

Aus der Abteilung für Nephrologie und Hypertensiologie  
(Leiterin Univ. - Prof. Dr. med. Sylvia Stracke)  
der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A  
(Direktor Univ.- Prof. Dr. Markus M. Lerch)  
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

**Der *in vitro* Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die Calcium- und Phosphat-induzierte Kalzifikation  
von humanen vaskulären glatten Muskelzellen unter Betrachtung der intrazellulären  
SAPK/JNK Signalkaskade**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin  
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2021

vorgelegt von:  
Philipp Gregor Albert  
geb. am: 03.07.1991  
in: Donaueschingen

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Sylvia Stracke

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Frieder Keller

Ort, Raum: Videokonferenz

Tag der Disputation: 11.02.2022

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	V
Tabellenverzeichnis .....	VI
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
1 Einleitung .....	1
1.1 Kardiovaskuläres System .....	1
1.2 Gefäßpathologie .....	2
1.3 Chronische Nierenerkrankung .....	3
1.4 CKD-MBD und kardiovaskuläres Risiko .....	6
1.5 Transdifferenzierung und Apoptose bei vaskulärer Kalzifikation .....	6
1.6 TGF- $\beta$ Signalkaskade .....	8
1.7 Einfluss von TGF- $\beta$ bei vaskulärer Kalzifikation .....	11
1.8 SAPK/JNK und dessen Einfluss auf vaskuläre Kalzifikation .....	12
1.9 Fragestellung und Ziel der Arbeit .....	13
2 Material und Methoden .....	14
2.1 Materialien .....	14
2.1.1 Puffer und Lösungen .....	14
2.1.2 Medien .....	14
2.1.3 Enzyme, Chemikalien und Antibiotika .....	15
2.1.4 Oligonukleotide .....	16
2.1.5 Kits .....	16
2.1.6 Software und Datenbanken .....	17
2.1.7 Instrumente .....	17
2.2 Methoden .....	19
2.2.1 Zellkultur .....	19
2.2.2 Kalzifikationsassay .....	20
2.2.3 Visualisierung mittels von Kossa Färbung .....	20
2.2.4 O-Cresolphthalein-Komplexon-Methode zur Quantifizierung .....	21
2.2.5 Proteinbestimmung mittels BCA Assay .....	21
2.2.6 Proteinanalyse mittels Western Blot .....	22
2.2.7 RNA Isolation und cDNA Synthese .....	24
2.2.8 Primerdesign, Polymerasekettenreaktion und DNA Gelelektrophorese .....	24

2.2.8.1 Primerdesign.....	24
2.2.8.2 Polymerasekettenreaktion .....	25
2.2.8.3 DNA Gelelektrophorese.....	25
2.2.9 Apoptoseassay .....	26
2.2.10 Statistische Analyse.....	26
3 Ergebnisse.....	28
3.1 Kalzifikationsassay .....	28
3.2 Konzentrationsabhängiger Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die Kalzifikation .....	29
3.3 Inhibition von SAPK/JNK begünstigt vaskuläre Kalzifikation TGF- $\beta$ 1-exponierter hVSMCs .....	31
3.4 Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die Phosphorylierung von SAPK/JNK in hVSMCs .....	32
3.5 TGF- $\beta$ 1 reduziert die Apoptose in kalzifizierenden hVSMCs .....	34
3.6 Einfluss vaskulärer Kalzifikation auf die osteogene Transdifferenzierung in hVSMCs .....	36
4 Diskussion .....	38
4.1 Auswahl des Modells der vaskulären Kalzifikation.....	39
4.2 Vaskuläre Kalzifikation der hVSMCs durch Calcium-Phosphat Exposition .....	41
4.3 Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die vaskuläre Kalzifikation.....	42
4.4 Interaktion zwischen TGF- $\beta$ 1 und MAPK Signalwegen.....	43
4.5 Vaskuläre Kalzifikation durch Apoptose .....	46
4.6 Vaskuläre Kalzifikation durch osteogene Transdifferenzierung .....	47
4.7 Fazit.....	49
5 Zusammenfassung.....	50
6 Literaturverzeichnis .....	51

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Folgen einer CKD-MBD auf die Kalzifikation von VSMCs.....	8
Abbildung 2: Darstellung intrazellulärer Signalkaskaden von TGF- $\beta$ .....	11
Abbildung 3: Kalzifikationsassay behandelter hVSMCs über 5, 7 und 9 Tage. ....	28
Abbildung 4: Konzentrationsabhängiger Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf KM-exponierte hVSMCs. ....	30
Abbildung 5: Einfluss von SAPK/JNK Inhibition auf die Kalzifikation TGF- $\beta$ 1-exponierter hVSMCs.....	32
Abbildung 6: Phosphorylierte- und gesamte SAPK/JNK Proteinlevel exponierter hVSMCs. ....	33
Abbildung 7: Apoptoseassay behandelter hVSMCs. ....	36
Abbildung 8: Transdifferenzierung behandelter hVSMCs hin zu osteoblastären Zellen. ...	37

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Gelistete Puffer und Lösungen .....	14
Tabelle 2: Gelistete Medien .....	14
Tabelle 3: Gelistete Enzyme, Chemikalien und Antibiotika.....	15
Tabelle 4: Primersequenzen für PCR und q-RT-PCR.....	16
Tabelle 5: Gelistete Kits .....	16
Tabelle 6: Gelistete Software und Datenbanken .....	17
Tabelle 7: Gelistete Instrumente .....	17
Tabelle 8: Standard PCR Pipettierschema für die DNA Analyse.....	25
Tabelle 9: Standard PCR Programm für die DNA Analyse .....	25

## Abkürzungsverzeichnis

3´	3 prime
5´	5 prime
BLAST	basic local alignment search tool
BMP	Bone Morphogenetic Proteins
bp	Basenpaar(e)
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovine Serum Albumin
Caspase	cysteiny-l-aspartate specific protease
CaSR	Calcium-Sensing Rezeptor
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
CKD – MBD	chronic kidney disease – mineral bone disorder
Co-SMAD	common-mediator Smad Protein
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	desoxynucleoside triphosphate
ERK	extracellular signal-regulated kinases
EZM	ExtrazellulärmatrIX
FGF-23	fibroblast growth factor 23
fwd	forward
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDF	Growth and Differentiation Factor
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GRB	Growth factor receptor-bound protein
h	hour(s)
hVSMC	human Vascular Smooth Muscle Cell
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaar(e)
KM	Kalzifikationsmedium
l	Liter

LLC	large latent complex
LM	Leermedium
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mg	Milligramm
min	Minute(n)
Mio	Million
mM	millimolar
MMS	Mönckeberg-Mediasklerose
MSX2	Homeobox protein MSX-2
ns	nicht signifikant
nt	Nukleotid(e)
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PiT	Phosphate Transporter
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTH	Parathormon
RANKL	Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand
rev	reverse
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
rpm	revolutions per minute
R-Smad	receptor-regulated Smad Protein
RT	Raumtemperatur
RUNX	Runt-related transcription factor
SAPK	stress-activated protein-kinase
SARA	Smad Anchor for Receptor Activation
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
SMAD	Small Mothers Against Decapentaplegic
SMGS	Smooth muscle growth supplement
SH	Src-homology
sHPT	sekundären Hyperparathyreoidismus



SOS	Son of Sevenless
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung, Tween 20
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor beta
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cell
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromol

## **1 Einleitung**

### **1.1 Kardiovaskuläres System**

Das Herz pumpt pro Minute etwa 6 Liter (l) Blut durch das Gefäßsystem des menschlichen Körpers. Das Blut, welches neben den zellulären Bestandteilen auch Hormone, Gase, Wärme, Nährstoffe und Stoffwechselprodukte transportiert, ist Basis aller im menschlichen Körper ablaufenden Funktionen [1]. Das Gefäßsystem, welches in einen venösen und arteriellen, sowie in einen großen Körper- und einen kleinen Lungenkreislauf unterteilt werden kann, hat aufgrund sich ständig ändernder externer Einflüsse zahlreiche Aufgaben, die es zu bewältigen gilt. Obwohl das Gefäßsystem in allen Kompartimenten des Körpers eine ähnliche Grundstruktur aufweist, variiert es je nach anatomischer Lokalisation enorm. Grundsätzlich sind Venen, die Blut zum Herzen hinführen und Arterien, welche das Blut vom Herzen wegtransportieren, aus einem dreischichtigen Gefüge aufgebaut. Diese drei Schichten werden von innen nach außen durch die Tunica intima (= Intima), Tunica media (= Media) und Tunica externa (= Adventitia) repräsentiert. Die Intima, welche wiederum aus Endothel sowie aus einer subendothelialen Schicht besteht, steht in direktem Kontakt mit dem zirkulierenden Blutstrom. Die einschichtig, platten Endothelzellen, die einer Basallamina aufliegen, befähigen die Arterien zu Interaktionen mit dem Blut, wie etwa Regulation bei Leukozytenmigration, als Diffusionsbarriere sowie als Baustein in der Blutgerinnung. Die subendotheliale Schicht, die überwiegend aus Extrazellulärmatrix (EZM) und nur aus wenigen Zellen besteht, liegt der gefensterten Membrana elastica interna auf, die eine Diffusion von Stoffen ermöglicht. Als voluminöseste Schicht großer Arterien steht die Media, welche neben vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC, vascular smooth muscle cells) auch aus EZM besteht. Diese vaskulären glatten Muskelzellen, welche teilweise bis in die subendotheliale Schicht migrieren, sind an der Produktion der EZM beteiligt. Miteinander verkoppelt werden die VSMCs der Media durch porenbildende Proteinkomplexe, den Gap junctions. Als Übergang, vorwiegend größerer arterieller Gefäße, zur Adventitia dient die Membrana elastica externa. Die Adventitia, welche aus Bindegewebe, genauer Kollagen, Proteoglykanen, Fibroblasten und elastischen Fasern besteht, bettet die Arterie in ihrer Umgebung ein. Arterien werden je nach anatomischer Lage und entsprechendem Anforderungsprofil sowohl in herznahe Arterien vom elastischen Typ und in peripher gelegene Arterien vom muskulären Typ eingeteilt. Je nach Lokalisation kommt es zu unterschiedlicher Dicke der Wandschichten. In großen

Gefäßen wie etwa der Aorta ist die Media mit den hier befindlichen VSMCs besonders stark ausgeprägt, wohingegen sie in den kleinsten Gefäßen wie den Arteriolen meist nur aus einer einzelnen Schicht vaskulärer glatter Muskelzellen besteht [2, 3].

## **1.2 Gefäßpathologie**

Verschiedene pathophysiologische Prozesse können zu Veränderungen der Gefäßwände führen. Ätiologisch können maligne Neoplasien, wie etwa dem Hämangiosarkom, autoimmunologische Erkrankungen oder inflammatorische Gefäßstenosierungen zugrunde liegen [4, 5]. Rudolf Virchow fand bereits Ende des 19. Jahrhunderts heraus, dass für einen physiologischen Kreislauf nicht nur die Zusammensetzung des Blutes und dessen regelhafte Zirkulation, sondern auch eine intakte Gefäßwand von Nöten ist. Eine Dysbalance einer dieser drei Faktoren kann dramatische Konsequenzen zur Folge haben [6].

Als bekannteste und verbreitetste Pathologie gilt die Arteriosklerose, welche umgangssprachlich häufig Gefäßverkalkung genannt wird. Bei der Arteriosklerose, welche den Überbegriff mehrerer Formen, wie etwa der Atherosklerose oder der Mediakalzifikation darstellt, handelt es sich per Definition um eine bindegewebsbedingte Verhärtung arterieller Gefäße. Die häufigste Form der Arteriosklerose ist die Atherosklerose, welche ihre Prädilektionsstelle vor allem in großen elastischen und mittelgroßen muskulären Arterien aufweist. Hier handelt es sich primär um inflammatorische Prozesse der Intima, die als Folge eines Endothelschadens zu einer progressiven Ablagerung von im Blut zirkulierenden Lipiden, wie LDL-Cholesterin und Schaumzellen in der subendothelialen Schicht führt [2]. Diese auch als atheromatöse Plaques bezeichneten Ablagerungen, zusammen mit aus der Media einwandernden und EZM produzierenden VSMCs, führen schließlich zu einer Stenosierung, zu einer Plaqueruptur und letztendlich Ischämie des betreffenden Gewebes. Folgen davon können ischämische Infarktgeschehen, wie sie bei Myokardinfarkten und Schlaganfällen vorkommen, sein. Mit mindestens genauso dramatischen Folgen stellt die Mediaverkalkung, auch Mönckeberg-Mediasklerose (MMS) eine zweite Pathogenese der Arteriosklerose dar [7]. Diese von J.G. Mönckeberg im Jahre 1903 erstmals beschriebene Mediasklerose begrenzt sich, im Gegensatz zur fast ausschließlich intimalen Atherosklerose, vor allem auf die Tunica media der Arterien [8]. Für die Entstehung von

MMS sind in erster Linie Primärerkrankungen wie Diabetes mellitus, chronische Nierenerkrankungen aber auch andere metabolische Erkrankungen verantwortlich. Durch Akkumulation medialer Verkalkungsherde und damit einhergehendem Untergang kontraktionsfähiger VSMCs, kommt es zur Volumenreduktion der Media innerhalb arterieller Gefäße und zu einer Zunahme der Gefäßsteifigkeit [9].

### **1.3 Chronische Nierenerkrankung**

Die Niere, eines der am stärksten durchbluteten Organe des menschlichen Körpers, ist neben der Regulierung des Hormon- und Wasserhaushalts auch für die Aufrechterhaltung des Elektrolythaushalts und somit der Homöostase verantwortlich. Durch Erkrankungen wie Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Autoimmunerkrankungen oder aber hereditäre Pathogenesen (z.B. Zystennieren) kommt es zu strukturellen Veränderungen der funktionellen Einheit der Nieren, den sog. Nephronen. Eine Niere hat ca. 1 Millionen Nephrone. Ein Nephron besteht aus einer Filtereinheit, dem Glomerulus und dem harnableitenden Tubulusapparat. Die Glomeruli sind vorwiegend in kortikalen Anteilen der Niere lokalisiert. Über die afferente Arteriole gelangt das Blut in den Glomerulus und somit zur Filtration. Die Arteriolen sind mit gefenstertem Endothel und glomerulärer Basalmembran ausgekleidet. Von dort wird nach Filtration und Produktion von Primärharn das Blut über efferente Arteriolen in die Vasa recta geleitet, die einen Anteil am Gegenstromprinzip einnehmen. Dieses Prinzip ist durch effizienten Stoffaustausch essentiell für die Harnkonzentrierung. In der Bowman-Kapsel, zwischen viszeralem und parietalem Blatt, wird der Primärharn aufgenommen und ins Tubulussystem weitergeleitet. Dieses System wird in die fünf Abschnitte, proximaler Tubulus mit Pars convoluta und Pars recta, Intermediärtubulus mit Pars descendens und Pars ascendens, distaler Tubulus mit Pars recta und Pars convoluta, dem Verbindungstubulus sowie dem Sammelrohr unterteilt. Schließlich verbleiben von 180 Litern Primärharn täglich ca. 1.5 Liter Sekundärharn, die über ableitende Harnwege ausgeschieden werden. Eine wichtige, vorwiegend in proximalen Tubuli stattfindende Aufgabe stellt die Hydroxylierung des 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub> durch die 1 $\alpha$ -Hydroxylase zum biologisch aktiven 1,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (= Calcitriol) dar [10, 11].

Funktionelle (Hyperfiltration) und strukturelle (Hypertrophie, Atrophie, Fibrose) Veränderungen können zum Funktionsverlust und somit zu einer Nierenerkrankung

führen. Je nach Verlauf wird diese in eine akute oder chronische Nierenerkrankung (CKD, chronic kidney disease) eingeteilt [12, 13]. Grundsätzlich wird die über einen Zeitraum von größer als 3 Monaten andauernde Schädigung von funktionsfähigem Nierengewebe mit einer eingeschränkten glomerulären Filtrationsrate (GFR) als CKD deklariert [14]. Eine neben der GFR auch die Albuminurie miteinbeziehende Graduierung kategorisiert die CKD in die Stadien 1 bis 5, die schließlich Auswirkungen auf die Therapie aber auch die Gesamtmortalität nehmen. Im Stadium G1 liegt die GFR noch bei  $\geq 90$  ml/min/1.73 m<sup>2</sup>, wohingegen sie im Stadium G5 auf  $< 15$  ml/min/1.73 m<sup>2</sup> reduziert ist. Bei der Albuminurie erstreckt sich die Einteilung mit steigender Albuminausscheidung zwischen den Stadien A1 - A3. Ätiologisch führend für die Entwicklung einer CKD sind vor allem hypertensive Nephropathien, diabetische Nephropathien, primäre Glomerulonephritiden und Systemerkrankungen [12]. Bei einer im Jahr 2016 veröffentlichten epidemiologischen Studie war das Ziel die Prävalenz von Nierenerkrankungen, mit Auswirkungen auf eine reduzierte GFR ( $< 60$  ml/min/1.73m<sup>2</sup>), in Deutschland zu erfassen. Bei einem Querschnitt durch die Bevölkerung (18 - 79 Jahre) lag die Prävalenz der CKD bei 2.3 % und somit waren über 1.53 Millionen Bundesbürger betroffen. Es konnte außerdem festgestellt werden, dass die chronische Nierenerkrankung eine starke Altersassoziation aufweist. Wenngleich bei den unter 50-jährigen die Nierenfunktion selten beeinträchtigt ist, leidet bei den 70 bis 79-jährigen bereits jede 8. Person an CKD [15]. Schäffner et al. wiesen bereits 2012 darauf hin, dass mit 48 % fast jede zweite Person über 70 Jahre an einer CKD mit einer GFR kleiner 60 ml/min/1.73m<sup>2</sup> leidet [16]. Aufgrund morphologischer Veränderungen des Nierenparenchyms und damit einhergehender reduzierter Filtrationsleistung bei CKD, kommt es im Serum betroffener Patienten zu einem konsekutiven Anstieg von Retentionsparametern. Hierzu zählen neben körperfremden Substanzen, wie beispielsweise Medikamenten, vor allem körpereigene Stoffe und Metaboliten wie Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure aber auch Elektrolyte wie Calcium und Phosphat. Sekundärerscheinungen der CKD mit teils verheerenden Auswirkungen stellen Störungen der Blutdruckregulation, neurologische, dermatologische, hämatologische und kardiovaskuläre Komplikationen sowie Störungen des Mineral- und Knochenstoffwechsels dar. Besonders letztere zeigen als Folge der CKD, mit der sog. CKD-MBD (chronic kidney disease – mineral and bone disorder; früher „renale Osteopathie“), eine gesonderte Pathologie auf, die wesentlicher Gegenstand dieser Arbeit ist. Durch eine chronische

Schädigung der Nieren in Folge der CKD kommt es hier nicht nur zum Umbau am Primärorgan, sondern viel mehr zu Dysbalancen im gesamten Mineralstoffwechsel und endokrinen Regulationsmechanismen sowie zu Störungen im Knochenstoffwechsel. Elektrolyte wie Calcium und Phosphat unterliegen unter physiologischen Voraussetzungen vor allem renalen, intestinalen und hormonellen Einflussfaktoren. Kommt es durch die CKD über eine verminderte Phosphatelimination zur Hyperphosphatämie, wird über eine vermehrte Produktion von FGF-23 (fibroblast growth factor 23) und dem von der Nebenschilddrüse (Glandula parathyroidea) produzierten Parathormon (PTH) eine reduzierte Phosphatrückresorption und folglich eine erhöhte Phosphatausscheidung induziert. FGF-23 und PTH sind phosphaturische Hormone. Diese Kompensationsmechanismen sind ab einer GFR < 30 ml/min (CKD Stadium G4) erschöpft, wodurch es schließlich zu einer im Serum messbaren Hyperphosphatämie kommt. Durch verminderte intestinale Calciumresorption, gesteigerte Phosphatretention und einer sich im Verlauf entwickelnden Resistenz ossärer PTH-Rezeptoren gegenüber PTH kommt es folglich zu einer herabgesetzten Calciumserumkonzentration. Diese Hypokalzämie induziert daraufhin am Calcium-Sensing Rezeptor (CaSR) der Glandula parathyroidea eine gesteigerte Synthese von PTH. Diese Induktion, sowie die verminderte Bereitstellung und damit reduzierten Spiegel von Calcitriol, begünstigen letztlich den sog. sekundären Hyperparathyreoidismus (sHPT) als Folge der CKD-MBD. Durch eine von PTH getriggerte Stimulation von RANKL (Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand) auf den Osteoblasten des Knochens kommt es zur Aktivierung von Osteoklasten [12, 17, 18]. Dies führt wiederum zu einem gesteigerten Um- und Abbau von Knochensubstanz, was am Knochen, je nach Überwiegen einer der Pathologien, zu einer sog. Osteitis fibrosa (PTH-Wirkung), einer Osteomalazie (Vitamin-D-Mangel), einer Mischform (sHPT plus Vitamin-D-Mangel) oder einem adynamen Knochen (z.B. bei niedrigem PTH, Diabetes mellitus oder anderen Komorbiditäten) führen kann. Folge des gestörten Calcium- und Phosphathaushaltes sind neben der gesteigerten Frakturanfälligkeit vor allem Erkrankungen, die sich durch in den Arterien abgelagerten Calcium-Phosphatkomplexen (extraossäre Kalzifikation), dem sogenannten Hydroxylapatit, sekundär manifestieren [19]. Vereinfacht beschrieben werden durch PTH die Knochen entkalkt und die Blutgefäße verkalkt.

