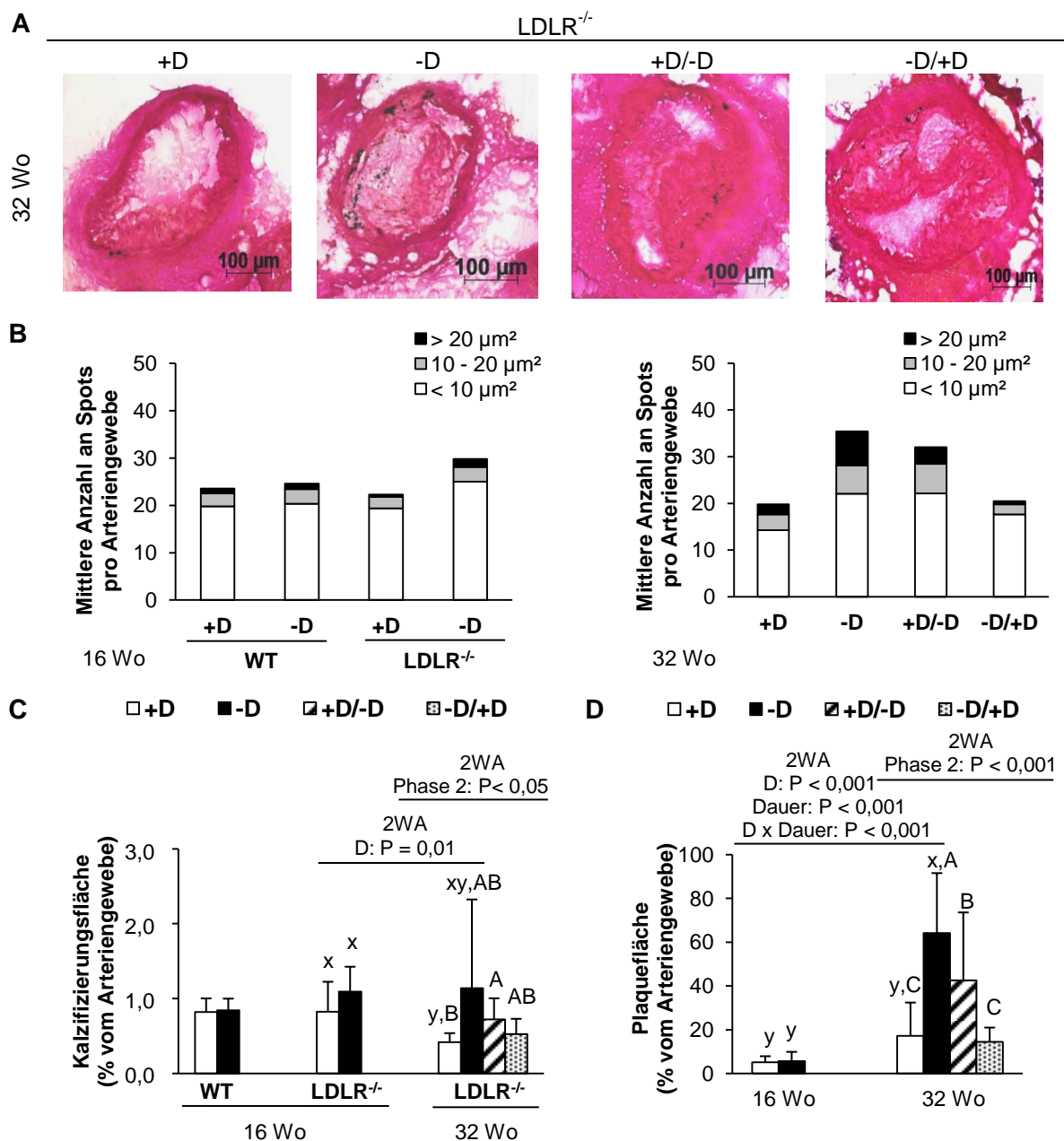


Abbildung 21: Einfluss von Vitamin D auf die Kalzifizierung und die Plauegröße der Arteria femoralis von Wildtyp (WT)- und $LDLR^{-/-}$ Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer *Western diet* mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.

(A) Repräsentative, mit von Kossa gefärbte Gefrierschnitte der Arteria femoralis. Kalzifizierungen sind als schwarz gefärbte Areale erkennbar. (B) Mittlere Anzahl an Kalzifizierungssots pro Gewebe der Arteria femoralis. (C) Relative Kalzifizierungsfläche (% vom Arterienewebe). (D) Relative Plauefläche (% vom Arterienewebe). Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 12 Mäusen pro Gruppe dargestellt. Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Two-Way-ANOVA (2WA) unterscheiden sich signifikant voneinander, $P < 0,05$.

3.3.10 Immunhistochemischer Nachweis der Expression von Osteoblastendifferenzierungsfaktoren in der Aorta

Da bereits der Zusammenhang zwischen vaskulärer Kalzifizierung und einer erhöhten Expression von Osteoblastendifferenzierungsfaktoren nachgewiesen werden konnte, sollte auch in der Aorta, als Hauptgefäß des Körpers, Bmp-2 als einer der bedeutendsten osteogenen Faktoren untersucht werden (Abbildung 22). Ein Nachweis von Bmp-2 ist

jedoch vorwiegend in Klappenarealen oder Plaques möglich. Somit konnte keine positive Reaktion bei den WT-Tieren in der Aorta festgestellt werden. Daher wurde die Bmp-2-Expression nur in den Aorten der LDLR^{-/-} Mäusen analysiert. Nach 16-wöchiger Fütterung konnte eine tendenziell höhere Expression von Bmp-2 bei Mäusen mit unzureichender Vitamin D-Versorgung im Vergleich zu denen mit adäquater Versorgung gezeigt werden ($P < 0,10$). Weiterhin nahm die Bmp-2-Expression der Tiere bei Fütterung der -D Diät für 32 Wochen im Vergleich zu 16 Wochen weiter zu, während bei den +D Tieren zwischen den beiden Zeiträumen kein Unterschied nachweisbar war. Die Two-Way ANOVA ergab dabei einen Vitamin D-Effekt ($P < 0,001$). Die 32 Wochen -D gefütterten Mäuse wiesen eine signifikant höhere Bmp-2-Expression auf als die +D und -D/+D Tiere ($P < 0,005$), zeigten jedoch keinen Unterschied zu den +D/-D Mäusen. Letztere unterschieden sich auch nicht von den +D und -D/+D Tieren. Die Vitamin D-Gabe des 2. Fütterungszeitraums von großer Bedeutung für die Expression dieses osteogenen Faktors ($P < 0,001$), während die Vitamin D-Versorgung der ersten 16 Wochen eher eine untergeordnete Rolle hatte.

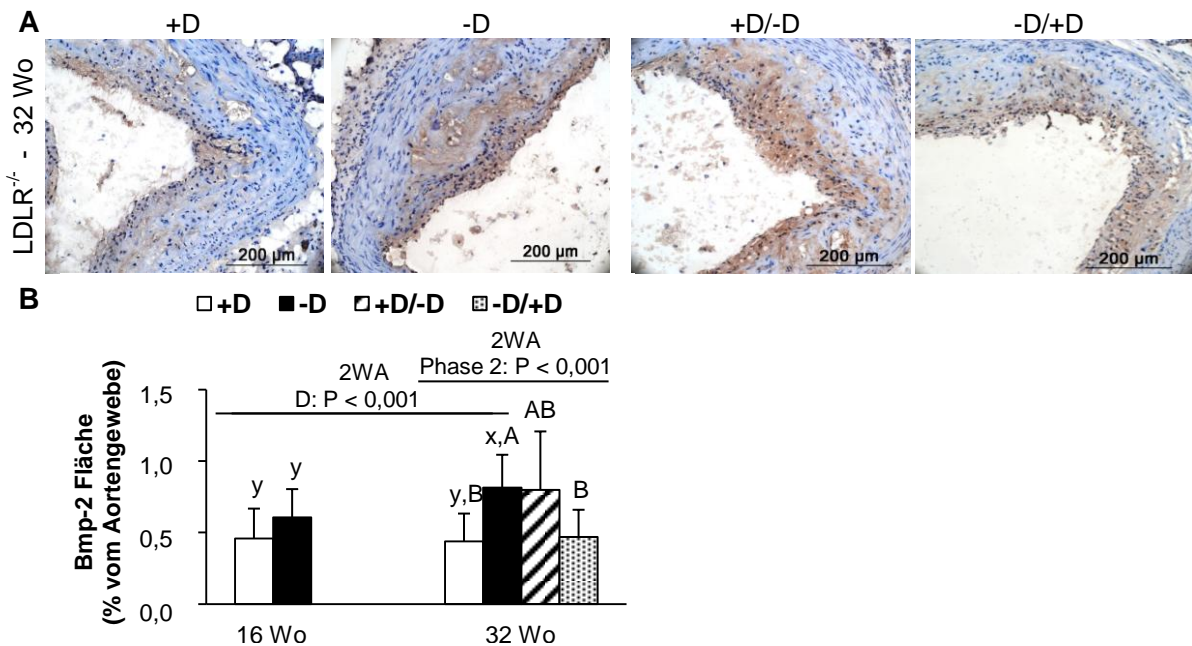


Abbildung 22: Einfluss von Vitamin D auf die Expression von Bmp-2 in der Aorta von Wildtyp (WT)- und LDLR^{-/-} Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer Western diet mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.

(A) Repräsentative, immunhistochemisch für Bmp-2 gefärbte Gefrierschnitte der Aorta. (B) Relative Bmp2-Expression (% vom Aortengewebe). Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 12 Mäusen pro Gruppe dargestellt. Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Two-Way-ANOVA (2WA) unterscheiden sich signifikant voneinander, $P < 0,05$.

3.3.11 Konzentrationen an Calcium und anorganischem Phosphat im Plasma

Um den möglichen Einfluss von Vitamin D auf wichtige, mit der Verkalkung assoziierte Plasmaparameter zu untersuchen, wurden die Plasmakonzentrationen an Calcium (Ca) und anorganischem Phosphat (P_i) bestimmt (Abbildung 23A und B). Vitamin D zeigte keinen Effekt auf die Plasmakonzentrationen an Calcium und anorganischem Phosphat

bei den 16 Wochen gefütterten Tieren. Die Plasmaspiegel beider Parameter waren bei den LDLR^{-/-} Mäusen signifikant höher als bei den WT-Tieren (Ca: P<0,01; P_i: P<0,001). Bei den LDLR^{-/-} Mäusen konnten nach 32-wöchiger Fütterung signifikant geringere Plasma-Calcium-Spiegel im Vergleich zu 16-wöchiger Fütterung nachgewiesen werden (P<0,001). Die Plasmaspiegel an anorganischem Phosphat waren nicht von der Fütterungsdauer beeinflusst. Zwischen den 4 Gruppen der 32 Wochen gefütterten LDLR^{-/-} Mäuse konnten keine Unterschiede bezüglich der Plasmakonzentrationen an Calcium und anorganischem Phosphat ermittelt werden.

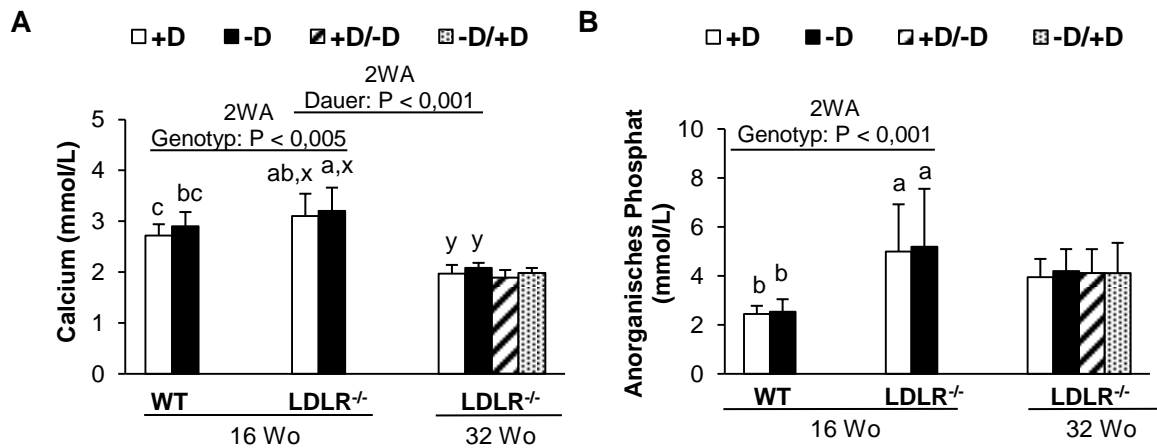


Abbildung 23: Einfluss von Vitamin D auf die Plasmakonzentrationen an Calcium und anorganischem Phosphat von Wildtyp (WT)- und LDLR^{-/-} Mäusen, die für 16 bzw. 32 Wochen mit einer *Western diet* mit adäquaten (+D) oder geringen (-D) Vitamin D-Mengen über die Diät versorgt wurden.

Plasmakonzentrationen an (A) Calcium und (B) anorganischem Phosphat von Wildtyp- und LDLR^{-/-} Mäusen. Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichungen von 12 Mäusen pro Gruppe dargestellt. Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Two-Way-ANOVA (2WA) unterscheiden sich signifikant voneinander, P < 0,05.

4 Diskussion

4.1 Tiermodelle

4.1.1 Die VDR-*knockout*-Mäuse

Um Einblicke in die physiologischen Wirkungen von Vitamin D und assoziierten Mangelerkrankungen zu schaffen, wurden spezifische Tiermodelle entwickelt. Experimentelle Untersuchungen an VDR-*knockout* (VDR^{-/-}) Mäusen lieferten dabei die besten Erkenntnisse, da durch den Rezeptormangel die genomischen und nicht-genomischen Vitamin D-Wirkungen in den Zellen fehlen. Daher wurden sie im Rahmen dieser Arbeit als Tiermodell verwendet. Die VDR^{-/-} Mäuse eignen sich sehr gut, um metabolische und pathophysiologische Veränderungen in Assoziation mit einem ausgeprägten Vitamin D-Mangel zu untersuchen (Zittermann 2010b). Dieses Mausmodell mit einem inaktivierten Vitamin D-Rezeptor (VDR) wurde im Jahr 2002 beschrieben (Erben et al. 2002). Durch homologe Rekombination wurde das für die erste Zinkfingerregion der DNA-Bindungsdomäne codierende Exon 2 des VDR durch eine bakterielle β -Galaktosidase (LacZ) mittels embryonaler Stammzelltechnologie ersetzt. LacZ als Reportergen ermöglicht, unter Transkriptionskontrolle des endogenen VDR-Promoters, die ontogenetische und postnatale Darstellung der VDR-Expressionsmuster in der Maus. Homozygote VDR^{-/-} Mäuse weisen verschiedene Veränderungen auf, wie Hypocalcämie, Hyperparathyroidismus, Rachitis, Osteomalazie, Entwicklung einer Alopezie sowie Minderwuchs, arterielle Hypertension und Herzhypertrophie (Bouillon et al. 2008b; Demay 2013), was bei Studien an diesem Tiermodell, wie im Rahmen dieser Arbeit, die Fütterung einer *Rescue diet* (calcium- und phosphatreich, 20% Laktose) erforderlich macht (Li et al. 1998). Diese Diät scheint im Dünndarm der Mäuse den Calciumtransport unabhängig vom 1,25(OH)₂D/VDR-System zu erhöhen, was vermutlich über einen passiven, parazellulären Calcium-Transport zur Normalisierung der Serum-Calciumspiegel bei Vitamin D-Mangel führt (Goltzman 2010). Es konnte bereits gezeigt werden, dass diese Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren vermehrt fibrotische Läsionen im Herzen aufweisen (Rahman et al. 2007). Bisher fehlen jedoch Untersuchungen am Gefäßsystem. Im Rahmen dieser Arbeit wurden aufgrund dessen histologische Analysen der Aortenklappe und der Gefäßzusammensetzung bei diesem, einen Vitamin D-Mangel nachahmenden Mausmodell (Nagpal et al. 2005) durchgeführt. Dabei wurden in diesem Versuch Wildtyp-Tiere in 2 Kontrollgruppen mitgeführt. Eine Gruppe wurde, wie die VDR^{-/-} Mäuse, mit der *Rescue diet* gefüttert, die andere erhielt eine Diät mit normalen Calcium- und Phosphorgehalten (Calcium 0,3%, Phosphor 0,156%) entsprechend den

Empfehlungen (*American Institute of Nutrition*, 1980). Dies war erforderlich, da Calcium per se einen Einfluss auf verschiedene Stoffwechselwege ausübt.

VDR^{-/-} Mäuse stellen jedoch nur ein Tiermodell dar, da der vollständige, genetischen VDR-Mangel in der Praxis, d.h. am Menschen, in dieser Art und Weise nicht auftritt. Somit können auftretende Veränderungen bei experimentellen Untersuchungen an diesen Mäusen nicht auf die humane Situation übertragen werden. Beim Menschen ist die selten auftretende Typ II Vitamin D-abhängige Rachitis (VDDR II) bekannt. Dabei liegt eine Mutation im VDR-Gen und somit eine Vitamin D-Resistenz des Gewebes vor (Brooks et al. 1978), sodass Vitamin D seine Wirkungen in der Zelle nicht entfalten kann. Die Patienten entwickeln eine Calciummalabsorption, Hypocalcämie, Hyperparathyroidismus, Knochenerkrankungen, Alopezie und Myopathie (Brooks et al. 1978): Eine Behandlung mit Vitamin D-Metaboliten ist nur sehr eingeschränkt möglich und es muss auf hochdosierte, orale Calciumsupplemente zurückgegriffen werden (Balsan et al. 1986).

Im Jahr 1997 gelang es erstmals, ein Mausmodell des VDDR II zu entwickeln. Diese VDR^{-/-} Mäuse besaßen eine Mutation des ersten Zinkfingers, der zur gezielten Inaktivierung des VDR führte. Problematisch hierbei war jedoch, dass sie in einigen grundlegenden phänotypischen Merkmalen vom VDDR II des Menschen abwichen und bei Homozygotie neben Auffälligkeiten wie Rachitis und Alopezie noch Infertilität durch Uterushypoplasie und eine stark eingeschränkte Lebenserwartung aufwiesen (Yoshizawa et al. 1997). Daher wurde kurze Zeit später ein weiteres Mausmodell mit einem, dem VDDR II des Menschen, vergleichbaren Phänotyp, ungestörter Fertilität und normaler Lebenserwartung bei vorhandener Rachitis und Alopezie entwickelt (Li et al. 1997). Diese Tiere wiesen eine durch Insertion verursachte, gezielte Mutation im Sequenzbereich des zweiten Zinkfingers der DNA-Bindungsregion auf, was einen vorzeitigen Abbruch der Transkription bewirkte. Vor der Entwicklung der VDR^{-/-} Mäuse erfolgten Untersuchungen zum Vitamin D-Mangel an anderen Tiermodellen. Erste in vivo Studien wurden an Vitamin D-defizienten Ratten durchgeführt (Halloran und Luca 1981; Miller et al. 1983; Dostal und Toverud 1984; Underwood und DeLuca 1984; Mathews et al. 1986). Dabei war jedoch problematisch, dass nur Wechselwirkungen des Vitamin D-Stoffwechsels aber keine molekularen Grundlagen beteiligter Prozesse untersucht werden konnten. Neben diesem Rattenmodell gibt es seit einigen Jahren auch Studien an Schweinen. Dieses Tiermodell wurde zufällig entdeckt und ähnelt aufgrund einer genetisch bedingten Funktionsstörung der renalen Metabolisierung des Vitamin D dem VDDR I des Menschen (Kaune und Harmeyer 1987). Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit der Tiere sowie deren ungeklärten molekularen Defekt wird das Schwein als Modelltier nur in wenigen Bereichen der Vitamin D-Forschung eingesetzt (Axen et al. 1998). Beim VDDR I handelt es sich, im Unterschied zum VDDR II, um den Typ I der Vitamin D-abhängigen Rachitis, der aus einem Funktionsdefekt der renalen 1 α -Hydroxylase resultiert (Labuda et al. 1992; Fu et al.

1997) und mit Hilfe von lebenslanger Gabe physiologischer Vitamin D-Dosen behandelt werden kann (Malloy und Feldmann 1999).

4.1.2 Die LDL-Rezeptor-*knockout*-Mäuse

Üblicherweise entwickeln Mäuse keine atherosklerotischen Veränderungen. Da Atherosklerose-assoziierte kardiovaskuläre Erkrankungen jedoch die Haupttodesursache in den westlichen Industrienationen darstellen, sollten Tiermodelle zur Untersuchung der Pathogenese und einer möglichen Behandlung atherosklerotischer Läsionen entwickelt werden. Im Jahr 1992 konnte durch einen *Knockout* des Gens für Apolipoprotein E (ApoE) ein murines Atherosklerose-Modell entwickelt werden (Zhang et al. 1992). Diese Mäuse wiesen bei der Fütterung einer normalen Diät bereits komplexe atherosklerotische Läsionen auf. ApoE-*knockout* (ApoE^{-/-}) Mäuse stellen das am besten charakterisierte Läsionsmodell dar. Daneben haben sich LDLR-*knockout* (LDLR^{-/-}) Mäuse zur Untersuchung der Atherosklerose bewährt. Diese Tiere besitzen erhöhte LDL-Spiegel, aber keine bzw. nur kleine, sich langsam entwickelnde Läsionen bei Fütterung einer normalen Diät (Zadelaar et al. 2007), können jedoch unter mehrwöchiger, cholesterin- und fettreicher Diät, der sogenannten *Western diet*, spontan Atherosklerose und Verkalkung ausbilden (Ishibashi et al. 1993; Piedrahita et al. 1992; Knowles und Maeda 2000). Die Morphologie der Läsionen ist bei beiden Mausmodellen vergleichbar, mit einer zeitabhängigen Plaqueentwicklung beginnend an der proximalen Aorta. LDLR^{-/-} Mäuse stellen aufgrund ihrer geringgradigeren Hyperlipidämie ein moderateres Atherosklerosemodell im Vergleich zu den ApoE^{-/-} Mäusen dar (Zadelaar et al. 2007). Zwischen beiden Modellen gibt es somit nur Unterschiede bezüglich Höhe des Cholesterinspiegels und der Geschwindigkeit der Plaqueentwicklung. Aufgrund des bewiesenen Zusammenhangs zwischen ApoE und dem Vitamin D-Stoffwechsel, d.h. einer Assoziation des ApoE ε4-Allels mit erhöhten 25(OH)D-Spiegeln (Huebbe et al. 2011), fiel die Entscheidung für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit auf die LDLR^{-/-} Maus als Atherosklerosemodell. Dabei sollte bei Fütterung einer *Western diet* mit unterschiedlichen Vitamin D-Konzentrationen für 16 bzw. 32 Wochen untersucht werden, ob eine physiologische, alimentäre Vitamin D-Versorgung einen Einfluss auf atherosklerotische Prozesse in verschiedenen fortgeschrittenen Erkrankungsstadien hat. Bei diesen Versuchen an LDLR^{-/-} Mäusen besteht, im Unterschied zum genetischen VDR-Mangel, aufgrund der Diät und den darin enthaltenen, verschiedenen Vitamin D-Konzentrationen, eine bessere Übertragbarkeit der Daten auf den Menschen. Die *Western diet* spiegelt gut die typische humane Ernährungsweise in den westlichen Industrienationen wider. Außerdem entsprechen die Vitamin D-Gaben in der Diät auch den bei Menschen nachgewiesenen Vitamin D-Versorgungszuständen, abhängig von deren Ernährungs- und Verhaltensweisen sowie bedingt durch mögliche Erkrankungen.

Der LDL-Rezeptor hat eine zentrale Bedeutung bei der Regulation der Cholesterinhomöostase (Brown und Goldstein 1986). In den Hepatozyten ist er für die Aufnahme von LDL (*low density lipoprotein*) und IDL (*intermediate density lipoprotein*) aus dem Blut zuständig und reguliert somit die Plasmacholesterinkonzentration. Durch Mutation dieses Rezeptors kommt es beim Menschen zum Erkrankungsbild der familiären Hypercholesterinämie Typ IIa. Patienten mit diesem Erbdefekt entwickeln frühzeitig stark ausgeprägte atherosklerotische Läsionen der Gefäßwände (Hobbs et al. 1992), was mit einer erheblichen Verkürzung der Lebenserwartung einhergeht. Im Mausmodell manifestiert sich der Rezeptor-*Knockout* (KO) in einer verzögerten Beseitigung/Clearance der cholesterinreichen Lipoproteine VLDL (*very low density lipoprotein*), IDL und LDL aus dem Plasma, was zu deren Akkumulation und im weiteren Verlauf zur Ablagerung von Cholesterinestern in makrophagozytären Schaumzellen im ganzen Körper führt (Ishibashi et al. 1994). Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen führt diese Mutation bei den LDLR^{-/-} Mäusen bei Fütterung einer fettreichen Diät zu einer mehr als zehnfachen Erhöhung des Cholesterinspiegels auf über 25 mmol/L, wobei Triglyzerid- und HDL-Spiegel unverändert bleiben (Ishibashi et al. 1993). Da die Lipidkonzentrationen einen Einfluss auf die endotheliale Dysfunktion, die Inflammation und den Verlauf der Atherosklerose haben können, wurden die Triglyzerid- und Cholesterinkonzentrationen im zweiten Versuch dieser Arbeit an LDLR^{-/-} Mäusen untersucht. Es konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Vitamin D-Behandlungsgruppen nachgewiesen werden. Dadurch kann eine Veränderung der Lipidkonzentration als mögliche Ursache bzw. Einflussfaktor auf die Atherosklerose-Entwicklung in diesem Versuch ausgeschlossen werden. Dies entspricht Daten einer anderen Studie, bei der ebenfalls keine Unterschiede in Triglyzerid- und Cholesterinkonzentration zwischen den Vitamin D-Behandlungsgruppen nachweisbar waren (Weng et al. 2013). In der Folge erhöhter Plasmalipidspiegel entstehen massive atherosklerotische Veränderung im Bereich der Aortenwurzel (Zadelaar et al. 2007). Dies konnte auch in den Versuchen 2 und 3 an LDLR^{-/-} Mäusen in dieser Arbeit festgestellt werden.