#### **1.4 CKD-MBD und kardiovaskuläres Risiko**

Patienten, die an CKD und den resultierenden Folgen erkranken, entwickeln im Vergleich zur Gesamtbevölkerung signifikant häufiger kardiovaskuläre Erkrankungen. Wie bereits in 1.3 beschrieben kommt es bei Patienten, die an der CKD-MBD und konsekutivem sHPT leiden, neben verändertem Hormonrelease vor allem auch zu kontinuierlicher und teils progressiver Dysregulation der Calcium - und Phosphathomöostase im Blutserum. Das führt im Vergleich zu altersgleichen gesunden Kontrollgruppen nicht nur zu einer intimalen Expansion, sondern insbesondere zur Größenprogredienz und Kalzinose der arteriellen Media [20, 21]. Leskinen et al. konnten mittels Ultraschall-Doppleruntersuchungen, je nach Schwere der Erkrankung, bei 23.1 - 41.7 % der 136 untersuchten Nierenerkrankten eine deutliche Mediasklerose ausfindig machen. Bei den 59 gesunden Kontrollprobanden wurde diese Mediasklerose hingegen nur bei 3.4 % identifiziert [22]. Als Folge dieser pathologischen Gefäßformierung kommt es bei diesen Patienten zu einer dramatisch erhöhten Mortalität aufgrund kardiovaskulärer Sekundärerkrankungen. Insbesondere durch die mit der Mediaalkalzinose einhergehende Gefäßsteifigkeit und verminderte Dehnbarkeit, kommt es zu gesteigerter Pulswellenlaufzeit, linksventrikulärer Hypertrophie und koronarer Minderperfusion [23, 24]. Außerdem konnte in unabhängigen Studien gezeigt werden, dass dialysepflichtige Patienten, die alle an CKD-MBD leiden, signifikant häufiger von kardiovaskulärer Kalzifikation betroffen sind als nicht-dialysepflichtige Patienten. Die Todesursache bei Dialysepatienten ist in ca. 45 % nicht die Nierenerkrankung, sondern sekundäre kardiovaskuläre Geschehen, wie ischämische Kardiomyopathien, Myokardinfarkte, klappenassoziiertes Herzversagen oder Schlaganfälle [22, 25].

#### **1.5 Transdifferenzierung und Apoptose bei vaskulärer Kalzifikation**

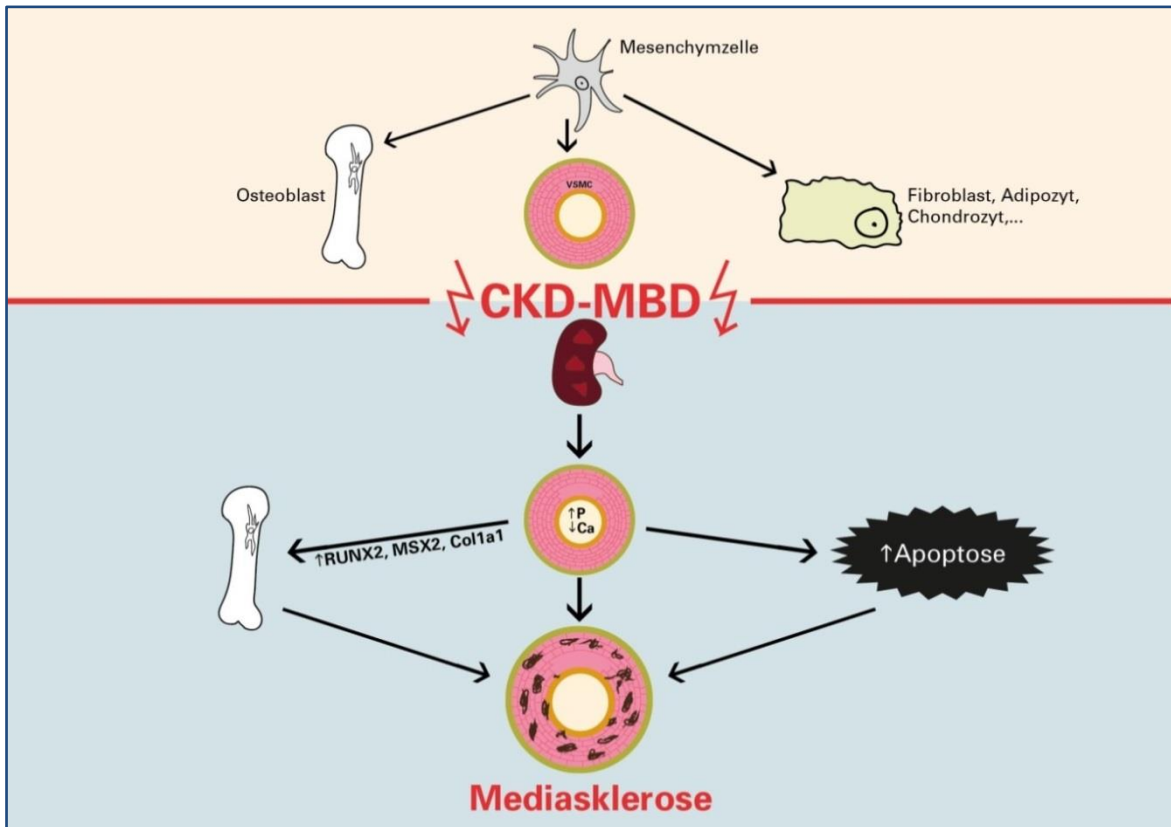
Lange Zeit wurde die Mediasklerose lediglich mit Verschiebungen innerhalb der Calcium- und Phosphathomöostase und der damit einhergehenden passiven Hydroxylapatitakkumulation verstanden. Inzwischen ist bekannt, dass diese passive Dysbalance zwar einen Anteil an der Kalzifikation einnimmt, der Pathomechanismus jedoch einer multifaktoriellen Genese und einem aktiven Remodeling unterliegt. In mediakalzifizierten Gefäßen werden durch pathologische Calcium- und Phosphatkonzentrationen aktive Umbauprozesse der VSMCs hin zu osteoblasten-

ähnlichen Zellen angeregt. So konnten Hoffmann Bowmann et al. zeigen, dass die vaskuläre Kalzifikation der VSMCs zu einer gesteigerten Expression osteochondrogener Gene und schließlich zum Auftreten von Zellen mit osteoblastärem Phänotyp führt [26]. Osteoblasten, die ursprünglich für die Synthese von Knochenmatrix verantwortlich sind, entstehen, wie auch die VSMCs, aus dem Mesoderm und sind somit identischen Ursprungs [27–29]. Deshalb wird vermutet, dass in Geweben mesodermalen Ursprungs je nach aktuellem Anforderungsprofil das Potential zur Differenzierung hin zu anderen mesodermalen Zellen möglich ist. Im konkreten Fall der vaskulären Kalzifikation kommt es durch das Hydroxylapatit, wie es hauptsächlich im Knochen vorzufinden ist, zu Transdifferenzierungsprozessen von VSMCs bis hin zu Zellen mit osteoblastärem Phänotyp. Ausgelöst werden diese Transdifferenzierungsprozesse durch natriumabhängige Phosphat-Co-Transporter (PiT-1), die auf den VSMCs exprimiert werden. Kommt es durch die CKD-MBD zu einer kontinuierlichen Hyperphosphatämie, so wird die Transportfähigkeit der PiT-1-Transporter erschöpft, worauf die VSMCs mit einer gesteigerten Genexpression, kodierend für das Transportprotein, reagieren. Dies führt schließlich zu einer erhöhten PiT-1-Rezeptordichte mit konsekutiv gesteigertem intrazellulärem Phosphat [30–32]. Durch diese intrazelluläre Phosphatverschiebung kommt es nachfolgend zu einer gesteigerten Expression osteogener Differenzierungsmarker wie etwa den Transkriptionsfaktoren RUNX2, Col1a1 und MSX2 in kalzifizierten VSMCs, sowie reduzierter Expression typischer VSMC Gene [33–37]. *In vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass durch gezielte Inhibition von PiT-1 in aortalen, glatten Muskelzellen eine verminderte Aktivität des Transporters mit nachfolgend geblockter Induktion osteogener Marker erzielt werden konnte. Diese Inhibition führte schließlich zu einer signifikant verminderten Kalzifikation der aortalen, glatten Muskelzellen [38].

Neben der osteogenen Transdifferenzierung stellt ferner die aktive Apoptose einen Bestandteil der vaskulären Kalzifikation dar. Eine Hyperphosphatämie begünstigt die Apoptose der VSMCs [39, 40]. Durch den programmierten Zelltod vaskulärer glatter Muskelzellen, sowie durch diese Zellen generierte und freigesetzte Matrixvesikel kommt es zu einer Anreicherung und Bindung von Hydroxylapatit mit nachfolgender vaskulärer Kalzifikation [41, 42]. Proudfoot et al. konnten sogar zeigen, dass die Formierung von Apoptosekörperchen in urämischen VSMCs bereits vor der eigentlichen vaskulären Kalzifikation eintritt [39]. Die Apoptose wird in den VSMCs, wie auch in anderen Zellen,



nach Stimulierung durch proapoptotische Signale und nachfolgender Expression apoptotischer Genprodukte initiiert. Hieran schließt sich eine irreversible Aktivierung einer Kaskade von Cysteinyl-aspartat-spezifischer Proteasen (Caspasen) an, welche durch proteolytische Aktivität zum programmierten Untergang der Zelle führen [43].



**Abbildung 1: Folgen einer CKD-MBD auf die Kalzifikation von VSMCs (eigene Darstellung).**

Unter physiologischen Bedingungen differenzieren die vom Mesoderm ausgehenden Mesenchymzellen zu verschiedenen Gewebszellen, wie etwa Osteoblasten, Fibroblasten, Adipozyten und vaskulären glatten Muskelzellen (hellrosé). Kommt es durch die CKD-MBD zur Hyperphosphatämie/Hypokalzämie resultiert eine osteogene Transdifferenzierung sowie gesteigerte Apoptose der VSMCs mit konsekutiver Mediakalzifikation arterieller Gefäße.

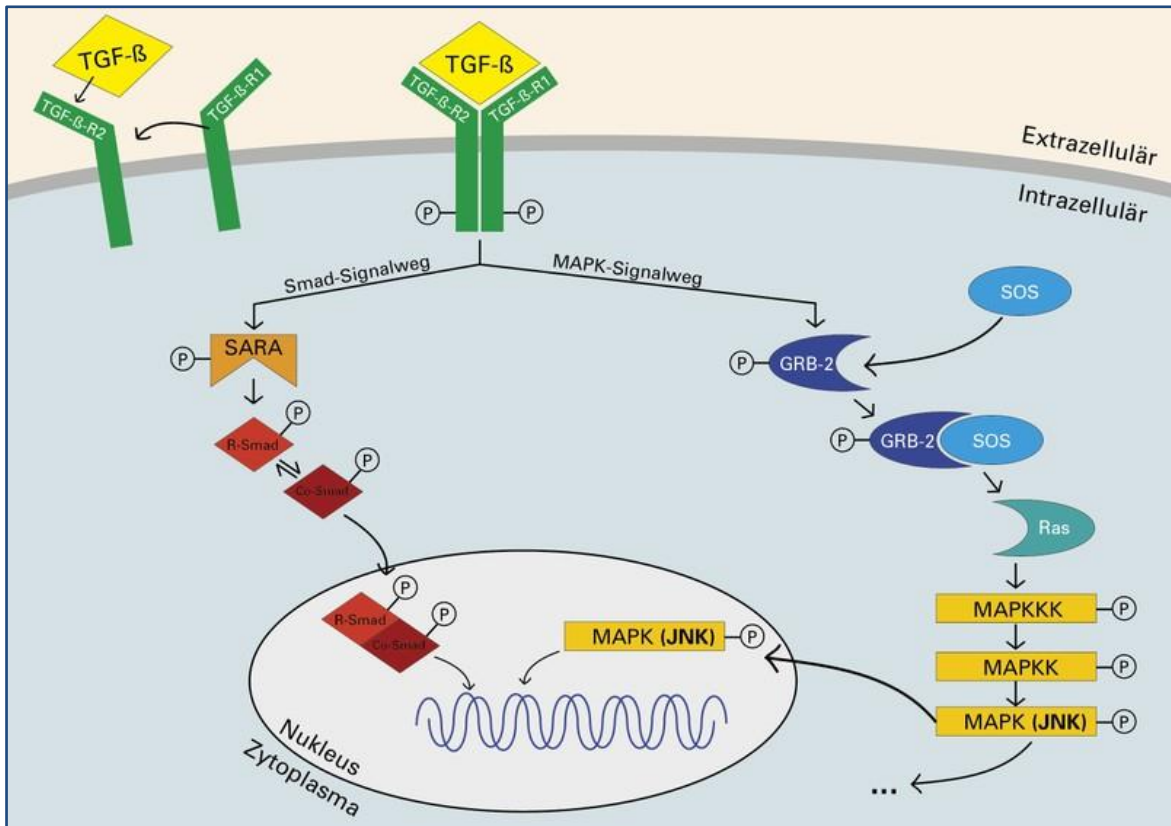
### 1.6 TGF- $\beta$ Signalkaskade

Als Grundgerüst einer wachsenden, sich entwickelnden Zelle zählen neben zellulären Bestandteilen auch Proteine, wie etwa Zytokine, die für zahlreiche Prozesse verantwortlich sind. Zytokine stellen eine vielzählige Gruppe von Proteinen dar, die durch gezielte Signaltransduktion an regulatorischen, intrazellulären Prozessen wie Migration, Immunreaktion, Proliferation oder aber Differenzierung maßgeblich beteiligt sind. Hierbei binden Zytokine an zielgerichtete Zytokinrezeptoren auf der Zelloberfläche, was zu einer

intrazellulären Signalkaskade und schließlich zu zielgerichteten molekularen Mechanismen führt [44]. Einen wichtigen Vertreter dieser Zytokine stellt das Protein Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ) dar. TGF- $\beta$ , das wiederum innerhalb einer großen Superfamilie in über 30 Mitglieder differenziert werden kann, wird vor allem durch die drei bekannten Isoformen TGF- $\beta$  1-3 repräsentiert. Durch die große Variabilität innerhalb der Subtypen ergibt sich ein enormes Aufgabengebiet dieser Zytokine. TGF- $\beta$  ist durch seine pleiotropen Effekte unter anderem in der Zelldifferenzierung, Zellzykluskontrolle, Angiogenese, Hämatopoese, extrazellulärer Matrixformierung sowie in vaskulären Umbauprozessen als ein entscheidendes Zytokin verantwortlich [45, 46]. Es konnte nachgewiesen werden, dass bei Patienten mit onkologischen, immuninduzierten oder vaskulären Pathomechanismen alternierende Plasmaspiegel von TGF- $\beta$  vorzufinden sind. So konnten beispielsweise direkte Zusammenhänge zwischen der Entstehung und dem Progress von schwerwiegenden Erkrankungen wie Pankreaskarzinomen, kleinzelligen Lungenkarzinomen, hepatozellulären Karzinomen, klarzelligen Nierenkarzinomen oder aber immunologisch bedingter Vaskulitiden in Verbindung mit Veränderungen plasmatischer TGF- $\beta$  Konzentrationen bestätigt werden [47–50]. Doch auch bei vaskulären Pathomechanismen, die schließlich zu gravierenden ischämischen Erkrankungen wie Myokardinfarkten, Schlaganfällen oder aber peripher arterieller Verschlusskrankheiten führen, ist TGF- $\beta$  maßgeblich beteiligt [51, 52]. Das in zahlreichen Geweben exprimierte Protein TGF- $\beta$ , zu dessen Superfamilie Mitglieder wie etwa Growth and Differentiation Factors (GDFs), Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), Activine oder Nodals gehören, unterliegt einem komplexen Signaltransduktionsmechanismus. Die drei Isoformen TGF- $\beta$  1-3, die unterschiedlicher chromosomaler Abstammung sind, aber in ihrer genetischen Ausprägung eine über 80-prozentige Homologie aufweisen, erfüllen *in vivo* vielfältigste Funktionen. TGF- $\beta$  liegt in hoher Konzentration als inaktives large latent complex (LLC), gebunden an extrazellulärer Matrix und somit nicht interaktionsfähig mit seinem Rezeptor, vor. Durch Autoregulation und gezielte Reize, wie etwa der hormonellen Regulation über Steroide oder aber Vitamin-D und Retinoide, kann eine gezielte und meist bedarfsgerechte Genexpression, Aktivierung sowie Mobilisierung der LLCs hin zum aktiven TGF- $\beta$  bewirkt werden [53–55]. Ähnlich wie bei den drei Isoformen TGF- $\beta$  1-3 gibt es TGF- $\beta$ -Rezeptoren vom Typ 1-3. Diese tetrameren Transmembranrezeptoren besitzen alle eine zytoplasmatische Serin/Threonin-Kinase. Nach Aktivierung des latenten TGF- $\beta$  und anschließender Rezeptorbindung an den Typ 2

Rezeptor fusioniert der Typ 1 Rezeptor mit dem bestehenden Rezeptor-Ligandenkomplex, wodurch ein Heterotetramer entsteht. Der Typ 3 Rezeptor bindet und präsentiert TGF- $\beta$  und reguliert als Co-Rezeptor die Signalkaskade. Über intrazelluläre Phosphorylierung des Typ 2 Rezeptors durch den Typ 1 Rezeptor können konsekutiv zwei untergeordnete Signalwege, der Smad und der MAPK Signalweg, durch Typ-1 Rezeptor vermittelte Phosphorylierung ausgelöst werden. Bei der Smad Signaltransduktion wird nach Phosphorylierung des receptor-regulated Smad Proteins (R-Smads), über die Regulierung des Smad Cofaktors SARA (Smad Anchor for Receptor Activation) ein Komplex mit dem common-mediator Smad Protein (Co-Smad) eingegangen. Dieser Komplex transloziert nachfolgend nukleär und löst TGF- $\beta$  vermittelte Genexpressionen aus.

Dagegen stellt der MAPK (Mitogen-activated protein kinase) Signalweg eine Smad-unabhängige Signalkaskade dar, welche ebenfalls nach TGF- $\beta$ -Rezeptor Dimerisierung und Autophosphorylierung aktiviert wird. Diese MAPKs werden wiederum differenziert und vertreten durch die drei Kinasen ERK (extracellular signal-regulated kinases), p-38, sowie die SAPK/JNK (stress-activated protein-kinase/c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase), die jeweils ihren eigenständigen Signalweg besitzen. Nach Aktivierung des TGF- $\beta$ -Membranrezeptorkomplexes wird je eine Phosphorylierungskaskade gestartet, bei der sich zuerst die SH2 Domäne des Proteins GRB-2 an den intrazellulären Membranrezeptorkomplex bindet. Daraufhin wird das Protein Son of Sevenless (SOS) rekrutiert, welches an die SH-3 Domäne von GRB-2 bindet und schließlich zur Aktivierung (Austausch GDP zu GTP) von Ras führt. Ras setzt konsekutiv eine weitere Kaskade in Gang, bei der sich die Proteinkinasen MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK), MAPK-Kinase (MAPKK) und MAPK nacheinander phosphorylieren/aktivieren [56, 57]. Die am Ende dieser Kaskade stehenden MAPKs, repräsentiert durch ERK, SAPK/JNK und p-38, beeinflussen schließlich zahlreiche zytoplasmatische als auch nukleär-transkriptionelle Prozesse.



**Abbildung 2: Darstellung intrazellulärer Signalkaskaden von TGF-β (eigene Darstellung).**

Das Zytokin TGF-β führt nach extrazellulärer Rezeptorbindung über Autophosphorylierung zu einer intrazellulären Dimerisierung. Über Phosphorylierung werden entweder die Smad Signalkaskade oder der MAPK Signalweg aktiviert. Als Endstrecke dieser beiden Wege werden zytoplasmatische und nukleär-transkriptionelle Prozesse reguliert.

### 1.7 Einfluss von TGF-β bei vaskulärer Kalzifikation

Dass TGF-β in der Stimulation und Inhibition der Angiogenese ein wichtiges Schlüsselzytokin repräsentiert, ist lange bekannt. Seine Rolle im Kontext mit der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen wird deshalb in den letzten Jahren gezielt erforscht. Wenngleich unter gesunden Bedingungen ein physiologisches TGF-β Level die Entwicklung und Erhaltung der Organfunktionen begünstigt, wird bei vielen Nierenerkrankungen, wie auch der CKD, eine Überexpression aller drei TGF-β Isoformen, insbesondere aber TGF-β1 sowie der TGF-β-Rezeptoren, beobachtet [58, 59]. Erhöhtes extrazelluläres Phosphat, wie es beispielsweise bei der CKD vorkommt, steigert in vaskulären glatten Muskelzellen die Produktion von TGF-β1 [60]. In den letzten Jahren wurde die Wirkung von TGF-β1 in Bezug auf vaskuläre Kalzifikation kontrovers diskutiert. Einerseits wurde TGF-β1 mit einem protektiven anti-atherosklerotisch/anti-kalzifizierenden Effekt durch Regulierung vaskulärer Zellproliferation und Antiinflammation, Reduzierung osteogener

Transdifferenzierung sowie verminderter Apoptose assoziiert [61–63]. Demgegenüber weisen Publikationen darauf hin, dass erhöhtes TGF- $\beta$ 1 für Differenzierung, Remodeling, Apoptose und somit dem Progress arterieller Läsionen verantwortlich ist [64–67].

In einer von Stracke et al. 2002 publizierten Arbeit konnte beobachtet werden, dass in den stenotischen AV-Fisteln von Hämodialysepatienten im Vergleich zu nicht stenotischen AV-Fisteln eine erhöhte Expression von TGF- $\beta$ 1 vorzufinden war. Es wird vermutet, dass durch Immunzellen und VSMCs verstärkt produziertes TGF- $\beta$ 1 zur Produktion und Anreicherung von ECM innerhalb der stenotischen Fisteln führt [68].

Als Folge nephrologischer Primärerkrankungen sind sekundäre, kardiovaskuläre Erkrankungen für die hohe Mortalität verantwortlich. Im Plasma zirkulierendes, aktives TGF- $\beta$ 1 ist bei Patienten mit Koronararterienerkrankung signifikant höher als bei Kontrollgruppen ( $1.74 \pm 0.18$  zu  $0.96 \pm 0.17$  ng/ml). Außerdem nimmt mit zunehmender Schwere der Koronararterienerkrankung auch die Konzentration von TGF- $\beta$ 1 zu [69].

### **1.8 SAPK/JNK und dessen Einfluss auf vaskuläre Kalzifikation**

Wie bereits erläutert, wird der SAPK/JNK Signalweg als ein Mitglied der MAPK Familie unter anderem durch den Liganden TGF- $\beta$  induziert. Es existieren die drei SAPK/JNK Gene JNK1, JNK2 und JNK3, die durch alternatives Splicing 10 Isoformen dieser MAPK hervorbringen können [70]. Sobald diese stress-aktivierte Proteinkinase phosphoryliert und aktiviert ist, migriert sie nukleär und moduliert schließlich zahlreiche Funktionen wie etwa die Regulierung der Apoptose, Immun- und Entzündungsmodulation, Transformation sowie viele Entwicklungsprozesse. Wie der Name dieser Kinase verrät, wird sie unter physiologischen Bedingungen nicht nur durch Zytokine, wie etwa TGF- $\beta$ 1, sondern vor allem durch Stressfaktoren wie UV-Strahlung, oxidativen Stress, Hitzeschock sowie chemischen oder mechanischen Stress aktiviert [71]. Eine Dysregulation dieses stressaktivierten Signalwegs scheint verantwortlich für die Entstehung und den Progress von Krankheiten wie Ischämien, malignen Neoplasien, chronischer Inflammation oder Neurodegeneration zu sein [72]. Phosphorylierung mit einhergehender Aktivierung der SAPK/JNK Signalkaskade konnte in einigen Arbeiten mit der Entstehung und dem Progress von vaskulärer Kalzifikation identifiziert werden. So beschrieben Hou et al., dass durch erhöhte Calcium-Phosphatwerte die SAPK/JNK Signalkaskade aktiviert und schließlich Apoptose und osteogene Differenzierung von VSMCs mit nachfolgender vaskulärer

Kalzifikation erfolgt [73]. Außerdem wird SAPK/JNK durch Urämietoxine wie Indoxylsulfat, welches in CKD-Patienten in erhöhter Konzentration vorliegt, aktiviert, was letztlich zu Transdifferenzierung und Matrixmineralisation von VSMCs führt [74]. In kalzifizierenden VSMCs konnte durch selektive Inhibition von JNK eine Prävention der osteogenen Differenzierung sowie der Apoptose mit nachfolgend verminderter vaskulärer Kalzifikation beobachtet werden [73–75].

### **1.9 Fragestellung und Ziel der Arbeit**

Von der chronischen Nierenerkrankung sind je nach Standort in Europa zwischen 3.3 - 17.3 % der Bevölkerung, durchschnittlich etwa 10 % der Europäer betroffen [76]. Alleine in Deutschland leiden über 80.000 Menschen an einer terminalen dialysepflichtigen Nierenerkrankung. Die Folge dieser Erkrankung sind vaskuläre Sekundärscheinungen, die für eine enorm hohe Mortalität verantwortlich sind.

Aufgabe dieser Arbeit ist es, diese komplexe Pathogenese der medialen Gefäßkalzifikation weiter zu erforschen und verstehen, um sie zukünftig zu einer besser behandelbaren Erkrankung werden zu lassen. Es soll verifiziert werden welche Rolle TGF- $\beta$ 1, hinsichtlich Inhibition oder aber Stimulation vaskulärer Kalzifikation, einnimmt. Wesentliches Ziel dieser Arbeit ist es zu erforschen, über welche molekularen Mechanismen TGF- $\beta$ 1 eine Rolle im Prozess der vaskulären Kalzifikation spielt. c-JNK, dessen Protein am Ende einer TGF- $\beta$ 1-induzierten Signalkaskade steht, wurde in bestehenden Publikationen als ein mögliches Bindeglied bei der Entstehung der Mediasklerose genannt. Ziel ist es herauszufinden, welche Rolle die TGF- $\beta$ 1-induzierte SAPK/JNK Signalkaskade am komplexen Prozess der Mediakalzifikation in humanen vaskulären glatten Muskelzellen einnimmt. Außerdem soll geklärt werden, ob die prokalzifizierenden Mechanismen wie Apoptose und osteogene Transdifferenzierung der hVSMCs über den TGF- $\beta$ 1 induzierten SAPK/JNK Signalweg reguliert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Puffer und Lösungen

**Tabelle 1: Gelistete Puffer und Lösungen**

Puffer und Lösungen	Chemische Zusammensetzung
2 prozentiges Agarose Gel	200 ml 1 x TAE, 4 g Agarose NEEO Ultra-Quality, 5 Tropfen 0.025 % Ethidiumbromid
1 x STRIP Puffer	62.5 mM Tris-HCl (1 M, pH 6.8), SDS (10 %), 100 mM $\beta$ -mercaptoethanol, ddH <sub>2</sub> O
1 x TAE	40 mM Tris base, 1 mM EDTA pH 8.0, Essigsäure, ddH <sub>2</sub> O
1 x TBST	20 mM Tris, 138 mM NaCl, pH 7,6, 0.1 % Tween 20
1 % PBS	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1 M Tris	Tris base, HCl, ddH <sub>2</sub> O
Agarose Gel Loading Buffer (6x)	Bromphenolblue 0.25 %, Xylene cyanol 0.25 %, Glycerol 30 %, EDTA 50 mM, ddH <sub>2</sub> O
Laemmli (SDS-PAGE) 2x	TRIS-HCL (1 M, pH 6.8) 125 mM, SDS 4 %, Glycerol 30 %, Bromphenol blue 0.01 %, ddH <sub>2</sub> O
RIPA	25 mM Tris, HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP -40, 1 % sodium desoxycholate, 0.1 % SDS
PMSF	0.1 M PMSF, Isopropanol
PFA	4 % Paraformaldehyde
STRIP Puffer	Tris-HCl 400 mM, EDTA (1 M, pH 6.8) 62.5 mM, SDS (10 %), 2 % $\beta$ -mercaptoethanol 100 mM, ddH <sub>2</sub> O

#### 2.1.2 Medien

**Tabelle 2: Gelistete Medien**

Medien	Hersteller
DMEM (1X) + GlutaMAX	ThermoFisher Scientific GmbH
Medium 231	ThermoFisher Scientific GmbH

### 2.1.3 Enzyme, Chemikalien und Antibiotika

**Tabelle 3: Gelistete Enzyme, Chemikalien und Antibiotika**

<b>Enzyme, Chemikalien und Antibiotika</b>	<b>Hersteller</b>
0.5 % Trypsin-EDTA (10X)	ThermoFisher Scientific GmbH
2-Mercaptoethanol	Merck KGaA
AgNO <sub>3</sub> #9370.4	Carl Roth GmbH & Co. KG
Antikörper - Anti- mouse HRP	GE Healthcare UK
Antikörper - Anti- rabbit HRP	GE Healthcare UK
Antikörper GAPDH – mouse monoclonal Antibody - #H86504M	Meridian Life Science, Inc.
Antikörper Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Antibody #9251	Cell Signaling Technology Europe
Antikörper RUNX2 (D1H7) Rabbit mAb #8486	Cell Signaling Technology Europe
Antikörper SAPK/JNK Antibody #9252	Cell Signaling Technology Europe
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAN-Biotech GmbH
Bradford Reagenz 0.1-1.4 mg/ml protein	Merck KGaA
DNA Ladder Low GeneRuler SM1191	ThermoFisher Scientific GmbH
DNA Ladder Mix GeneRuler SM0331	ThermoFisher Scientific GmbH
DNA Loading Dye 6X	ThermoFisher Scientific GmbH
Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH & Co. KG
dNTP's	ThermoFisher Scientific GmbH
Ethidiumbromidlösung 0.025 %	Carl Roth GmbH & Co. KG
Humanes TGF-beta 1	Sino Biological, Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH
hVSMC - CC-2583	Lonza - Biological Manufacturing
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG
JNK Inhibitor, SP600125	InvivoGen USA
Smooth Muscle Growth Supplement 20X	ThermoFisher Scientific GmbH
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	ThermoFisher Scientific GmbH



SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	ThermoFisher Scientific GmbH
Penicillin – Streptomycin	ThermoFisher Scientific GmbH
Protein Ladder PageRuler Prestained 26617	ThermoFisher Scientific GmbH
Tetramethylethylendiamin	Carl Roth GmbH & Co. KG
TRIzol Reagenz 200 ml	ThermoFisher Scientific GmbH
WesternBright Chemilumineszenz Substrat Quantum	Biozym Scientific GmbH

#### 2.1.4 Oligonukleotide

**Tabelle 4: Primersequenzen für PCR und q-RT-PCR**

Name/ Gen	Sequence (5' → 3')
RUNX2 - forward	TGCCTAGGCGCATTTCAGGTG
RUNX2 – reverse	GGCTTTGGGAAGAGCCGGGG
MSX2 – forward	AAATTCAGAAGATGGAGCGGCGTG
MSX2 – reverse	CTGGGATGTGGTAAAGGGCGTGCG
Col1a1 – forward	CAAGGACAAGAGGCATGTCTGG
Col1a1 – reverse	GCTGTTCTTGCACTGGTAGGTG

#### 2.1.5 Kits

**Tabelle 5: Gelistete Kits**

Kit	Hersteller
In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescin	Roche Diagnostics GmbH
M-MLV Reverse Transcriptase	ThermoFisher Scientific GmbH
Power SYBR Green PCR Master Mix	ThermoFisher Scientific GmbH
Reverse Transcription Kit QuantiTect0	Qiagen GmbH
PCR Master Mix (2X) 1.25 ml	ThermoFisher Scientific GmbH

## 2.1.6 Software und Datenbanken

**Tabelle 6: Gelistete Software und Datenbanken**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Adobe Acrobat	Adobe Systems GmbH
Adobe Photoshop	Adobe Systems GmbH
AlphaEaseFC (FluorChem SP)	Genetic Technologies, Inc.
FUSION-CAPT	Vilber Lourmat Smart Imaging
Microsoft Excel	Microsoft Deutschland GmbH
Microsoft Word	Microsoft Deutschland GmbH
NCBI PubMed	National Center for Biotechnology Information
GraphPad Prism 4	GraphPad Software, Inc.
ImageJ	EHD imaging GmbH
InDesign CS6	Adobe Systems GmbH
Primer - Universal ProbeLibrary Assay Design Center	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
QuantStudio 7 Flex Software Properties	ThermoFisher Scientific GmbH
SoftMax Pro 6.3	Molecular devices Deutschland GmbH

## 2.1.7 Instrumente

**Tabelle 7: Gelistete Instrumente**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
6-Well-Zellkulturplatten	Greiner Bio-One International GmbH
12-Well-Zellkulturplatten	Greiner Bio-One International GmbH
96-Well-TC-Platte, Standard	Sarstedt AG & Co
100 TC Schale, Standard Zellkulturplatte	Sarstedt AG & Co
384-Well-PCR-Platte TW-MT	Biozym Scientific GmbH
Alpha Innotech's Fluorchem Imagers	Isotron Deutschland GmbH
Aluminiumfolie Rotilabo	Carl Roth GmbH & Co. KG
BioPhotometer RS 232 C	Eppendorf AG

Blotting Filterpapier, extra dick	Bio-rad laboratories GmbH
Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG
Centrifuge 5424 R	Eppendorf AG
Centrifuge 5804 R	Eppendorf AG
Deckgläser 20 x 20 mm	R. Langenbrinck GmbH
Elektrophorese Power Supply EPS 301	Amersham Biosciences Europe GmbH
Eppendorf Tubes 1.5 ml, 2.0 ml	Eppendorf AG
Falcon 15 ml	Sarstedt AG & Co
Falcon 50 ml	Corning B.V. Life Sciences
Inkubator Heraeus Instruments	ThermoFisher Scientific GmbH
Inkubator Serie BD	Binder GmbH
Kamera Canon DS126191	Canon Deutschland GmbH
Laborflasche, Kimax (Boro 3.3) 250 ml, 500 ml, 1000 ml	neoLab Migge GmbH
MicroAmp Optical Adhesive Film Real-time PCR Compatible	ThermoFisher Scientific GmbH
Mikroplatten-Reader Spectra Max 190	Molecular devices Deutschland GmbH
Mikroplatten-Reader Spectra Max 384 Plus	Molecular devices Deutschland GmbH
Mikroskop Zeiss Primo Star	Carl Zeiss AG
Mikroskop Zeiss Primo Vert	Carl Zeiss AG
Mikrowelle CMC 2895 DS	Candy Hoover GmbH
Nitrozellulose Blotting Membran 0.2 µm NC	GE Healthcare GmbH
PCR 8-Tube Stripes	Greiner Bio-One International GmbH
PCR Mastercycler pro	Eppendorf AG
PerfectBlue Doppel-Gelsystem Twin S	PEQLAB Biotechnologie GmbH
PerfectBlue Gel System Mini L, Elektrophorese	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Pipetten 2.5 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Biozym Scientific GmbH

Pipetierhilfe pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG
Schüttler TCR 170	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co
Sicherheitswerkbank Herasafe Kendro	ThermoFisher Scientific GmbH
Thermocycler	Eppendorf AG
Thermomixer compact	Eppendorf AG
Trans-Blot Turbo Blotting System	Bio-rad laboratories GmbH
Variomag Mono Rührer	ThermoFisher Scientific GmbH
Viber Lourmat Fusion Fx – Western Blot Imaging	Vilber Lourmat Smart Imaging
Vortex Schüttler MS 3 digital	IKA-Werke GmbH & Co. KG
Zählkammer 0.100 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG
Zellschaber 16 cm 2-Pos.-Klinge	Sarstedt AG & Co

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden im Zellkulturmodell verifiziert, wofür humane vaskuläre glatte Muskelzellen (hVSMC) aus Koronararteriengefäßen (CC-2583) von der Firma Lonza verwendet wurden. Die Durchführung sämtlicher Versuche geschah in den Zellpassagen 5-8. Inkubiert wurden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid. Die Kultivierung der hVSMCs geschah im Zellkulturmedium 231 unter Zugabe eines Wachstumssupplements (Smooth Muscle Growth Supplement 20X) und einer 5 % Penicillin-Streptomycin Lösung zur Vermeidung bakterieller Kontaminationen. Für optimale Wachstumsbedingungen und um einen kontinuierlichen Metabolismus der Zellen aufrecht zu erhalten, fand alle zwei Tage ein Medienwechsel, mit einem im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmtem Medium, statt. Zur Beurteilung des Wachstumsverhaltens der adhärennten Zellen erfolgte täglich eine mikroskopische Sichtkontrolle des Zellrasens. Im subkonfluenten Stadium des Zellrasens erfolgte das Passagieren der Zellen. Hierfür wurden die Zellen nach dem Absaugen des Mediums mit 1

x PBS gewaschen und für ca. zwei Minuten mit 1 ml Trypsin pro 10-cm-Schale inkubiert, um sie vom Boden der Zellkulturschale zu lösen. Nach Hinzugabe von 5 ml Medium wurde die Suspension in ein 15 ml Falcon überführt und bei RT für 3 min bei 800 rpm zentrifugiert. Die Trypsin-Mediumlösung konnte vorsichtig abgesaugt werden, um das am Boden des Falcons verbleibende Zellpellet in 1 ml frischem trypsinfreiem Medium zu resuspendieren. Anschließend konnten die Zellen weiter passagiert und kultiviert oder je nach Passage oder Bedarf für anstehende Versuche in die Zellkulturschalen ausgesät werden. Zur Gewährleistung eines homogenen Zellrasens wurde die Zellzahl mit Hilfe der Zählkammer verifiziert und anschließend in die Versuchsplatten ausgesät. Die Zelldichte in den 6-Well-Platten wurde mit 150.000 Zellen pro Well, und in den 12-Well-Platten mit 75.000 Zellen pro Well angestrebt. Der Versuchsbeginn der Experimente erfolgte bei mikroskopischer Konfluenz der Zellen.

### **2.2.2 Kalzifikationsassay**

Um die urämischen Bedingungen einer CKD-MBD zu simulieren, wurde dem 231-Zellkulturmedium der hVSMCs Calcium und anorganisches Phosphat supplementiert. Die final verwendete Konzentration von Calcium ( $C = 2.4 \text{ mmol/l}$ ) und anorganischem Phosphat ( $C = 2.7 \text{ mmol/l}$ ), bei der sich optimal präsentierende qualitative- und quantitative Kalzifikation, mit Erhalt der Zellstruktur bot, wurden im Labor, bereits vor Beginn dieser Arbeit, in Zusammenarbeit mit der Klinischen Chemie, eruiert. Je nach Versuchsaufbau sollten die Zellen diesem Kalzifikationsmedium (KM), sowie einer Negativkontrolle (Leermedium (LM)), die lediglich aus dem 231-Zellkulturmedium bestand, für unterschiedliche Zeiten exponiert werden.