4.1.3 Die Wildtyp-Mäuse

Wildtyp (WT)-Mäuse sind aufgrund ihrer hohen HDL- sowie niedrigen LDL- und VLDL-Spiegel resistent gegen Atherosklerose (Zadelaar et al. 2007). Diese Mäuse repräsentieren sozusagen eine gesunde Tierpopulation und eignen sich daher ideal als Referenzgruppe. Im Versuch 3 dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob bei diesen Tieren im Vergleich zu LDLR^{-/-} Mäusen ebenfalls Veränderungen im Bereich der Herzklappen und der Gefäße auftreten. Somit könnte geklärt werden, ob Vitamin D-Mangel-induzierte pathologische Prozesse im vaskulären System im Zusammenhang mit einer atherosklerotischen Erkrankung stehen oder dies unabhängig davon stattfindet. Im

Versuch 1 dieser Arbeit dienten die WT-Gruppen als Kontrolle, um Calcium-vermittelte Effekte auf das vaskuläre System ausschließen zu können und somit Wirkungen eines genetisch bedingten VDR-Mangels im Vergleich zu Tieren, die diesen Rezeptor exprimieren, zu untersuchen.

4.2 Vitamin D Status

Zur Beurteilung der Vitamin D-Versorgungslage ist die Messung der zirkulierenden 25(OH)D-Konzentration im Blut der am besten geeignete Parameter, da die Synthese dieses Vitamin D-Metaboliten keiner strengen Regulation unterliegt und vorwiegend von der Substratkonzentration abhängig ist. Außerdem sind die 25(OH)D-Spiegel eng mit der Menge des aufgenommenen oder endogen synthetisierten Vitamin D assoziiert und es hat eine nachgewiesene Halbwertszeit von 2 bis 3 Wochen (Holick 2004). Bei LDLR^{-/-} und WT-Mäusen mit unzureichender Vitamin D-Zufuhr über die Diät konnte, wie erwartet, eine geringere Plasma-25(OH)D-Konzentration im Vergleich zu adäquater Versorgung festgestellt werden. Eine weitere Erhöhung der Calcidiolspiegel konnte bei reichlich mit Vitamin D-versorgten LDLR^{-/-} Mäusen im Vergleich zur adäquaten Gabe nach 16-wöchiger Fütterung ermittelt werden. Somit spiegelt dieser Parameter gut die Vitamin D-Zufuhr über die Diät wider. Fraglich ist nur, welche 25(OH)D-Spiegel als möglicher optimaler Bereich anzusehen sind. Eine Vitamin D-Gabe von 1.000 IU/kg Diät in den Versuchen 2 und 3 an LDLR^{-/-} und WT-Mäusen wurde für diese Tiere als adäquate Dosierung festgelegt und entspricht damit den Empfehlungen (NRC; 1995). Beim Menschen müssten jedoch zum Erreichen eines optimalen Vitamin D-Status verschiedene gesundheitliche, metabolische und Umweltfaktoren berücksichtigt werden, wobei bei vielen Personen höhere Vitamin D-Dosen zum Erreichen einer ausreichenden Versorgungslage notwendig wären. Dies könnte dann aufgrund der häufig eingeschränkten endogenen Synthese und der wenigen Nahrungsquellen oftmals nur über Supplemente erreicht werden. Außerdem müsste die Vitamin D-Gabe aufgrund der unterschiedlichen Bedürfnisse der verschiedenen Organsysteme individuell angepasst werden. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Dosierung von 1.000 IU/kg Diät und deren positive Effekte weisen darauf hin, dass bei den Mäusen vermutlich ein nahezu optimaler Vitamin D-Status erreicht werden konnte. Beim Menschen ist dies jedoch unklar und die Daten der vorliegenden Versuche können aufgrund dessen nicht eins zu eins auf die humane Situation übertragen werden.

Neben den 25(OH)D-Spiegeln der Mäuse wurde auch das 24,25(OH)₂D bestimmt. 24,25(OH)₂D entsteht aus 25(OH)D mittels der 24-Hydroxylase (CYP24A1) und ist ein Abbauprodukt des Vitamin D-Moleküls. Es war bei den adäquat mit Vitamin D-versorgten Tieren höher als bei denen mit Vitamin D-Insuffizienz. Eine weitere Erhöhung an

24,25(OH)₂D trat bei reichlicher Vitamin D-Zufuhr über die Diät auf. Es konnte bereits gezeigt werden, dass 24,25(OH)₂D auch einen Einfluss auf die Atherosklerose haben kann. Transgene Ratten, die das CYP24-Gen exprimieren, weisen geringere 24,25(OH)₂D-Spiegel auf und entwickeln, auch bei einer Standard-Rattendiät, eine Hyperlipidämie sowie Atherosklerose. Somit scheint 24,25(OH)₂D ebenfalls an der atherosklerotischen Plaqueeentwicklung beteiligt zu sein (Kasuga et al. 2002). Da auch bei den Mäusen dieser Arbeit die 24,25(OH)₂D-Spiegel bei alimentärer Vitamin D-Unterversorgung verringert waren, könnte dieses Abbauprodukt des Vitamin D-Metabolismus eine wichtige Rolle bei der Atherosklerose-Entwicklung von LDLR^{-/-} Mäusen haben.

Bisherige epidemiologische Studien konnten einen Zusammenhang zwischen geringen Plasma-Vitamin D-Spiegeln und der Prädisposition für kardiovaskuläre Ereignisse (Wang et al. 2008; Lee et al. 2008) sowie einer erhöhten Gesamtsterblichkeit (Zittermann et al. 2009) nachweisen. Einige Beobachtungsstudien zeigten außerdem eine verminderte kardiovaskuläre Sterblichkeit bei Patienten mit CKD, die Calcitriol erhalten haben (Shoben et al. 2008; Wolf et al. 2008). Am Tiermodell (ApoE^{-/-} Mäuse) bewirkte eine orale Gabe von Calcitriol eine Abnahme atherosklerotischer Läsionen (Takeda et al. 2010). Aufgrund dessen wurde die biologisch aktive Form des Vitamin D, das 1,25(OH)₂D₃, im zweiten Versuch an LDLR^{-/-} Mäusen sowie im dritten Versuch an WT- und LDLR^{-/-} Mäusen bestimmt. Es entsteht in den proximalen Tubuli der Niere durch enzymatische Umwandlung aus 25(OH)D, ist streng reguliert und die Plasmakonzentrationen bleiben oftmals im normalen Bereich trotz einer möglichen, deutlichen Reduktion der Plasmaspiegel an 25(OH)D (Holick 2004). Die Mäuse des 2. Versuchs, die adäquat mit Vitamin D versorgt wurden, wiesen höhere Spiegel an 1,25(OH)₂D auf als die im Vitamin D-Mangel, während sich die Tiere mit reichlicher Vitamin D-Gabe trotz geringerer Verkalkung nicht von denen mit unzureichender Vitamin D-Versorgung unterschieden. Die LDLR^{-/-} Mäuse des 3. Versuchs mit 32-wöchiger, adäquater Vitamin D-Versorgung wiesen ebenfalls höhere Plasma-1,25(OH)₂D₃-Spiegel im Vergleich zu den Tieren mit unzureichender Vitamin D-Versorgung auf. Normalerweise ist eine hohe Vitamin D-Aufnahme mit einer Abnahme der Calcitriolspiegel im Plasma über eine Verminderung der Aktivität der renalen 1 α -Hydroxylase (CYP27B1), dem Enzym zur Umwandlung von 25(OH)D in die biologisch aktive Form 1,25(OH)₂D, assoziiert (Fleet et al. 2008). In den Versuchen der vorliegenden Arbeit können die verringerten Calcitriolspiegel durch eine hohe Vitamin D-Aufnahme induziert worden sein. Daher scheinen Effekte hoher 25(OH)D- und 1,25(OH)₂D₃-Konzentrationen auf pathologische Prozesse im Gefäßsystem unterschiedlich zu sein. Die beobachteten vaskulären Veränderungen, wie eine vermehrte valvuläre Kalzifizierung bei unzureichenden 25(OH)D-Spiegeln, scheinen bereits fortzuschreiten, wenn die 1,25(OH)₂D₃-Konzentrationen noch im Normalbereich sind.

Zusammen mit PTH gewährleistet Vitamin D die Serumhomöostase an Calcium und Phosphat dadurch, dass es sowohl auf die intestinale Absorption, die renale Rückresorption als auch auf die Resorption aus dem Knochen stark regulatorisch eingreift. Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein Einfluss der Vitamin D-Gabe auf die Plasmakonzentrationen von Calcium und anorganischem Phosphat nachgewiesen werden. Auch in einer anderen Studie gab es keinen Einfluss von Vitamin D auf die Serumkonzentration von Calcium (Weng et al. 2013). Auch die VDR^{-/-} - und WT-Mäuse wiesen keinen Unterschied im Plasmaspiegel an anorganischem Phosphat auf. Mit zunehmendem Alter der Mäuse kam es zu einer Abnahme der Calciumspiegel im Plasma, wobei auch hier kein Unterschied zwischen den Gruppen bestand. Auch eine andere Arbeitsgruppe konnte diese altersbedingte Reduktion der Calciumkonzentration nachweisen (Weiss et al. 2013). Da keine Änderungen der Calcium- und anorganischen Phosphatspiegel festgestellt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass diese zirkulierenden Plasmaparameter keine bedeutende Rolle im Zusammenhang mit den pathologischen Gefäßveränderungen bei unzureichender, alimentärer Vitamin D-Versorgung haben.

4.3 Wirkungen von Vitamin D auf das vaskuläre System

4.3.1 Experimentell nachgewiesene, Vitamin D-abhängige Gefäßveränderungen

Es konnte bereits ein kausaler Zusammenhang zwischen verminderten Serum-25(OH)D-Spiegeln und einer vermehrten vaskulären Kalzifizierung beim Menschen nachgewiesen werden (Cannata-Andia et al. 2006). In Zellkulturstudien hemmte eine VDR-Aktivierung verschiedene Schritte der Pathogenese der Atherosklerose. Dabei scheint Vitamin D die Bildung von Schaumzellen aus Makrophagen zu hemmen und die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle sowie die Proliferation glatter Muskelzellen zu unterdrücken (Bouillon et al. 2008a; Riek et al. 2013; Weng et al. 2013).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss ein Vitamin D-Mangel auf Entstehung und Verlauf der Atherosklerose sowie auf den Prozess der Kalzifizierung innerhalb des Gefäßsystems am Mausmodell hat. Es konnte erstmals an LDLR^{-/-} Mäusen gezeigt werden, dass eine unzureichende, alimentäre Vitamin D-Versorgung mit einem vermehrten Auftreten von Kalzifizierungen im Vergleich zur adäquaten Vitamin D-Gabe assoziiert ist. Nach 16-wöchiger Fütterung konnte kein Einfluss auf Plaque-, Kollagen- oder Lipidanteil in den atherosklerotischen Läsionen festgestellt werden. Auch der Anteil an Makrophagen und glatten Muskelzellen war durch die Behandlung nicht beeinflusst. Ein prolongierter, 32-wöchiger Vitamin D-Mangel verschlechterte die Erkrankung, was mit einer weiteren Zunahme der

Kalzifizierungsfläche, aber auch mit einer Erhöhung des Lipidanteils assoziiert war. Eine langfristige Fütterung der Diäten führte bei LDLR^{-/-} Mäusen zu einer Erhöhung der Plaquesfläche, jedoch zu einer Verringerung der Kollagenfläche, wobei sich die Behandlungsgruppen nicht voneinander unterschieden. Außerdem war ein genetisch bedingter VDR-Mangel ebenfalls mit einer erhöhten Kalzifizierungsfläche im Bereich der Aortenklappe im Vergleich zu WT-Tieren assoziiert. Dies trat unabhängig von weiteren vaskulären Veränderungen auf. In anderen Tierstudien war ein Vitamin D-Mangel mit einem beschleunigten Fortschreiten der Atherosklerose und einer verminderten VDR-Aktivierung verbunden, was ebenfalls mit einer Erhöhung der Größe atherosklerotischer Plaques zusammenhing (Schnatz et al. 2012; Weng et al. 2013).

Bei der Analyse anderer Plaquebestandteile konnte im Rahmen dieser Arbeit, neben der Kalzifizierung, sowohl beim Lipidanteil als auch beim Anteil an Makrophagen und Entzündungsmarkern ein höherer Gehalt bei der 32 Wochen Vitamin D-unterversorgten Gruppe im Vergleich zur adäquat mit Vitamin D-versorgten Gruppe nachgewiesen werden. Aufgrund des bekannten Zusammenhangs zwischen dem Auftreten einer vaskulären Kalzifizierung und der osteogenen Differenzierung von Zellen des Gefäßsystems, wurde die Expression von Osteoblastendifferenzierungsfaktoren untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl eine durch das Fehlen des VDR als auch durch eine Vitamin D-Mangel-induzierte Kalzifizierung mit einer erhöhten Expression dieser Marker assoziiert war. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass dabei der Anteil an glatten Muskelzellen im Vergleich zur Alkalischen Phosphatase, als Marker für eine osteogene Umwandlung, mit zunehmender Kalzifizierungsfläche bei unzureichender Vitamin D-Versorgung im Vergleich zu adäquater Vitamin D-Gabe abnahm. Szeto und Kollegen gelang der Nachweis, dass eine Aktivierung des makrophagozytären VDR die Atherosklerose in Mäuse durch eine Unterdrückung des lokalen RAAS hemmt (Szeto et al. 2012). Somit scheint Vitamin D nachweisbar wichtige Wirkungen auf das vaskuläre System und dabei einen Einfluss auf pathologische Veränderungen im Rahmen der Atherosklerose und Kalzifizierung auszuüben.

4.3.2 Verlauf der Atherosklerose und der vaskulären Kalzifizierung – allgemeiner Überblick

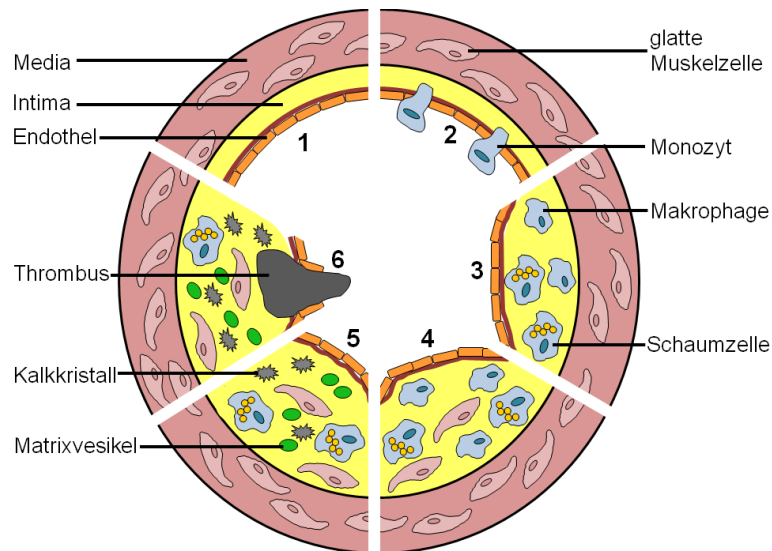
Vaskuläre Kalzifizierungen sowie Lipidablagerungen und assoziierte inflammatorische Prozesse in den Gefäßen stellen eine wichtige Ursache für kardiovaskuläre Erkrankungen dar. Sie treten vorwiegend bei Patienten mit Osteoporose, Atherosklerose, Diabetes, Bluthochdruck und chronischen Nierenerkrankungen zusammen mit einem gestörten Calcium/Phosphat-Serumspiegel und verbundenem, abnormalen Knochenstoffwechsel auf (Zittermann et al. 2007; Nitta 2011). Durch Störungen im vaskulären Calciumgehalt kommt es zu negativen Auswirkungen auf den Cholesterinstoffwechsel, die

Insulinsekretion und -sensitivität, Vasodilatation sowie inflammatorische und thrombotische Prozesse, die letzten Endes zu Verkalkungen führen (Wang et al. 2012). Die bedeutende Rolle der Plasmaspiegel an Calcium und anorganischem Phosphat auf den Kalzifizierungsprozess kommt dadurch zustande, dass durch die Änderung der Membranpermeabilität der Zellen ein erhöhter Calcium-Influx stattfindet. Bei hohen Calcium- und Phosphatspiegeln können sich eingewanderte Calciumionen in membrangebundenen, intrazellulären Kompartimenten mit Phosphationen verbinden. Dies führt zu deren Präzipitation als sog. Calciumphosphatsalze. Sie bestehen vorwiegend aus Hydroxylapatit, können aber auch Calciumoxalat oder Octacalciumphosphat enthalten (Giachelli 1999). Da bei den Mäusen der Versuche dieser Arbeit keine Unterschiede in den Calcium- und anorganischen Phosphatkonzentrationen im Plasma nachgewiesen werden konnten, scheinen diese Plasmaparameter keinen Einfluss auf die beobachteten Effekte bezüglich der Kalzifizierung zu haben. Durch Kalzifizierungen im Gefäßsystem wird die Elastizität dieser Gefäße reduziert, was wiederum das Risiko für arteriellen Hochdruck, Aortenstenose, verschlechterte kardiovaskuläre Hämodynamik, Herzhypertrophie und Ischämie drastisch steigert (Karwowski et al. 2012). Durch ihre Folgeerkrankungen wie koronare Herzkrankheit, plötzlicher Herztod, periphere arterielle Verschlusskrankheit, Herzinfarkt und Schlaganfall, sind diese pathologischen Gefäßveränderungen mit einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität assoziiert (London 2005; El-Abbadi und Giachelli 2005; Giachelli 2009; Wayhs et al. 2002; Keelan et al. 2001; Kelly et al. 1992; Ohtsuka et al. 1994, 1992). Arterielle Kalzifizierung stellt einen von Zellen aktiv regulierten Prozess dar, der in morphologischer, biologischer und molekularer Hinsicht zahlreiche Analogien mit der Osteogenese und dem Knochenstoffwechsel aufweist (Abedin et al. 2004; Bostrom 2001; Demer und Tintut 2008; Johnson et al. 2006). Man unterscheidet hierbei, abhängig von Lokalisation, Ätiologie, Histologie und klinischer Ausprägung, vier Haupttypen: (1) atherosklerotische Intimaverkalkung, (2) Mediaverkalkung (Mönckeberg-Sklerose), (3) Aortenklappenverkalkung und (4) urämisch-kalzifizierende Arteriopathie (Calciphylaxie) (Demer und Tintut 2008; Johnson et al. 2006; Lee D 2011). Die Calciphylaxie resultiert aus einer passiven Gewebemineralisierung, bei der ein Überangebot des Calcium-Phosphat-Produkts vorhanden ist. Die anderen drei Varianten entstehen jedoch z.T. durch Matrixvesikel-vermittelte Kalzifizierung, die typisch für intramembranöse und endochondrale Knochenbildung ist (Vattikuti und Towler 2004; Abedin et al. 2004; Moe und Chen 2004).

Die atherosklerotische Intimaverkalkung, die Hauptform der extraossären arteriellen Kalzifizierung (Demer und Tintut 2008), tritt in Plaquebereichen auf und ist mit Cholesterinablagerungen, inflammatorischen und nekrotischen Prozessen assoziiert. Sie kommt im Spätstadium der Atherosklerose vor und ist mit einem erhöhten

kardiovaskulären Risiko verbunden (Blacher et al. 2001; van Popele et al. 2006). Es kommt zu einer osteogenen Umwandlung vaskulärer Zellen durch inflammatorische Faktoren innerhalb der atheromatösen Plaques wie Zytokine oder modifizierte Lipoproteine (Demer 2001). Um zu untersuchen, ob physiologische Vitamin D-Konzentrationen einen Einfluss auf die Atherosklerose und die vaskuläre Kalzifizierung haben, wurden LDLR^{-/-} Mäuse mit verschiedenen Vitamin D-Dosen gefüttert und die Ausbildung bzw. das Fortschreiten der Atherosklerose mittels Bestimmung der Plaquegröße und deren Zusammensetzung aus Fett, Kalk und Kollagen analysiert. Durch den *Knockout* des Gens für den LDL-Rezeptor und der Fütterung einer cholesterin- und fettreichen Diät (*Western diet*) für 16 bzw. 32 Wochen entwickelten diese Tiere eine ausgeprägte Atherosklerose. Dabei handelt es sich um eine chronisch entzündliche, progrediente Erkrankung in der Intima der Gefäße, die durch Einlagerung fibrösen Materials zur Plaquebildung und somit zur zunehmenden Einengung des Gefäßlumens führt. Durch die Entstehung von Stenosen und Plaquerupturen, verbunden mit Blutungen und Thrombusbildungen, kann es zu lebensbedrohlichen Komplikationen kommen. Atherosklerotische Prozesse werden neben genetischen und umweltbedingten kardiovaskulären Risikofaktoren (Lusis 2000) auch von der Art des in dem jeweiligen Gefäßabschnitt vorherrschenden Blutflusses beeinflusst, wobei man zwischen laminären und turbulenten Strömungen unterscheidet. Letztere treten vorwiegend an Gefäßbifurkationen und -abgängen, im Klappenbereich und im Aortenbogen auf (VanderLaan et al. 2004; Davies 2009; Wasilewski et al. 2012). Aufgrund dessen sollte im Rahmen von Versuch 3 dieser Arbeit neben einer Untersuchung der Aortenklappenregion weitere Herzklappen, sowie aortale Areale und die Abgänge der Arteriae brachiocephalica und femoralis auf atherosklerotische Veränderungen untersucht werden. Entstehende Scherkräfte in Arealen mit turbulenten Strömungen stellen einen mechanischen Reiz für das Endothel dar und regen die Endothelzellen zur vermehrten Expression proatherogener Adhäsionsmoleküle an (Nagel et al. 1994; Suo et al. 2007). Somit sind diese Gefäßregionen für die Entstehung der Atherosklerose prädisponierter als die mit laminärer Strömung (McMillan 1985; VanderLaan et al. 2004).

Die Atherosklerose läuft in verschiedenen Stadien ab (Abbildung 24, Tabelle 18).



Stadien der Atherosklerose:

- 1 „Normale“ Gefäßwand
- 2 Endothelschädigung: Infiltration von Entzündungszellen
- 3 Schaumzellen, Bildung von Fettstreifen „Fatty Streaks“
- 4 Intermediäre Läsion
- 5 Atherom/Fibroatherom
- 6 Komplizierte Läsion/Plaqueruptur

Abbildung 24: Pathogenese der Atherosklerose.

Da pathologische vaskuläre Veränderungen wie eine starke Plaqueausprägung und eine Kalzifizierung im fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose auftreten, wurden die Mäuse des 2. und 3. Versuchs dieser Arbeit für 16 bzw. 32 Wochen gefüttert und ein möglicher Zusammenhang mit der Vitamin D-Versorgung über die Diät untersucht.

Zunächst sollen jedoch im Überblick die Entstehung und der Verlauf der Erkrankung, die Entwicklung dieser verschiedenen Stadien und den damit verbundenen Schädigungen im Gefäßsystem vorgestellt werden. Zu Beginn der Atherosklerose tritt eine endotheliale Dysfunktion auf, die durch oxidativen, mechanischen, immunologischen, metabolischen oder toxischen Stress auf das Endothel entsteht. In der Folge kommt es zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels für LDL-Partikel aus dem Lumen, die sich in der Intima ablagern können und zu einer erhöhten Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle (ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), E-Selektin, P-Selektin) (Springer und Cybulsky 1996) und Chemokine (MCP-1 (*monocyte chemoattractant/chemotactic protein 1*), IL-8 (Interleukin 8)) (Libby et al. 2002; Hristov et al. 2007a; Hristov et al. 2007b) führen. Diese exprimierten Moleküle bewirken anschließend eine Adhäsion von Leukozyten und Monozyten aus dem Blut an das Endothel und es kommt zur gerichteten Migration dieser Zellen in den subendothelialen Raum. Dort erfolgt durch deren Differenzierung eine lokale Entzündungsreaktion (Ross 1999). Die in die Intima eingedrungenen LDL-Partikel werden von endothelialen Lipoxygenasen und makrophagozytären, zelltoxischen, reaktiven Sauerstoffspezies

oxidiert. Dadurch können diese Partikel nicht mehr von LDL-Rezeptoren in die Zellen aufgenommen werden und es erfolgt nun eine Phagozytose über Scavenger Rezeptoren der Makrophagen (Brown und Goldstein 1990). Dabei entstehen sog. Schaumzellen, die nekrotisch oder apoptotisch werden können, was zu einer extrazellulären Ablagerung von Lipiden und Zelldetritus in Form eines nekrotischen Kerns in der Intima führt. Durch die chronische Entzündungsreaktion exprimieren und sezernieren ortsständige Zellen Chemokine und Wachstumsfaktoren (TGF- β (*transforming growth factor β*)) (Libby et al. 2002). Dies führt zur Einwanderung glatter Gefäßmuskelzellen aus der Media und deren Proliferation. Die Zellen bilden eine kollagene Bindegewebsmatrix mit Elastin und Proteoglykanen sowie eine fibröse Kappe, die das Gefäßlumen vom nekrotischen Kern trennt und somit als Barriere dient. Dadurch wird ein Kontakt zwischen Gerinnungskaskade und dem thrombogenen, makrophagozytären *tissue factor* verhindert, was der Bildung eines Thrombus entgegenwirkt (Libby 2002). Dieser Kern fördert durch freigesetzte, hochgradig proinflammatorisch wirkenden Lipide und Zelldetritus die chronische Entzündung, was zu einer vermehrten Einwanderung von Makrophagen, weiteren Entzündungszellen und glatten Gefäßmuskelzellen sowie zur weiteren Sezernierung von Zytokinen und Chemokinen führt (Ross 1999). Aufgrund des dadurch induzierten Fortschreitens der Läsion gewinnt der atherosklerotische Plaque an Größe und Durchmesser, was eine Lumeneinengung verursacht. Dieser zunächst stabile Plaque besitzt eine dicke fibröse Kappe und einen kleinen Lipidkern. Mit zunehmendem Verlauf der Erkrankung und assoziierten Risikofaktoren kann früher oder später eine komplizierte atherosklerotische Läsion entstehen (Insull, JR 2009).