### **2.2.3 Visualisierung mittels von Kossa Färbung**

Zur Visualisierung der Kalzifikation der hVSMCs wurde die von Kossa Färbung gewählt. Ausgesäte und konfluent gewachsene Zellen (6-Well-Platte) wurden anschließend für 5, 7 oder 9 Tage bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 % Kohlenstoffdioxid den jeweiligen Behandlungsgruppen (siehe Versuchsaufbau) exponiert. Daraufhin wurde das Behandlungsmedium aus den 6-Well-Platten abgesaugt und die Zellen zunächst mit 1 x PBS und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch 30-minütige Inkubation von ca. 1.5 ml Paraformaldehyd (PFA) pro Well bei RT. Daraufhin wurden die Zellen drei Mal mit

destilliertem Wasser gewaschen. Nachfolgend konnten die Zellen mit 1.5 ml  $\text{AgNO}_3$  pro Well angefärbt und zur Bindung der Calciumablagerungen für 45 min unter UV Licht bei RT inkubiert werden. Nach Absaugen des  $\text{AgNO}_3$  wurden sie erneut 3 x mit destilliertem Wasser gewaschen und schließlich zur Entfernung instabiler Calciumablagerungen für 5 min mit  $\sim 1.5$  ml  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  inkubiert. Vor Mikroskopie (Zeiss Primo Star) und Digitalisierung (Canon DS126191) der Zellen bei 40- und 100-facher Vergrößerung wurden die Zellen erneut 3 x mit destilliertem Wasser gewaschen.

#### **2.2.4 O-Cresolphthalein-Komplexon-Methode zur Quantifizierung**

Die quantitative Untersuchung der Kalzifikation der behandelten hVSMCs erfolgte mit Hilfe der kolorimetrischen O-Cresolphthalein-Komplexon-Methode. Wie bei der von Kossa Versuchsreihe wurden auch hier ausgesäte, konfluent gewachsene Zellen (12-Well-Platte) für 5, 7 oder 9 Tage bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid den jeweiligen Behandlungsgruppen (siehe Versuchsaufbau) exponiert. Zur Optimierung der Versuchsergebnisse sollten alle Behandlungsgruppen in Triplets angesetzt werden. Nach Exposition wurden die Zellen am jeweiligen Untersuchungstag mit 1 x PBS gewaschen und anschließend zur Ablösung des Calciums für 24 h mit 500  $\mu\text{l}$  0.6 M HCl pro Well bei RT auf dem Rüttler inkubiert. Von der inkubierten Suspension wurden für die bevorstehende Messung je 10  $\mu\text{l}$  entnommen und in eine 96-Well-Platte überführt. Zur Verifizierung dienten die vorgegebenen Standards von 2.5 mg/ml bis 0.5 mg/ml und als Blank wurde 0.6 M HCl verwendet. Nach Hinzugabe von je 100  $\mu\text{l}$  Farbreagenz und 100  $\mu\text{l}$  AMP Puffer zu den Proben sowie 1 h Inkubation bei RT im Dunkeln erfolgte die photometrische Messung ( $\lambda = 570$  nm) der 96-Well-Platten.

#### **2.2.5 Proteinbestimmung mittels BCA Assay**

Um die Validität aller Ergebnisse gewährleisten zu können, wurden für die quantitative Analyse der Kalzifikation die Proben in  $\mu\text{g}$  Calcium pro  $\mu\text{g}$  Protein aufgetragen. Zur Eruiierung des Proteingehalts der exponierten hVSMCs musste das 24 h inkubierte HCl aus den 12-Well-Platten (siehe 2.2.4) entfernt und 1 ml 0.1 M  $\text{Na}_2\text{OH}$  + 0.1 % SDS pro Well auf dem Rüttler bei RT inkubiert werden. Anschließend wurden je 50  $\mu\text{l}$  der Suspension (Triplettbestimmung) in eine 96-Well-Platte pipettiert. Als Standards dienten je 50  $\mu\text{l}$  BSA zwischen 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bis 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und als Blank  $\text{Na}_2\text{OH}$  SDS. Nach Supplementierung von je

50 µl Working Reagenz wurde die 96-Well-Platte für 2 h bei RT im Dunkeln inkubiert und nach Herstellerangaben (Micro BCA Protein Assay Kit) gemessen.

Die in 2.2.4 ermittelte Calciumkonzentration konnte anschließend gegen den Proteingehalt normalisiert werden.

## **2.2.6 Proteinanalyse mittels Western Blot**

### **Vorbereitung**

Der Nachweis der zu verifizierenden Proteine erfolgte durch die Western Blot Methode. Zur Gewährleistung eines einheitlichen Zellzyklusstatus der Zellen wurden alle zu behandelnden Zellen (6-Well-Platten) 12 h vor Versuchsbeginn auf das serumfreie Medium 231, ohne Zusatz vom Wachstumssupplement und Antibiotika, gesetzt, um synchrone Stadien der Zellen gewährleisten zu können. Daraufhin erfolgte bei den Behandlungsgruppen, die mit den Substanzen TGF- $\beta$ 1 und/oder dem SAPK/JNK Inhibitor SP600125 exponiert wurden, eine 30-minütige Präinkubation dieser Substanzen zusammen mit 2 ml serum- und antibiotikafreiem 231 Medium. Anschließend erfolgte die Exposition der Zellen mit allen Substanzen der jeweiligen Behandlungsgruppen (siehe Versuchsaufbau). Bei Langzeitexpositionsversuchen (5, 7 und 9 Tage) zur Untersuchung der osteogenen Transdifferenzierung wurde grundsätzlich 231 Medium + Wachstumssupplement + Antibiotika verwendet. Bei den Kurzzeitexpositionen (30 – 240 min) zur Analyse des SAPK/JNK Proteins/Phosphorylierungsstatus, wurde lediglich mit 231 Medium gearbeitet, um mögliche Artefakte, hervorgerufen durch Wachstumssupplement und Antibiotika, zu verhindern.

### **Zellyse/ Proteinextraktion**

Zur Isolierung und weiteren Analyse der Proteine aus den behandelten Zellen wurden diese zunächst lysiert. Damit es hierbei nicht zum Proteinverdau kam, wurden die Zellen ständig auf Eis gehalten. Nach Absaugen des Behandlungsmediums und 2-maligem Waschen der Zellen mit 1 x PBS, wurde den Zellen 70 µl eiskalter RIPA Puffer pro Well hinzugefügt. Nach 5 min Inkubation konnte die lysierte Zellsuspension mit einem Zellkratzer vom Well gelöst und in ein 1.5 ml Eppendorftube überführt werden. Dieses wurde anschließend für 15 min bei 4 °C und 12300 rpm zentrifugiert. Die im Überstand befindliche Proteinschicht konnte nach dem Überführen in ein neues Eppendorftube aliquotiert werden. 10 µl des

extrahierten Proteins wurden hierbei in 90 µl destilliertem Wasser gelöst und mit 4 x Laemmli mit 10 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (1:4) gemischt. Nach 5 min Inkubation bei 95 °C konnte diese Mischung mittels Western Blot weiter verarbeitet werden.

### **Proteinkonzentration - Auftrennung und Transfer**

Vor Beginn der Western Blot Analyse musste die Proteinkonzentration bestimmt werden, wofür ein Bradford-Assay verwendet wurde. 10 µl des mit destilliertem Wasser aliquotierten Probenmaterials (1:10) wurden für die bevorstehende photometrische Messung in eine 96-Well-Platte überführt. Nach Aliquotieren der Bradford Reagenz mit destilliertem Wasser (1:5) wurden 190 µl dieser Reagenz zu den Proben im 96-Well supplementiert. Zur Verifizierung diente als Standard eine Verdünnungsreihe aus BSA. Nach 10-minütiger Inkubation der pipettierten 96-Well-Platte bei RT im Dunkeln wurden die Proteinkonzentrationen photometrisch bei  $\lambda = 595$  nm ermittelt (Tripletbestimmung). Für die nachfolgende Proteinauftrennung mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) wurden bei den Einzelversuchen je die gleiche Proteinkonzentrationen verwendet. Als Trenngel diente ein 12.5 % SDS-Gel, welches nach Aushärten in eine Laufkammer überführt wurde, die schließlich mit 1xTris/SDS Laufpuffer aufgefüllt wurde. Nach Auftragen der Proteine sowie der je nach Proteingröße passenden Proteinleiter zur Detektion des Molekulargewichts wurden die Proteine, unter Anlegen einer Spannung von 70 mV, aufgetrennt.

Die nun im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf Nitrozellulose (Porengröße 0.45 µm) transferiert. Hierfür wurden in Sandwichtechnik die Schichten Whatmanpapier, Nitrozellulose, SDS-Gel und erneut Whatmanpapier übereinander gelagert und schließlich das Gel bei 25 V für 30 min auf die Nitrozellulose geblottet.

Die anschließende Blockung der Nitrozellulosemembran, um unspezifische Bindungen zu vermeiden, erfolgte unter 1-stündiger Inkubation bei RT auf dem Rüttler eingelegt in 25 ml TBS-T Blockingpuffer (5 % BSA in Tris - Lösung mit 0.05 % Tween 20).

Nach erfolgtem Blotten und Blocken wurde die Nitrozellulosemembran mit dem zu untersuchenden Primärantikörper in Verbindung gebracht. Der Primärantikörper wurde in TBS-T (5 % BSA in Tris - Lösung mit 0.05 % Tween 20) verdünnt (total-JNK: 1:1000, phospho-JNK: 1:2000, RUNX2: 1:1000, GAPDH: 1:1000) und auf dem Rüttler bei 4 °C über Nacht inkubiert. Daraufhin wurde die Membran 3 x für 5 min mit TBS-T gewaschen und mit dem



ebenfalls in TBS-T (5 % BSA in Tris - Lösung mit 0.05 % Tween 20) verdünnten Sekundärantikörper (anti-mouse IgG, anti-rabbit IgG, 1:10.000) für 1 h auf dem Rüttler bei RT inkubiert. Nach einmaligem Waschen der Membran mit 1 x TBS-T wurde diese im Imager mit ECL-Entwicklerlösung überschichtet und abgelichtet. Je nach Strahlkraft der Banden wurden unterschiedliche Expositionszeiten gewählt und die Bilder schließlich mittels ImageJ Software quantifiziert.

### **2.2.7 RNA Isolation und cDNA Synthese**

Die RNA Isolation aus den hVSMCs erfolgte nach der Trizol-Methode, wobei darauf zu achten war, dass das zu behandelnde Probenmaterial ständig auf Eis lagerte. Hierfür wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und nach 2-3 min Inkubation auf 1 ml Trizol mit dem Zellschaber gelöst und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Hinzugabe von 200 µl Chloroform, kurzem Vortexen und 3 min Inkubation bei RT, wurde die Suspension zentrifugiert (12000 rpm, 15 min, -4 °C). Anschließend wurde die obere wässrige Phase in 500 µl 100 % Isopropanol präzipitiert, für 10 min bei RT inkubiert und erneut zentrifugiert (12000 rpm, 10 min, -4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml 75 % Ethanol gelöst und zentrifugiert (7500 rpm, 5 min, -4 °C). Erneut wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 25 µl RNasefreiem Wasser resuspendiert und die RNA Konzentration photometrisch bestimmt. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

Für nachfolgende Versuche erfolgte die Synthese der cDNA aus der isolierten RNA nach dem Protokoll der Kits (Reverse Transcription Kit QuantiTect0/ M-MLV Reverse Transcriptase).

### **2.2.8 Primerdesign, Polymerasekettenreaktion und DNA Gelelektrophorese**

#### **2.2.8.1 Primerdesign**

Die Primersequenzen für anschließende Amplifikationen wurden mit Hilfe der Software „Primer - Universal ProbeLibrary Assay Design Center“ entworfen und von der Firma Life Technologies GmbH hergestellt. Gelöst wurden die Primer in deionisiertem Wasser. Nach Aliquotieren in 10 µM Arbeitsstocks wurden diese bei -20 °C gelagert. Die optimale Annealing Temperatur der Primer (RUNX2: 60.5 °C, MSX2: 62.5 °C, Col1a1: 60.0 °C) konnte mittels Gradienten-PCR ermittelt werden.

### 2.2.8.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgte mit Hilfe des PCR Master Mix (2X) nach folgendem Pipettierschema und PCR Programm im Thermocycler.

**Tabelle 8: Standard PCR Pipettierschema für die DNA Analyse**

Pipettierschema	Konzentration	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
Deionisiertes Wasser	-	7.5
PCR Master Mix (2X) (Taq DNA Polymerase)	0.05 U/ $\mu\text{L}$	10
Forward Primer	10 $\mu\text{M}$	0.25
Reverse Primer	10 $\mu\text{M}$	0.25
DNA Template	50 ng/ $\mu\text{l}$	2.0
<b>Gesamtvolumen</b>		<b>20.0</b>

**Tabelle 9: Standard PCR Programm für die DNA Analyse**

PCR Programm	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Zeit in Sekunden	Zyklen
Vorheizen	95	300	
Denaturierung	95	30	
Primer Annealing	60.0, 60.5, 62.5	30	40
Elongation	72	30	
Extension	72	300	
Kühlung	4	$\infty$	

### 2.2.8.3 DNA Gelelektrophorese

Nach erfolgter PCR wurde mittels Gelelektrophorese ermittelt, ob die erhaltenen PCR Amplikons die erwarteten Basenpaarlängen aufweisen. Hierfür wurde ein 2 % Gel mit 1 x TAE Puffer, Agarose und Ethidiumbromid gegossen. Die DNA wurde mit 6X Loading Dye gemischt und mit einem DNA Größenmarker auf das getrocknete Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA Fragmente erfolgte mittels 1 x TAE Puffer bei 140 V, 280 W für ca. 35 min. Die anschließende Visualisierung der Nukleinsäuren geschah durch den Alpha Innotech's Fluorchem Imager.

### **2.2.9 Apoptoseassay**

Zur Ermittlung der Apoptose der behandelten hVSMCs wurde auf die TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) Methode in Kombination mit einer Färbung durch 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) zurückgegriffen. Zu Beginn erfolgte die Aussaat von je 5000 hVSMCs pro Kammer auf ein 8-Kammerslide mit nachfolgender Behandlung mit dem 231 Medium (in Kombination mit Smooth Muscle Growth Supplement 20X und 5 % Penicillin – Streptomycin). Nach Erreichen der mikroskopischen Konfluenz erfolgte die Behandlung der hVSMCs mit den zu untersuchenden Behandlungsgruppen (Mediumwechsel alle zwei Tage) und nach 5, 7 oder 9 Tagen wurde schließlich die Apoptoserate bestimmt.

Hierfür wurden die Slides einmalig mit 1 x PBS gewaschen und anschließend kurz luftgetrocknet. Daraufhin erfolgte die Fixierung der Zellen durch einstündige Inkubation mit 4 % PFA bei RT. Die Zellen sollten danach 3 x gewaschen (1 x PBS) und mittels 100 µl Permeabilisationslösung pro Kammer für 5 min bei 4 °C permeabel gemacht werden. Nach erneutem Waschen der Zellen mit 1 x PBS (2 x), wurde diesen für 75 min 50 µl/Kammer TUNEL-Reaktionsmix zur Färbung hinzugegeben und anschließend erneut mit 1 x PBS (2 x) gewaschen. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde eine Negativkontrolle mit lediglich einer Label-Lösung und eine Positivkontrolle durch 10 min Inkubation mit rekombinanter DNase 1 (3000 U/ml) mitgeführt.

Zur Visualisierung der nukleären DNA wurde nun noch eine DAPI Färbung angeschlossen. 100 µl einer 1:1000 Verdünnung (DAPI-Färbereagenz: 1 x PBS) wurden für 45 sek pro Kammer auf die Slides pipettiert und diese anschließend 2 x mit 1 x PBS gewaschen. Nach Beschichtung mittels Mounting Medium wurden Aufnahmen im DAPI und FIT-C Kanal, sowie als fusioniertes Merge Bild mittels Fluoreszenzmikroskop, generiert.

### **2.2.10 Statistische Analyse**

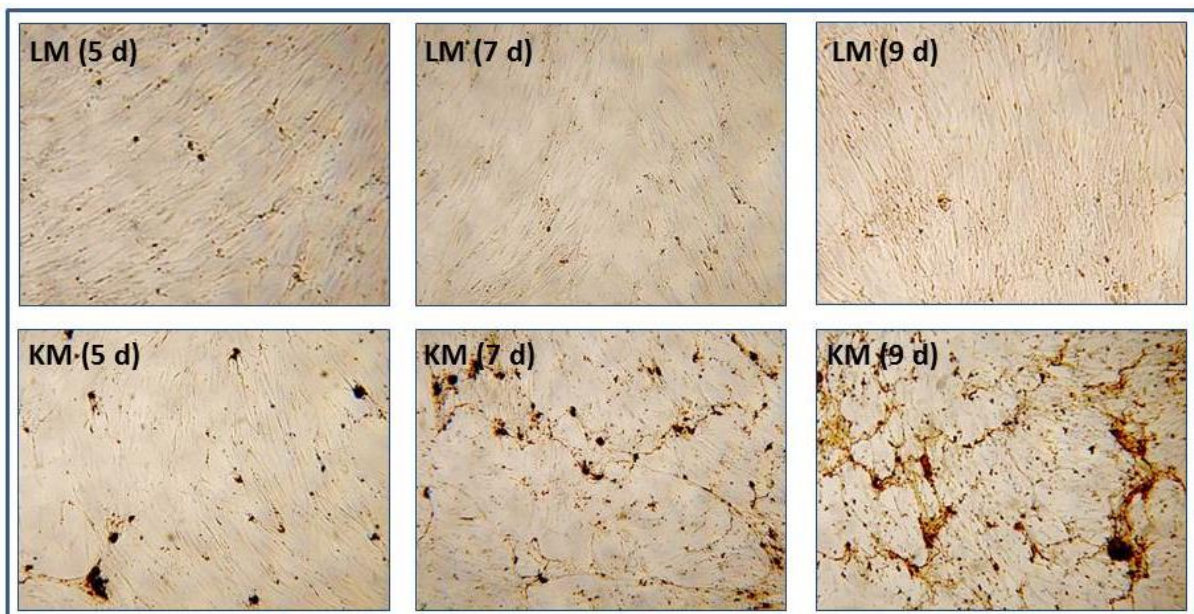
Zuerst wurden die Daten auf Normalverteilung untersucht. Bei Normalverteilung wurde mit einem t-Test mit Welch's-Correction, bzw. bei mehreren Gruppen mit dem ANOVA (+ Dunn's, Dunnet oder Tukey Test) gearbeitet. Bei nicht normalverteilten Gruppen erfolgte die Auswertung mit dem Mann-Whitney-U Test, respektive dem Kruskal-Wallis-Test (+ Dunn's, Dunnet oder Tukey Test). Um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden Versuche bei denen eine Quantifizierung erfolgte mindestens dreimal ( $n \geq 3$ ) und Versuche ohne Quantifizierung mindestens zweimal ( $n \geq 2$ ) wiederholt.

Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert kleiner als 0.05 (\*  $p \leq 0.05$ ) angesehen. Die abgebildeten Diagramme sind mit Standardfehler dargestellt. Zur Ermittlung der Signifikanzniveaus und zur Visualisierung der Daten wurde mit der GraphPad Prism 7 Software gearbeitet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Kalzifikationsassay

In dieser Versuchsreihe wurde zunächst ermittelt, wie sich urämisch exponierte hVSMCs, im Vergleich zu hVSMCs die physiologischen Serumkonzentrationen ausgesetzt waren, verhielten (Abb. 3). Urämische Bedingungen (KM), die eine CKD-MBD partiell simulieren sollten, wurden durch Hinzugabe von Calcium ( $C = 2.4 \text{ mmol/l}$ ) und anorganischem Phosphat ( $C = 2.7 \text{ mmol/l}$ ) zum Leermedium (LM) erzielt. Die physiologischen Bedingungen wurden durch ein Leermedium (LM) erreicht. Nach 5-, 7- und 9-tägiger Exposition erfolgte die Visualisierung des Kalzifikationsniveaus der behandelten hVSMCs mittels von Kossa Färbung.



**Abbildung 3: Kalzifikationsassay behandelter hVSMCs über 5, 7 und 9 Tage.**

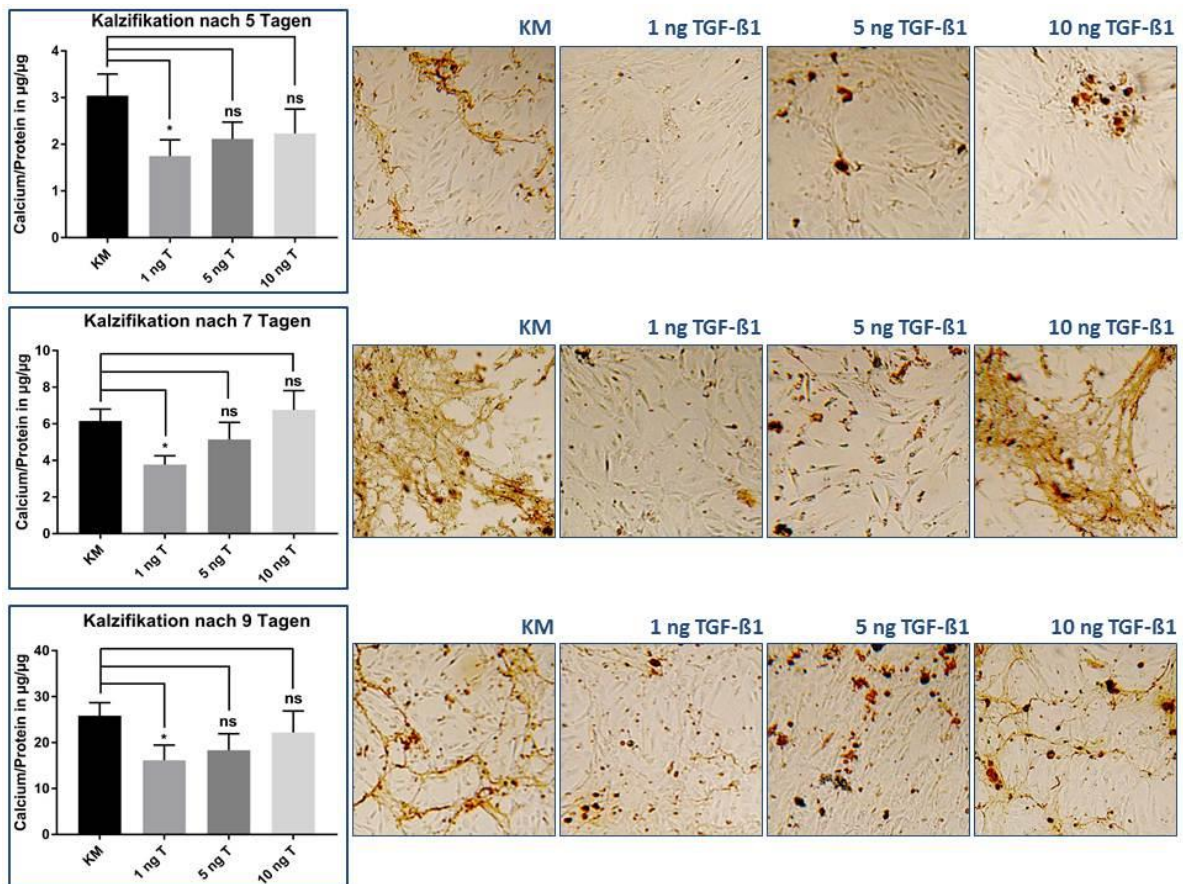
Als Behandlungsgruppen dienten eine mit Leermedium (LM) behandelte Kontrollgruppe und eine repräsentativ für die CKD-MBD mit erhöhten Calcium- und Phosphatwerten (KM) exponierte Gruppe von hVSMCs. Die Visualisierung der Kalzifikation erfolgte mittels von Kossa Färbung.

In den mit Leermedium (LM) behandelten Zellen kam es über alle drei Messzeitpunkte zu kaum detektierbarer Kalzifikationen der hVSMCs. Auch die von Kossa Färbung deutete in den LM-behandelten Zellen auf keine mikroskopisch sichtbaren Kalzifikationen hin. Demgegenüber repräsentierten sich die KM-behandelten Zellen unter dem Mikroskop mit sowohl zellauflagernden, als auch zellübergreifenden Verkalkungsherden. Diese Verkalkungsherde waren bereits nach 5-tägiger Exposition deutlich sichtbar und nahmen

mit zunehmender Expositionsdauer zu, sodass nach 9 Tagen eine flächenhafte Verkalkung mit beginnendem Zelluntergang imponierte. Diese sowohl visuelle als auch quantitative Kalzifikation präsentierte bis zum 9. Expositionstag einen starken Progress. Die Kalzifikation der behandelten hVSMCs wurde mittels O-Cresolphthalein-Komplexon-Methode quantifiziert, aufgrund der fehlenden Kalzifikation der mit LM behandelten Zellen hier jedoch nicht abgebildet.

### **3.2 Konzentrationsabhängiger Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die Kalzifikation**

Da die Wirkung von TGF- $\beta$ 1 auf die Kalzifikation vaskulärer glatter Muskelzellen kontrovers diskutiert wird und seine inhibierende bzw. stimulierende Wirkung nicht abschließend geklärt ist, wurde zunächst die Wirkung von TGF- $\beta$ 1 in urämischen hVSMCs ermittelt. Als Positivkontrolle (Urämie Simulation) dienten mit Kalzifikationsmedium (KM) behandelte hVSMCs. Um den Effekt von TGF- $\beta$ 1 unter diesen urämischen Bedingungen zu verifizieren, wurden hVSMCs in verschiedenen Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 (1, 5 und 10 ng/ml) kombiniert und mit KM exponiert (Abb. 4). Die visuelle (von Kossa Färbung) und quantitative (O-Cresolphthalein-Komplexon-Methode) Auswertung der Zellen erfolgte nach 5-, 7- und 9-tägiger Probenexposition.



**Abbildung 4: Konzentrationsabhängiger Effekt von TGF-β1 auf KM-exponierte hVSMCs.**

Als Positivkontrolle dienten hVSMCs, die einem Kalzifikationsmedium (KM) exponiert wurden. Drei Behandlungsgruppen ansteigender TGF-β1 Konzentrationen (1, 5 und 10 ng/ml) + KM dienten zur Untersuchung eines konzentrationsabhängigen Assays. Visualisiert wurden die behandelten Zellen nach 5-, 7- und 9-tägiger Probenexposition mittels von Kossa Färbung. Die Quantifizierung der Kalzifikation erfolgte nach selbiger Expositionsdauer durch O-Cresolphthalein-Komplexon-Methode. Signifikante Ergebnisse ( $p \leq 0.05$ ) wurden mit \*, nicht signifikante Ergebnisse mit ns dargestellt.

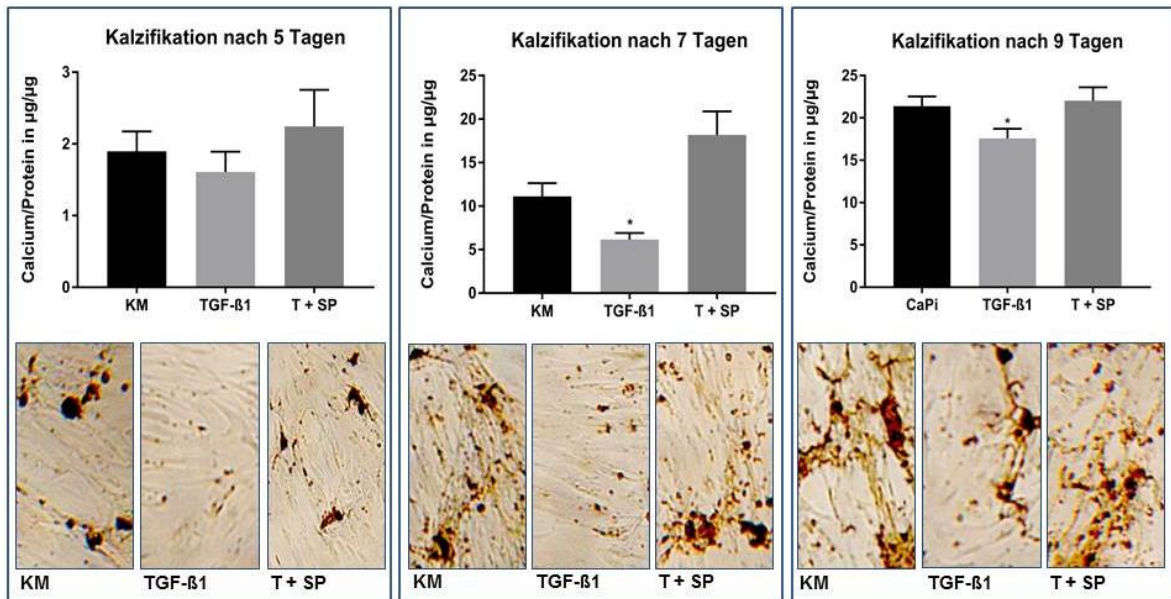
Wie in 3.1 kam es auch in dieser Versuchsreihe nach Exposition der hVSMCs zu starken Kalzifikationen der KM-behandelten Zellen, die visuell und quantitativ nachzuweisen waren. Diese Kalzifikationen nahmen mit Zunahme der Expositionsdauer zu und präsentierten nach 9 Tagen ihr Maximum. In den mit TGF-β1 (unabhängig von den Konzentrationen) + KM-behandelten hVSMCs konnte ebenfalls ein Anstieg der Kalzifikation mit zunehmender Expositionsdauer beobachtet werden. Die mit hohen TGF-β1 Konzentrationen (5 und 10 ng/ml) behandelten hVSMCs präsentierten eine geringe, nicht signifikante Reduktion der Kalzifikation im Vergleich zu den KM-behandelten Zellen. Wurden die hVSMCs hingegen einer geringen TGF-β1 Konzentration (1 ng/ml) ausgesetzt, so bot sich nach 5, 7 und 9 Tagen eine signifikante Reduktion der Kalzifikation im Vergleich zu den mit KM behandelten hVSMCs. Diese Kalzifikationsinhibition konnte sowohl visuell

als auch quantitativ festgestellt werden. Am stärksten ausgeprägt war die Reduktion/Inhibition der Kalzifikation nach Behandlung der hVSMCs mit 1 ng/ml TGF- $\beta$ 1, weshalb in nachfolgenden Versuchen mit dieser Konzentration weiter verfahren wurde.

### **3.3 Inhibition von SAPK/JNK begünstigt vaskuläre Kalzifikation TGF- $\beta$ 1-exponierter hVSMCs**

Die Kalzifikationsinhibition geringer TGF- $\beta$ 1 Konzentrationen konnte bestätigt werden. TGF- $\beta$ 1 ist im menschlichen Körper ubiquitär verbreitet und sorgt für zahlreiche Signalinteraktionen. Der SAPK/JNK Signalweg, der als eigenständige Signalkaskade zur Familie der MAPK Signalwege gehört, wird unter anderem durch eine TGF- $\beta$ 1-vermittelte Phosphorylierung reguliert. Nachfolgendes Experiment soll Aufschluss darüber geben, ob der kalzifikationsinhibierende Effekt von TGF- $\beta$ 1 über die SAPK/JNK Signalkaskade vermittelt wird. Hierfür wurde eine Versuchsreihe etabliert, bei der als Positivkontrolle KM-behandelte hVSMCs eine CKD-MBD simulieren. Als zweite Behandlungsgruppe dienten TGF- $\beta$ 1 (1 ng/ml) + KM-behandelte Zellen. Zusätzlich zum KM + TGF- $\beta$ 1 erhielt die dritte Behandlungsgruppe den selektiven SAPK/JNK Inhibitor SP600125 (3  $\mu$ mol). Der Kalzifikationsstatus der behandelten hVSMCs wurde nach 5-, 7- und 9-tägiger Exposition quantitativ (O-Cresolphthalein-Komplexon-Methode) und visuell (von Kossa Färbung) eruiert (Abb. 5).





**Abbildung 5: Einfluss von SAPK/JNK Inhibition auf die Kalzifikation TGF-β1-exponierter hVSMCs.**

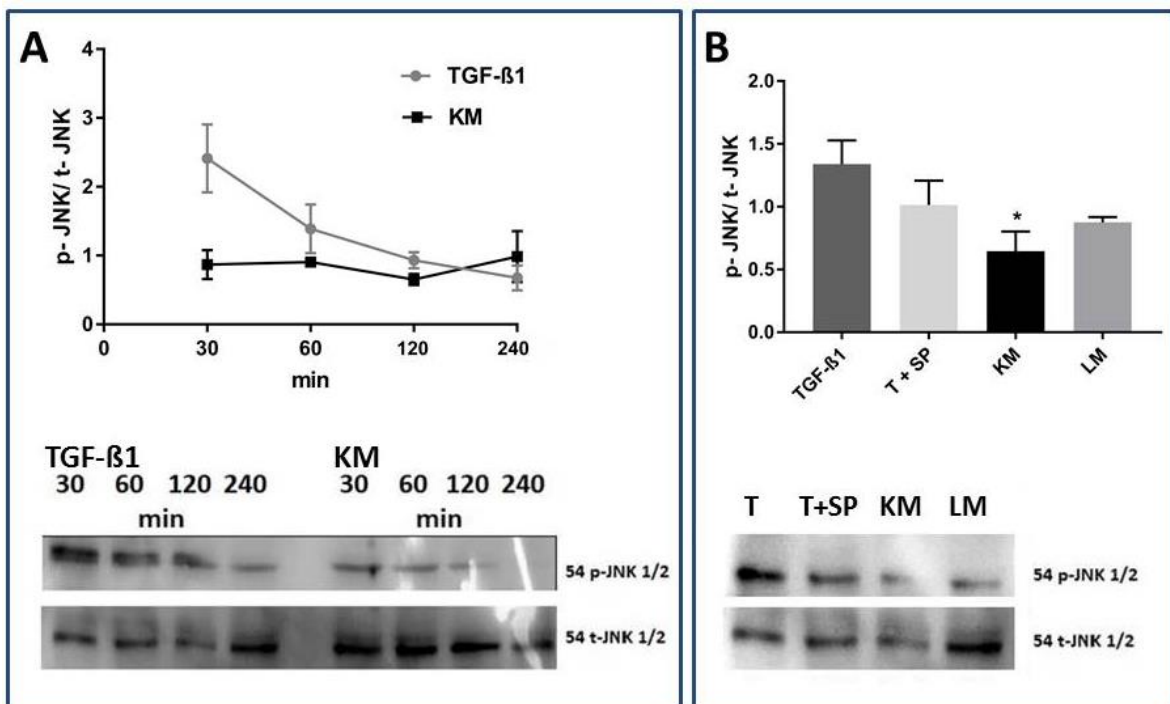
Als Positivkontrolle dienten KM-exponierte hVSMCs, die eine signifikant erhöhte, zeitlich progrediente Kalzifikation, verglichen mit TGF-β1 + KM-exponierten Zellen, aufwiesen. Der kalzifikationsinhibierende Effekt von TGF-β1 wurde durch Behandlung des SAPK/JNK Inhibitors SP600125 (+ TGF-β1 + KM) aufgehoben. Die hVSMCs dieser Behandlungsgruppen zeigten tendenziell sogar eine höhere Kalzifikation als KM-behandelte Zellen. Visualisierung (von Kossa Färbung) und Quantifizierung (O-Cresolphthalein-Komplexon-Methode) erfolgte nach 5-, 7- und 9-tägiger Exposition. Signifikante Ergebnisse ( $p \leq 0.05$ ) wurden mit \* dargestellt.

In den KM-exponierten hVSMCs konnte eine visuelle und quantitativ gesteigerte Kalzifikation nachgewiesen werden, die vom 5. bis zum 9. Expositionstag einen progredienten Verlauf präsentierte. Die hVSMCs, die mit TGF-β1 + KM behandelt waren, wiesen zu allen drei Messzeitpunkten (5, 7 und 9 Tage) geringere Kalzifikationslevel als die KM-behandelten Zellen auf, was bereits in 3.2 untersucht wurde. Wurden die Zellen zusätzlich mit dem SAPK/JNK Inhibitor SP600125 behandelt, so imponierte eine verstärkt auftretende Kalzifikation der hVSMCs. Der kalzifikationsinhibierende Effekt von TGF-β1 wurde durch Hinzugabe von SP600125 aufgehoben. SP600125-behandelte Zellen zeigten sogar eine stärkere Kalzifikation, als sie in den KM-behandelten Zellen vorzufinden war. Dieser Effekt wurde nach 5, 7 und 9 Tagen erzielt.

### 3.4 Einfluss von TGF-β1 auf die Phosphorylierung von SAPK/JNK in hVSMCs

Der kalzifikationsinhibierende Effekt von TGF-β1 wurde durch Exposition des SAPK/JNK Inhibitors SP600125 aufgehoben. Durch Blockierung der SAPK/JNK Signalkaskade konnte TGF-β1 dessen protektiv-kalzifikationsinhibierende Wirkung nicht aufrechterhalten. Nun sollte die Frage geklärt werden, ob diese protektiv-kalzifikationsinhibierende Wirkung von

TGF- $\beta$ 1 über die Phosphorylierung und somit Aktivierung der SAPK/JNK Signalkaskade, welche Downstream von TGF- $\beta$ 1 liegt, vermittelt wird. Deshalb wurde ein Modell etabliert, bei dem die Behandlungsgruppen nach Exposition auf deren SAPK/JNK Proteinlevel und somit dessen Phosphorylierungsstatus mittels Western Blot untersucht wurden (Abb. 6). Dieser Phosphorylierungsstatus diente als SAPK/JNK Aktivitätsmarker. SAPK/JNK liegt in Zellen als gesamtes, total-JNK und in seiner aktiven, phosphorylierten Form (phospho-JNK) vor. Um Rückschlüsse auf die tatsächliche SAPK/JNK Aktivität der behandelten hVSMCs zu bekommen, wurden die phosphorylierten SAPK/JNK Proteinlevel gegen das total-JNK Proteinlevel normalisiert. Die hVSMCs wurden für 30, 60, 120 und 240 min den beiden Behandlungsgruppen KM (Calcium: C = 2.4 mmol/l, Phosphat: C = 2.7 mmol/l) und TGF- $\beta$ 1 (KM + 1 ng/ml TGF- $\beta$ 1) ausgesetzt, bevor der Proteinstatus durch Western Blot analysiert wurde.



**Abbildung 6: Phosphorylierte- und gesamte SAPK/JNK Proteinlevel exponierter hVSMCs.**

A: Zur Verifizierung, nach welcher Expositionszeit das SAPK/JNK Proteinlevel ihr Maximum erreicht, wurde zunächst eine zeitabhängige Exposition der hVSMCs durchgeführt. Hierfür wurden nach 30-, 60-, 120- und 240-minütiger Probenexposition die Proteine isoliert und phosphorylierte (p-JNK) sowie gesamte (t-JNK) SAPK/JNK Proteinlevel mittels Western Blot ermittelt. B: Da die SAPK/JNK Blots ihr Maximum nach 30 min Probenexposition aufwiesen, wurde für die nachfolgende Exposition mit den Proben T (KM + TGF- $\beta$ 1), T+SP (KM + TGF- $\beta$ 1 + SP600125), KM (Kalzifikationsmedium) und LM (Leermedium) eine 30-minütige Exposition gewählt. Nach erfolgtem Western Blot wurden die Ergebnisse quantifiziert und signifikante Ergebnisse ( $p \leq 0.05$ ) wurden mit \* dargestellt.