Durch die Zusammensetzung der Läsionen, der Zunahme an Kalzifizierungen sowie der Nekrose konnte die Atherosklerose der LDLR^{-/-} Mäuse dieser Versuche nach Stary in die Stadien V - VIII eingeordnet werden (Stary 1992; Stary 1999). Einen Überblick über die Atherosklerose-Stadien ist in Tabelle 18 dargestellt.

Die Tiere zeigten einen zunehmenden Plaquebefall von 30 - 40% nach 16 Wochen und bis zu 70% nach 32 Wochen, was zu einer starken Einengung des Gefäßlumens führt. Auch andere Autoren konnten eine vergleichbare, zeitabhängige Erhöhung der Läsionsfläche bei KO-Mäusen bei Fütterung einer *Western diet* feststellen, was typisch für den Verlauf der Atherosklerose ist (Joven et al. 2007; Szeto et al. 2012). In diesem Spätstadium der Atherosklerose entwickeln sich instabile, sog. vulnerable Plaques sowie atherosklerotische Intimaverkalkungen. Diese Plaques zeichnen sich durch eine dünne Kappe und einem großen Lipidkern aus. Ursachen für den Übergang von stabilem zu instabilem Plaque sind vielfältig (Virmani et al. 2006). Der Anteil der von den glatten Gefäßmuskelzellen synthetisierten Kollagenfasern in der fibrösen Kappe beeinflusst stark die mechanische Belastbarkeit. Die Kollagensynthese wird durch die Expression von

IFN γ (Interferon γ) und MMPs (Matrixmetalloproteinasen) der T-Lymphozyten und Makrophagen inhibiert.

Tabelle 18: Histomorphometrische Klassifikation atherosklerotischer Läsionen nach H.C. Stary [nach Stary 1992; Stary et al. 1994; Stary et al. 1995; Stary 2000].

Klassifikation		Charakteristika	
Typ I	Initiale Läsion	erste intrazelluläre Lipidablagerungen, Lipoproteinakkumulation in der Intima, vereinzelte Makrophagen & Schaumzellen	
Typ II	Fettstreifen (<i>Fatty Streak</i>)	Lipoproteinakkumulation in der Intima, multiple Schaumzellschichten, erhöhter Anteil an Makrophagen ohne eingelagerte Lipidtröpfchen, glatte Muskelzellen mit Lipideinlagerungen sowie T-Lymphozyten	Frühe Läsionen
IIa	Progressionsgefährdet	adaptive Verdickung, erhöhte Anzahl an Makrophagen & weitere Lipidakkumulation, Makrophagen ohne Lipidspeicher nahe der Oberflächenendothelschicht, Schaumzellen tief in Proteoglykanschicht eingebettet	
IIb	Progressionsresistent	reduzierte Anreicherung von Lipiden	
Typ III	Intermediäre Läsion, Präatherom	alle Veränderungen der Typ IIa-Läsion plus multiple (kleine membrangebundene oder freiliegende) Ablagerungen von extrazellulären Lipiden	Intermediäre / Übergangsläsion
Typ IV	Atherom	alle Veränderungen der Typ IIa-Läsion plus konfluente Masse an extrazellulären Lipiden (Lipidkern) mit massiven strukturellen Schäden der Intima	
Typ V	Fibroatherom	alle Veränderungen der Typ IV-Läsion plus Ausbildung einer Kollagen- und glatten Muskelzell-reichen fibrösen Kappe über dem Lipidkern	
Va	mehrschichtiges Fibroatherom	multiple Lipidkerne unregelmäßig in dicke fibröse Bindegewebsschichten eingebettet	
Vb / VII	kalzifiziertes Fibroatherom	vermehrtes Auftreten von Mineralisierungen, Kalzifizierung von Lipidkernen, nekrotischen Arealen und anderen Läsionsbestandteilen, strukturelle Deformierungen	Fortgeschrittene Läsionen
Vc / VIII	fibrotische Läsion	dicke fibröse Kappe ersetzt normale Intimastruktur, keine/kaum Lipideinlagerungen, vorwiegend Kollagen	
Typ VI	Komplizierte Läsion	alle Veränderungen der Typ V-Läsion plus thrombotische Ablagerungen, Hämorrhagie, Ulzerationen, Erosion oder Fissuren durch Aufbruch der Kappe	
VIa	thrombo-hämorrhagisch	Aufbruch der Oberfläche, Einblutungen & Hämatombildung	
VIb	thrombotisch	Aufbruch der Oberfläche mit Thrombusbildung	
VIc	hämorrhagisch	Aufbruch der Oberfläche mit Einblutungen, Hämatom- & Thrombusbildung	

Weiterhin besteht ein Einfluss von proteolytischen Enzymen, die, inflammationsbedingt, von Makrophagen exprimiert werden und zur Erosion der fibrösen Kappe führen (Insull, JR 2009). Durch das Verdünnen der Kappe kann es zur Plaqueruptur und somit zum Kontakt zwischen *tissue factor* und Gerinnungskaskade kommen. Es entsteht ein Thrombus, der zu einer Stenose oder vollständigen Okklusion des betroffenen Gefäßes führen kann (Insull, JR 2009). Ein nahezu kompletter Gefäßverschluss konnte im dritten Versuch dieser Arbeit bei der histologischen Untersuchung der Arteriae brachiocephalica und femoralis bei fortgeschrittener Erkrankungen nach 32-wöchiger Fütterung der LDLR^{-/-} Mäuse ebenfalls festgestellt werden. Solche vaskulären Komplikationen können sich klinisch in einem Herzinfarkt oder Schlaganfall äußern.

4.3.3 Einfluss von Vitamin D auf die vaskuläre Kalzifizierung

Es konnte erstmals an LDLR^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden, dass eine unzureichende, alimentäre Vitamin D-Versorgung mit einem vermehrten Auftreten von Kalzifizierungen im Vergleich zur adäquaten Vitamin D-Gabe assoziiert ist. Ein prolongierter, 32-wöchiger Vitamin D-Mangel führte zu einer weiteren Zunahme der Kalzifizierungsfläche. Durch Vitamin D-Gabe nach 16-wöchigem Mangel konnte im Rahmen dieser Arbeit außerdem erstmals gezeigt werden, dass das Fortschreiten der Kalzifizierung gestoppt bzw. rückgängig gemacht werden kann. Dies ist v.a. im Zusammenhang mit den saisonalen Schwankungen der Plasma-25(OH)D-Konzentrationen beim Menschen interessant. Während die Spiegel in den Wintermonaten eher niedrig sind, treten im Sommer höhere Werte auf. Somit ist es möglich, dass das durch geringe 25(OH)D-Spiegel in den Wintermonaten verursachte, vermehrte Auftreten von vaskulären Kalzifizierungen zumindest z. T. durch höhere 25(OH)D-Konzentrationen während des Sommers rückgängig gemacht werden könnte. Es ist jedoch nicht bekannt, wie hoch der 25(OH)D-Spiegel beim Menschen mindestens sein muss, um bestehende vaskuläre Kalzifizierungen wieder zu verringern. Daher bleibt diese Hypothese rein spekulativ. Kein Individuum hat aber dauerhaft reduzierte Plasma-25(OH)D-Spiegel im Bereich eines ausgeprägten Vitamin D-Mangels, wie es bei den Mäusen mit prolongierter unzureichender Versorgung mit Vitamin D der Fall ist. Daher könnten die jahreszeitlich schwankenden 25(OH)D-Spiegel möglicherweise die saisonalen Unterschiede von kardiovaskulären Ereignissen und Kalzifizierungen mit höherer Prävalenz von kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität während der Wintermonate im Vergleich zum Sommer erklären (Cigolini et al. 2006; Douglas et al. 1995). Außerdem könnte dies der Grund sein, warum in einigen Humanstudien kein Zusammenhang zwischen zirkulierenden 25(OH)D-Spiegeln und kardiovaskulären Erkrankungen nachweisbar war (Wang et al. 2008; Kilkinen et al. 2009; Garcia-Canton et al. 2010; Jassal et al. 2010). Weiterhin deckt sich die Kalzifizierung sehr gut mit Daten von CKD-Patienten (Blacher et

al. 2001), da bei diesen Patienten ebenfalls ein Morbiditäts-assoziiertes Vitamin D-Mangel für das Auftreten dieser Gefäßmineralisierung sowie einer erhöhten Mortalitätsrate verantwortlich sein kann (Garcia-Canton et al. 2011; Shoben et al. 2008; Drechsler et al. 2011).

Aufgrund des bereits bekannten inversen Zusammenhangs zwischen zirkulierenden Plasma-Calcitriolspiegeln und der Gesamtsterblichkeit (Zittermann et al. 2009) sowie dem Auftreten von vaskulären Kalzifizierungen bei Patienten mit hohem oder moderatem Risiko für koronare Herzerkrankungen (Watson et al. 1997) wurden im zweiten Versuch an LDLR^{-/-} Mäusen sowie im dritten Versuch an WT- und LDLR^{-/-} Mäusen die Plasmakonzentrationen der biologisch aktiven Vitamin D-Form bestimmt. Während die 25(OH)D-Konzentrationen bei Mäusen mit unzureichender Vitamin D-Versorgung nach 16-wöchiger Fütterung mit einer deutlichen Zunahme an kalzifizierten Arealen im Vergleich zu adäquater Vitamin D-Gabe assoziiert war, waren die 1,25(OH)₂D₃-Konzentrationen in beiden Versuchen nicht beeinflusst. Somit scheint das Fortschreiten der Verkalkung auch bei 1,25(OH)₂D₃-Spiegeln, die noch im normalen Bereich liegen, stattzufinden. Nach 32-wöchiger Fütterung kam es zu einer weiteren Zunahme an verkalkten Arealen sowie einer Reduzierung der Plasmakonzentrationen beider Vitamin D-Metabolite bei unzureichender Vitamin D-Zufuhr. Die beschriebene negative Korrelation zwischen dem Plasma-Calcitriol und der vaskulären Kalzifizierung scheint nur dann zu gelten, wenn geringe Plasma-Calcitriolspiegel durch CKD, geringe kutane Vitamin D-Synthese oder geringe diätetische Vitamin D-Aufnahme auftreten. Dies gilt nicht, wenn die verringerten Calcitriolspiegel durch eine hohe Vitamin D-Aufnahme induziert werden. Folglich scheinen hohe 25(OH)D-Spiegel andere Effekte auf die Kalzifizierung im Gefäßsystem zu haben als hohe 1,25(OH)₂D₃-Spiegel, da letztere situationsabhängig unterschiedlich sind (Schmidt et al. 2012). Da eine Steigerung der Vitamin D-Spiegel über den adäquaten, empfohlenen Bereich zu keiner weiteren Reduktion der Kalzifizierungsfläche führte, scheint bei alimentärer Vitamin D-Versorgung die bereits beschriebene biphasische Dosis-Wirkungskurve von Vitamin D auf die Gefäßverkalkung nicht anwendbar zu sein.

Auch unabhängig vom Atherosklerose-Prozess konnte ein negativer Effekt eines alimentären Vitamin D-Mangels bei WT-Mäusen sowie eines fehlenden Vitamin D-Rezeptors ermittelt werden. Diese Tiere wiesen ebenfalls vermehrt Kalzifizierungen im Bereich der Aortenklappen im Vergleich zu adäquat versorgten bzw. gesunden, den Vitamin D-Rezeptor exprimierenden Mäusen auf.

Somit scheint eine Vitamin D-Gabe bzw. das Vorhandensein des VDR und der damit assoziierte, verminderte Kalkanteil in den Aortenklappen der Mäuse im vorliegenden Versuch mit einer Verzögerung der Erkrankung einherzugehen. Auch in der Mitral- und

Trikuspidalklappe traten bei den Mäusen mit Vitamin D-Unterversorgung mehr Kalzifizierungen auf als bei denen mit adäquater Vitamin D-Zufuhr. Verkalkungen im Gefäßsystem führen zu einer Versteifung betroffener Areale, was mit einer verminderten Elastizität einhergeht. Dies kann sowohl zu einer Stenose des Gefäßes und einem damit verbundenen Blutdruckanstieg als auch zum Aneurysma führen (Back et al. 2013). Eine Reduktion der Kalzifizierung kann demnach positive Effekte auf das Gefäßsystem und die Blutdruckregulation haben. Es konnte vor kurzem der direkte Effekt von Vitamin D auf den Blutdruck von LDLR^{-/-} Mäusen beschrieben werden. Die Tiere zeigten bei unzureichender Vitamin D-Versorgung eine Erhöhung des systolischen und diastolischen Blutdrucks um bis zu 12 mmHg im Vergleich zu adäquat mit Vitamin D versorgten Mäusen. Dies war mit einer um mehr als das 1,5fache erhöhten Serum-Renin-Aktivität und einer um 37% verminderten Natrium-Ausscheidung über den Urin assoziiert. Hierbei scheinen die Aktivierung des RAAS und ein erhöhter Aldosteronereffekt auf den renalen Salztransport durch den Vitamin D-Mangel eine bedeutende Rolle zu spielen. Eine Vitamin D-Gabe scheint sich auf den Blutdruck dagegen positiv auszuwirken und ihn sogar wieder zu senken, wenn er zuvor durch Vitamin D-Mangel erhöht war (Weng et al. 2013). Anhand des beobachteten vermehrten Kalkanteils in den Herzklappen der Mäuse mit unzureichender Vitamin D-Versorgung über die Diät bzw. mit genetischem Vitamin D-Mangel in den Versuchen dieser Arbeit und dem damit verbundenen, bekannten Risiko einer zunehmenden Versteifung des betroffenen Gefäßes sowie eines Blutdruckanstiegs, ist es nicht auszuschließen, dass diese Tiere ebenfalls eine Hypertonie aufwiesen. Auch in hypertensiven Ratten konnte eine Blutdrucksenkung bei oraler Vitamin D-Gabe und somit eine Verbesserung der Endothelzell-abhängigen Vasodilatation nachgewiesen werden (Borges et al. 1999b, 1999a).

Der Zusammenhang eines geringen Vitamin D-Status mit einer Erhöhung des Blutdrucks konnte außerdem beim Menschen nachgewiesen werden (Burgaz et al. 2011; Pilz et al. 2009; Kienreich et al. 2013). Es konnte bereits in einigen Metaanalysen gezeigt werden, dass eine Supplementierung mit Vitamin D zur Senkung des systolischen Blutdrucks um 2 - 6 mmHg führt (Pittas et al. 2010; Witham et al. 2009; Wu et al. 2010; Pilz und Tomaschitz 2010). Antihypertensive Eigenschaften des Vitamins sind renoprotektive Effekte, Unterdrückung der RAAS-Aktivität, direkte Effekte auf Gefäßzellen und Verbesserung der Endothelfunktion sowie Wirkungen auf den Calciummetabolismus und damit Schutz vor sekundärem Hyperparathyroidismus (Pilz et al. 2009; Vaidya et al. 2011; Forman et al. 2010; Tomaschitz et al. 2010; Brewer et al. 2011). Snijder et al. (2007) wies außerdem die bedeutende Rolle des PTH in diesem Zusammenhang nach. Bei Vitamin D-Mangel kommt es zu erhöhten PTH-Spiegeln, die ebenfalls bekannte Risikofaktoren für Herzhypertrophie und hohen Blutdruck sind (Snijder et al. 2007). Laut Tomaschitz et al. (2012a + b) können kardiovaskuläre Schädigungen auch unabhängig vom RAAS

auftreten und durch das Zusammenspiel von Vitamin D, PTH und Aldosteron vermittelt werden. Somit sollte bei zukünftigen Untersuchungen an alimentär Vitamin D-defizienten Mäusen im Vergleich zu adäquat versorgten Tieren sowohl im Zusammenhang mit dem Atheroskleroseprozess als auch unabhängig davon die Bestimmung des Blutdrucks sowie der Effekt auf das RAAS genauer untersucht werden.

Auch bei der Untersuchung der wichtigsten, blutversorgenden Gefäße, d.h. Aorta, Arteria brachiocephalica und Arteria femoralis, konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein Zusammenhang zwischen einer vermehrten Kalzifizierung und einer unzureichenden Vitamin D-Versorgung nachgewiesen werden. Die Verkalkungen treten, wie bereits bei der Aortenklappe festgestellt, auch unabhängig von atherosklerotischen Veränderungen in den Gefäßen auf. Durch die Kalzifizierungen kann es in den Gefäßen, z.T. zusammen mit dem Auftreten atherosklerotischer Plaques, zu einer Verschlechterung der vasodilatatorischen und –kontraktorischen Gefäßfunktion, einer Störung des Blutflusses und einer erhöhten Wandschubspannung (*wall shear stress*) kommen (Gambillara et al. 2005; Merino et al. 2013). In den Gefäßen der LDLR^{-/-} Mäuse konnte außerdem eine Zunahme der Plaquegröße und -fläche festgestellt werden. Dies erhöht das Risiko für eine Gefäßokklusion und das Auftreten von vulnerablen Plaques, die in den Gefäßen, v.a. in Bereichen von Verzweigungen, zu biomechanischen Störungen des Blutflusses führen (Cunningham und Gotlieb 2005). Diese pathologischen Veränderungen konnten vorwiegend in der Brachialarterie nachgewiesen werden, was mit einer möglichen Einschränkung der Blutversorgung des Gehirns, einem erhöhten Risiko für dessen unzureichende Sauerstoffversorgung und der Entstehung eines Schlaganfalls assoziiert sein kann (Madden 2012).

Ein weiter wichtiger Faktor in der Pathogenese der Atherosklerose sowie der Kalzifizierung ist die Größe und Verteilung der Kalzifizierungssots. Größere flächenhafte Spots bzw. Verkalkungen im Gefäß scheinen eine Art Barriere zu bilden und damit zur Stabilisierung von Plaques beizutragen (Doherty und Detrano 1994). Dabei scheint ein Durchmesser der Kalzifizierungssots ab 40 µm keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen zu haben (Ewence et al. 2008). Kleinere Kristalle (< 1 µm) stellen dagegen ein Risikofaktor dar. Sie fördern die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, reduzieren damit die Überlebensfähigkeit der Zellen (Ewence et al. 2008) und können durch ihre "spot-artige" Verteilung die Gefahr von Plaquerupturen (Cilla et al. 2013; Vengrenyuk et al. 2006; Virmani et al. 2003) sowie einer verschlechterten Klappenfunktion (Ehara et al. 2004; Kataoka et al. 2012) erhöhen.

In den Versuchen dieser Arbeit traten die Spots im Klappenbereich (bei allen Mäusen), im Plaquebereich (bei LDLR^{-/-} Mäusen) sowie lumennah in den Gefäßen auf. Dabei war die Anzahl v.a. der kleinen Spots bei Mäusen mit Vitamin D-Mangel größer im Vergleich zur

adäquat mit Vitamin D versorgten Gruppe. Eine Progression der Erkrankung und ein prolongierter Vitamin D-Mangel führten zu einem weiteren Anstieg der Spotzahl, wobei die kleinen und mittelgroßen Kalzifizierungssots vermehrt vorhanden waren. Auch $VDR^{-/-}$ Mäuse wiesen mehr Kalzifizierungssots im Vergleich zu den WT-Tieren auf, wobei die Anzahl aller Spotgrößen bei den $VDR^{-/-}$ Mäusen erhöht war.

Vor allem die Mikrokalzifizierungen im Bereich der dünnen ($< 65 \mu\text{m}$) fibrösen Kappe, die oberhalb des nekrotischen Kerns atherosklerotischer Plaques liegt, sind, aufgrund ihres Risikos zu rupturieren und zu Ablösungen zu führen, sehr gefährlich (Vengrenyuk et al. 2006). Dies kann zu akuter Thrombose und frühzeitigem Tod durch fatalen Herzinfarkt führen (Vengrenyuk et al. 2006; Virmani et al. 2006; Shanahan 2007; Ehara et al. 2004) (siehe Abbildung 25). Somit scheinen $VDR^{-/-}$ Mäuse als auch Tiere mit unzureichender, alimentärer Vitamin D-Versorgung ein erhöhtes Risiko für instabile, sog. vulnerable Plaques und Plaqueruptur zu haben. Vitamin D könnte aufgrund dessen eine Plaque-stabilisierende Wirkung ausüben.

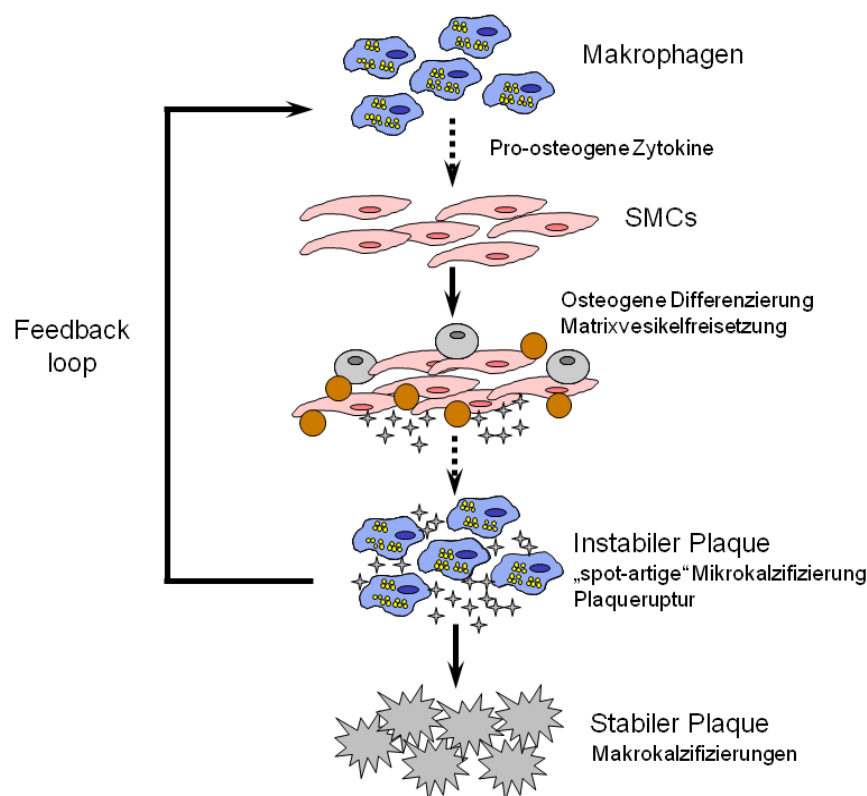


Abbildung 25: Bedeutung der Inflammation im Rahmen der atherosklerotischen Kalzifizierung [nach New und Aikawa 2011].

Makrophagen setzen pro-osteogene Zytokine frei, die glatte Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMCs) zur osteogenen Differenzierung und Matrixvesikel-Freisetzung stimulieren. Diese Matrixvesikel dienen als Ablagerungsstätte für Kalzifizierungen. Dadurch kommt es zur Entstehung von Mikrokalzifizierungen, die zusammen mit der Inflammation die Erscheinungsform der Ruptur-gefährdeten, „spot-artigen“ Kalzifizierung ausbilden. Durch langandauernde Inflammation und fortschreitende Kalzifizierung kann es zur Ruptur dieser „spot-artigen“ Läsionen kommen. Ein positiver *Feedback loop* kann die Progression der arteriellen Kalzifizierung vorantreiben. Im Endstadium können sich Makrokalzifizierungen entwickeln, die zur Stabilisierung der Plaques beitragen.

4.3.3.1 Mechanismen der vaskulären Kalzifizierung

Das vermehrte Auftreten von Kalzifizierungen im Gefäßsystem der Mäuse mit genetischem oder alimentärem Vitamin D-Mangel im Vergleich zu WT- oder adäquat mit Vitamin D-versorgten Tieren in den vorliegenden Versuchen kann verschiedene molekulare Ursachen haben. Die vaskuläre Kalzifizierung ist ein aktiv regulierter Prozess, der durch vier verschiedene Mechanismen ausgelöst werden kann (Giachelli 2004; Speer und Giachelli 2004): (1) vermehrtes Auftreten von Induktoren, (2) Mangel an Inhibitoren, (3) Freisetzung von Nukleationskomplexen und (4) Zelltod. Als Induktoren werden sog. mineralisationsregulierende bzw. -fördernde Proteine bezeichnet. Dazu gehören zum Beispiel Osteocalcin (Pal et al. 2010), Bmp-2 (Bostrom et al. 1993; Kaden et al. 2004) und RANKL (*receptor activator of NF- κ B ligand*) (Panizo et al. 2009). Das Vorhandensein und die gesteigerte Expression dieser Proteine in kalzifizierten, vaskulären Läsionen (Mohler et al. 2001; Hunt et al. 2002) gibt einen Hinweis auf eine bedeutende Rolle osteogener Prozesse bei der Kalzifizierung im Gefäßsystem. Durch phänotypische Veränderungen durchlaufen die vaskulären Zellen eine Umwandlung in osteoblasten- und chondrozyten-ähnliche Zellarten, die mit dem Kalzifizierungsprozess einhergehen (Tintut et al. 1998; Tintut et al. 2000; Jono et al. 2000). Einen Überblick über bekannte Induktoren der vaskulären Kalzifizierung zeigt Tabelle 19.