In den KM-exponierten hVSMCs wurde ein hohes Proteinlevel der total-JNK und ein geringer SAPK/JNK Phosphorylierungsstatus (p-JNK) bestimmt. Das p-JNK und t-JNK Proteinlevel war nach 30 min am höchsten und zeigte nach 60, 120 und 240 min eine kontinuierliche Regredienz. Bei den TGF- $\beta$ 1 (+ KM)-exponierten hVSMCs konnte eine gesteigerte SAPK/JNK Phosphorylierung (p-JNK) nach TGF- $\beta$ 1-Behandlung beobachtet werden. Diese Phosphorylierung nahm ebenfalls mit zunehmender Expositionsdauer ab. Auch bei den TGF- $\beta$ 1-exponierten Zellen war eine t-JNK Expression gegeben, die sich mit Zunahme der Expositionsdauer steigerte. Nach Normalisierung der p-JNK Proteinlevel gegen den t-JNK Proteingehalt zeigten sich signifikant erhöhte SAPK/JNK Level bei den TGF- $\beta$ 1 (+ KM)-behandelten Zellen, verglichen mit den lediglich mit KM behandelten Zellen (\*  $p \leq 0.05$ ). Im nachfolgenden Experiment, bei dem eine Behandlungsgruppe zusätzlich mit dem SAPK/JNK Inhibitor exponiert wurde, konnte bei den mit TGF- $\beta$ 1 behandelten Zellen (T) erneut ein erhöhtes SAPK/JNK Proteinlevel, verglichen mit den mit KM behandelten Zellen, reproduziert werden. Die hVSMCs, die mit dem SAPK/JNK Inhibitor SP600125 (KM + TGF- $\beta$ 1 + SP600125, T + SP) behandelt wurden, zeigten im Western Blot eine starke Reduktion der Proteinlevel, verglichen mit den mit TGF- $\beta$ 1 (T) behandelten Zellen.

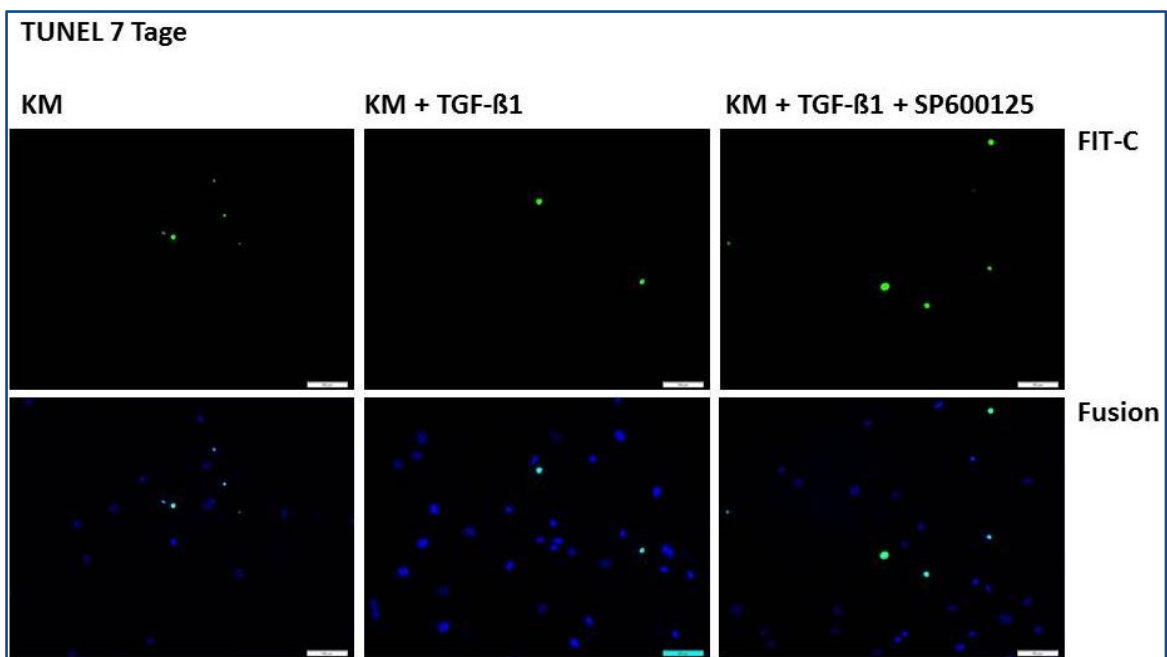
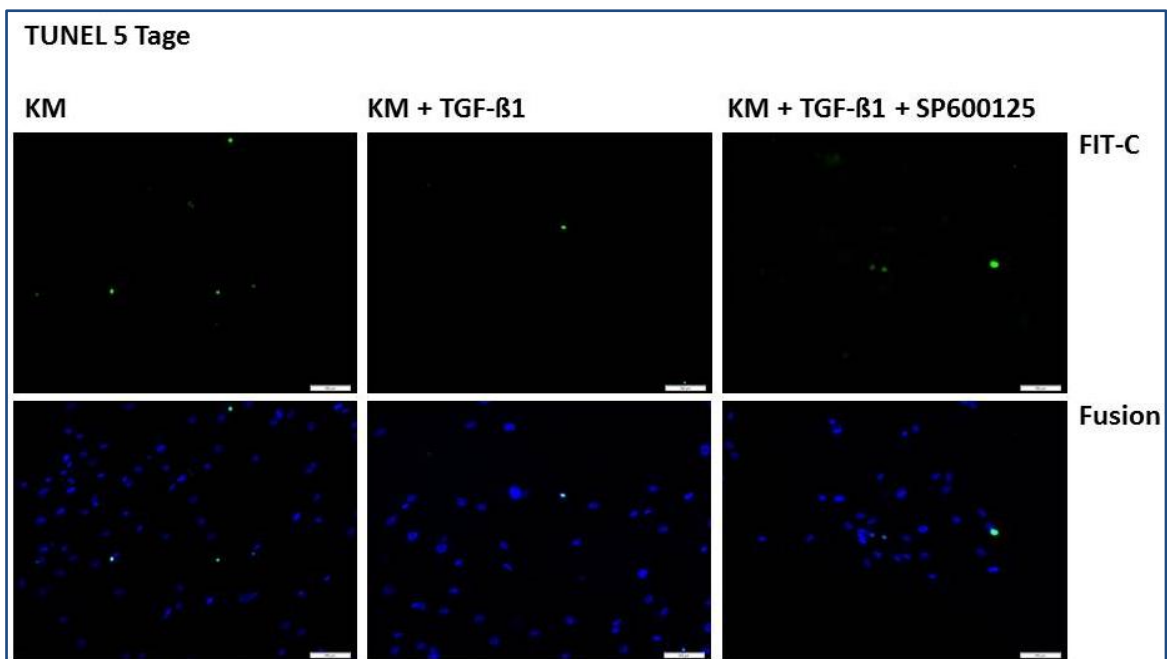
### **3.5 TGF- $\beta$ 1 reduziert die Apoptose in kalzifizierenden hVSMCs**

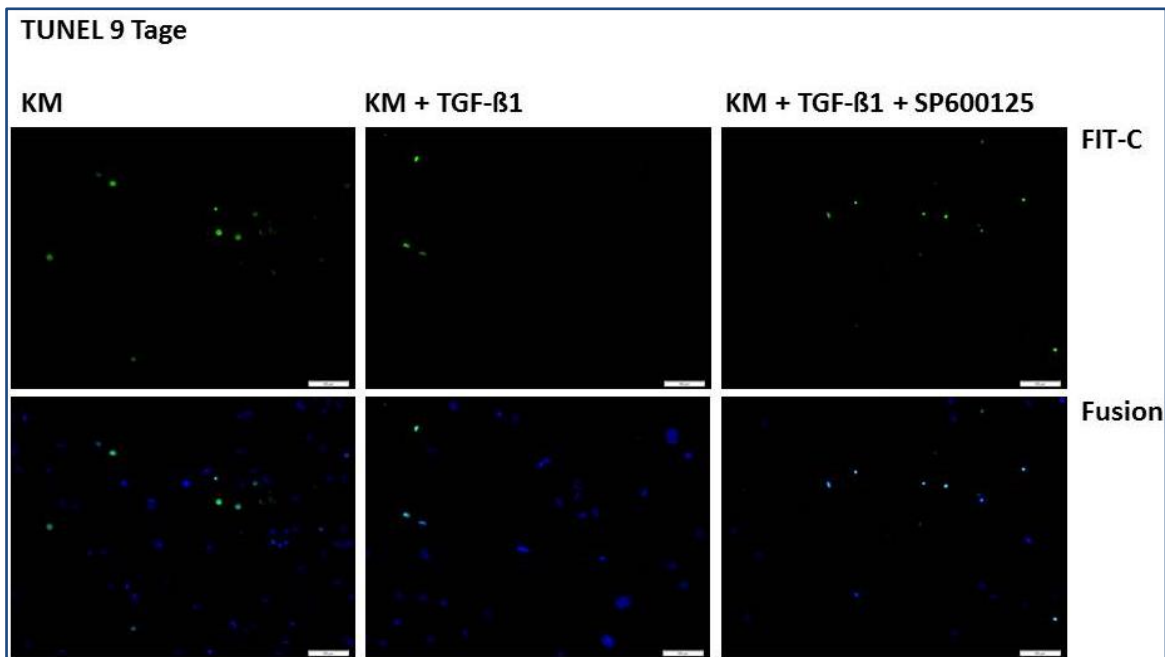
Im folgenden Versuch wurde geklärt, welchen Einfluss TGF- $\beta$ 1 in kalzifizierenden hVSMCs auf die Apoptose nimmt. Außerdem wurde geklärt, ob pro- bzw. anti-apoptotische Effekte von TGF- $\beta$ 1 über den SAPK/JNK Signalweg vermittelt werden.

Zur Eruiierung der Apoptoserate wurden die behandelnden hVSMCs mittels TUNEL Assay untersucht (Abb. 7). Als Behandlungsgruppen dienten KM-behandelte hVSMCs (2.4 mmol/l Calcium + 2.7 mmol/l Phosphat), TGF- $\beta$ 1-behandelte Zellen (1 ng/ml TGF- $\beta$ 1 + KM), sowie zusätzlich mit 20  $\mu$ mol des SAPK/JNK Inhibitors SP600125 (TGF- $\beta$ 1 + KM + SAPK/JNK)-exponierte Zellen. Nach 5-, 7- und 9-tägiger Probenexposition der behandelten hVSMCs erfolgte die Ablichtung und Auswertung im FIT-C und DAPI Kanal. Zur Sichtkontrolle apoptotischer Zellkörper mit den zugehörigen hVSMCs erfolgte eine Fusion der beiden Kanäle.

Bereits nach 5-tägiger Exposition konnten in allen Behandlungsgruppen apoptotische Zellen beobachtet werden. Bei den KM-behandelten, sowie den mit KM + TGF- $\beta$ 1 +

SP600125 behandelten Zellen imponierten stark gesteigerte Apoptoseraten. Im Vergleich dazu gingen in den KM + TGF- $\beta$ 1-behandelten hVSMCs deutlich weniger Zellen in den programmierten Zelltod (weniger Apoptosekörperchen pro Gesichtsfeld). Die Apoptose dieser TGF- $\beta$ 1-behandelten Zellen war auch nach 7 und 9 Tagen deutlich reduziert, vor allem im Vergleich zu den beiden anderen Behandlungsgruppen. Grundsätzlich war allen Behandlungsgruppen gleich, dass mit Zunahme der Expositionsdauer (5, 7, 9 Tage) auch eine Zunahme der Apoptose zu detektieren war.



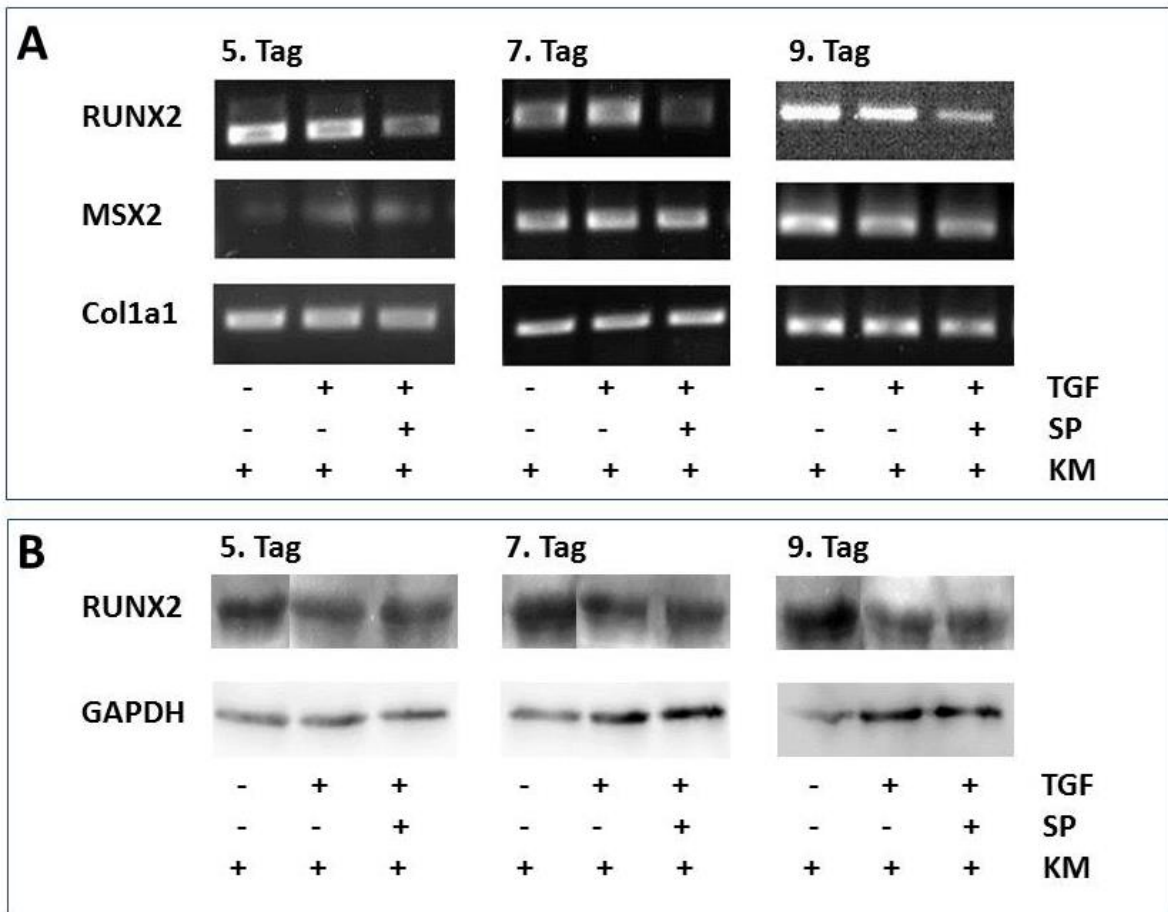


**Abbildung 7: Apoptoseassay behandelter hVSMCs.**

Die hVSMCs wurden für 5, 7 und 9 Tage mit folgenden Behandlungsgruppen exponiert und anschließend im FIT-C- sowie im DAPI-Kanal belichtet und als Fusionsbild abgebildet: KM (2.4 mmol/l Calcium + 2.7 mmol/l Phosphat), KM + TGF- $\beta$ 1 (KM + 1 ng/ml TGF- $\beta$ 1), KM + TGF- $\beta$ 1 + SP600125 (KM + TGF- $\beta$ 1 + 20  $\mu$ mol SP600125). Apoptosekörperchen als grünliche Signale erkennbar.

### 3.6 Einfluss vaskulärer Kalzifikation auf die osteogene Transdifferenzierung in hVSMCs

Neben der Apoptose repräsentiert auch die osteogene Transdifferenzierung vaskulärer glatter Muskelzellen eine Ursache der Mediakalzifikation. Im folgenden Experiment sollte geklärt werden, ob es in hVSMCs zu Transdifferenzierungsprozessen hin zu osteoblastären Zellen kommt. Außerdem sollte eine mögliche Einflussnahme von TGF- $\beta$ 1 auf diese osteogene Differenzierung bestimmt werden. Zur Verifizierung wurde zunächst auf transkriptioneller Ebene mittels PCR untersucht, ob die behandelten hVSMCs die Gene der osteogenen Transdifferenzierungsmarker RUNX2, MSX2 und Col1a1 exprimieren (Abb. 8 A). Nachfolgend sollte mittels Western Blot untersucht werden, ob es neben der Geneexpression auch zur Translation und schließlich zum Proteinnachweis der osteogenen Transdifferenzierungsmarker kommt (Abb. 8 B). Weiterhin war es Ziel zu ermitteln, ob es zu quantitativen Unterschieden der Proteinlevel durch die verschiedenen Behandlungsgruppen kommt. Alle Versuche wurden nach 5-, 7- und 9-tägiger Exposition mit den Behandlungsgruppen von Abbildung 8 durchgeführt.



**Abbildung 8: Transdifferenzierung behandelter hVSMCs hin zu osteoblastären Zellen.**

A: Mittels PCR sollte untersucht werden, ob die Gene RUNX2, MSX2 und Col1a1 nach 5, 7 und 9 Tagen Probenexposition in den hVSMCs exprimiert wurden. B: Daraufhin erfolgte mittels Western Blot die Quantifizierung der Proteinexpression des osteogenen Markers RUNX2. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

Zunächst konnte in allen Behandlungsgruppen eine Genexpression aller drei untersuchten osteogenen Differenzierungsmarker RUNX2, MSX2 sowie Col1a1 verzeichnet werden. Diese Genexpression zeichnete sich nach 5, 7 und 9 Tagen ab (Abb. 8 A). Des Weiteren wurde in allen drei Behandlungsgruppen das Protein RUNX2 nach 5-, 7- und 9-tägiger Exposition exprimiert. Außerdem ist zu erkennen, dass in den KM-behandelten Zellen die Expression des osteogenen Markers am prominentesten zu erkennen war. Somit konnte nicht nur auf Gen-Ebene, sondern auch eine Proteinexpression des osteogenen Differenzierungsmarkers aller behandelten hVSMCs festgestellt werden.

## 4 Diskussion

### Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

- hVSMCs zeigen nach Calcium-Phosphat Exposition eine Kalzifikation, die mit zunehmender Expositionsdauer progredient ist
- TGF- $\beta$ 1 vermittelt einen konzentrationsabhängigen, kalzifikationsinhibierenden Effekt – nur die niedrige Konzentration (1 ng/ml) TGF- $\beta$ 1 wirkt signifikant kalzifikationsinhibierend
- Kalzifikationsinhibierende Effekte von TGF- $\beta$ 1 werden durch den SAPK/JNK Inhibitor SP600125 aufgehoben und somit über SAPK/JNK Signaling mitvermittelt
- TGF- $\beta$ 1 Exposition führt zu einer gesteigerten Phosphorylierung und somit Aktivierung von SAPK/JNK
- Apoptose in Calcium-Phosphat-exponierten hVSMCs wird durch TGF- $\beta$ 1 reduziert – Die Apoptoserate steigt bei simultaner SAPK/JNK Inhibition an
- Osteogene Differenzierungsmarker werden auf Gen- und Proteinebene in exponierten hVSMCs exprimiert und sind mitbeteiligt an dessen Kalzifikation

Noch vor den malignen Tumorerkrankungen stehen weltweit seit vielen Jahren die kardiovaskulären Erkrankungen auf Platz eins der Haupttodesursachen [77]. Die chronische Nierenerkrankung repräsentiert zwar eine Pathologie des nephrologischen Formenkreises, die Folgen dieser Erkrankung stehen aber in unmittelbarer Korrelation mit der hohen kardiovaskulären Mortalität. Patienten mit CKD versterben primär nicht an unmittelbar nephrologischen Komplikationen, sondern an den aus dieser Krankheit hervorgehenden kardiovaskulären Sekundärererscheinungen. Durch eine zunehmende Einschränkung der Nierenfunktion kommt es zu Verschiebungen in Regelkreisen, wie etwa dem Wasser- und Elektrolythaushalt, dem Blutdruck oder dem Hormonregulationssystem. Als Folge einer chronischen Verschiebung dieser Regelkreise und schließlich erschöpften Kompensationsmechanismen resultiert eine Dysbalance, die im vaskulären System zu Umbauprozessen führt [78]. Humane vaskuläre glatte Muskelzellen repräsentieren eine wichtige Stellschraube in der Pathophysiologie dieses vaskulären Remodelings. Wesentliches Ziel dieser Arbeit war es zu erforschen, wie der Progress des vaskulären Remodelings, insbesondere der vaskulären Kalzifikation reguliert wird und ob eine Reduktion dieser Kalzifikation über gezielte Einflussnahme möglich ist.

#### **4.1 Auswahl des Modells der vaskulären Kalzifikation**

Für die Erforschung vaskulärer Umbauprozesse als Sekundärererscheinung der CKD stehen verschiedene Modelle zur Verfügung, bei denen es zunächst galt, das passende auszuwählen und einen entsprechenden Versuchsaufbau zu etablieren. Als ein mögliches Modell steht die *in vitro* Zellkultur zur Auswahl. Hierbei kann sowohl in ein humanes, als auch in ein tierisches Zellkulturmodell unterschiedlicher Spezies subklassifiziert werden. Das Zellkulturmodell bietet die Möglichkeit, isolierte Zellen fast jeden Ursprungs, wie beispielsweise die humanen vaskulären glatten Muskelzellen aus den Koronararterien, zu züchten und sowohl die Physiologie als auch die Pathophysiologie dieser Zellreihe gezielt zu erforschen. Nährstoffversorgung, Temperatur, Umgebungsmilieu und andere mögliche Einfluss- und Störfaktoren können standardisiert werden. So kann eine gezielte Erforschung des Zellverhaltens mit einem hohen Maß an Reproduzierbarkeit gewährleistet werden. Nichtsdestotrotz repräsentiert diese Art des Versuchsaufbaus ein artifizielles System, das zwar experimentelle Rückschlüsse auf potenziell relevante *in vivo* Sachverhalte nahelegt, diese aber zur Abklärung der Übertragbarkeit einem Versuchssetting *in vivo*



bedürfen. Zusammenhängende biologische Prozesse können deshalb teils unzureichend auf den lebenden Organismus extrapoliert werden. Für dieses Setting steht das *in vivo* Tiermodell zur Verfügung. Ein Tiermodell ist essentiell vor Beginn klinischer Studien am Patienten, um möglichst physiologische *in vivo* Verhältnisse zu generieren. Häufig werden als *in vivo* Tiermodell Mäuse verwendet, bei denen je nach Setting genetisch modifizierte Tiere oder manipulierende Faktoren wie etwa eine 5/6 Nephrektomie, zur Generierung einer CKD, gewählt werden können [79]. An seine Grenzen stößt dieses Untersuchungsverfahren allerdings in der Betrachtung gezielter Expositionen und deren Auswirkungen auf eine singuläre Zellreihe, wie etwa den VSMCs. Außerdem handelt es sich beim Mausmodell um ein tierisches Setting, bei dem zwar *in vivo* Sachverhalte getätigt werden, eine Extrapolation der generierten Ergebnisse auf den Menschen aber durch viele genetische, epigenetische und andere grundlegende Unterschiede zwischen Tier und Mensch nicht zuverlässig zu gewährleisten ist. Weiterhin gelten für die Durchführung von Tierversuchen nach dem Tierschutzgesetz komplexere Anforderungen als im Zellkulturmodell. So muss ein Nachweis der Qualifikation der Experimentatoren, der Einhaltung strenger Haltungs- und Hygienestandards und vor allem auch der Berücksichtigung ethischer Aspekte in Bezug auf die Beziehung zwischen Mensch und Tier gewährleistet und verhältnismäßig sein [80].

Ein möglicher Kompromiss zwischen diesen beiden Modellen stellt die experimentelle Untersuchung am arteriell- humanen Gefäßring dar. Hierfür werden intakte Gefäßringe präpariert und anschließend unter sterilen Bedingungen weiter prozessiert. Diese Gefäßringe können sowohl tierischen als auch humanen Ursprungs sein. Neben der aufwändigen Gewinnung der Gefäßringe stellt auch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, unter anderem aufgrund der variierenden Lokalisation der gewonnenen Gefäßringe, einen Nachteil dar. Hierfür häufig verwendete abdominale Gefäßringe bestehen zwar grundsätzlich aus den selben Schichten wie koronararterielle Gefäße, jedoch variiert die Zusammensetzung dieser Schichten durch die unterschiedliche Lokalisation teils stark.

Da es sich bei den durchgeführten Experimenten um Grundlagenforschung mit begrenztem Erkenntnisstand auf diesem Gebiet handelt, fiel die Wahl des Modells auf die primäre, humane Zellkultur. Hierbei besteht der wesentliche Vorteil, dass die Wirkung generierter Ergebnisse direkt auf die exponierten Zellen der Koronararterien übertragen werden kann. Darüber hinaus bestand im Laboratorium bereits jahrelange Expertise beim Umgang mit

diesem Modell, auf deren Erkenntnisse aufgebaut werden konnte. Um eine möglichst hohe Validität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleisten zu können, wurden für die Experimente lediglich koronararterielle Zellen derselben Reihe, beschaffen vom selben Vertrieb und für die Ausführung der Versuche ausschließlich in Passage 4 – 7, verwendet. Nach entsprechender Auswahl des Zellkulturmodells konnte zu Beginn der Arbeit auf ein durch den Mitdoktoranden Jonas Engeßer bereits etabliertes Kalzifikationsmedium zurückgegriffen werden. Bei der Etablierung dieses Mediums wurde neben der Orientierung an einschlägiger Literatur darauf geachtet, die bei CKD-MBD abnormen Konzentrationen an Calcium und Phosphat zu generieren, welche zumindest in Hinsicht auf diese beiden Elektrolyte eine urämische Umgebung simulieren sollten. Orientierend an entsprechenden Publikationen wurde nach Vorversuchen eine Expositionsdauer von 5, 7 und 9 Tagen gewählt, bei denen eine starke Kalzifikation der hVSMCs bei noch erhaltener Vitalität derselbigen zu gewährleisten war.

#### **4.2 Vaskuläre Kalzifikation der hVSMCs durch Calcium-Phosphat Exposition**

Zunächst wurde die bereits bestehende Hypothese, dass gesteigerte Calcium- und Phosphatwerte im Serum/ Medium zu einer Kalzifikation humaner vaskulärer glatter Muskelzellen führen, bestätigt. Zur Generierung eines *in vitro* Kalzifikationsmediums zur Behandlung der hVSMCs wurde nach Recherche und Vorversuchen ein Kalzifikationsmedium etabliert, das den glatten Muskelzellen lebensfähiges Wachstum ermöglicht, unter gleichzeitiger Generierung einer Kalzifikation derselbigen. Hypothesen, dass es durch eine Dysbalance im Blutserum zu calciumreicher Deposition in der medialen Schicht arterieller Gefäße mit nachfolgend gravierenden kardiovaskulären Erkrankungen kommt, wurden bereits Anfang des 20. Jahrhunderts erforscht und sind bis heute Gegenstand aktueller Forschung [8, 81–83]. In dieser experimentellen Versuchsreihe konnte die bestehende Hypothese bestätigt und darüber hinaus gezeigt werden, dass die Kalzifikation mit zunehmender Expositionsdauer einen progredienten Verlauf aufweist. Mittels Färbung behandelter Zellen konnten die Calciumablagerungen visualisiert und somit gezeigt werden, welchen Einfluss eine Dysregulation der Calcium- und Phosphat-Homöostase auf die glatten Muskelzellen des vaskulären Systems ausübt. Gerade bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen sind diese Dysregulationen verantwortlich für die Sekundärpathologien und somit für die hohe Morbidität und Mortalität. In den mit

dem Kalzifikationsmedium behandelten Zellen konnten Verkalkungsherde festgestellt werden, die sich fischzugartig über viele hVSMCs erstreckten und zu konfluierenden Kalzifikationssspots führten. Im Vergleich dazu war die Konfluenz der unbehandelten hVSMCs mit zunehmender Behandlungsdauer visuell nicht regressiv. Dahingegen imponiert in den kalzifizierenden hVSMCs mit zunehmender Expositionsdauer des Kalzifikationsmediums ein stetiger Rückgang der Zellzahl mit Aufbruch des konfluierenden Zellrasens und entsprechendem Hinweis auf gesteigerten Zelluntergang. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass es durch das Kalzifikationsmedium zu einer toxischen Umgebung kommt, bei der ein Persistieren oder gar eine gesunde Zellproliferation der hVSMCs nicht ermöglicht werden kann.

#### **4.3 Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die vaskuläre Kalzifikation**

Die Zellen des Körpers werden über externe Einflüsse und regulierende Reize, die zum Wachstum, Umbau, Seneszens oder Apoptose führen, reguliert. Das Zytokin TGF- $\beta$ 1 stellt im Bereich der vaskulären Regulation einen zentralen Faktor dar. Glatte Muskelzellen, die einen wesentlichen Hauptbestandteil vaskulärer Strukturen repräsentieren, werden durch das in der unmittelbaren Umgebung vorherrschende Milieu reguliert. So leiten alternierende Konzentrationen plasmatischer Elektrolyte vaskuläre Veränderungen ein. Im Rahmen einer chronischen Nierenerkrankung kommt es etwa zur Hyperphosphatämie. Diese Erhöhung extrazellulären Phosphats führt folglich zur gesteigerten Produktion von TGF- $\beta$ 1 [60, 84].

TGF- $\beta$ 1 beeinflusste die vaskuläre Kalzifikation exponierter hVSMCs signifikant. Es konnte eine konzentrationsabhängige Beeinflussung von TGF- $\beta$ 1 sowohl auf qualitativ-visueller, als auch auf quantitativer Ebene festgestellt werden. Eine geringe Konzentration von TGF- $\beta$ 1 reduzierte die vaskuläre Kalzifikation signifikant, wohingegen höhere TGF- $\beta$ 1 Konzentrationen eine derartige Inhibition der Kalzifikation nicht gewährleisteten. Diese Kontinuität wurde nach unterschiedlicher Probenexpositionsdauer reproduziert und unterlag keinem singulären Ereignis. Effekte von TGF- $\beta$ 1, insbesondere im Bereich kardiovaskulärer Erkrankungen, sind bereits bekannt, wobei die finale Antwort auf die Frage eines protektiven, passiven oder aber destruktiven Einflusses von TGF-1 nicht abschließend geklärt ist [63]. Durch die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse konnten kalzifikationsinhibierende Effekte, begünstigt durch TGF- $\beta$ 1, bestätigt und darüber hinaus

eine konzentrationsabhängige Beeinflussung verifiziert werden. Diese signifikant alternierenden, konzentrationsabhängigen Effekte von TGF- $\beta$ 1 auf die Kalzifikation exponierter hVSMCs decken sich mit den in der Literatur kontrovers diskutierten protektiven vs. destruktiven Ergebnissen. In Publikationen beschriebene, kalzifikationsinhibierende Effekte wurden durch Exposition mit einer geringen Konzentration an TGF- $\beta$ 1 (1 ng/ml) erzielt. Demgegenüber wurde von prokalzifizierenden Effekten, insbesondere durch hohe TGF- $\beta$ 1 Konzentrationen, berichtet. Außerdem bezogen sich viele Publikationen, die solche Beobachtungen feststellten, auf die Verwendung tierischer Zellkulturmodelle, was die Übertragbarkeit auf eine humane Zellreihe nicht uneingeschränkt zulässt. Zudem wurden in Publikationen, die TGF- $\beta$ 1 einen prokalzifizierenden Effekt zusprechen, mit hohen Zellkulturpassagen (bis 13. Passage) gearbeitet. Dadurch könnten mögliche extrinsische Störfaktoren, wie eine fortschreitende osteogene Differenzierung, veränderte genetische Expressionsprofile, alternierende Proliferationsraten, gesteigerte Apoptoseanfälligkeit sowie der natürliche Prozess der replikativen Seneszenz die Kalzifikation begünstigt haben [66, 67, 85–88]. Bereits vor vielen Jahren konnte *in vivo* festgestellt werden, dass es bei humanen, koronararteriellen Erkrankungen zu erhöhten aktiven TGF- $\beta$ 1 Konzentrationen kommt und es darüber hinaus mit steigender Stenosierung der koronararteriellen Gefäße zu einem nahezu linearen Anstieg des aktiven TGF- $\beta$ 1 kommt. Diese Ergebnisse decken sich mit den in dieser Arbeit generierten konzentrationsabhängigen Effekten von TGF- $\beta$ 1 [69]. Unter Berücksichtigung der Erkenntnis, dass eine Hyperphosphatämie, wie sie bei der CKD und den daraus sekundär resultierenden Koronarerkrankungen beobachtet wird, die Produktion von TGF- $\beta$ 1 induziert, erscheint naheliegend, dass durch chronisch hohe Phosphatwerte stark erhöhte TGF- $\beta$ 1 Konzentrationen vorliegen. Normwertige extrazelluläre Phosphatwerte würden demnach eine normale oder lediglich leicht erhöhte TGF- $\beta$ 1 Konzentration induzieren, was wiederum einen kalzifikationsinhibierenden Effekt nach sich zieht [60, 69, 84].

#### **4.4 Interaktion zwischen TGF- $\beta$ 1 und MAPK Signalwegen**

Da die kalzifikationsinhibierende Wirkung geringer TGF- $\beta$ 1 Konzentrationen bestätigt werden konnte, sollte nachfolgend erforscht werden, über welche Regulationsmechanismen diese Wirkung erzielt wurde. c-JNK als einer von drei MAPK

Signalwegen repräsentiert eine Schlüsselrolle in zellregulierenden Mechanismen, wie Apoptose, Differenzierung und Transformation. Um eine mögliche Interaktion der TGF- $\beta$ 1 Signalkaskade mit einem weiter downstream gelegenen Signalweg zu erforschen, war ein wesentliches Ziel dieser Arbeit zu eruieren, inwiefern TGF- $\beta$ 1 und SAPK/JNK interagieren, und weiterführend mögliche Zusammenhänge hinsichtlich vaskulärer Kalzifikation zu klären. Zunächst konnte gezeigt werden, dass unter Inhibition der SAPK/JNK Signalkaskade mittels des selektiven Inhibitors SP600125 der kalzifikationsinhibierende Effekt von TGF- $\beta$ 1 aufgehoben wurde. Der in urämischen hVSMCs signifikant kalzifikationsinhibierende Effekt unter TGF- $\beta$ 1 wurde nach Exposition mit TGF- $\beta$ 1 + JNK Inhibitor vollständig aufgehoben. Eine in urämischen VSMCs gesteigerte Aktivierung des MAPK Signalwegs SAPK/JNK konnte zwar auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden [73–75], jedoch waren Interaktionen zwischen SAPK/JNK und TGF- $\beta$ 1 hinsichtlich vaskulärer Kalzifikation weitgehend unerforscht. Bisher ist unklar, in welchem Ausmaß das transmembranär bindende TGF- $\beta$ 1, welches upstream der SMAD-unabhängigen SAPK/JNK Kaskade steht, zur Hemmung der Kalzifikationsinhibition führt.

Zur Eruierung des kalzifikationsinhibierenden Effekts auf urämische hVSMCs, ausgehend von TGF- $\beta$ 1, wurde nachfolgend geklärt, ob es durch TGF- $\beta$ 1 zur Aktivierung von SAPK/JNK kommt. Als Aktivitätsparameter für das SAPK/JNK Signaling diente hierfür dessen Phosphorylierungsstatus. Über eine zeitabhängige Probenexposition mit nachfolgender quantitativer Auswertung des Proteinlevels wurde zunächst der Expositionszeitpunkt bestimmt, bei dem sich das Maximum der Phosphorylierung einstellte. Dieser Zeitpunkt wurde für die nachfolgende Auswertung aller Behandlungsgruppen herangezogen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es in urämisch exponierten Zellen, die zusätzlich mit TGF- $\beta$ 1 behandelt wurden, zu einer signifikant gesteigerten Phosphorylierung und folglich einer erhöhten Aktivität des SAPK/JNK Signalings kam, verglichen mit hVSMCs, die lediglich unter urämischen Bedingungen exponiert wurden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass TGF- $\beta$ 1 zu einer Aktivierung von SAPK/JNK Signaling führt. Auch bei den urämischen Zellen, die mit TGF- $\beta$ 1 + SAPK/JNK – Inhibitor behandelt wurden, kam es, im Vergleich zu den lediglich urämischen Zellen, zu einer gesteigerten SAPK/JNK Phosphorylierung, welche jedoch durch den SAPK/JNK Inhibitor geringer ausfiel als in der Gruppe mit den TGF- $\beta$ 1 exponierten Zellen. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass TGF- $\beta$ 1 zur Aktivierung der SAPK/JNK und dies nachfolgend zur verminderten Kalzifikation der urämischen hVSMCs, führt.

SP600125 repräsentiert einen selektiven SAPK/JNK Inhibitor, der in vielen Forschungsarbeiten zur Inhibition dieses Signalwegs genutzt wird [73, 74, 89]. Hierbei kann jedoch nicht zuverlässig ausgeschlossen werden, dass es durch diesen Inhibitor zu unspezifischen Interaktionen, möglicherweise mit anderen Signalkaskaden, kommt, welche partiell oder in Kombination mit der SAPK/JNK Inhibition den erzielten kalzifikationsinhibierenden Effekt hervorbrachten. Eine Möglichkeit, durch SP600125 ausgelöste unspezifische Interaktionen auszuschließen, wäre zum Beispiel ein durch CRISPR/Cas9 hervorgebrachtes Knockout Modell der SAPK/JNK. Bei einem solchen Modell müsste jedoch die Kultivierbarkeit und Lebensfähigkeit der Zellen geprüft werden.

Aufgrund der Interaktion zwischen SAPK/JNK und TGF- $\beta$ 1 wurden nachfolgend kalzifizierende hVSMCs dem Zytokin TGF- $\beta$ 1, sowie einem Aktivator des SAPK/JNK Signalwegs (Anisomycin) exponiert. Dieses Experiment wurde unter der Hypothese durchgeführt, dass die kalzifizierenden Zellen nicht nur vom kalzifikationsinhibierenden Effekt von TGF- $\beta$ 1 profitieren, sondern es darüber hinaus auch durch die Aktivierung von SAPK/JNK zur Potenzierung der Kalzifikationsinhibition kommen könnte. Entgegen dieser Erwartungen kam es in diesen Behandlungsgruppen bereits vor Ablauf der üblichen Expositionsdauer (5, 7 und 9 Tage) zur erheblichen Kalzifikation und raschen Destruktion des vitalen Zellrasens. Dieser durch Anisomycin getriggerte Zelluntergang imponierte konzentrationsunabhängig, woraufhin eine weiterführende experimentelle Betrachtung eingestellt und auf eine Abbildung dieser Daten verzichtet wurde. Die weiterführende Beobachtung dieses durch Anisomycin ausgelösten destruktiven Effekts, möglicherweise mit alternativen SAPK/JNK Aktivatoren, wie etwa Ursodeoxycholsäure, könnte Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten werden.

Da die MAPK Signalwege neben der SAPK/JNK auch durch die ERK 1/2 Signalkaskade repräsentiert wird, war der Inhalt einer anderen experimentellen Arbeit des Labors zu erforschen, ob kalzifikationsinhibierende Effekte von TGF- $\beta$ 1 auch über ERK 1/2 vermittelt werden. Die Forschungsergebnisse wiesen jedoch darauf hin, dass die Phosphorylierung von ERK 1/2 nicht durch TGF- $\beta$ 1 begünstigt und es somit nicht zu einer gesteigerten Aktivierung der ERK 1/2, vermittelt durch TGF- $\beta$ 1, kam. Interessant für zukünftige Versuche wäre es zu erforschen, welche Rolle p38 als dritte MAPK in der TGF- $\beta$ 1-vermittelten Kalzifikationsinhibition einnimmt. Darüber hinaus stehen zahlreiche weitere

Signalkaskaden in Interaktion mit TGF- $\beta$ 1 und sollten in Hinblick auf vaskuläre Kalzifikation untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass TGF- $\beta$ 1 über Interaktion mit SAPK/JNK zur Kalzifikationsinhibition beiträgt. Bekannt ist, dass TGF- $\beta$ 1 im humanen Organismus ein Zytokin darstellt, das unter anderem in mesenchymalen Zellen bei der Signaltransduktion ubiquitär Zielstrukturen ansteuert und beeinflusst. Außerdem steht SAPK/JNK downstream von TGF- $\beta$ 1 in Interaktion mit diesem Signalweg. Hierbei gibt es den Smad3-abhängigen sowie den Smad3-unabhängigen Weg, den TGF- $\beta$ 1 beeinflussen kann [90, 91]. Für eine gezieltere Betrachtung, über welchen dieser Wege TGF- $\beta$ 1, vermittelt über SAPK/JNK, zur Kalzifikationsinhibition beiträgt, wäre für zukünftige Fragestellungen eine gezielte Einzelbetrachtung der beiden Signalwege, ggf. über selektive Inhibitionen oder Knockout-Modelle, ratsam.