Tabelle 19: Induktoren vaskulärer Kalzifizierung und deren Bedeutung [modifiziert nach Lee D 2011].

Induktor	Rolle
erhöhte Calcium- & Phosphatspiegel	anorganisches Phosphat gelangt mittels Pit-1 in humane SMCs & führt zu einer vermehrten Expression osteogener Gene, Pit-1 wird durch Calcium-Ionen hochreguliert
Bmp-2 & Bmp-4	Bmp-2 reguliert die Expression von Pit-1, Bmp-4 signalisiert & induziert die promineralisierende Aktivität der VSMCs in Verbindung mit VEGF
zelluläre Seneszenz der VSMC	erhöht die Expression von Runx2, reduziert die Expression von Osterix
TGF- β 1 & 25-Hydroxycholesterol	induzieren CVCs in atherosklerotischen Plaques zur Expression Osteoblasten-ähnlicher Eigenschaften & bilden Mineralisationsnester
FGF-23	positive Korrelationen zwischen FGF-23-Spiegeln & der Intima-Media-Dicke der Karotis
Alkalische Phosphatase	bewirkt lokalen Abbau von Pyrophosphat
Runx2	fördert die Veränderung von VSMCs zu einem osteoblastischen Phänotyp
RANKL	wichtigster Regulator der Osteoklasten, bei chronischen Nierenerkrankungen erhöht

Bmp, *bone morphogenetic protein*; CVCs, *calcifying vascular cells*; FGF, *fibroblast growth factor*; Pit, anorganischer Phosphattransporter; RANKL, *receptor activator of NF- κ B-ligand*; Runx, *runt-related transcription factor*; TGF, *transforming growth factor*; (V)SMC, (*vascular*) *smooth muscle cell*.

Unter normalen Bedingungen werden im Gefäß Mineralisationsinhibitoren, wie die klassischen Vertreter Pyrophosphat (O'Neill 2006), MGP (Matrix Gla Protein) (Shanahan et al. 1994), OPG (Osteoprotegerin) (Morony et al. 2008) und Fetuin-A (Ketteler et al. 2003), exprimiert. Unter pathologischen Gefäßveränderungen kommt es zu einem Mangel

an diesen Inhibitoren, was mit einer spontanen Kalzifizierung (Reynolds et al. 2004) sowie einer höheren Mortalität verbunden ist (Ketteler et al. 2005; Luo et al. 1997) Ketteler 2003 #831}. Die wichtigsten Inhibitoren sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Inhibitoren vaskulärer Kalzifizierung und deren Bedeutung [modifiziert nach Lee D 2011].

Inhibitor	Rolle
OPN	stimuliert die Resorption von Calciumphosphat-Kristallen, Anker der Osteoklasten an Mineralien
MGP	bindet Calcium & Phosphat durch Vitamin K-abhängige Reaktion, bindet an Bmp-2
OPG	Abfangrezeptor zur Neutralisation zellgebundener und löslicher Formen von RANKL
Bmp-7	schützt vor vaskulärer Kalzifizierung durch chronische Nierenerkrankungen, erhält SMC-Phänotyp & kehrt die Progression zum osteoblastären Phänotyp in VSMCs um
Fetuin-A	löst Calcium-Phosphat als Kolloid auf & formt Calciprotein-Partikel, Antagonist zu TGFs & Bmps
Pyrophosphat	blockiert direkt die Hydroxylapatit-Bildung
ANK	Transmembrantransporter zum Transport von Pyrophosphat zwischen intra- & extrazellulären Kompartimenten

ANK, *ankylosis protein*; Bmp, *bone morphogenetic protein*; MGP, *Matrix Gla Protein*; OPG, *Osteoprotegerin*; OPN, *Osteopontin*, RANKL, *receptor activator of NF- κ B-ligand*; TGF, *transforming growth factor*; (V)SMC, (*vascular smooth muscle cell*).

Knochen unterliegen ständigen Umbauprozessen, um sich verschiedenen mechanischen Anforderungen anpassen zu können. Durch zahlreiche Studien kam es zu der Hypothese, dass es einen Zusammenhang zwischen vaskulärer Kalzifizierung und osteoklastärer Resorption gibt (Bucay et al. 1998; Yano et al. 1999; Min et al. 2000). Nach einer Theorie von Price und Kollegen (Price et al. 2002b) scheinen aus Gebieten der Knochenresorption stammende Kristallisationskeime im Gefäßsystem die Kalzifizierung zu fördern. Dies würde bedeuten, dass diese Komplexe über die Blutbahn in die Gefäße gelangen, wobei bisher nicht bekannt ist, wie sie die Endothelbarriere durchdringen können. Es konnte bereits gezeigt werden, dass unter bestimmten Bedingungen ein Komplex aus Calciumphosphat, Fetuin-A und MGP aus dem Knochen freigesetzt und ins Blut gelangen kann, was wiederum durch osteoklastäre Inhibitoren verhindert werden kann (Price et al. 2002a).

Der Zelltod ist ein weiterer möglicher Mechanismus der vaskulären Kalzifizierung. Sterbende Zellen werden für Calcium- und Phosphat-Ionen permeabel und lagern diese ein, was bei Überschreitung des Löslichkeitsproduktes mit einer Bildung von Nukleationskristallen einhergeht. Von diesen absterbenden Zellen abstammende Matrixvesikel sowie Apoptosekörperchen dienen als Initiations- und Nukleationskeime für Calciumphosphat-Ablagerungen im Gefäßsystem und fördern somit die vaskuläre Kalzifizierung (Proudfoot et al. 2000). Matrixvesikel können sich aber auch von der Plasmamembran lebender Zellen abschnüren. In atherosklerotischen Kalzifizierungen

bilden Makrophagen pro-osteogene Zytokine, die VSMCs zur Freisetzung kalzifizierender Matrixvesikel (30 – 300 nm) stimulieren (New und Aikawa 2011). Diese Matrixvesikel scheinen vorwiegend bei der Kalzifizierung der Aorta aufzutreten (Shao et al. 2010) und mögliche Vorläufer bei der Entstehung von Mikrokalzifizierungen zu sein (New et al. 2013).

4.3.3.2 Osteogene Differenzierung im vaskulären System

In zahlreichen Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass verschiedene, an der Osteogenese beteiligte Proteine durch pathologische Veränderungen im Gefäßsystem exprimiert werden (Abedin et al. 2004; Johnson et al. 2006; Danilevicius et al. 2007). Diese Faktoren regulieren im Rahmen der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen Inflammation und atypische Zelldifferenzierung. Verschiedene *bone morphogenetic proteins* (Bmps) konnten bereits in kalzifizierten atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden (Dhore et al. 2001; Schluesener und Meyermann 1995) und scheinen einen Einfluss auf endotheliale Inflammation und Zelldifferenzierung zu haben (Yao et al. 2010).

Aufgrund der bewiesenen Assoziation zwischen Kalzifizierung und osteogener Differenzierung wurden die verschiedenen Bmp-2-regulierten Signalwege im Rahmen dieser Arbeit untersucht und überprüft, ob es dabei eine Vitamin D-abhängige Regulation dieser gibt. Sowohl ein Fehlen des Vitamin D-Rezeptors als auch ein alimentärer Vitamin D-Mangel war mit einer erhöhten Expression von Osteoblastendifferenzierungsfaktoren (Bmp-2, Runx2 (*runx-related transcription factor 2*), Msx2 (*muscle segment of homeobox 2*)) sowohl im Bereich der Aortenwurzel als auch in den Herzklappen assoziiert. Auch in der Aorta der LDLR^{-/-} Mäuse war die Bmp-2-Expression bei unzureichender Vitamin D-Versorgung im Vergleich zu adäquater Vitamin D-Gabe erhöht. Daneben konnten keine Unterschiede bezüglich der Expression dieses Osteoblastendifferenzierungsfaktors zwischen den Vitamin D-Behandlungsgruppen im Knochen festgestellt werden. Somit scheint Vitamin D im Gefäßsystem eine entscheidende Rolle bei der Hemmung dieser Signalwege darzustellen und auf verschiedenen Ebenen regulatorisch einzugreifen (Abbildung 26).

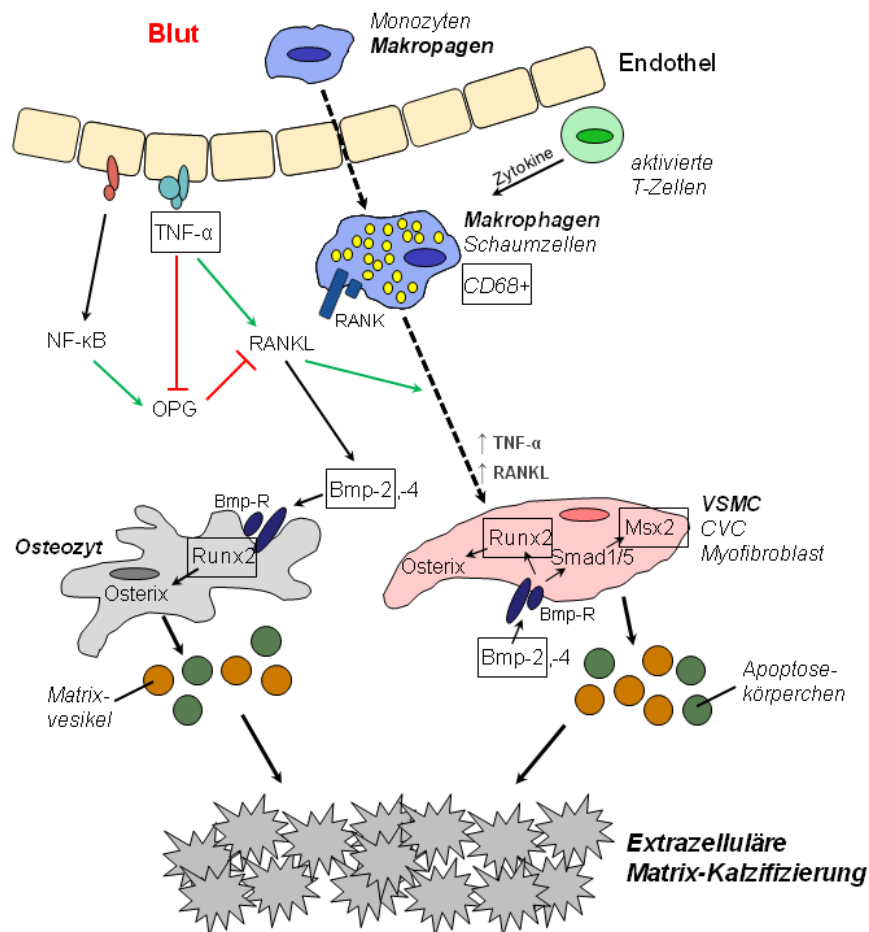


Abbildung 26: Beeinflussung der vaskulären Kalzifizierung durch Inflammation und osteogener Differenzierung.

Parameter mit Umrandung wurden bezüglich vaskulärer Kalzifizierung in Assoziation mit Inflammation und Osteogenese untersucht und es konnte ein Vitamin D-Effekt festgestellt werden.

Bmp-2, *bone morphogenetic protein-2*; Bmp-R, Bmp-Rezeptor; CVC, *calcifying vascular cells*; Msx2, *muscle segment homeobox 2*; NF-κB, *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*; OPG, *Osteoprotegerin*; RANK(L), *receptor activator of NF-κB (ligand)*; Runx2, *runt-related transcription factor 2*; Smad, *small body size-mother against decapentaplegic*; TNF-α, *Tumornekrosefaktor α*; VSMC, *vascular smooth muscle cell*.

Bmp-2, ein Mitglied der *transforming growth factor-β*-Superfamilie, ist ein wichtiges, knochenbildendes Signalmolekül. Es hat eine bedeutende Rolle in der Embryonalentwicklung und der Organogenese (Dhore et al. 2001), induziert ektopische Knochen- und Knorpelbildung und hemmt myogene Differenzierung (Dhore et al. 2001; Musgrave et al. 1999; Yamaguchi et al. 1991). Bmp-2 konnte im Gefäßsystem sowohl in VSMCs (Willette et al. 1999) und in Endothelzellen (Csiszar et al. 2005) als auch in Perizyten, mesenchymalen und inflammatorischen Zellen (Ryoo et al. 2006) nachgewiesen werden. Unter normalen Bedingungen wird die vaskuläre Bmp-Aktivität durch MGP, einem potenten Inhibitor der Gefäßkalzifizierung (Zebboudj et al. 2002), reduziert (Wallin et al. 2000). MGP dient somit als negativer Feedback-Regulator von Bmps. Es kann dabei direkt an Bmp-2 binden, verhindert dessen Rezeptorbindung und damit die Aktivierung von Smads (*small body size-mother against decapentaplegic*),

wichtigen Cofaktoren im Rahmen Runx2-abhängiger osteochondrogener Differenzierung (Zebboudj et al. 2002).

Im Rahmen von Kalzifizierungsprozessen der Intima, Media und Herzklappen kommt es durch oxidierte Lipide zu einer geringgradigen Entzündung mit einer erhöhten Expression von TNF- α und Bmp-2 (Bostrom et al. 1993). Auch in dieser Arbeit war eine erhöhte Bmp-2-Expression bei einer unzureichenden Vitamin D-Zufuhr im Vergleich zu adäquater Gabe nach 16 Wochen bei LDLR^{-/-} Mäusen im 2. Versuch, bei WT-Tieren sowie nach 32 Wochen bei LDLR^{-/-} Mäusen im 3. Versuch nachweisbar. Auch ein genetisch bedingter VDR-Mangel führte zu einer Zunahme an Bmp-2. In vaskulären Fibromyoblasten und im Endothel gibt es dabei verschiedene Aktivatoren der Bmp-2-Expression, wie oxidierte Lipide (Cola et al. 2004), TNF- α (Cola et al. 2004) und Hyperglykämie (Zhang et al. 2003; Cheng et al. 2003). Im dritten Versuch dieser Arbeit konnte der Zusammenhang dieses osteogenen Faktors mit einer erhöhten TNF- α -Expression bei unzureichender Vitamin D-Zufuhr im Vergleich zu adäquater Gabe nachgewiesen werden. Somit könnte TNF- α im Vitamin D-Mangel als Bmp-2-Aktivator fungieren.

Im Verlauf atherosklerotischer Prozesse wird Bmp-2, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene, von VSMCs fortgeschrittener, humaner, atherosklerotischer Plaques exprimiert (Shanahan et al. 1994; Dhore et al. 2001). Es fördert dabei die Entstehung von Kalzifizierungen durch Steigerung der Expression von Pit-1 (Li et al. 2008; Suzuki et al. 2006) sowie durch eine vermehrte Differenzierung von VSMCs zu einem Osteoblasten-ähnlichen Phänotyp (Stompor 2007). Auch die osteogene und chondrogene Umwandlung multipotenter, mesenchymaler Vorläufer kann durch Bmp-2 gelenkt (Shea et al. 2003; Rawadi et al. 2003) und die Kalzifizierung von Fibromyoblasten in der Aorta vorangetrieben werden (Al-Aly et al. 2007). Durch die nachgewiesenen erhöhte Bmp-2-Expression im Vitamin D-Mangel scheint es auch in den Versuchen dieser Arbeit zu einer vermehrten osteogenen Differenzierung vaskulärer Zellen sowie einer damit verbundenen Zunahme von Kalzifizierungen bei unzureichender Vitamin D-Versorgung zu kommen. Auch ein Zusammenhang zwischen Vermittlern der endothelialen Dysfunktion, wie oxidativer Stress (Mody et al. 2001) und Hypoxie (Bouletreau et al. 2002), und einer erhöhten Bmp-2-Expression konnte bereits nachgewiesen werden.

Neben seiner bedeutenden Rolle als Vermittler der vaskulären Kalzifizierung kann Bmp-2 weitere Effekte über die Regulation osteogener Transkriptionsfaktoren, wie Msx2, Runx2 und Osterix vermitteln (Johnson et al. 2006; Matsubara et al. 2008). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein positiver Effekt einer Vitamin D-Gabe bzw. eines vorhandenem VDR auf die Expression Bmp-2 selbst und auf dessen regulierte Faktoren der osteogenen Differenzierung Runx2 und Msx2 nachgewiesen werden. Durch die geringere Umwandlung vaskulärer in Osteoblasten-ähnliche Zellen unter Vitamin D-Einfluss konnte

somit die direkte Assoziation mit der Atherosklerose-abhängigen und -unabhängigen Kalzifizierung hergestellt werden. Runx2 ist als Schlüsselregulator der osteogenen Differenzierung zusammen mit dem aktivierten Osterix bedeutend in der Knochenbildung (Ducy et al. 1997; Komori et al. 1997). Im Rahmen der vaskulären Kalzifizierung stellt er einen wichtigen und frühzeitigen Marker osteogener Umwandlung von VSMCs dar und konnte bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen gezielt in kalzifizierten arteriellen Geweben gezeigt werden (Moe et al. 2003). Die Expression von Runx2 kann z.B. durch erhöhte Konzentrationen an anorganischem Phosphat induziert werden (Mori et al. 1999; Steitz et al. 2001). Es wird außerdem durch Calcitriol transkriptionell reguliert (Barthel et al. 2007). Da in den Versuchen dieser Arbeit keine Unterschiede in den Plasmaspiegeln an anorganischem Phosphat festgestellt werden konnten, scheint die Expression von Runx2 hier unabhängig davon durch die transkriptionelle Vitamin D-Regulation zu erfolgen. Sowohl ein genetischer als auch ein alimentärer Vitamin D-Mangel führte in den Versuchen dieser Arbeit zur Erhöhung der Runx2-Expression im Vergleich zu WT-Tieren oder Mäusen mit adäquater Vitamin D-Gabe. In LDLR^{-/-} Mäusen konnte auch die Induktion eines weiteren Signalweges ermittelt werden. Dabei kam es durch die Hyperlipidämie zu einer erhöhten Bmp-2-Expression in der Aorta dieser Mäuse, was wiederum den Msx2-Wnt-Signalweg der Adventitia förderte. Dies löste bei CVCs und anderen Osteoprogenitoren in der Gefäßwand eine osteoblastäre Differenzierung mittels TNF- α -abhängigen Signalen aus (Al-Aly et al. 2007). Sowohl die Versuche dieser Arbeit als auch andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass fettreich gefütterte LDLR^{-/-} Mäuse eine vaskuläre Kalzifizierung sowie eine erhöhte BMP-2- und Msx2-Expression im Bereich der Aortenklappe (Schmidt et al. 2012) und in der Aorta (Cheng et al. 2003, 2003) aufwiesen. Auch ein genetisch bedingtes Fehlen des VDR führte zur Zunahme der Expression von Msx2. Es konnte dabei bereits gezeigt werden, dass die Msx2-Expression die des VSMC- α -Aktin in den Herzklappen und Fibroblasten der Adventitia überragt (Towler et al. 1998). Msx2 kontrolliert nach Induktion durch Bmp-2 die kraniofasziale Mineralisation (Satokata et al. 2000). Es fördert die frühe Osteoblastenentwicklung, hemmt aber die abschließende Osteoblastendifferenzierung. Hierbei kann Msx2 durch inhibitorische Protein-Protein-Interaktionen mit Mitgliedern der Dlx (*distal-less homeobox*)-Familie in seiner Expression herunter geregelt werden, was eine vollständige Ausbildung des osteoblastären Phänotyps ermöglicht (Newberry et al. 1998). Auch in vitro-Untersuchungen konnten zeigen, dass Msx2 die vaskuläre Kalzifizierung in einem osteogenen Milieu fördert, was z.T. auf eine Aktivierung des Wnt-Signalweges zurückzuführen ist (Shao et al. 2005). In zukünftigen Untersuchungen könnte daher der Einfluss des Wnt-Signalweges auf die Kalzifizierung und die damit verbundene Umwandlung vaskulärer in osteogene Zellen bei Mäusen mit unterschiedlicher alimentärer Vitamin D-Versorgung genauer überprüft werden. Erste Studien konnte bereits zeigen,

dass LRP (*low-density lipoprotein-receptor-related protein*) 5 und 6, Transmembranproteine und Corezeptoren für Wnt-Proteine (Marinou et al. 2012), an der Kalzifizierung der Aortenklappe von hypercholesterinämischen ApoE^{-/-} Mäusen beteiligt sind (Rajamannan 2011). Außerdem wurde von Barthel und Kollegen (2007) eine transkriptionelle Regulation von LRP5 durch Calcitriol nachgewiesen.

Grundsätzlich wird Bmp-2 mit zunehmender Entwicklung atherosklerotischer Läsionen und assoziierter Kalzifizierung vermehrt exprimiert, wobei dies durch eine Vielzahl von Zellen innerhalb dieser Läsionen geschieht, wie Endothelzellen, Schaumzellen und SMCs (Bostrom et al. 1993; Shin et al. 2004; Dhore et al. 2001; Csiszar et al. 2005). Diese Zellen können eine Umwandlung in Osteoblasten-ähnliche Zellen durchlaufen, was am Beispiel der VSMCs mit einer erhöhten Expression der Alkalischen Phosphatase (ALP) sowie weiterer osteogener Marker, als Induktoren der Kalzifizierung, und einer verringerten Expression charakteristischer Marker der VSMCs, wie dem α -Aktin, einhergeht (Kanemaru et al. 2008; Steitz et al. 2001; Essalihi et al. 2004). Dieses Expressionsschema konnte auch im Rahmen dieser Arbeit im Bereich der Aortenklappen und -wurzel bei Mäusen mit unzureichender Vitamin D-Versorgung im Vergleich zu adäquat mit Vitamin D versorgten Tieren nachgewiesen werden. Bei den Untersuchungen zur Kolo-kalisation von ALP und α -Aktin, zeigte sich, dass bei den Mäusen mit unzureichender Vitamin D-Zufuhr mehr ALP als α -Aktin in den Aortenklappen exprimiert war und nur kleine Regionen mit Coexpression beider Parameter vorhanden waren. Vitamin D scheint somit die Umwandlung von VSMCs und anderen vaskulären Zellen in einen osteoblastären Phänotyp sowohl über eine Reduktion der Osteoblastendifferenzierungsfaktoren als auch über eine Verminderung der Expression an ALP zu hemmen.

4.3.3.3 Inflammatorische Prozesse bei vaskulären pathologischen Veränderungen

Die Bildung proinflammatorischer Zytokine spielt sowohl in der Atherosklerose per se als auch in der Pathogenese der Kalzifizierung eine Rolle. Aufgrund dessen wurde TNF- α (Tumornekrosefaktor α) sowie der Makrophagenmarker CD68+ (*cluster of differentiation*) untersucht. Die Akkumulation intimaler CD68+ Makrophagen ist charakteristisch für eine atherosklerotische Kalzifizierung und tritt dabei eher als bei einer Kalzifizierung der Media auf (Nakamura et al. 2009). Ein Vitamin D-Mangel war bei den Versuchen an LDLR^{-/-} Mäusen in dieser Arbeit mit einer vermehrten Inflammation im Vergleich zu adäquater Vitamin D-Versorgung verbunden. Die Expression der Entzündungsmarker war dabei deutlich erhöht. Ein prolongierter Vitamin D-Mangel führte weiterhin zu einem stärkeren Entzündungsprozess im Vergleich zu den Tieren mit adäquater Vitamin D-Versorgung, wobei die Expression von TNF- α bei letzteren sogar rückläufig war. Dies ist vermutlich mit der geringeren Anzahl an kleinen Kalkkristallen bei ausreichender

Vitamin D-Versorgung und der bereits beschriebenen, in diesem Fall geringeren Ausschüttung dieses Zytokins verbunden. Somit konnte auch ein positiver Einfluss von Vitamin D auf die Inflammation nachgewiesen werden, was sich wiederum günstig auf den Verlauf der Atherosklerose, auf die Verkalkung und die Viabilität der Zellen auswirken könnte.

TNF- α ist ein von Monozyten und Makrophagen ausgeschüttetes Zytokin. Es hat im Rahmen der Atherosklerose und anderen metabolischen und inflammatorischen Erkrankungen, wie z.B. Adipositas und Insulinresistenz, proinflammatorische Effekte. TNF- α tritt in atherosklerotischen Plaques auf (Kleemann et al. 2008) und ist mit der osteogenen Transdifferenzierung von Zellen assoziiert (Bostrom 2005; Nadra et al. 2005; Stenvinkel und Alvestrand 2002). Die Arbeitsgruppe von Tintut und Demer konnte erstmals zeigen, dass TNF- α an der vaskulären Kalzifizierung beteiligt ist, indem es die Aktivität der ALP steigert. Die sog. CVCs (*calcifying vascular cells*) benötigen die ALP für den Prozess der Mineralisierung in vitro (Tintut et al. 2000). Die Wirkungen von TNF- α auf VSMCs wird über den NF- κ B-Weg vermittelt und beinhaltet eine Erhöhung des *bone morphogenetic protein 2* (Bmp-2) (Yu et al. 2011). Es konnte außerdem bereits gezeigt werden, dass TNF- α bei LDLR^{-/-} Mäusen zur Akkumulation von Calcium in der Aorta über den Msx2-Wnt-Signalweg fördert (Al-Aly et al. 2007). Somit wäre es möglich, dass die erhöhte TNF- α -Expression bei LDLR^{-/-} Mäusen mit unzureichender Vitamin D-Versorgung im 3. Versuch im Zusammenhang mit der erhöhten Msx2-Expression für den vermehrten ALP-Nachweis verantwortlich sein könnte. Dies steht dann auch in direkter Assoziation zur gesteigerten Kalzifizierung bei diesen Tieren. Die Beziehung zwischen TNF- α -induzierter Msx2-Expression über den NF- κ B-Signalweg, was wiederum zur Erhöhung von ALP führt, konnte in VSMCs durch Lee und Kollegen (2010) nachgewiesen werden (Lee et al. 2010). Die zirkulierenden TNF- α -Spiegel sind mit einem erhöhten Risiko für wiederkehrenden Herzinfarkt, atherosklerotische Verdickung der Karotid-Intima und -Media, Störungen der Triglyzerid- und Glucose-Homöostase sowie mit altersabhängiger Atherosklerose assoziiert (Kleemann et al. 2008). Schleithoff und Kollegen konnten zeigen, dass eine Vitamin D-Supplementierung mit einer Verringerung der Serum-TNF- α -Spiegel und einer Erhöhung des antiatherogen wirkenden IL-10 (Mallat et al. 1999) assoziiert war (Schleithoff et al. 2006). Im Versuch 3 dieser Arbeit konnte eine Abnahme der TNF- α -Expression bei Vitamin D-Supplementierung im Vergleich zu unzureichender Zufuhr bei 32-wöchiger Fütterung von LDLR^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden.

4.3.3.4 Einfluss von Vitamin D auf die Plaquezusammensetzung

In der Entstehung und im Verlauf der Atherosklerose kommt es zur Plaquebildung und Änderungen in der Plaquezusammensetzung, was maßgeblich zur Krankheitsprogression und möglichen Folgeschäden, wie Rupturen, Thrombusbildung und Gefäßokklusion,

beiträgt. Seit den 60er Jahren wird die Rolle von Vitamin D in der Entwicklung der Erkrankung untersucht (Zemplenyi und Mrhova 1965). Bei ersten experimentellen Studien wurde festgestellt, dass eine Erhöhung der Calcidiol-Konzentration mit einer Vergrößerung atherosklerotischer Plaques bei Ratten bzw. normolipämischen Schweinen einhergeht und somit eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Vitamin D-Supplementierung und der Atherosklerose-Entstehung besteht (Kunitomo et al. 1981; Taura et al. 1979). Jedoch wurden zunächst nur die negativen, Atherosklerose-fördernden Wirkungen exzessiver Vitamin D-Dosierungen untersucht. Mehrere Arbeitsgruppen konnten dabei verschiedene Angriffspunkte des Vitamin D feststellen, wie den Einfluss von Calcitriol auf die Genexpression von VEGF (*vascular endothelial growth factor*), MMP-9, Myosin sowie Elastin und Typ I Kollagen als Strukturproteine (Lin et al. 2002; Cardus et al. 2009). Weiterhin scheint hochdosiertes Vitamin D die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen in die Intima zu fördern (Cardus et al. 2006; Rebsamen et al. 2002). Es ist jedoch bereits bekannt, dass nicht nur hochdosiertes sondern auch mangelndes Vitamin D einen Einfluss auf Entwicklung und Verlauf der Atherosklerose hat, was Gegenstand dieser Arbeit war und am Mausmodell untersucht werden sollte. Nach 16-wöchiger Fütterung konnte im Rahmen des 2. und 3. Versuchs kein Einfluss auf Plaque-, Kollagen- oder Lipidanteil in den atherosklerotischen Läsionen der LDLR^{-/-} Mäuse festgestellt werden. Auch der Anteil an Makrophagen und glatten Muskelzellen war durch die Behandlung nicht beeinflusst. Ein prolongierter, 32-wöchiger Vitamin D-Mangel verschlechterte die Erkrankung, was mit einer Erhöhung des Lipidanteils assoziiert war. Bei 32-wöchiger Fütterung der Diäten kam es bei LDLR^{-/-} Mäusen zu einer Erhöhung der Plaquefläche, jedoch zur Verringerung der Kollagenfläche ohne Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Weng und Kollegen (2013) konnten dagegen bei einer Vitamin D-Mangel-Diät sowohl bei ApoE^{-/-}- als auch bei LDLR^{-/-} Mäusen eine 2,3 – 2,6fache Erhöhung der Läsionsfläche im Vergleich zu den adäquat mit Vitamin D versorgten Tieren feststellen. Es geht aus der Studie jedoch nicht hervor, ob die Mäuse, die eine Vitamin D-Mangel-Diät erhielten, letztendlich kein Vitamin D aufnahmen oder, wie im Rahmen dieses Versuches, eine geringe Dosis im Futter vorhanden war. Es ist auch nicht klar belegt, welche Vitamin D-Dosis der Diät in der Studie dieser Arbeitsgruppe als "adäquat" bezeichnet wurde. Nach Angaben des Herstellers scheint die Nagerdiät eine Konzentration an Vitamin D von 5,1 IU/g (5.100 IU/kg) Diät zu besitzen. Da in den Versuchen dieser Arbeit 1.000 IU/kg Diät als adäquate Vitamin D-Dosierung eingesetzt wurde, können Effekte der Studie von Weng und Kollegen (2013), die im Rahmen der vorliegenden Versuche nicht beobachtet werden konnten, durch die ca. 5fach höhere Vitamin D-Konzentration verursacht worden sein. In einer Untersuchung an ApoE^{-/-} Mäusen wurden bereits weitere mögliche, auch in der vorliegenden Arbeit, aufgrund des fortgeschrittenen Atherosklerose-Stadiums

beschriebene Plauebestandteile charakterisiert. Dazu gehören sog. Cholesterin-Klüfte (*cholesterol clefts*), die in der vorliegenden Arbeit vorwiegend ein nadelförmiges Erscheinungsbild aufwiesen, azelluläre und nekrotische Areale sowie Apoptosekörperchen und Mikrovesikel (Kuchibhotla et al. 2008). Diese vaskulären Veränderungen sind bezeichnend für einen langandauernden Erkrankungsprozess, scheinen durch den prolongierten Vitamin D-Mangel verursacht worden zu sein und somit die Plauestabilität zu beeinflussen.

Es ist bereits hinreichend bekannt, dass MMPs, v.a. MMP-2 und -9, eine bedeutende Rolle für eine Störung der Plauestabilität, eine Schädigung des Plaques und einer resultierenden Ruptur mit dem Austritt thrombotischen Materials haben (Galis und Khatri 2002; Longo et al. 2002, 2002; Lindsey et al. 2006; Matsumura et al. 2005). Eine Aktivierung der MMPs trägt dabei zum Abbau der extrazellulären Matrix, dem Verdünnen der Herzwand und der Dilatation des linken Ventrikels bei (Spinale 2002). Auch die Kalzifizierung im Gefäßsystem wird durch MMPs gefördert (Basalyga et al. 2004). Es konnte bereits gezeigt werden, dass bei $VDR^{-/-}$ Mäusen die Expression beider MMPs im Vergleich zu WT-Mäusen erhöht war. Außerdem konnte dabei nachgewiesen werden, dass die Inhibitoren dieser MMPs (TIMPs, *tissue inhibitor of metalloproteinases*) bei den Mäusen mit fehlendem Vitamin D-Rezeptor signifikant geringer exprimiert waren im Vergleich zu den WT-Tieren (Rahman et al. 2007). Somit könnte auch im vorliegenden Versuch an $VDR^{-/-}$ Mäusen ein Zusammenhang zwischen einem vermehrten Vorhandensein von MMPs und stärkerer Ausprägung von Kalzifizierungen im aortalen Klappenbereich im Vergleich zu WT-Mäusen bestehen. Bei der Probenbearbeitung im Rahmen des ersten Versuchs konnte außerdem eine verringerte Stabilität und erhöhte Zerbrechlichkeit der Aortenklappen von $VDR^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu den WT-Gruppen festgestellt werden, was möglicherweise durch von Rahman et al (2007) beschriebene, gesteigerte MMP-Expression verursacht worden sein könnte. Es existiert eine weitere Studie, die zeigt, dass Vitamin D in Form vom Calcitriol die Gewebeexpression der MMPs moduliert (Dean et al. 1996). Es könnte demnach möglich sein, dass auch in den vorliegenden Versuchen an $LDLR^{-/-}$ Mäusen ein Einfluss von Vitamin D auf die MMPs/TIMPs besteht und diese v.a. bei prolongiertem Vitamin D-Mangel die Plauestabilität reduzieren und somit das Risiko für Rupturen erhöhen. Um dieser Hypothese nachzugehen, könnten zukünftige Untersuchungen bei Mäusen, die mit unterschiedlichen Vitamin D-Konzentrationen in der Diät gefüttert wurden, zum möglichen Einfluss von Vitamin D auf die MMPs/TIMPs, speziell im Rahmen der Atherosklerose, durchgeführt werden.

4.4 Fazit

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Daten dieser Arbeit auf einen kausalen Zusammenhang zwischen Vitamin D-Mangel, Inflammation und vaskulärer Kalzifizierung über eine osteogene Differenzierung von CVCs, speziell der VSMCs, hinweisen. Dies scheint aber nicht zwangsläufig an andere atherosklerotische Prozesse gebunden zu sein. Sowohl TNF- α über die Aktivierung von ALP und Msx2 als auch die Bmp-2-regulierten Signalwege können dabei eine bedeutende Rolle haben. Vitamin D übt dabei auf verschiedenen Ebenen regulatorische Funktionen aus (siehe Abbildung 26), schützt somit vor einem beschleunigten Fortschreiten der Erkrankung und kann auch bestehende Vitamin D-Mangel-induzierte Schädigungen aufhalten bzw. sogar rückgängig machen. Außerdem beeinflusst Vitamin D positiv die Plaquezusammensetzung und trägt damit zur Stabilität der Plaques bei.

Vitamin D scheint ein entscheidender Faktor in der Pathogenese und Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen zu sein. 2012 überarbeitete die Deutsche Gesellschaft für Ernährung ihre D-A-C-H-Referenzwerte für Vitamin D und steigerte ihre bisherige Empfehlung von 5 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ auf nun 20 $\mu\text{g}/\text{Tag}$, um dem weitverbreiteten Vitamin D-Mangel aufgrund der problematischen alimentären Zufuhr entgegenzuwirken (DGE 2012). Dabei beruhen diese Angaben jedoch nur auf die Wirkungen von Vitamin D im Hinblick auf das Fraktur- und Sturzrisiko, da keine ausreichende Prävalenz für eine Supplementierung im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen besteht.

Die Stärke der Untersuchungen an LDLR^{-/-} und WT-Mäusen liegt darin, dass es im Rahmen dieser Arbeit möglich war, einen moderaten Vitamin D-Mangel durch Diäten mit geringen Vitamin D-Konzentrationen zu induzieren. Dies reflektiert gut die humane Vitamin D-Situation. Eine Schwäche der Studien ist jedoch, dass der Plasma-25(OH)D-Spiegel der Mäuse nicht direkt mit denen des Menschen vergleichbar ist. Außerdem können der Grad und die Schnelligkeit hinsichtlich Entstehung und Progression der vaskulären Veränderungen, die in den Mäusen beobachtet werden konnten, nicht einfach auf den Menschen extrapoliert werden. Das könnte wiederum die Stärken der berichteten Ergebnisse reduzieren. Humane Interventionsstudien müssen nun klären, ob niedrige Vitamin D-Spiegel wirklich kausal mit der vaskulären Kalzifizierung verbunden sind. Dabei sollte außerdem der für die Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen optimale Vitamin D-Status aufgrund der bekannten biphasischen Beziehung und der Unterschiede im Vitamin D-Bedarf zwischen den verschiedenen Organsystemen ermittelt werden. Daten aus solchen Untersuchungen sind zwingend erforderlich, bevor man die Aussage treffen kann, dass eine Optimierung des 25(OH)D-Status zur Reduktion des Risikos für vaskuläre und valvuläre Kalzifizierungen und daraus resultierenden kardiovaskulären Ereignissen zu empfehlen ist.

5 Zusammenfassung

Aufgrund der jahreszeitlich eingeschränkten Vitamin D-Synthese und den wenig effizienten Vitamin D-Quellen in der Nahrung ist die Vitamin D-Versorgung der Bevölkerung vielfach unzureichend. Daten epidemiologischer Studien zeigen eine Assoziation zwischen niedrigen Plasmakonzentrationen an 25(OH)D und einem erhöhten Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Es existieren bereits einige Studien, die Effekte von unzureichenden und hochdosierten, pharmakologischen Konzentrationen an Vitamin D auf Atherosklerose und vaskuläre Kalzifizierung beschreiben. Bisher erfolgte jedoch eine Beurteilung der 25(OH)D-Spiegel primär anhand des Fraktur- und Sturzrisikos, wobei keine Einigkeit zwischen den verschiedenen medizinischen Fachgesellschaften (z.B. *Institute of Medicine*) besteht. Es gibt bislang nur wenige Studien, die sich damit beschäftigt haben, ob es tatsächlich einen kausalen Zusammenhang zwischen der Vitamin D-Versorgung und der kardiovaskulären Gesundheit gibt. Für eine allgemeine Empfehlung zur Vitamin D-Zufuhr und damit zur Erreichung eines optimalen Spiegels im Hinblick auf kardiovaskuläre Erkrankungen fehlt den meisten bisher existierenden Studien die Kausalität. Um die Wirkungen von Vitamin D auf das vaskuläre System und mögliche pathologische Prozesse zu prüfen, wurden in dieser Arbeit verschiedene Versuche an Mausmodellen durchgeführt. Zunächst sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob Vitamin D-Rezeptor-*knockout*- (VDR^{-/-}) Mäuse aufgrund des genetisch bedingten Fehlens des Vitamin D-Rezeptors (VDR) Veränderungen in der vaskulären Integrität aufweisen. Des Weiteren sollte getestet werden, welchen Einfluss ein alimentär induzierter Vitamin D-Mangel auf das Gefäßsystem von LDL-Rezeptor-*knockout*- (LDLR^{-/-}) Mäusen, einem Atherosklerosemodell, im Vergleich zu adäquat versorgten Tieren hat. Schließlich sollte untersucht werden, ob eine unzureichende Vitamin D-Versorgung auch das Gefäßsystem von Wildtyp (WT)-Mäusen, die keine atherosklerotischen Plaques bilden, verändert.

Im ersten Versuch wurden männliche VDR^{-/-} Mäuse eingesetzt und mit WT-Mäusen hinsichtlich Veränderungen der Anatomie der Aortenklappe und der Zusammensetzung des Gefäßes verglichen. Die VDR^{-/-} Mäuse und eine WT-Gruppe erhielten eine *Rescue diet*, die reich an Calcium (2%) und Phosphor (1,25%) war. Diese Diät vermeidet bei den VDR^{-/-}-Tieren eine VDR-Mangel induzierte Hypoglykämie. Eine zweite WT-Gruppe erhielt eine Diät mit normalen Calcium- (0,3%) und Phosphorkonzentrationen (0,156%). Zur Quantifizierung möglicher vaskulärer Veränderungen wurden Gefrierschnitte von der Aortenwurzel der Tiere angefertigt und eine histologische Färbung kalzifizierter Areale sowie eine immunhistochemische Analyse der osteogenen Differenzierung durchgeführt. Nach 8-wöchiger Fütterung der Tiere konnte festgestellt werden, dass VDR^{-/-} Mäuse im Vergleich zu WT-Tieren größere Kalzifizierungsflächen, mehr kalzifizierte Bereiche sowie

eine höhere Expression der Osteoblastendifferenzierungsfaktoren Bmp-2 (*bone morphogenetic protein-2*), Msx2 (*muscle segment homeobox 2*) und Runx2 (*runt-related transcription factor 2*) aufwiesen. Ein genetisch bedingter VDR-Mangel war somit mit einer vermehrten Kalzifizierung durch osteogene Differenzierung von vaskulären Zellen assoziiert. Bei der Präparation der Schnitte war außerdem auffällig, dass die Gewebeschnitte der VDR^{-/-} Mäuse deutlich instabiler und somit fragiler waren als die der WT-Tiere.

Aufgrund des nachgewiesenen negativen Effektes eines genetisch bedingten VDR-Mangels auf das vaskuläre System sollte in dieser Arbeit auch der Einfluss eines alimentären Vitamin D-Mangels auf die Atherogenese untersucht werden. Als Modelltier wurden LDLR^{-/-} Mäuse eingesetzt, da diese Tiere aufgrund des fehlenden LDL-Rezeptors bei Fütterung einer zucker-, fett- und cholesterinreichen Diät ausgesprochen hohe LDL-Cholesterinspiegel und somit eine ausgeprägte Atherosklerose entwickeln. Daher stellen sie ein für Untersuchungen atherosklerotischer Veränderungen im Gefäßsystem geeignetes Tiermodell dar. Die Tiere erhielten über 16 Wochen eine semisynthetische *Western diet*, die entweder geringe (50 IU/kg Diät), adäquate (1.000 IU/kg Diät) oder reichliche (10.000 IU/kg Diät) Vitamin D-Mengen enthielt. Zur Quantifizierung der Atherosklerose wurden Gefrierschnitte der Aortenwurzel der Tiere angefertigt und verschiedene morphologische Strukturen histologisch oder immunhistochemisch angefärbt. Es wurde gezeigt, dass die Größe der atherosklerotischen Plaques, deren Kollagen- und Lipidgehalt sowie der Anteil an Makrophagen und glatten Muskelzellen durch die unterschiedliche Vitamin D-Versorgung nicht beeinflusst wurden. Ähnlich wie im Versuch an VDR^{-/-} Mäusen führte auch eine unzureichende alimentäre Vitamin D-Gabe im Vergleich zu adäquater bzw. reichlicher Versorgung zu einer signifikanten Erhöhung der Kalzifizierungsareale in den Plaques der LDLR^{-/-} Mäuse. Die Kalkkristalle waren spotartig in den atherosklerotischen Plaques eingestreut, wobei die Anzahl an Verkalkungssots bei den LDLR^{-/-} Mäusen mit unzureichender Vitamin D-Zufuhr deutlich höher als bei den anderen beiden Gruppen war. Das vorwiegende Auftreten von kleinen Kalkkristallen wird im Zusammenhang mit einer Verminderung der Plaquestabilität beschrieben. Ähnlich wie die VDR^{-/-} Mäuse, wiesen auch LDLR^{-/-} Mäuse mit einer unzureichenden Vitamin D-Versorgung eine höhere Expression von Bmp-2, Msx2 und Runx2 im Bereich der Aortenwurzel im Vergleich zu adäquater oder reichlicher Vitamin D-Zufuhr auf.

Aufgrund der Daten aus den ersten beiden Studien sollten in einem weiteren Versuch die folgenden Fragen geklärt werden: (1) Bewirkt ein Vitamin D-Mangel auch bei Mäusen, die keine Atherosklerose entwickeln, vaskuläre Kalzifizierungen? (2) Kann eine Vitamin D-Gabe eine Vitamin D-Mangel-induzierte Gefäßverkalkung rückgängig machen? (3) Welchen Einfluss hat ein prolongierter Vitamin D-Mangel auf die Plaquezusammen-

setzung der Aortenklappe und des Gefäßes? Außerdem sollte untersucht werden, ob eine Transdifferenzierung vaskulärer Zellen eine Rolle bei unzureichender Vitamin D-Versorgung im Zusammenhang mit den vaskulären Veränderungen spielt und welchen Effekt Vitamin D auf eine Kalzifizierung aller Herzklappen haben könnte. Da pathologische Veränderungen häufig in Gefäßbifurkationen und Gefäßarealen, die hohen mechanischen Belastungen unterliegen, auftreten, wurden des Weiteren verschiedene arterielle Gefäße hinsichtlich Kalzifizierung untersucht. Zu den betroffenen Gefäßen zählen v.a. die Aorta sowie ihre Hauptabzweigungen, die Arteriae brachiocephalica (Halsschlagader) und femoralis (Oberschenkelarterie). LDLR^{-/-} Mäuse und WT-Tiere erhielten für 16 Wochen eine semisynthetischen *Western diet* mit entweder unzureichenden (50 IU/kg Diät) oder adäquaten (1.000 IU/kg Diät) Vitamin D-Mengen. Außerdem wurden LDLR^{-/-} Mäuse für weitere 16 Wochen (insgesamt 32 Wochen) mit diesen Diäten gefüttert, wobei bei der Hälfte der Tiere die Vitamin D-Versorgung nach 16-wöchiger Fütterung getauscht wurde. Somit sollte nach einem bestehenden Vitamin D-Mangel der Effekt einer Vitamin D-Gabe bzw. nach adäquater Versorgung die Wirkungen eines nun einsetzenden Mangels untersucht werden. Parallel sollten auch Auswirkungen der jeweiligen Vitamin D-Versorgungszustände auf das Gefäßsystem der Tiere nach 32-wöchiger gegenüber 16-wöchiger Fütterung ermittelt werden. Es wurden ebenfalls Gefrierschnitte der Aortenwurzel, der Trikuspidal- und Mitralklappe sowie der Gefäße angefertigt und verschiedene morphologische Strukturen analysiert. Dabei ergab sich nach 16-wöchiger Fütterung eine bei den LDLR^{-/-} Mäusen signifikant bei den WT-Tieren tendenziell erhöhte Kalzifizierungsfläche bei unzureichender Vitamin D-Gabe im Vergleich zu adäquater Versorgung, was, wie bereits in den anderen Versuchen beschrieben, mit einer vermehrten Expression der Osteoblastendifferenzierungsfaktoren assoziiert war. Sowohl die Aorta als auch die Basis der Arteria brachiocephalica von WT- und LDLR^{-/-} Mäusen wiesen bei unzureichender Vitamin D-Versorgung über 16 Wochen größere Kalzifizierungsflächen auf als bei ausreichender Vitamin D-Zufuhr. Bei den WT-Mäusen konnten ansonsten keine vaskulären Veränderungen nachgewiesen werden. Die LDLR^{-/-} Mäuse zeigten eine ausgeprägte Plaquentwicklung mit Kollagen- und Lipidablagerungen sowie einen Anteil an Makrophagen, jedoch ohne Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Dagegen war der Inflammationsmarker TNF- α bei unzureichender Vitamin D-Gabe stärker exprimiert als bei adäquater Versorgung. Nach 32 Wochen konnte die deutlichste Zunahme an kalzifizierten Arealen sowohl im Bereich der Aortenwurzel und in den Gefäßen als auch in Trikuspidal- und Mitralklappe in den dauerhaft unzureichend mit Vitamin D versorgten Tieren nachgewiesen werden. Bei den Mäusen, die nach einem bestehenden Mangel an Vitamin D nun adäquat versorgt wurden, konnte ein weiteres Fortschreiten der Verkalkung gestoppt werden bzw. war sogar reversibel, was auch mit einer verringerten Expression osteogener Faktoren

verbunden war. Die Anzahl und Fläche der Kalkkristalle entsprach bei dieser Gruppe denen der 32 Wochen adäquat versorgten Tiere. Nach 32-wöchiger Fütterung kam es zu einer weiteren Zunahme der Plauefläche, die im Bereich der Aortenwurzel und in der Aorta nicht unterschiedlich zwischen den Gruppen war. In den Arteriae brachiocephalica und femoralis dagegen kam es zu einer signifikanten Erhöhung der atherosklerotischen Plaqueareale bei unzureichender Vitamin D-Versorgung im Vergleich zu adäquater Vitamin D-Gabe. Des Weiteren konnte bei prolongiertem Vitamin D-Mangel im Bereich der Aortenwurzel ein erhöhter Anteil an Lipiden, Makrophagen und dem Entzündungsmarker TNF- α im Vergleich zu adäquater Versorgung ermittelt werden. Anhand der erhöhten Expression von ALP (Alkalische Phosphatase) und der Abnahme der Expression von SMC (*smooth muscle cell*)- α -Aktin bei WT- und LDLR^{-/-} Mäusen mit unzureichender Vitamin D-Versorgung kann vermutet werden, dass bei diesen Tieren eine vermehrte Transdifferenzierung vaskulären Zellen stattgefunden haben könnte. Somit scheint ein lang andauernder Vitamin D-Mangel sowohl Verkalkungs- als auch inflammatorische Prozesse zu fördern, eine Vitamin D-Gabe positive Effekte auf pathologische Vorgänge im Gefäßsystem zu haben und hemmend auf die Transdifferenzierung von glatten Muskelzellen und Fibromyoblasten in Osteoblasten-ähnliche Zellen zu wirken.

Zusammenfassend haben die Studien dieser Arbeit gezeigt, dass sich ein genetisch bedingtes Fehlen des VDR bzw. Vitamin D-arme Diäten negativ auf das vaskuläre System auswirken können. Dabei besteht deren Wirkung v.a. in der Steigerung von Kalzifizierung, osteogener Differenzierung und Inflammation. Dies könnte zu einem vermehrten Elastizitätsverlust betroffener Gefäße sowie zur Verringerung der Plaquestabilität führen, was wiederum das Risiko für eine Blutdruckerhöhung und eine Plaqueruptur erhöhen kann. Außerdem konnte erstmals gezeigt werden, dass pathologische Veränderungen im Gefäßsystem durch eine Vitamin D-Gabe nach bestehendem Mangel reversibel sind. Eine Optimierung der Vitamin D-Versorgung kann sich daher durch die Reduktion der Kalzifizierungen positiv auf das Gefäßsystem und die Blutdruckregulation auswirken. Sollten sich die Befunde beim Menschen bestätigen, könnte vermutlich das Erkrankungsrisiko für Atherosklerose und andere kardiovaskuläre Erkrankungen vermindert werden. Bevor jedoch Aussagen über einen kausalen Zusammenhang zwischen niedrigen Vitamin D-Spiegeln und eine vaskuläre Kalzifizierung getroffen werden, müssen weitere humane Interventionsstudien durchgeführt werden. Daten aus solchen Untersuchungen unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Vitamin D-Bedarfs der verschiedenen Organsysteme sind zwingend erforderlich, bevor Empfehlungen zur Optimierung des 25(OH)D-Status im Zusammenhang mit einer Reduktion des Risikos für vaskuläre und valvuläre Kalzifizierungen und daraus resultierenden kardiovaskulären Ereignissen getroffen werden können.

Summary

Due to the seasonal restricted vitamin D synthesis and rarely available dietary vitamin D sources there is an inadequate vitamin D supply in many cases in the general population. Data of epidemiological studies show a verifiably association of low plasma 25(OH)D levels with a higher risk of cardiovascular disease. There are different studies describing the effects of very low and high-dose vitamin D concentrations on atherosclerosis and vascular calcification. However, until now vitamin D cut-off levels were primarily established in relation to the risk of fractures and falls, but there is a discrepancy in the classification of the vitamin D state between the medical expert panels (i.e. Institute of Medicine). Only few studies were engaged in researching if there is a causal link between vitamin D supply and cardiovascular health. Existing data are ambiguously and do not allow to publish general recommendation for a vitamin D administration to achieve an optimal level with regard to cardiovascular disease. To investigate the impact of vitamin D on the vascular system and possible pathological processes, different analysis with mouse models were conducted within the scope of this work. Initially there should be examined if vitamin D receptor knockout (VDR^{-/-}) mice show changes in the vascular integrity in response to their genetically induced vitamin D receptor (VDR) deficiency. Furthermore, there should be tested the possible impact of an alimentary induced insufficient vitamin D supply on the vascular system of LDL receptor knockout (LDLR^{-/-}) mice, a mouse model of atherosclerosis, in comparison to a diet with adequate vitamin D amounts. Finally the possible negative effect of a low-dose vitamin D feeding on the vasculature should be investigated in wild-type (WT) mice without developing atherosclerosis.

In the first study male VDR^{-/-} mice were used and compared with WT mice to analyze changes in the anatomy of the aortic valve and the composition of the vessel. VDR^{-/-} and one group of WT mice received a rescue diet containing high amounts of calcium (2%) and phosphorous (1.25%). This diet can prevent a VDR deficiency induced hypocalcaemia in the VDR^{-/-} mice. A second group of WT mice were fed a diet with normal calcium (0.3%) and phosphorous (0.156%) concentrations. To quantify possible vascular alterations frozen sections of the aortic root of the animals were prepared and histological and immunohistochemical stained for calcification and osteogenic differentiation. After 8 weeks of feeding there could be determined that a genetically lack of the VDR was associated with an increase in calcification of the aortic valve, a higher number of calcified spots and an increased expression of the osteoblast differentiation factors Bmp-2 (bone morphogenetic protein-2), Msx2 (muscle segment homeobox 2) und Runx2 (runt-related transcription factor 2) in comparison to WT mice. Consequently, a genetic deficiency of the VDR was associated with an increase in calcification through osteogenic differentiation of cells of the vascular system. When preparing the sections, there was

noticeable that the aortic sections of the VDR^{-/-} mice were more instable and more fragile than that of WT mice.

Based on the detected finding of deleterious effects of the VDR knockout on the vascular system the impact of a nutritional vitamin D deficiency on atherogenesis should be examined in a second animal study. LDLR^{-/-} mice were used as a model of pronounced atherosclerosis which will be developed due to the lack of the LDL receptor by feeding a sugar, fat and cholesterol rich diet and by the associated increase of LDL cholesterol levels. This allows a usage of these mice for investigations of atherosclerotic alterations in the vascular system. The mice were fed a semi synthetic western diet with either low (50 IU/kg diet), adequate (1,000 IU/kg diet) or high (10,000 IU/kg diet) amounts of vitamin D. To quantify atherosclerosis, frozen sections of the aortic root of the animals were prepared and histological and immunohistochemical analyzed for different relevant morphologic structures. The size of atherosclerotic plaques, the plaque content in collagen and fat as well as the portion of macrophages and smooth muscle cells was not affected by the different dietary vitamin D concentrations. Similar to the experiment with VDR^{-/-} mice, an insufficient alimentary vitamin D supply produced a greater calcified area in the plaques of LDLR^{-/-} mice than an adequate or high vitamin D feeding. The calcified crystals had a spot-like distribution in the atherosclerotic plaque with a higher number of spots in the LDLR^{-/-} mice with low-dose vitamin D compared to the other treatment groups. The predominantly appearance of small calcified crystals was described in association with a reduction in plaque stability. Similar to the VDR^{-/-} mice, LDLR^{-/-} mice with an inadequate vitamin D supply showed a higher expression of Bmp-2, Msx2 and Runx2 in the aortic root than mice fed a diet with adequate or high amounts of vitamin D.

In the next part of this work resultant questions of the first two studies should be clarified: (1) Does vitamin D deficiency also induce vascular calcification in mice lacking atherosclerotic plaques? (2) Can vascular calcification induced by a low vitamin D diet be reversed by vitamin D supplementation? (3) Does atherosclerotic plaque composition change in response to persistent vitamin D insufficiency? Further it should be analyzed whether a transdifferentiation of vascular cells may additionally play a role in vitamin D deficiency associated vascular calcification and if vitamin D has an effect on the calcification process in all heart valves. Because of the fact that pathological changes especially occur in vessel bifurcations and areas with high mechanical stress, different arterial vessels were also analyzed regarding calcification. Affected vessels are predominantly the aorta and their main branches, i.e. the innominate and femoral arteries. LDLR^{-/-} and WT mice were fed a semi synthetic western diet with either low (50 IU/kg diet) or adequate (1,000 IU/kg diet) amounts of vitamin D for 16 weeks. Furthermore, LDLR^{-/-} mice received these diets for another 16 weeks (total 32 weeks) whereat half of the animals were switched in their feeding regime. This should allow determining possible vitamin D effects after an existing deficiency as well as the potential impact of an induced vitamin D deficiency after an adequate supply. In parallel there should be examined which

consequences result after 32 weeks of vitamin D administration on the vasculature of the LDLR^{-/-} mice in relation to 16 weeks of feeding diets with different vitamin D amounts. After preparing frozen sections of the aortic root, the tricuspid and mitral valves as well as of the vessels different morphologic structures were analyzed. After 16 weeks of feeding a low vitamin D diet LDLR^{-/-} mice had a significantly higher and WT mice tended to have an increase in calcification compared to the mice received the adequate vitamin D diet. This was associated with a higher expression of osteoblast differentiation factors as seen in the other studies. Both the aorta and innominate artery showed a higher calcified area in WT and LDLR^{-/-} mice after 16 weeks of feeding a low vitamin D diet compared to adequate vitamin D supply. The WT mice otherwise showed no vascular changes. The LDLR^{-/-} mice exhibited a distinct plaque development with deposition of collagen and lipids as well as a portion of macrophages, but without differences between the treatment groups. However there was an increased expression of the inflammatory marker TNF- α in the low vitamin D group compared to the mice fed the adequate diet. After the 32 week feeding period the highest amount of calcification in the aortic root, in the vessels as well as in the tricuspid and mitral valve was determined in the group received the diet with insufficient vitamin D amounts for the whole time. Animals which were fed the adequate vitamin D diet after an existing deficiency showed a stop or even a regression of calcification with a reduction in expression of osteogenic factors, respectively. The number and area of calcified crystals of this group were according to the mice fed the diet with adequate vitamin D amounts for 32 weeks. There was a further increase in the plaque area of the aortic root and the aorta after 32 weeks of feeding with no differences between the treatment groups. In contrast, mice fed the vitamin D deficient diet showed a significant higher area of atherosclerotic plaque in the innominate and femoral arteries than mice with an adequate vitamin D supply. In addition, a prolonged vitamin D deficiency was associated with an increased percentage of lipids, macrophages and the inflammatory marker TNF- α in comparison to the adequate vitamin D group. On the basis of an increased expression of ALP (alkaline phosphatase) and a reduction in the SMC (smooth muscle cell)- α -Aktin expression in WT and LDLR^{-/-} mice with an insufficient vitamin D supply there could be assumed that a higher rate of transdifferentiation of vascular cells could occur in these animals. These findings indicate a supporting role of vitamin D deficiency over a long time on calcification and inflammatory processes whereas vitamin D seems to have positive effects on pathological events in the vascular system and may inhibit transdifferentiation of smooth muscle cells and fibromyoblasts in osteoblast-like cells.

In conclusion the studies of this work demonstrate a negative impact of a lacking VDR and low vitamin D diets on the vascular system, respectively. Their effects include an increase in calcification, osteogenic differentiation and inflammation. This could lead to a reduction of vessel elasticity and plaque stability and therefore increase the risk of hypertension and plaque rupture. In addition, first indications for reversibility of vitamin D deficiency induced pathological changes by vitamin D supplementation could be provided. An optimization of

the vitamin D supply could have a positive impact on the vasculature and the blood pressure regulation by declining calcification. Therefore, if the results should be confirmed in humans, it may be possible to reduce the risk of incident atherosclerosis and other cardiovascular diseases. Before stating a causal link between low vitamin D levels and vascular calcification further human interventional studies are needed. Data of those examinations under regard of the variable vitamin D requirements of different organ systems are mandatory before recommending an optimization of the 25(OH)D state in association with a risk reduction for vascular and valvular calcification and resultant cardiovascular events.

6 Literaturverzeichnis

- Abedin M, Tintut Y, Demer LL (2004) Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (7), 1161 - 1170.
- Al-Aly Z, Shao J, Lai C, Huang E, Cai J, Behrmann A, Cheng S, Towler DA (2007) Aortic Msx2-Wnt calcification cascade is regulated by TNF-alpha-dependent signals in diabetic Ldlr-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27 (12), 2589 - 2596.
- American Institute of Nutrition (AIN) (1980) Second report of the ad hoc committee for experimental animals. *J. Nutr.* 110:1726.
- Andress DL (2006) Vitamin D in chronic kidney disease: a systemic role for selective vitamin D receptor activation. *Kidney Int* 69 (1), 33 - 43.
- Axen E, Harmeyer J, Wikvall K (1998) Renal and hepatic 1 alpha-hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D3 in piglets suffering from pseudo vitamin D-deficiency rickets, type I. *Biochim Biophys Acta* 1407 (3), 234 - 242.
- Back M, Gasser TC, Michel J, Caligiuri G (2013) Biomechanical factors in the biology of aortic wall and aortic valve diseases. *Cardiovasc Res* 99 (2), 232 - 241.
- Balsan S, Garabedian M, Larchet M, Gorski AM, Cournot G, Tau C, Bourdeau A, Silve C, Ricour C (1986) Long-term nocturnal calcium infusions can cure rickets and promote normal mineralization in hereditary resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Clin Invest* 77 (5), 1661 - 1667.
- Barthel TK, Mathern DR, Whitfield GK, Haussler CA, Hopper HA, 4th., Hsieh J, Slater SA, Hsieh G, Kaczmarek M, Jurutka PW, Kolek OI, Ghishan FK, Haussler MR (2007) 1,25-Dihydroxyvitamin D3/VDR-mediated induction of FGF23 as well as transcriptional control of other bone anabolic and catabolic genes that orchestrate the regulation of phosphate and calcium mineral metabolism. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103 (3-5), 381 - 388.
- Bas A, Lopez I, Perez J, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E (2006) Reversibility of calcitriol-induced medial artery calcification in rats with intact renal function. *J Bone Miner Res* 21 (3), 484 - 490.
- Basalyga DM, Simionescu DT, Xiong W, Baxter BT, Starcher BC, Vyavahare NR (2004) Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: role of matrix metalloproteinases. *Circulation* 110 (22), 3480 - 3487.
- Bassler R, Buchholz H. (1993) Methodenbuch Band III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. Darmstadt, *VDLUFA-Verlag*.
- Bastos Goncalves F, Voute MT, Hoeks SE, Chonchol MB, Boersma EE, Stolker RJ, Verhagen HJM (2012) Calcification of the abdominal aorta as an independent predictor of cardiovascular events: a meta-analysis. *Heart* 98 (13), 988 - 994.
- Bennett BJ, Wang SS, Wang X, Wu X, Lusis AJ (2009) Genetic regulation of atherosclerotic plaque size and morphology in the innominate artery of hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29 (3), 348 - 355.
- Beno DW, Brady LM, Bissonnette M, Davis BH (1995) Protein kinase C and mitogen-activated protein kinase are required for 1,25-dihydroxyvitamin D3-stimulated Egr induction. *J Biol Chem* 270 (8), 3642 - 3647.

- Bergwitz C, Juppner H (2010) Regulation of phosphate homeostasis by PTH, vitamin D, and FGF23. *Annu Rev Med* 61, 91 - 104.
- Berl T, Henrich W (2006) Kidney-heart interactions: epidemiology, pathogenesis, and treatment. *Clin J Am Soc Nephrol* 1 (1), 8 - 18.
- Biesalski HK (2011) Vitamin D recommendations: beyond deficiency. *Ann Nutr Metab* 59 (1), 10 - 16.
- Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Staehelin HB, Orav JE, Stuck AE, Theiler R, Wong JB, Egli A, Kiel DP, Henschkowski J (2009) Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 339, b3692.
- Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, London GM (2001) Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension* 38 (4), 938 - 942.
- Boer RA de (2011) Vitamin D and cardiovascular disease: a jack of all trades? *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 12 (2), 123 - 124.
- Borges AC, Feres T, Vianna LM, Paiva TB (1999a) Effect of cholecalciferol treatment on the relaxant responses of spontaneously hypertensive rat arteries to acetylcholine. *Hypertension* 34 (4 Pt 2), 897 - 901.
- Borges AC, Feres T, Vianna LM, Paiva TB (1999b) Recovery of impaired K⁺ channels in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats by prolonged treatment with cholecalciferol. *Br J Pharmacol* 127 (3), 772 - 778.
- Bostrom K (2001) Insights into the mechanism of vascular calcification. *Am J Cardiol* 88 (2A), 20E-22E.
- Bostrom K (2005) Proinflammatory vascular calcification. *Circ Res* 96 (12), 1219 - 1220.
- Bostrom K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL (1993) Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 91 (4), 1800 - 1809.
- Bouillon R, Bischoff-Ferrari H, Willett W (2008a) Vitamin D and health: perspectives from mice and man. *J Bone Miner Res* 23 (7), 974 - 979.
- Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, Lieben L, Mathieu C, Demay M (2008b) Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* 29 (6), 726 - 776.
- Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Peled ZM, Gerrets RP, Greenwald JA, Longaker MT (2002) Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. *Plast Reconstr Surg* 109 (7), 2384 - 2397.
- Brewer LC, Michos ED, Reis JP (2011) Vitamin D in atherosclerosis, vascular disease, and endothelial function. *Curr Drug Targets* 12 (1), 54 - 60.
- Brooks MH, Bell NH, Love L, Stern PH, Orfei E, Queener SF, Hamstra AJ, DeLuca HF (1978) Vitamin-D-dependent rickets type II. Resistance of target organs to 1,25-dihydroxyvitamin D. *N Engl J Med* 298 (18), 996 - 999.
- Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E (1999) Vitamin D. *Am J Physiol* 277 (2 Pt 2), F157-75.

- Brown MS, Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232 (4746), 34 - 47.
- Brown MS, Goldstein JL (1990) Atherosclerosis. Scavenging for receptors. *Nature* 343 (6258), 508 - 509.
- Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS (1998) osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12 (9), 1260 - 1268.
- Burgaz A, Orsini N, Larsson SC, Wolk A (2011) Blood 25-hydroxyvitamin D concentration and hypertension: a meta-analysis. *J Hypertens* 29 (4), 636 - 645.
- Cannata-Andia JB, Rodriguez-Garcia M, Carrillo-Lopez N, Naves-Diaz M, Diaz-Lopez B (2006) Vascular calcifications: pathogenesis, management, and impact on clinical outcomes. *J Am Soc Nephrol* 17 (12 Suppl 3), S267-73.
- Cardus A, Panizo S, Encinas M, Dolcet X, Gallego C, Aldea M, Fernandez E, Valdivielso JM (2009) 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates VEGF production through a vitamin D response element in the VEGF promoter. *Atherosclerosis* 204 (1), 85 - 89.
- Cardus A, Parisi E, Gallego C, Aldea M, Fernandez E, Valdivielso JM (2006) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through a VEGF-mediated pathway. *Kidney Int* 69 (8), 1377 - 1384.
- Carthy EP, Yamashita W, Hsu A, Ooi BS (1989) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and rat vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension* 13 (6 Pt 2), 954 - 959.
- Cauley JA, Wampler NS, Barnhart JM, Wu L, Allison M, Chen Z, Hendrix S, Robbins J, Jackson RD (2008) Incidence of fractures compared to cardiovascular disease and breast cancer: the Women's Health Initiative Observational Study. *Osteoporos Int* 19 (12), 1717 - 1723.
- Cheng S, Shao J, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA (2003) MSX2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. *J Biol Chem* 278 (46), 45969 - 45977.
- Chen S, Glenn DJ, Ni W, Grigsby CL, Olsen K, Nishimoto M, Law CS, Gardner DG (2008) Expression of the vitamin d receptor is increased in the hypertrophic heart. *Hypertension* 52 (6), 1106 - 1112.
- Chen S, Law CS, Grigsby CL, Olsen K, Gardner DG (2010) A role for the cell cycle phosphatase Cdc25a in vitamin D-dependent inhibition of adult rat vascular smooth muscle cell proliferation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 122 (5), 326 - 332.
- Chowdhury R, Stevens S, Ward H, Chowdhury S, Sajjad A, Franco OH (2012) Circulating vitamin D, calcium and risk of cerebrovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Epidemiol.* 27 (8), 581 - 591.
- Cigolini M, Iagulli MP, Miconi V, Galiotto M, Lombardi S, Targher G (2006) Serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and prevalence of cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 29 (3), 722 - 724.
- Cilla M, Monterde D, Pena E, Martinez MA (2013) Does microcalcification increase the risk of rupture? *Proc Inst Mech Eng H* 227 (5), 588 - 599.
- Claassen H, Schicht M, Brandt J, Reuse K, Schadlich R, Goldring MB, Guddat SS, Thate A, Paulsen F (2011) C-28/I2 and T/C-28a2 chondrocytes as well as human primary

- articular chondrocytes express sex hormone and insulin receptors--Useful cells in study of cartilage metabolism. *Ann Anat* 193 (1), 23 - 29.
- Cola C, Almeida M, Li D, Romeo F, Mehta JL (2004) Regulatory role of endothelium in the expression of genes affecting arterial calcification. *Biochem Biophys Res Commun* 320 (2), 424 - 427.
- Csiszar A, Smith KE, Koller A, Kaley G, Edwards JG, Ungvari Z (2005) Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression in endothelial cells: role of nuclear factor-kappaB activation by tumor necrosis factor-alpha, H₂O₂, and high intravascular pressure. *Circulation* 111 (18), 2364 - 2372.
- Cunningham KS, Gotlieb AI (2005) The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest* 85 (1), 9 - 23.
- Danilevicius CF, Lopes JB, Pereira RMR (2007) Bone metabolism and vascular calcification. *Braz J Med Biol Res* 40 (4), 435 - 442.
- Davies PF (2009) Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 6 (1), 16 - 26.
- Dean DD, Schwartz Z, Schmitz J, Muniz OE, Lu Y, Calderon F, Howell DS, Boyan BD (1996) Vitamin D regulation of metalloproteinase activity in matrix vesicles. *Connect Tissue Res* 35 (1-4), 331 - 336.
- Demay MB (2013) Physiological insights from the vitamin D receptor knockout mouse. *Calcif Tissue Int* 92 (2), 99 - 105.
- Demer LL (2001) Cholesterol in vascular and valvular calcification. *Circulation* 104 (16), 1881 - 1883.
- Demer LL, Tintut Y (2008) Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation* 117 (22), 2938 - 2948.
- DGE (2012) New reference values for vitamin D. *Ann Nutr Metab* 60 (4), 241 - 246.
- Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, Tordoir JH, Spronk HM, Vermeer C, Daemen MJ (2001) Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21 (12), 1998 - 2003.
- Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, Renner W, Seelhorst U, Wellnitz B, Kinkeldei J, Boehm BO, Weihrauch G, Maerz W (2008) Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin d and 1,25-dihydroxyvitamin d levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med* 168 (12), 1340 - 1349.
- Doherty TM, Detrano RC (1994) Coronary arterial calcification as an active process: a new perspective on an old problem. *Calcif Tissue Int* 54 (3), 224 - 230.
- Doorenbos CRC, van den Born J, Navis G, Borst MH de (2009) Possible renoprotection by vitamin D in chronic renal disease: beyond mineral metabolism. *Nat Rev Nephrol* 5 (12), 691 - 700.
- Dostal LA, Toverud SU (1984) Effect of vitamin D₃ on duodenal calcium absorption in vivo during early development. *Am J Physiol* 246 (5 Pt 1), G528-34.
- Douglas AS, Dunnigan MG, Allan TM, Rawles JM (1995) Seasonal variation in coronary heart disease in Scotland. *J Epidemiol Community Health* 49 (6), 575 - 582.

- Drechsler C, Pilz S, Obermayer-Pietsch B, Verduijn M, Tomaschitz A, Krane V, Espe K, Dekker F, Brandenburg V, Marz W, Ritz E, Wanner C (2010) Vitamin D deficiency is associated with sudden cardiac death, combined cardiovascular events, and mortality in haemodialysis patients. *Eur Heart J* 31 (18), 2253 - 2261.
- Drechsler C, Verduijn M, Pilz S, Dekker FW, Krediet RT, Ritz E, Wanner C, Boeschoten EW, Brandenburg V (2011) Vitamin D status and clinical outcomes in incident dialysis patients: results from the NECOSAD study. *Nephrol Dial Transplant* 26 (3), 1024 - 1032.
- Drueke TB, Massy ZA (2012) Role of vitamin D in vascular calcification: bad guy or good guy? *Nephrol Dial Transplant* 27 (5), 1704 - 1707.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997) Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89 (5), 747 - 754.
- Durup D, Jorgensen HL, Christensen J, Schwarz P, Heegaard AM, Lind B (2012) A reverse J-shaped association of all-cause mortality with serum 25-hydroxyvitamin D in general practice: the CopD study. *J Clin Endocrinol Metab* 97 (8), 2644 - 2652.
- Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E (2005) Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 289 (1), F8-28.
- Ebert R, Schutze N, Adamski J, Jakob F (2006) Vitamin D signaling is modulated on multiple levels in health and disease. *Mol Cell Endocrinol* 248 (1-2), 149 - 159.
- Ehara S, Kobayashi Y, Yoshiyama M, Shimada K, Shimada Y, Fukuda D, Nakamura Y, Yamashita H, Yamagishi H, Takeuchi K, Naruko T, Haze K, Becker AE, Yoshikawa J, Ueda M (2004) Spotty calcification typifies the culprit plaque in patients with acute myocardial infarction: an intravascular ultrasound study. *Circulation* 110 (22), 3424 - 3429.
- El-Abbadi M, Giachelli CM (2005) Arteriosclerosis, calcium phosphate deposition and cardiovascular disease in uremia: current concepts at the bench. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14 (6), 519 - 524.
- Erben RG, Soegiarto DW, Weber K, Zeitz U, Lieberherr M, Gniadecki R, Moller G, Adamski J, Balling R (2002) Deletion of deoxyribonucleic acid binding domain of the vitamin D receptor abrogates genomic and nongenomic functions of vitamin D. *Mol Endocrinol* 16 (7), 1524 - 1537.
- Essalihi R, Ouellette V, Dao HH, McKee MD, Moreau P (2004) Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells during medial arterial calcification: a role for endothelin? *J Cardiovasc Pharmacol* 44 Suppl 1, S147-50.
- Ewence AE, Bootman M, Roderick HL, Skepper JN, McCarthy G, Epple M, Neumann M, Shanahan CM, Proudfoot D (2008) Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells: a potential mechanism in atherosclerotic plaque destabilization. *Circ Res* 103 (5), e28-34.
- Fernandes de Abreu DA, Eyles D, Feron F (2009) Vitamin D, a neuro-immunomodulator: implications for neurodegenerative and autoimmune diseases. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1, S265-77.
- Fleet JC, Gliniak C, Zhang Z, Xue Y, Smith KB, McCreedy R, Adedokun SA (2008) Serum metabolite profiles and target tissue gene expression define the effect of cholecalciferol intake on calcium metabolism in rats and mice. *J Nutr* 138 (6), 1114 - 1120.
- Forman JP, Williams JS, Fisher NDL (2010) Plasma 25-hydroxyvitamin D and regulation of the renin-angiotensin system in humans. *Hypertension* 55 (5), 1283 - 1288.

- Fu GK, Lin D, Zhang MY, Bikle DD, Shackleton CH, Miller WL, Portale AA (1997) Cloning of human 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase and mutations causing vitamin D-dependent rickets type 1. *Mol Endocrinol* 11 (13), 1961 - 1970.
- Galis ZS, Khatri JJ (2002) Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 90 (3), 251 - 262.
- Gambillara V, Montorzi G, Haziza-Pigeon C, Stergiopoulos N, Silacci P (2005) Arterial wall response to ex vivo exposure to oscillatory shear stress. *J Vasc Res* 42 (6), 535 - 544.
- Garcia-Canton C, Bosch E, Auyanet I, Ramirez A, Rossique P, Culebras C, Sanchez A, Toledo A, Lago M, Esparza N, Checa MD (2010) 25 hydroxyvitamin D levels and cardiovascular risk in a cohort of patients with advanced chronic kidney disease. *Nefrologia* 30 (4), 435 - 442.
- Garcia-Canton C, Bosch E, Ramirez A, Gonzalez Y, Auyanet I, Guerra R, Perez MA, Fernandez E, Toledo A, Lago M, Checa MD (2011) Vascular calcification and 25-hydroxyvitamin D levels in non-dialysis patients with chronic kidney disease stages 4 and 5. *Nephrol Dial Transplant* 26 (7), 2250 - 2256.
- Giachelli CM (1999) Ectopic calcification: gathering hard facts about soft tissue mineralization. *Am J Pathol* 154 (3), 671 - 675.
- Giachelli CM (2004) Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 15 (12), 2959 - 2964.
- Giachelli CM (2009) The emerging role of phosphate in vascular calcification. *Kidney Int* 75 (9), 890 - 897.
- Ginde AA, Liu MC, Camargo CA, JR (2009) Demographic differences and trends of vitamin D insufficiency in the US population, 1988-2004. *Arch Intern Med* 169 (6), 626 - 632.
- Goltzman D (2010) Vitamin D action. Lessons learned from genetic mouse models. *Ann N Y Acad Sci* 1192, 145 - 152.
- Gouni-Berthold I, Krone W, Berthold HK (2009) Vitamin D and cardiovascular disease. *Curr Vasc Pharmacol* 7 (3), 414 - 422.
- Grandi NC, Breitling LP, Brenner H (2010a) Vitamin D and cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Prev Med* 51 (3-4), 228 - 233.
- Grandi NC, Breitling LP, Vossen CY, Hahmann H, Wusten B, Marz W, Rothenbacher D, Brenner H (2010b) Serum vitamin D and risk of secondary cardiovascular disease events in patients with stable coronary heart disease. *Am Heart J* 159 (6), 1044 - 1051.
- Hagenau T, Vest R, Gissel TN, Poulsen CS, Erlandsen M, Mosekilde L, Vestergaard P (2009) Global vitamin D levels in relation to age, gender, skin pigmentation and latitude: an ecologic meta-regression analysis. *Osteoporos Int* 20 (1), 133 - 140.
- Halloran BP, Luca HF de (1981) Effect of vitamin D deficiency on skeletal development during early growth in the rat. *Arch Biochem Biophys* 209 (1), 7 - 14.
- Hausler MR, Hausler CA, Jurutka PW, Thompson PD, Hsieh JC, Remus LS, Selznick SH, Whitfield GK (1997) The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states. *J Endocrinol* 154, S57-73.
- Henley C, Colloton M, Cattley RC, Shatzken E, Towler DA, Lacey D, Martin D (2005) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 but not cinacalcet HCl (Sensipar/Mimpara) treatment mediates aortic

- calcification in a rat model of secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant* 20 (7), 1370 - 1377.
- Hintzpeter B, Mensink GBM, Thierfelder W, Muller MJ, Scheidt-Nave C (2008) Vitamin D status and health correlates among German adults. *Eur J Clin Nutr* 62 (9), 1079 - 1089.
- Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL (1992) Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1 (6), 445 - 466.
- Holick MF (2004) Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 79 (3), 362 - 371.
- Holick MF (2006) High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc* 81 (3), 353 - 373.
- Holick MF (2007) Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 357 (3), 266 - 281.
- Holick MF (2008) Vitamin D: a D-Lightful health perspective. *Nutr Rev* 66 (10 Suppl 2), S182-94.
- Holick MF (2012) The D-lightful vitamin D for child health. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 36 (1 Suppl), 9S-19S.
- Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB, Holick SA, Potts JT, JR, Anderson RR, Blank IH, Parrish JA, Elias P (1980) Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. *Science* 210 (4466), 203 - 205.
- Holick MF, Siris ES, Binkley N, Beard MK, Khan A, Katzer JT, Petruschke RA, Chen E, Papp AE de (2005) Prevalence of Vitamin D inadequacy among postmenopausal North American women receiving osteoporosis therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 90 (6), 3215 - 3224.
- Hristov M, Zerneck A, Bidzhekov K, Liehn EA, Shagdarsuren E, Ludwig A, Weber C (2007a) Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury. *Circ Res* 100 (4), 590 - 597.
- Hristov M, Zerneck A, Liehn EA, Weber C (2007b) Regulation of endothelial progenitor cell homing after arterial injury. *Thromb Haemost* 98 (2), 274 - 277.
- Huebbe P, Nebel A, Siegert S, Moehring J, Boesch-Saadatmandi C, Most E, Pallauf J, Egert S, Muller MJ, Schreiber S, Nothlings U, Rimbach G (2011) APOE epsilon4 is associated with higher vitamin D levels in targeted replacement mice and humans. *FASEB J* 25 (9), 3262 - 3270.
- Hunt JL, Fairman R, Mitchell ME, Carpenter JP, Golden M, Khalapyan T, Wolfe M, Neschis D, Milner R, Scoll B, Cusack A, Mohler ER3 (2002) Bone formation in carotid plaques: a clinicopathological study. *Stroke* 33 (5), 1214 - 1219.
- Husain K, Ferder L, Mizobuchi M, Finch J, Slatopolsky E (2009) Combination therapy with paricalcitol and enalapril ameliorates cardiac oxidative injury in uremic rats. *Am J Nephrol* 29 (5), 465 - 472.
- Insull W, JR (2009) The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am J Med* 122 (1 Suppl), S3-S14.
- Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J (1993) Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 92 (2), 883 - 893.

- Ishibashi S, Goldstein JL, Brown MS, Herz J, Burns DK (1994) Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest* 93 (5), 1885 - 1893.
- Ivanovski O, Nikolov IG, Joki N, Caudrillier A, Phan O, Mentaverri R, Maizel J, Hamada Y, Nguyen-Khoa T, Fukagawa M, Kamel S, Lacour B, Drueke TB, Massy ZA (2009) The calcimimetic R-568 retards uremia-enhanced vascular calcification and atherosclerosis in apolipoprotein E deficient (apoE^{-/-}) mice. *Atherosclerosis* 205 (1), 55 - 62.
- Jassal SK, Chonchol M, Muhlen D von, Smits G, Barrett-Connor E (2010) Vitamin d, parathyroid hormone, and cardiovascular mortality in older adults: the Rancho Bernardo study. *Am J Med* 123 (12), 1114 - 1120.
- Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J (2006) Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res* 99 (10), 1044 - 1059.
- Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM (2000) Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 87 (7), E10-7.
- Joven J, Rull A, Ferre N, Escola-Gil JC, Marsillach J, Coll B, Alonso-Villaverde C, Aragonés G, Claria J, Camps J (2007) The results in rodent models of atherosclerosis are not interchangeable: the influence of diet and strain. *Atherosclerosis* 195 (2), e85-92.
- Judd SE, Nanes MS, Ziegler TR, Wilson PWF, Tangpricha V (2008) Optimal vitamin D status attenuates the age-associated increase in systolic blood pressure in white Americans: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Clin Nutr* 87 (1), 136 - 141.
- Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, Vahl CF, Hagl S, Brueckmann M, Haase KK, Dempfle C, Borggrefe M (2004) Expression of bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-2 in calcific aortic stenosis. *J Heart Valve Dis* 13 (4), 560 - 566.
- Kanemaru K, Seya K, Miki I, Motomura S, Furukawa K (2008) Calcification of aortic smooth muscle cells isolated from spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Sci* 106 (2), 280 - 286.
- Karwowski W, Naumnik B, Szczepanski M, Mysliwiec M (2012) The mechanism of vascular calcification - a systematic review. *Med Sci Monit* 18 (1), RA1-11.
- Kasuga H, Hosogane N, Matsuoka K, Mori I, Sakura Y, Shimakawa K, Shinki T, Suda T, Taketomi S (2002) Characterization of transgenic rats constitutively expressing vitamin D-24-hydroxylase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 297 (5), 1332 - 1338.
- Kataoka Y, Wolski K, Uno K, Puri R, Tuzcu EM, Nissen SE, Nicholls SJ (2012) Spotty calcification as a marker of accelerated progression of coronary atherosclerosis: insights from serial intravascular ultrasound. *J Am Coll Cardiol* 59 (18), 1592 - 1597.
- Kaune R, Harmeyer J (1987) Vitamin D3 metabolism in a pig strain with pseudo vitamin D-deficiency rickets, type I. *Acta Endocrinol (Copenh)* 115 (3), 345 - 352.
- Keelan PC, Bielak LF, Ashai K, Jamjoum LS, Denktas AE, Rumberger JA, Sheedy II PF, Peyser PA, Schwartz RS (2001) Long-term prognostic value of coronary calcification detected by electron-beam computed tomography in patients undergoing coronary angiography. *Circulation* 104 (4), 412 - 417.
- Kelly RP, Tunin R, Kass DA (1992) Effect of reduced aortic compliance on cardiac efficiency and contractile function of in situ canine left ventricle. *Circ Res* 71 (3), 490 - 502.

- Kempker JA, Tangpricha V, Ziegler TR, Martin GS (2012) Vitamin D in sepsis: from basic science to clinical impact. *Crit Care* 16 (4), 316.
- Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, Wildberger JE, Mahnken AH, Bohm R, Metzger T, Wanner C, Jahnke-Dechent W, Floege J (2003) Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet* 361 (9360), 827 - 833.
- Ketteler M, Westenfeld R, Schlieper G, Brandenburg V, Floege J (2005) "Missing" inhibitors of calcification: general aspects and implications in renal failure. *Pediatr Nephrol* 20 (3), 383 - 388.
- Kienreich K, Tomaschitz A, Verheyen N, Pieber TR, Pilz S (2013) Vitamin D and arterial hypertension: treat the deficiency! *Am J Hypertens* 26 (2), 158.
- Kilkkinen A, Knekt P, Aro A, Rissanen H, Marniemi J, Heliovaara M, Impivaara O, Reunanen A (2009) Vitamin D status and the risk of cardiovascular disease death. *Am J Epidemiol* 170 (8), 1032 - 1039.
- Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T (2008) Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res* 79 (3), 360 - 376.
- Knowles JW, Maeda N (2000) Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 (11), 2336 - 2345.
- Kochupillai N (2008) The physiology of vitamin D. Current concepts. *Indian J Med Res* 127 (3), 256 - 262.
- Koenig W, Khuseynova N (2007) Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27 (1), 15 - 26.
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T (1997) Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89 (5), 755 - 764.
- Kovesdy CP, Lu JL, Malakauskas SM, Andress DL, Kalantar-Zadeh K, Ahmadzadeh S (2012) Paricalcitol versus ergocalciferol for secondary hyperparathyroidism in CKD stages 3 and 4: a randomized controlled trial. *Am J Kidney Dis* 59 (1), 58 - 66.
- Kuchibhotla S, Vanegas D, Kennedy DJ, Guy E, Nimako G, Morton RE, Febbraio M (2008) Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A I/II. *Cardiovasc Res* 78 (1), 185 - 196.
- Kunitomo M, Kinoshita K, Bando Y (1981) Experimental atherosclerosis in rats fed a vitamin D, cholesterol-rich diet. *J Pharmacobiodyn* 4 (9), 718 - 723.
- Labuda M, Fujiwara TM, Ross MV, Morgan K, Garcia-Heras J, Ledbetter DH, Hughes MR, Glorieux FH (1992) Two hereditary defects related to vitamin D metabolism map to the same region of human chromosome 12q13-14. *J Bone Miner Res* 7 (12), 1447 - 1453.
- Lagishetty V, Liu NQ, Hewison M (2011) Vitamin D metabolism and innate immunity. *Mol Cell Endocrinol* 347 (1-2), 97 - 105.
- Lee D (2011) Vascular calcification: Inducers and inhibitors. *Materials Science and Engineering: B* (176), 1133 - 1141.

- Lee JH, O'Keefe JH, Bell D, Hensrud DD, Holick MF (2008) Vitamin D deficiency an important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor? *J Am Coll Cardiol* 52 (24), 1949 - 1956.
- Lee H, Woo KM, Ryoo H, Baek J (2010) Tumor necrosis factor-alpha increases alkaline phosphatase expression in vascular smooth muscle cells via MSX2 induction. *Biochem Biophys Res Commun* 391 (1), 1087 - 1092.
- Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420 (6917), 868 - 874.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A (2002) Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105 (9), 1135 - 1143.
- Lieberherr M, Grosse B, Duchambon P, Druke T (1989) A functional cell surface type receptor is required for the early action of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the phosphoinositide metabolism in rat enterocytes. *J Biol Chem* 264 (34), 20403 - 20406.
- Lindsey ML, Escobar GP, Dobrucki LW, Goshorn DK, Bouges S, Mingoia JT, McClister DM, JR, Su H, Gannon J, MacGillivray C, Lee RT, Sinusas AJ, Spinale FG (2006) Matrix metalloproteinase-9 gene deletion facilitates angiogenesis after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290 (1), H232-9.
- Lin R, Amizuka N, Sasaki T, Aarts MM, Ozawa H, Goltzman D, Henderson JE, White JH (2002) 1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 promotes vascularization of the chondro-osseous junction by stimulating expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase 9. *J Bone Miner Res* 17 (9), 1604 - 1612.
- Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, Ochoa MT, Schaubert J, Wu K, Meinken C, Kamen DL, Wagner M, Bals R, Steinmeyer A, Zugel U, Gallo RL, Eisenberg D, Hewison M, Hollis BW, Adams JS, Bloom BR, Modlin RL (2006) Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 311 (5768), 1770 - 1773.
- Li X, Yang H, Giachelli CM (2008) BMP-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 199 (2), 271 - 277.
- Li YC, Amling M, Pirro AE, Priemel M, Meuse J, Baron R, Delling G, Demay MB (1998) Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor-ablated mice. *Endocrinology* 139 (10), 4391 - 4396.
- Li YC, Pirro AE, Amling M, Delling G, Baron R, Bronson R, Demay MB (1997) Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (18), 9831 - 9835.
- London GM (2005) Vascular disease and atherosclerosis in uremia. *Nefrologia* 25 Suppl 2, 91 - 95.
- Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT (2002) Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest* 110 (5), 625 - 632.
- Lopez I, Mendoza FJ, Aguilera-Tejero E, Perez J, Guerrero F, Martin D, Rodriguez M (2008) The effect of calcitriol, paricalcitol, and a calcimimetic on extraosseous calcifications in uremic rats. *Kidney Int* 73 (3), 300 - 307.

- Luo G, Ducky P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G (1997) Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 386 (6620), 78 - 81.
- Lusis AJ (2000) Atherosclerosis. *Nature* 407 (6801), 233 - 241.
- Madden JA (2012) Role of the vascular endothelium and plaque in acute ischemic stroke. *Neurology* 79 (13 Suppl 1), S58-62.
- Mallat Z, Besnard S, Duriez M, Deleuze V, Emmanuel F, Bureau MF, Soubrier F, Esposito B, Duez H, Fievet C, Staels B, Duverger N, Scherman D, Tedgui A (1999) Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res* 85 (8), e17-24.
- Malloy PJ, Feldman D (1999) Molecular Defects in the Vitamin-D Receptor Associated with Hereditary 1,25-DihydroxyVitamin-D-Resistant Rickets. In: Vitamin D. Physiology, Molecular Biology und Clinical Applications. Holick MF ed. *Humana Press Totowa, N J*; pp 317-336.
- Marinou K, Christodoulides C, Antoniadou C, Koutsilieris M (2012) Wnt signaling in cardiovascular physiology. *Trends Endocrinol Metab* 23 (12), 628 - 36.
- Martinesi M, Bruni S, Stio M, Treves C (2006) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced adhesion molecule expression in endothelial cells. *Cell Biol Int* 30 (4), 365 - 375.
- Martins D, Wolf M, Pan D, Zadshir A, Tareen N, Thadhani R, Felsenfeld A, Levine B, Mehrotra R, Norris K (2007) Prevalence of cardiovascular risk factors and the serum levels of 25-hydroxyvitamin D in the United States: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med* 167 (11), 1159 - 1165.
- Mathews CH, Brommage R, DeLuca HF (1986) Role of vitamin D in neonatal skeletal development in rats. *Am J Physiol* 250 (6 Pt 1), E725-30.
- Mathew S, Lund RJ, Chaudhary LR, Geurs T, Hruska KA (2008) Vitamin D receptor activators can protect against vascular calcification. *J Am Soc Nephrol* 19 (8), 1509 - 1519.
- Mathieu C, van Etten E, Gysemans C, Decallonne B, Kato S, Laureys J, Depovere J, Valckx D, Verstuyf A, Bouillon R (2001) In vitro and in vivo analysis of the immune system of vitamin D receptor knockout mice. *J Bone Miner Res* 16 (11), 2057 - 2065.
- Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, Aburatani H, Nishimura R, Yoneda T (2008) BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 283 (43), 29119 - 29125.
- Matsumura S, Iwanaga S, Mochizuki S, Okamoto H, Ogawa S, Okada Y (2005) Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *J Clin Invest* 115 (3), 599 - 609.
- McMillan DE (1985) Blood flow and the localization of atherosclerotic plaques. *Stroke* 16 (4), 582 - 587.
- Melamed ML, Michos ED, Post W, Astor B (2008) 25-hydroxyvitamin D levels and the risk of mortality in the general population. *Arch Intern Med* 168 (15), 1629 - 1637.
- Merino H, Parthasarathy S, Singla DK (2013) Partial ligation-induced carotid artery occlusion induces leukocyte recruitment and lipid accumulation--a shear stress model of atherosclerosis. *Mol Cell Biochem* 372 (1-2), 267 - 273.

- Merke J, Hofmann W, Goldschmidt D, Ritz E (1987) Demonstration of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ receptors and actions in vascular smooth muscle cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 41 (2), 112 - 114.
- Merke J, Milde P, Lewicka S, Hugel U, Klaus G, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, Rauterberg EW, Ritz E (1989) Identification and regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor activity and biosynthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Studies in cultured bovine aortic endothelial cells and human dermal capillaries. *J Clin Invest* 83 (6), 1903 - 1915.
- Miller SC, Halloran BP, DeLuca HF, Jee WS (1983) Studies on the role of vitamin D in early skeletal development, mineralization, and growth in rats. *Calcif Tissue Int* 35 (4-5), 455 - 460.
- Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, Van G, Kaufman S, Kostenuik PJ, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS (2000) Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med* 192 (4), 463 - 474.
- Mithal A, Wahl DA, Bonjour J, Burckhardt P, Dawson-Hughes B, Eisman JA, El-Hajj Fuleihan G, Josse RG, Lips P, Morales-Torres J (2009) Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporos Int* 20 (11), 1807 - 1820.
- Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL (2001) Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med* 31 (4), 509 - 519.
- Moe SM, Chen NX (2004) Pathophysiology of vascular calcification in chronic kidney disease. *Circ Res* 95 (6), 560 - 567.
- Moe SM, Duan D, Doehle BP, O'Neill KD, Chen NX (2003) Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney Int* 63 (3), 1003 - 1011.
- Mohler ER3, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG, Kaplan FS (2001) Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation* 103 (11), 1522 - 1528.
- Molinari C, Uberti F, Grossini E, Vacca G, Carda S, Invernizzi M, Cisari C (2011) 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol induces nitric oxide production in cultured endothelial cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 27 (6), 661 - 668.
- Morelli S, Boland AR de, Boland RL (1993) Generation of inositol phosphates, diacylglycerol and calcium fluxes in myoblasts treated with 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochem J* 289 (Pt 3), 675 - 679.
- Mori K, Shioi A, Jono S, Nishizawa Y, Morii H (1999) Dexamethasone enhances In vitro vascular calcification by promoting osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19 (9), 2112 - 2118.
- Morony S, Tintut Y, Zhang Z, Cattley RC, Van G, Dwyer D, Stolina M, Kostenuik PJ, Demer LL (2008) Osteoprotegerin inhibits vascular calcification without affecting atherosclerosis in *ldl(-/-)* mice. *Circulation* 117 (3), 411 - 420.
- Motiwala SR, Wang TJ (2012) Vitamin D and cardiovascular risk. *Curr Hypertens Rep* 14 (3), 209 - 218.
- Moyad MA (2009) Vitamin D: a rapid review. *Dermatol Nurs* 21 (1), 25-30, 55.
- Musgrave DS, Bosch P, Ghivizzani S, Robbins PD, Evans CH, Huard J (1999) Adenovirus-mediated direct gene therapy with bone morphogenetic protein-2 produces bone. *Bone* 24 (6), 541 - 547.

- Nadra I, Mason JC, Philippidis P, Florey O, Smythe CDW, McCarthy GM, Landis RC, Haskard DO (2005) Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: a vicious cycle of inflammation and arterial calcification? *Circ Res* 96 (12), 1248 - 1256.
- Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF, JR, Gimbrone MA, JR (1994) Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 94 (2), 885 - 891.
- Nagpal S, Na S, Rathnachalam R (2005) Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev* 26 (5), 662 - 687.
- Nakamura S, Ishibashi-Ueda H, Niizuma S, Yoshihara F, Horio T, Kawano Y (2009) Coronary calcification in patients with chronic kidney disease and coronary artery disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 4 (12), 1892 - 1900.
- Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R (1994) ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 14 (1), 133 - 140.
- National Research Council (NRC), Committee on Animal Nutrition (1995) Nutrient Requirements of Laboratory Animals. Washington, D.C.: *National Academy Press*. pp 80–102.
- Naves-Diaz M, Cabezas-Rodriguez I, Barrio-Vazquez S, Fernandez E, Diaz-Lopez JB, Cannata-Andia JB (2012) Low calcidiol levels and risk of progression of aortic calcification. *Osteoporos Int* 23 (3), 1177 - 1182.
- Need AG, Morris HA, Horowitz M, Nordin C (1993) Effects of skin thickness, age, body fat, and sunlight on serum 25-hydroxyvitamin D. *Am J Clin Nutr* 58 (6), 882 - 885.
- Newberry EP, Latifi T, Towler DA (1998) Reciprocal regulation of osteocalcin transcription by the homeodomain proteins Msx2 and Dlx5. *Biochemistry* 37 (46), 16360 - 16368.
- New SEP, Aikawa E (2011) Cardiovascular calcification: an inflammatory disease. *Circ J* 75 (6), 1305 - 1313.
- New SEP, Goettsch C, Aikawa M, Marchini JF, Shibasaki M, Yabusaki K, Libby P, Shanahan CM, Croce K, Aikawa E (2013) Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques. *Circ Res* 113 (1), 72 - 77.
- Nimitphong H, Holick MF (2011) Vitamin D, neurocognitive functioning and immunocompetence. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14 (1), 7 - 14.
- Nitta K (2011) Vascular calcification in patients with chronic kidney disease. *Ther Apher Dial* 15 (6), 513 - 521.
- Norman AW, Bouillon R (2010) Vitamin D nutritional policy needs a vision for the future. *Exp Biol Med (Maywood)* 235 (9), 1034 - 1045.
- Oh J, Weng S, Felton SK, Bhandare S, Riek A, Butler B, Proctor BM, Petty M, Chen Z, Schechtman KB, Bernal-Mizrachi L, Bernal-Mizrachi C (2009) 1,25(OH)₂ vitamin d inhibits foam cell formation and suppresses macrophage cholesterol uptake in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 120 (8), 687 - 698.
- Ohtsuka S, Kakihana M, Watanabe H, Sugishita Y (1994) Chronically decreased aortic distensibility causes deterioration of coronary perfusion during increased left ventricular contraction. *J Am Coll Cardiol* 24 (5), 1406 - 1414.

- O'Neill WC (2006) Pyrophosphate, alkaline phosphatase, and vascular calcification. *Circ Res* 99 (2), e2.
- Pal SN, Rush C, Parr A, van Campenhout A, Golledge J (2010) Osteocalcin positive mononuclear cells are associated with the severity of aortic calcification. *Atherosclerosis* 210 (1), 88 - 93.
- Panizo S, Cardus A, Encinas M, Parisi E, Valcheva P, Lopez-Ongil S, Coll B, Fernandez E, Valdivielso JM (2009) RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circ Res* 104 (9), 1041 - 1048.
- Piedrahita JA, Zhang SH, Hagaman JR, Oliver PM, Maeda N (1992) Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (10), 4471 - 4475.
- Pilz S, Kienreich K, Tomaschitz A, Lerchbaum E, Meinitzer A, Marz W, Zittermann A, Dekker JM (2012) Vitamin D and cardiovascular disease: update and outlook. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 243, 83 - 91.
- Pilz S, Tomaschitz A (2010) Role of vitamin D in arterial hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 8 (11), 1599 - 1608.
- Pilz S, Tomaschitz A, Drechsler C, Dekker JM, Marz W (2010) Vitamin D deficiency and myocardial diseases. *Mol Nutr Food Res* 54 (8), 1103 - 1113.
- Pilz S, Tomaschitz A, Marz W, Drechsler C, Ritz E, Zittermann A, Cavalier E, Pieber TR, Lappe JM, Grant WB, Holick MF, Dekker JM (2011) Vitamin D, cardiovascular disease and mortality. *Clin Endocrinol (Oxf)* 75 (5), 575 - 584.
- Pilz S, Tomaschitz A, Ritz E, Pieber TR (2009) Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review. *Nat Rev Cardiol* 6 (10), 621 - 630.
- Pittas AG, Chung M, Trikalinos T, Mitri J, Brendel M, Patel K, Lichtenstein AH, Lau J, Balk EM (2010) Systematic review: Vitamin D and cardiometabolic outcomes. *Ann Intern Med* 152 (5), 307 - 314.
- Prentice A (2008) Vitamin D deficiency: a global perspective. *Nutr Rev* 66 (10 Suppl 2), S153-64.
- Price PA, Caputo JM, Williamson MK (2002a) Bone origin of the serum complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix Gla protein: biochemical evidence for the cancellous bone-remodeling compartment. *J Bone Miner Res* 17 (7), 1171 - 1179.
- Price PA, June HH, Buckley JR, Williamson MK (2002b) SB 242784, a selective inhibitor of the osteoclastic V-H+ATPase, inhibits arterial calcification in the rat. *Circ Res* 91 (6), 547 - 552.
- Priemel M, Domarus C von, Klatter TO, Kessler S, Schlie J, Meier S, Proksch N, Pastor F, Netter C, Streichert T, Püschel K, Amling M (2010) Bone mineralization defects and vitamin D deficiency: histomorphometric analysis of iliac crest bone biopsies and circulating 25-hydroxyvitamin D in 675 patients. *J. Bone Miner. Res.* 25 (2), 305 - 312.
- Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL (2000) Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res* 87 (11), 1055 - 1062.
- Rahman A, Hershey S, Ahmed S, Nibbelink K, Simpson RU (2007) Heart extracellular matrix gene expression profile in the vitamin D receptor knockout mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103 (3-5), 416 - 419.

- Rajamannan NM (2011) The Role of Lrp5/6 in Cardiac Valve Disease: Experimental Hypercholesterolemia in the ApoE^{-/-}/Lrp5^{-/-} Mice. *J Cell Biochem* 112 (10), 2987 - 2991.
- Rawadi G, Vayssiere B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S (2003) BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res* 18 (10), 1842 - 1853.
- Rebsamen MC, Sun J, Norman AW, Liao JK (2002) 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 induces vascular smooth muscle cell migration via activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Circ Res* 91 (1), 17 - 24.
- Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, Jahnen-Dechent W, Weissberg PL, Shanahan CM (2004) Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 15 (11), 2857 - 2867.
- Riek AE, Oh J, Bernal-Mizrachi C (2013) 1,25(OH)₂ vitamin D suppresses macrophage migration and reverses atherogenic cholesterol metabolism in type 2 diabetic patients. *J Steroid Biochem Mol Biol* 136, 309 - 312.
- Roman Vinas B, Ribas Barba L, Ngo J, Gurinovic M, Novakovic R, Cavelaars A, Groot LCPGM de, van't Veer P, Matthys C, Serra Majem L (2011) Projected prevalence of inadequate nutrient intakes in Europe. *Ann Nutr Metab* 59 (2-4), 84 - 95.
- Rosenfeld ME, Averill MM, Bennett BJ, Schwartz SM (2008) Progression and disruption of advanced atherosclerotic plaques in murine models. *Curr Drug Targets* 9 (3), 210 - 216.
- Rosenfeld ME, Polinsky P, Virmani R, Kauser K, Rubanyi G, Schwartz SM (2000) Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 (12), 2587 - 2592.
- Ross R (1999) Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 138 (5 Pt 2), S419-20.
- Ryoo H, Lee M, Kim Y (2006) Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene* 366 (1), 51 - 57.
- Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heaney S, Peters H, Tang Z, Maxson R, Maas R (2000) Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet* 24 (4), 391 - 395.
- Schleithoff SS, Zittermann A, Tenderich G, Berthold HK, Stehle P, Koerfer R (2006) Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr* 83 (4), 754 - 759.
- Schluesener HJ, Meyermann R (1995) Immunolocalization of BMP-6, a novel TGF-beta-related cytokine, in normal and atherosclerotic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 113 (2), 153 - 156.
- Schmidt N, Brandsch C, Kuhne H, Thiele A, Hirche F, Stangl GI (2012) Vitamin D receptor deficiency and low vitamin D diet stimulate aortic calcification and osteogenic key factor expression in mice. *PLoS One* 7 (4), e35316.

- Schnatz PF, Nudy M, O'Sullivan DM, Jiang X, Cline JM, Kaplan JR, Clarkson TB, Appt SE (2012) The quantification of vitamin D receptors in coronary arteries and their association with atherosclerosis. *Maturitas* 73 (2), 143 - 147.
- Schottker B, Ball D, Gellert C, Brenner H (2013) Serum 25-hydroxyvitamin D levels and overall mortality. A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Ageing Res Rev* 12 (2), 708 - 718.
- Scragg R, Sowers M, Bell C (2007) Serum 25-hydroxyvitamin D, ethnicity, and blood pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Hypertens* 20 (7), 713 - 719.
- Shanahan CM (2007) Inflammation ushers in calcification: a cycle of damage and protection? *Circulation* 116 (24), 2782 - 2785.
- Shanahan CM, Cary NR, Metcalfe JC, Weissberg PL (1994) High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 93 (6), 2393 - 2402.
- Shao J, Cheng S, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA (2003) Teriparatide (human parathyroid hormone (1-34)) inhibits osteogenic vascular calcification in diabetic low density lipoprotein receptor-deficient mice. *J Biol Chem* 278 (50), 50195 - 50202.
- Shao J, Cheng S, Pingsterhaus JM, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA (2005) Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J Clin Invest* 115 (5), 1210 - 1220.
- Shao J, Cheng S, Sadhu J, Towler DA (2010) Inflammation and the osteogenic regulation of vascular calcification: a review and perspective. *Hypertension* 55 (3), 579 - 592.
- Shea CM, Edgar CM, Einhorn TA, Gerstenfeld LC (2003) BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis. *J Cell Biochem* 90 (6), 1112 - 1127.
- Shin V, Zebboudj AF, Bostrom K (2004) Endothelial cells modulate osteogenesis in calcifying vascular cells. *J Vasc Res* 41 (2), 193 - 201.
- Shoben AB, Rudser KD, Boer IH de, Young B, Kestenbaum B (2008) Association of oral calcitriol with improved survival in nondialyzed CKD. *J Am Soc Nephrol* 19 (8), 1613 - 1619.
- Simpson RU, Hershey SH, Nibbelink KA (2007) Characterization of heart size and blood pressure in the vitamin D receptor knockout mouse. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 103 (3-5), 521 - 524.
- Sinha A, Cheetham TD, Pearce SHS (2012) Prevention and Treatment of Vitamin D Deficiency. *Calcif Tissue Int.*
- Slomski A (2011) IOM endorses vitamin D, calcium only for bone health, dispels deficiency claims. *JAMA* 305 (5), 453-4, 456.
- Snijder MB, Lips P, Seidell JC, Visser M, Deeg DJH, Dekker JM, van Dam RM (2007) Vitamin D status and parathyroid hormone levels in relation to blood pressure: a population-based study in older men and women. *J Intern Med* 261 (6), 558 - 565.
- Somjen D, Weisman Y, Kohen F, Gayer B, Limor R, Sharon O, Jaccard N, Knoll E, Stern N (2005) 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase is expressed in human vascular smooth muscle cells and is upregulated by parathyroid hormone and estrogenic compounds. *Circulation* 111 (13), 1666 - 1671.

- Speer MY, Giachelli CM (2004) Regulation of cardiovascular calcification. *Cardiovasc Pathol* 13 (2), 63 - 70.
- Spinale FG (2002) Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 90 (5), 520 - 530.
- Springer T, Cybulsky M (1996) Traffic signals on endothelium for leukocytes in health, inflammation, and atherosclerosis. *Philadelphia: Lippincott-Raven*, 511-538.
- Stary HC (1992) Composition and classification of human atherosclerotic lesions. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 421 (4), 277 - 290.
- Stary HC (2000) Natural history of calcium deposits in atherosclerosis progression and regression. *Z Kardiol* 89 Suppl 2, 28 - 35.
- Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, JR, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1995) A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15 (9), 1512 - 1531.
- Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, JR, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1994) A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb* 14 (5), 840 - 856.
- Stary, Herbert C. (1999): An atlas of atherosclerosis. Progression and regression. New York: Parthenon Pub. Group (The Encyclopedia of visual medicine series).
- Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM (2001) Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res* 89 (12), 1147 - 1154.
- Stenvinkel P, Alvestrand A (2002) Inflammation in end-stage renal disease: sources, consequences, and therapy. *Semin Dial* 15 (5), 329 - 337.
- Stompor T (2007) An overview of the pathophysiology of vascular calcification in chronic kidney disease. *Perit Dial Int* 27 Suppl 2, S215-22.
- Suo J, Ferrara DE, Sorescu D, Guldberg RE, Taylor WR, Giddens DP (2007) Hemodynamic shear stresses in mouse aortas: implications for atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27 (2), 346 - 351.
- Suzuki A, Ghayor C, Guicheux J, Magne D, Quillard S, Kakita A, Ono Y, Miura Y, Oiso Y, Itoh M, Caverzasio J (2006) Enhanced expression of the inorganic phosphate transporter Pit-1 is involved in BMP-2-induced matrix mineralization in osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 21 (5), 674 - 683.
- Szeto FL, Reardon CA, Yoon D, Wang Y, Wong KE, Chen Y, Kong J, Liu SQ, Thadhani R, Getz GS, Li YC (2012) Vitamin D receptor signaling inhibits atherosclerosis in mice. *Mol Endocrinol* 26 (7), 1091 - 1101.
- Takeda M, Yamashita T, Sasaki N, Nakajima K, Kita T, Shinohara M, Ishida T, Hirata K (2010) Oral administration of an active form of vitamin D3 (calcitriol) decreases atherosclerosis in mice by inducing regulatory T cells and immature dendritic cells with tolerogenic functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30 (12), 2495 - 2503.

- Taura S, Taura M, Kamio A, Kummerow FA (1979) Vitamin D-induced coronary atherosclerosis in normolipemic swine: comparison with human disease. *Tohoku J Exp Med* 129 (1), 9 - 16.
- Teupser D, Persky AD, Breslow JL (2003) Induction of atherosclerosis by low-fat, semisynthetic diets in LDL receptor-deficient C57BL/6J and FVB/NJ mice: comparison of lesions of the aortic root, brachiocephalic artery, and whole aorta (en face measurement). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 (10), 1907 - 1913.
- Tintut Y, Demer LL (2001) Recent advances in multifactorial regulation of vascular calcification. *Curr Opin Lipidol* 12 (5), 555 - 560.
- Tintut Y, Parhami F, Bostrom K, Jackson SM, Demer LL (1998) cAMP stimulates osteoblast-like differentiation of calcifying vascular cells. Potential signaling pathway for vascular calcification. *J Biol Chem* 273 (13), 7547 - 7553.
- Tintut Y, Patel J, Parhami F, Demer LL (2000) Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation* 102 (21), 2636 - 2642.
- Tomaschitz A, Fahrleitner-Pammer A, Pieske B, Verheyen N, Amrein K, Ritz E, Kienreich K, Horina JH, Schmidt A, Kraigher-Krainer E, Colantonio C, Meinitzer A, Pilz S (2012a) Effect of eplerenone on parathyroid hormone levels in patients with primary hyperparathyroidism: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *BMC Endocr Disord* 12, 19.
- Tomaschitz A, Pilz S, Ritz E, Grammer T, Drechsler C, Boehm BO, Marz W (2010) Independent association between 1,25-dihydroxyvitamin D, 25-hydroxyvitamin D and the renin-angiotensin system: The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. *Clin Chim Acta* 411 (17-18), 1354 - 1360.
- Tomaschitz A, Ritz E, Pieske B, Fahrleitner-Pammer A, Kienreich K, Horina JH, Drechsler C, März W, Ofner M, Pieber TR, Pilz S (2012b) Aldosterone and parathyroid hormone: a precarious couple for cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* 94 (1), 10 - 19.
- Towler DA, Bidder M, Latifi T, Coleman T, Semenkovich CF (1998) Diet-induced diabetes activates an osteogenic gene regulatory program in the aortas of low density lipoprotein receptor-deficient mice. *J Biol Chem* 273 (46), 30427 - 30434.
- Underwood JL, DeLuca HF (1984) Vitamin D is not directly necessary for bone growth and mineralization. *Am J Physiol* 246 (6 Pt 1), E493-8.
- Vaidya A, Forman JP, Hopkins PN, Seely EW, Williams JS (2011) 25-Hydroxyvitamin D is associated with plasma renin activity and the pressor response to dietary sodium intake in Caucasians. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 12 (3), 311 - 319.
- Valdivielso JM (2009) The physiology of vitamin D receptor activation. *Contrib Nephrol* 163, 206 - 212.
- van Popele NM, Mattace-Raso FUS, Vliegenthart R, Grobbee DE, Asmar R, van der Kuip DAM, Hofman A, Feijter PJ de, Oudkerk M, Witteman JCM (2006) Aortic stiffness is associated with atherosclerosis of the coronary arteries in older adults: the Rotterdam Study. *J Hypertens* 24 (12), 2371 - 2376.
- VanderLaan PA, Reardon CA, Getz GS (2004) Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (1), 12 - 22.

- Vanoirbeek E, Krishnan A, Eelen G, Verlinden L, Bouillon R, Feldman D, Verstuyf A (2011) The anti-cancer and anti-inflammatory actions of 1,25(OH)₂D₃. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 25 (4), 593 - 604.
- Vattikuti R, Towler DA (2004) Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286 (5), E686-96.
- Vengrenyuk Y, Carlier S, Xanthos S, Cardoso L, Ganatos P, Virmani R, Einav S, Gilchrist L, Weinbaum S (2006) A hypothesis for vulnerable plaque rupture due to stress-induced debonding around cellular microcalcifications in thin fibrous caps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (40), 14678 - 14683.
- Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD (2006) Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol* 47 (8 Suppl), C13-8.
- Virmani R, Burke AP, Kolodgie FD, Farb A (2003) Pathology of the thin-cap fibroatheroma: a type of vulnerable plaque. *J Interv Cardiol* 16 (3), 267 - 272.
- Wallin R, Cain D, Hutson SM, Sane DC, Loeser R (2000) Modulation of the binding of matrix Gla protein (MGP) to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). *Thromb Haemost* 84 (6), 1039 - 1044.
- Wang L, Song Y, Manson JE, Pilz S, Marz W, Michaelsson K, Lundqvist A, Jassal SK, Barrett-Connor E, Zhang C, Eaton CB, May HT, Anderson JL, Sesso HD (2012) Circulating 25-hydroxy-vitamin D and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis of prospective studies. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 5 (6), 819 - 829.
- Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, Benjamin EJ, D'Agostino RB, Wolf M, Vasan RS (2008) Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 117 (4), 503 - 511.
- Wasilewski J, Mirota K, Wilczek K, Glowacki J, Polonski L (2012) Calcific aortic valve damage as a risk factor for cardiovascular events. *Pol J Radiol* 77 (4), 30 - 34.
- Watanabe H, Ohtsuka S, Kakihana M, Sugishita Y (1992) Decreased aortic compliance aggravates subendocardial ischaemia in dogs with stenosed coronary artery. *Cardiovasc Res* 26 (12), 1212 - 1218.
- Watson KE, Abrolat ML, Malone LL, Hoeg JM, Doherty T, Detrano R, Demer LL (1997) Active serum vitamin D levels are inversely correlated with coronary calcification. *Circulation* 96 (6), 1755 - 1760.
- Wayhs R, Zelinger A, Raggi P (2002) High coronary artery calcium scores pose an extremely elevated risk for hard events. *J Am Coll Cardiol* 39 (2), 225 - 230.
- Weiss RM, Lund DD, Chu Y, Brooks RM, Zimmerman KA, El Accaoui R, Davis MK, Hajj GP, Zimmerman MB, Heistad DD (2013) Osteoprotegerin inhibits aortic valve calcification and preserves valve function in hypercholesterolemic mice. *PLoS One* 8 (6), e65201.
- Weng S, Sprague JE, Oh J, Riek AE, Chin K, Garcia M, Bernal-Mizrachi C (2013) Vitamin D deficiency induces high blood pressure and accelerates atherosclerosis in mice. *PLoS One* 8 (1), e54625.
- Willette RN, Gu JL, Lysko PG, Anderson KM, Minehart H, Yue T (1999) BMP-2 gene expression and effects on human vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res* 36 (2), 120 - 125.

- Williams H, Johnson JL, Carson KGS, Jackson CL (2002) Characteristics of intact and ruptured atherosclerotic plaques in brachiocephalic arteries of apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 (5), 788 - 792.
- Witham MD, Nadir MA, Struthers AD (2009) Effect of vitamin D on blood pressure: a systematic review and meta-analysis. *J Hypertens* 27 (10), 1948 - 1954.
- Wolden-Kirk H, Overbergh L, Christesen HT, Brusgaard K, Mathieu C (2011) Vitamin D and diabetes: its importance for beta cell and immune function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 347 (1-2), 106 - 120.
- Wolf M, Betancourt J, Chang Y, Shah A, Teng M, Tamez H, Gutierrez O, Camargo CA, JR, Melamed M, Norris K, Stampfer MJ, Powe NR, Thadhani R (2008) Impact of activated vitamin D and race on survival among hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 19 (7), 1379 - 1388.
- Wu SH, Ho SC, Zhong L (2010) Effects of vitamin D supplementation on blood pressure. *South Med J* 103 (8), 729 - 737.
- Xiang W, Kong J, Chen S, Cao L, Qiao G, Zheng W, Liu W, Li X, Gardner DG, Li YC (2005) Cardiac hypertrophy in vitamin D receptor knockout mice: role of the systemic and cardiac renin-angiotensin systems. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288 (1), E125-32.
- Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, Wozney JM, Rosen V, Wang EA, Kahn AJ, Suda T, Yoshiki S (1991) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol* 113 (3), 681 - 687.
- Yano K, Tsuda E, Washida N, Kobayashi F, Goto M, Harada A, Ikeda K, Higashio K, Yamada Y (1999) Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor: increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 14 (4), 518 - 527.
- Yao Y, Bennett BJ, Wang X, Rosenfeld ME, Giachelli C, Lusic AJ, Bostrom KI (2010) Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification. *Circ Res* 107 (4), 485 - 494.
- Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, Takeda S, Sekine K, Yoshihara Y, Kawakami T, Arioka K, Sato H, Uchiyama Y, Masushige S, Fukamizu A, Matsumoto T, Kato S (1997) Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat Genet* 16 (4), 391 - 396.
- Young KA, Snell-Bergeon JK, Naik RG, Hokanson JE, Tarullo D, Gottlieb PA, Garg SK, Rewers M (2011) Vitamin D deficiency and coronary artery calcification in subjects with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 34 (2), 454 - 458.
- Yu Z, Seya K, Daitoku K, Motomura S, Fukuda I, Furukawa K (2011) Tumor necrosis factor-alpha accelerates the calcification of human aortic valve interstitial cells obtained from patients with calcific aortic valve stenosis via the BMP2-Dlx5 pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 337 (1), 16 - 23.
- Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, Vries-Van der Weij J de, van der Hoorn J, Princen HM, Kooistra T (2007) Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27 (8), 1706 - 1721.

- Zanello LP, Norman AW (1996) $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D₃-mediated stimulation of outward anionic currents in osteoblast-like ROS 17/2.8 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 225 (2), 551 - 556.
- Zebboudj AF, Imura M, Bostrom K (2002) Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 277 (6), 4388 - 4394.
- Zemplenyi T, Mrhova O (1965) Vascular enzyme activity changes accompanying the induction of experimental atherosclerosis. 2. Rats fed excess vitamin D. *J Atheroscler Res* 5 (6), 548 - 555.
- Zhang L, Zalewski A, Liu Y, Mazurek T, Cowan S, Martin JL, Hofmann SM, Vlassara H, Shi Y (2003) Diabetes-induced oxidative stress and low-grade inflammation in porcine coronary arteries. *Circulation* 108 (4), 472 - 478.
- Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N (1992) Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258 (5081), 468 - 471.
- Zittermann A (2006) Vitamin D and disease prevention with special reference to cardiovascular disease. *Prog Biophys Mol Biol* 92 (1), 39 - 48.
- Zittermann A (2010a) The estimated benefits of vitamin D for Germany. *Mol Nutr Food Res* 54 (8), 1164 - 1171.
- Zittermann, A (2010b): Vitamin D in der Präventivmedizin. 1. Aufl. Bremen, London, Boston, Mass: UNI-MED-Verl (UNI-MED science).
- Zittermann A, Iodice S, Pilz S, Grant WB, Bagnardi V, Gandini S (2012) Vitamin D deficiency and mortality risk in the general population: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Am J Clin Nutr* 95 (1), 91 - 100.
- Zittermann A, Koerfer R (2008) Vitamin D in the prevention and treatment of coronary heart disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11 (6), 752 - 757.
- Zittermann A, Kuhn J, Dreier J, Knabbe C, Gummert JF, Borgermann J (2013) Vitamin D status and the risk of major adverse cardiac and cerebrovascular events in cardiac surgery. *Eur Heart J* 34 (18), 1358 - 1364.
- Zittermann A, Schleithoff SS, Frisch S, Gotting C, Kuhn J, Koertke H, Kleesiek K, Tenderich G, Koerfer R (2009) Circulating calcitriol concentrations and total mortality. *Clin Chem* 55 (6), 1163 - 1170.
- Zittermann A, Schleithoff SS, Koerfer R (2007) Vitamin D and vascular calcification. *Curr Opin Lipidol* 18 (1), 41 - 46.

Lebenslauf

Name: Schmidt
 Vorname: Nadine
 Geburtsdatum: 31.05.1985
 Geburtsort: Sangerhausen
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig

Schulbildung: 1991/1995 Grundschule, Roßla
 1995/1997 Sekundarschule, Roßla
 1997/2004 Goethe-Gymnasium, Kelbra (Kyffhäuser)
 Abitur 2004

Akademische Ausbildung: 2004/2009 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
 Studium der Ernährungswissenschaften

Diplomarbeit April 2009 – Dezember 2009
*„Die Wirkungen von Lupinenprotein-
 hydrolysaten auf den Lipidstoffwechsel in
 humanen Leberhepatomazellen“*
 Diplom 2009

2010/2013 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 Wissenschaftliche Mitarbeiterin/
 Promotionsstudentin am Lehrstuhl für
 Humanernährung des Instituts für Agrar- und
 Ernährungswissenschaften

Halle (Saale), 18.07.2014

Ort, Abgabedatum



Nadine Schmidt

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit zum Thema „Experimentelle Studien zur Bedeutung von Vitamin D für das vaskuläre System“ selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Es wurden bisher keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen. Die Arbeit wurde bislang in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde/Fakultät vorgelegt.

Halle (Saale), 18.07.2014

Ort, Abgabedatum



Nadine Schmidt

Erklärung über bestehende Vorstrafen und anhängige Ermittlungsverfahren

Hiermit erkläre ich, dass ich weder vorbestraft bin noch dass gegen mich Ermittlungsverfahren anhängig sind.

Halle (Saale), 18.07.2014

Ort, Abgabedatum



Nadine Schmidt

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Gabriele I. Stangl gilt mein aufrichtiger Dank für die Vergabe des interessanten Themas, die sehr gute Betreuung während meiner gesamten Doktorandenzeit, die konstruktiven Gespräche und Hilfestellungen, die angenehme Zusammenarbeit beim Schreiben der Veröffentlichungen sowie die Anregungen zur Dissertationsschrift.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Corinna Brandsch für die sehr gute Betreuung, die vielfältige Hilfestellung bei den großen und kleine Laborproblemen, den konstruktiven Tipps und ihre stetige Hilfsbereitschaft bei den „Probenahmen“.

Herrn Dr. Rene Schmidt und Frau Elke Gebauer vom Institut für Tierzucht der Martin-Luther-Universität gilt mein herzlicher Dank für die überaus engagierte Hilfe beim Erlernen der Anfertigung histologischer Schnitte sowie der Färbung von Präparaten.

Herrn Dr. Nico Markus vom Institut für Tierernährung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich für die Hilfe bei der fachlichen Anleitung der ICP-OES-Analysen.

Herrn Dr. Martin Schicht vom Institut für Anatomie, Lehrstuhl II der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg danke ich für die histologische Probenbearbeitung der Mäusefemura, seine Hilfe bei der Quantifizierung sowie seinen vielen Tipps.

Ferner gilt mein herzlicher Dank allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Ernährungswissenschaften, insbesondere den technischen Kräften Frau Ingeborg Kaiser, Frau Christine Leibelt und Frau Heike Giese sowie allen Doktoranden bei der bereitwilligen Mitarbeit bei der Probenentnahme und Probenaufarbeitung.

Ein spezieller Dank gilt Frau Juliane Radtke und Frau Julia Kühn für die schöne, konstruktive und gemeinsame Doktorandenzeit mit vielen Motivationsschüben sowie ihre stetige Hilfsbereitschaft. Danke für die tolle Zeit im unserem Büro!

Außerdem danke ich dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die finanzielle Unterstützung des Forschungsprojektes.

Abschließend möchte ich mich bei meiner gesamten Familie, meinen Freunden und besonders bei meinen Eltern und meinem Verlobten bedanken, die mich während der ganzen Zeit unterstützt, motiviert und aufgemuntert haben. Danke, ohne euch wäre das nie so toll gelaufen!