#### **4.5 Vaskuläre Kalzifikation durch Apoptose**

Der vaskulären Kalzifikation liegt ein komplexes Konstrukt aus dem Zusammenspiel mehrerer Mechanismen, wie etwa Apoptose und osteogener Transdifferenzierung, zugrunde. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit nachfolgend erarbeitet, in welchem Ausmaß die Apoptose beim Progress vaskulärer Kalzifikation involviert ist. Neben der passiven Nekrose stellt der aktiv regulierte Prozess der Apoptose durch endogene Mediatoren und dem Zusammenspiel von Proteasen den wesentlichen Prozess des programmierten Zelltods dar [92]. Lange Zeit wurde die passive Nekrosebildung als dominanter Prozess in pathologischen Umbauprozessen von kalzifizierenden VSMCs in die Verantwortung gezogen. Inzwischen ist man sich indes einig, dass Apoptose eine weitaus bedeutendere Rolle spielt [93, 94]. Insbesondere bei Patienten, die pathologische Elektrolytkonzentrationen, wie sie etwa bei CKD-MBD vorkommen, ausgesetzt sind, wurden erhöhte Apoptoseraten gemessen [95]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass hohe Phosphatwerte einen proapoptotischen Effekt, etwa durch gesteigerte Expression von BCL2 Proteinen und Caspase 3, die bei der Regulierung des programmierten Zelltods eine zentrale Rolle einnehmen, begünstigten [39, 40, 96, 97].

Urämische hVSMCs, die simultan mit TGF- $\beta$ 1 exponiert wurden, wiesen signifikant geringere Apoptoseraten auf, als sie in lediglich urämischen hVSMCs vorzufinden waren. Die TGF- $\beta$ 1-vermittelte, verminderte Apoptose stellte sich nach 5-, 7- und 9-tägiger

Probenexposition ein. Diese Ergebnisse decken sich mit anderen Publikationen und demonstrieren den apoptoseinhibierenden Effekt von TGF- $\beta$ 1 in hVSMCs, die urämischen Bedingungen ausgesetzt sind [63, 98].

Zusammenhänge zwischen TGF- $\beta$ 1 und Apoptose, beeinflusst durch MAPK Signalwege, wurden bereits beschrieben [99]. So zeigten Atfi et al., dass TGF- $\beta$  die Aktivierung von JNK beeinflusst und SAPK/JNK folglich zu einer TGF- $\beta$ -beteiligten Genexpression und Beeinflussung der Apoptose führt [100, 101]. In den hier durchgeführten Experimenten konnte die reduzierte Apoptoserate, bei gleichzeitiger Inhibition des SAPK/JNK Signalwegs, aufgehoben werden. Nach 5-, 7- und 9-tägiger Exposition der urämischen hVSMCs mit TGF- $\beta$ 1 in Kombination mit dem SAPK/JNK Inhibitor war eine quantitativ ähnliche Apoptose zu erkennen, wie sie bei den lediglich urämischen hVSMCs vorzufinden war. Hou et al. beschrieben bereits, dass in urämischen hVSMCs eine Aktivierung der SAPK/JNK Signalkaskade bestand und folglich eine gesteigerte Apoptose die Folge sei [73]. Zudem konnte gezeigt werden, dass der JNK Inhibitor SP600125 eine TGF- $\beta$ 1-induzierte Apoptose auslösen kann [89]. Mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen konnten die von Hou et al., sowie Lin et al. publizierten Daten bestätigt und weiter untermauert werden. Da bekannt ist, dass Apoptose einen großen Stellenwert im Prozess vaskulärer Kalzifikation einnimmt, liegt nahe, dass die TGF- $\beta$ 1-vermittelte Kalzifikationsinhibition unter anderem über eine verminderte Apoptose, beeinflusst durch SAPK/JNK Signaling, vermittelt wird. Weiterführende Forschungen sollten mit Fokus auf die durch Apoptose getriggerte Kalzifikation als einen möglichen Angriffspunkt zukünftig vertieft werden.

#### **4.6 Vaskuläre Kalzifikation durch osteogene Transdifferenzierung**

Neben der Apoptose stellt die osteogene Differenzierung einen wesentlichen Faktor in der Entstehung vaskulärer Kalzifikation dar [35, 36, 102]. In der Formierung von Knochen kommt es neben der intramembranösen Ossifikation auch zur enchondralen Ossifikation. Bei der intramembranösen Ossifikation kommt es zur Formierung von Hydroxylapatit durch Osteoblasten, welches nachfolgend in einem dichten ECM Netzwerk zur Formierung von Knochenstruktur führt. Der pathologische Vorgang der ektopen Kalzifikation unterliegt ebenfalls aktiven Prozessen einer Knochenformierung und wird durch extraossäre, osteoblastäre Zellen induziert. Vaskuläre Zellen, die mit der pluripotenten Stammzelle dieselbe Vorläuferzelle wie die Osteoblasten aufweisen, erfahren unter wechselndem



Milieu, wozu es bei der CKD-MBD kommt, eine phänotypische Transformation hin zu osteoblastären Zellen [103]. In dieser Arbeit wurde auf Genexpressions- als auch auf Proteinexpressionsebene identifiziert, ob es zu osteogener Differenzierung der hVSMCs kommt. Auf molekularer Ebene konnte identifiziert werden, dass es in den behandelten hVSMCs zur Genexpression der untersuchten osteogenen Differenzierungsmarker kam. Zudem konnte durch Proteinsynthese der valide Marker für osteogene Differenzierung RUNX2 in den behandelten Expositionsgruppen nachgewiesen werden. Deshalb wird davon ausgegangen, dass neben der Apoptose auch die osteogene Transdifferenzierung für die vaskuläre Kalzifikation mitverantwortlich war. Seit vielen Jahren ist bekannt, dass es in Zellen, die von Kalzifikation betroffen sind, zu einer gesteigerten Regulation von osteogenen Genen wie etwa RUNX2 kommt [104, 105]. Es ist davon auszugehen, dass es aufgrund des Kalzifikationsmediums in sämtlichen untersuchten Behandlungsgruppen zur Expression von osteogenen Differenzierungsmarkern kam. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass die Zellen von einem adulten Spender, mit potentiell vorherrschender Prädisposition für osteogene Differenzierung, isoliert wurden. Um diesen alterungsbedingten Konfundierungseffekt, der eine osteogene Differenzierung begünstigen könnte, experimentell zu minimieren, wurde bei allen Versuchen mit möglichst niedrigen Zellpassagen (Passage 5-8) gearbeitet. Trotz vieler homologer Eigenschaften von Osteoblasten mit kalzifizierenden hVSMCs gibt es viele Unterschiede der beiden Zellreihen. So kommt es in kalzifizierenden VSMCs zu einer ca. 40-fach geringeren Expression von osteogenen Markern, wie etwa RUNX2, als in ossifizierenden Osteoblasten. Zudem besitzen kalzifizierende VSMCs nicht die Möglichkeit, kollagenhaltigen Knochen zu bilden. Interessant erscheint zudem der Aspekt, dass Kalzifikation in VSMCs, konträr zu Osteoblasten, einen negativen Einfluss hinsichtlich der Lebensfähigkeit und Vitalität auf diese Zellen ausübt. Dieser negative Einfluss begünstigt wiederum eine gesteigerte Apoptose der kalzifizierenden VSMCs, was auf eine Art Circulus vitiosus zwischen Apoptose und osteogener Differenzierung hindeutet. Kalzifizierende hVSMCs weisen 50 % gesteigerte Apoptoseraten im Vergleich zu nichtkalzifizierenden hVSMCs und Osteoblasten auf [106]. Eine Korrelation zwischen osteogener Differenzierung und einer gesteigerten Apoptose im Progress vaskulärer Kalzifikation liegt somit nahe. Aufgrund fehlender Signifikanz der osteogenen Differenzierung, wird in dieser Arbeit dem Einfluss der Apoptose auf die vaskuläre Kalzifikation ein prädominanter Stellenwert zugeschrieben.

Neben den auch in dieser Arbeit untersuchten osteogenen Markern konnte in Studien darüber hinaus gezeigt werden, dass auf VSMCs der Farnesoid X Rezeptor (FXR), der für die Regulierung der Gallensäure, des Cholesterins oder des Glukosestoffwechsel verantwortlich ist, exprimiert wird. Miyazaki-Anzai et al. zeigten hier, dass es auch in bovinen, urämischen VSMCs zu einer gesteigerten Expression dieses FXR Rezeptors kommt und eine Aktivierung von FXR schließlich zur verminderten Mineralisation, Lipidakkumulation und osteogenen Differenzierung führt. Außerdem sorgt eine FXR Aktivierung zur gesteigerten SAPK/JNK Phosphorylierung [107]. Interessant wäre nun zu erforschen, ob auch TGF- $\beta$ 1 die Aktivität von FXR in VSMCs beeinflusst und somit eine Kalzifikationsinhibition über SAPK/JNK ermöglicht werden könnte.

#### **4.7 Fazit**

Durch die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse konnten wir bestätigen, dass TGF- $\beta$ 1 einen dosisabhängigen, kalzifikationsinhibierenden Effekt auf urämische hVSMCs ausübt. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass der kalzifikationsinhibierende Effekt über die MAPK Signaling zugehörige SAPK/JNK Signalkaskade vermittelt wird. So konnten wir aufklären, dass nach Inhibition des SAPK/JNK Signalwegs der kalzifikationsinhibierende Effekt aufgehoben ist und somit eine Interaktion zwischen dem TGF- $\beta$ 1 Signaling und der SAPK/JNK Kaskade besteht. Weiterhin bestätigten wir, dass der Prozess und Progress der Kalzifikation unmittelbar mit einer gesteigerten Apoptose einhergeht und die Apoptose einen prädominanten Faktor der vaskulären Kalzifikation *in vitro* repräsentiert. Sicherlich bleibt trotz der generierten Ergebnisse die Frage offen, welche zusätzlichen intrazellulären Signalwege an der Verhinderung des Kalzifikationsprogresses, vermittelt durch TGF- $\beta$ 1, involviert sind. Außerdem muss sich der Frage gestellt werden, ob eine gezielte Beeinflussung, wie etwa die Aktivierung von SAPK/JNK, einen potenziellen Ansatz zur Verhinderung der vaskulären Kalzifikation leisten kann. Schließlich ist festzuhalten, dass es sich bei den generierten Ergebnissen um Grundlagenforschung im *in vitro* Zellkulturmodell handelt. Eine Ausweitung auf ein *in vivo* Mausmodell, wie etwa der 5/6 nephrektomierten Maus wäre ein potentieller nächster Schritt um zu eruieren, ob diese Ergebnisse auch im *in vivo* Organismus geltend gemacht werden können.

## 5 Zusammenfassung

Störungen im Calcium- und Phosphatstoffwechsel bei chronisch Nierenkranken führen zur sogenannten „Chronic Kidney Disease - Mineral and Bone Disorder“ (CKD-MBD). Die CKD-MBD umfasst neben laborchemischen Veränderungen und Knochenerkrankungen vor allem Gefäßverkalkungen. Letztere sind aktive vaskuläre Umbauprozesse und finden sich insbesondere in der Tunica media arterieller Gefäße, mit einer Assoziation zu einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität.

Ziel dieser Arbeit war es, vertiefende Einblicke in den Prozess der vaskulären Kalzifikation zu erlangen. Hierbei sollte die Frage geklärt werden, über welche Signalwege das in urämischen Gefäßen überexprimierte TGF- $\beta$ 1 möglicherweise zur Inhibition vaskulärer Kalzifikation beiträgt und ob eine Beeinflussung möglich ist.

Zur Klärung dieses Sachverhalts wurde ein *in vitro* Zellkulturmodell (human vascular smooth muscle cells, hVSMCs) durch Zusatz von erhöhtem Calcium- und Phosphat etabliert, ähnlich den laborchemischen Veränderungen bei CKD-MBD. Die kalzifikationsbeeinflussende Rolle von TGF- $\beta$ 1 sollte geklärt und mit dem SAPK/JNK (stress-activated protein-kinase/ c-Jun N-terminale Kinase) Signalweg eine mögliche Interaktion dieser beiden Signalkaskaden identifiziert werden. Außerdem sollte der Stellenwert der Apoptose sowie der osteogenen Differenzierung im Prozess vaskulärer Kalzifikation analysiert werden.

TGF- $\beta$ 1 zeigte eine konzentrationsabhängige, kalzifikationsinhibierende Wirkung. TGF- $\beta$ 1 vermittelte diesen Effekt unter anderem über Phosphorylierung der Proteinkinase SAPK/JNK, die im Zusammenhang mit Apoptose, Zellproliferation und Differenzierungsprozessen steht. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass die Apoptose eine wichtige Rolle bei der Initiation der vaskulären Kalzifikation spielt.

Die weiterführende Erforschung der Interaktion des SAPK/JNK Signalwegs mit TGF- $\beta$ 1 und einem damit verbundenem, potentiellen Therapieansatz bei Patienten mit vaskulärer Kalzifikation sollte *in vivo* in einem Tiermodell untersucht werden, insbesondere um herauszufinden, ob der Signalweg ohne Beeinträchtigung wichtiger zellulärer Funktionen beeinflusst werden kann. Sowohl TGF- $\beta$ 1 als auch SAPK/JNK könnten mögliche Targets für neue therapeutische Strategien wie die Entwicklung von sog. „*biased ligands*“ darstellen, welche selektiv bestimmte Signalwege regulieren können.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Pittman RN. Regulation of Tissue Oxygenation Second Edition. Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function. 2016;8:i-99.
2. Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen. 4th ed. Stuttgart: Thieme; 2012, 680 pp.
3. Mescher AL, Junqueira LCU. Junqueira's basic histology: Text and atlas. 13th ed. New York, NY: McGraw-Hill Medical; 2013, 544 pp.
4. Berry C, Sidik N, Pereira AC, Ford TJ, Touyz RM, Kaski J-C, Hainsworth AH. Small-Vessel Disease in the Heart and Brain: Current Knowledge, Unmet Therapeutic Need, and Future Directions. *J Am Heart Assoc.* 2019;8:e011104.
5. Savage CO, Harper L, Cockwell P, Adu D, Howie AJ. ABC of arterial and vascular disease: vasculitis. *BMJ.* 2000;320:1325–8.
6. Bagot CN, Arya R. Virchow and his triad: a question of attribution. *Br J Haematol.* 2008;143:180–90.
7. Faber A. Die Mediaverkalkung. *Virchows Arch. path Anat.* 1924;251:137–40.
8. Mönckeberg JG. Über die reine Mediaverkalkung der Extremitätenarterien und ihr Verhalten zur Arteriosklerose. *Virchows Arch. path Anat.* 1903;171:141–67.
9. Sucker C, Lanzer P. Arteriosklerose und Mediasklerose Eine Gegenüberstellung zweier kalzifizierender Gefäßerkrankungen. *Med Klin.* 2000;95:207–10.
10. Preuss HG. Basics of Renal Anatomy and Physiology. *Clinics in Laboratory Medicine.* 1993;13:1–11.
11. Schweda F, Segerer K, Wanner C. Anatomie und Physiologie der Niere. In: Segerer K, Wanner C, Steffel J, Luescher T, editors. *Niere und Ableitende Harnwege.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 3–14.
12. Levey AS, Jong PE de, Coresh J, El Nahas M, Astor BC, Matsushita K, et al. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int.* 2011;80:17–28.
13. Levey AS, James MT. Acute Kidney Injury. *Ann Intern Med.* 2017;167:ITC66-ITC80.
14. Chapter 1: Definition and classification of CKD. *Kidney International Supplements.* 2013;3:19–62.

15. Girndt M, Trocchi P, Scheidt-Nave C, Markau S, Stang A. The Prevalence of Renal Failure. Results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults, 2008-2011 (DEGS1). *Dtsch Arztebl Int.* 2016;113:85–91.
16. Schaeffner ES, Ebert N, Delanaye P, Frei U, Gaedeke J, Jakob O, et al. Two novel equations to estimate kidney function in persons aged 70 years or older. *Ann Intern Med.* 2012;157:471–81.
17. Kuhlmann U, Böhler J, Luft FC, Alscher MD, Kunzendorf U. *Nephrologie.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2015.
18. Hou Y-C, Lu C-L, Lu K-C. Mineral bone disorders in chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton).* 2018;23 Suppl 4:88–94.
19. Seifert G. Heterotope (extraossäre) Verkalkung (Kalzinose). *Der Pathologe.* 1997;18:430–8.
20. Guérin AP, London GM, Marchais SJ, Metivier F. Arterial stiffening and vascular calcifications in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15:1014–21.
21. Nakano T, Ninomiya T, Sumiyoshi S, Fujii H, Doi Y, Hirakata H, et al. Association of kidney function with coronary atherosclerosis and calcification in autopsy samples from Japanese elders: the Hisayama study. *Am J Kidney Dis.* 2010;55:21–30.
22. Leskinen Y, Salenius JP, Lehtimäki T, Huhtala H, Saha H. The prevalence of peripheral arterial disease and medial arterial calcification in patients with chronic renal failure: requirements for diagnostics. *Am J Kidney Dis.* 2002;40:472–9.
23. London GM, Guérin AP, Marchais SJ, Métivier F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18:1731–40.
24. Safar ME, Blacher J, Pannier B, Guerin AP, Marchais SJ, Guyonvarc'h P-M, London GM. Central pulse pressure and mortality in end-stage renal disease. *Hypertension.* 2002;39:735–8.
25. Górriz JL, Molina P, Cerverón MJ, Vila R, Bover J, Nieto J, et al. Vascular calcification in patients with nondialysis CKD over 3 years. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015;10:654–66.
26. Hofmann Bowman MA, Gawdzik J, Bukhari U, Husain AN, Toth PT, Kim G, et al. S100A12 in vascular smooth muscle accelerates vascular calcification in apolipoprotein E-null mice by activating an osteogenic gene regulatory program. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:337–44.

27. Geddes AC. The Origin of the Osteoblast and of the Osteoclast. *J Anat Physiol.* 1913;47:159–76.
28. Sinha S, Iyer D, Granata A. Embryonic origins of human vascular smooth muscle cells: implications for in vitro modeling and clinical application. *Cell. Mol. Life Sci.* 2014;71:2271–88.
29. Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiological Reviews.* 1995;75:487–517.
30. El Husseini D, Boulanger M-C, Fournier D, Mahmut A, Bossé Y, Pibarot P, Mathieu P. High Expression of the Pi-Transporter SLC20A1/Pit1 in Calcific Aortic Valve Disease Promotes Mineralization through Regulation of Akt-1. *PLoS ONE.* 2013;8:e53393.
31. Chavkin NW, Jun Chia J, Crouthamel MH, Giachelli CM. Phosphate Uptake-Independent Signaling Functions of the Type III Sodium-Dependent Phosphate Transporter, PiT-1, in Vascular Smooth Muscle Cells. *Exp Cell Res.* 2015;333:39–48.
32. Crouthamel MH, Lau WL, Leaf EM, Chavkin N, Wallingford MC, Peterson DF, et al. Sodium-dependent phosphate cotransporters and phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells: Redundant roles for PiT-1 and PiT-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33:2625–32.
33. Speer MY, Li X, Hiremath PG, Giachelli CM. Runx2/Cbfa1, but not loss of Myocardin, is Required for Smooth Muscle Cell Lineage Reprogramming toward Osteochondrogenesis. *J Cell Biochem.* 2010;110:935–47.
34. Koleganova N, Piecha G, Ritz E, Schirmacher P, Muller A, Meyer H-P, Gross M-L. Arterial calcification in patients with chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2009;24:2488–96.
35. Byon CH, Chen Y. Molecular Mechanisms of Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease: The Link between Bone and the Vasculature. *Curr Osteoporos Rep.* 2015;13:206–15.
36. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang H-Y, Haynes P, Aebersold R, et al. Smooth Muscle Cell Phenotypic Transition Associated With Calcification. *Circulation Research.* 2001;89:1147–54.
37. Shao J-S, Cheng S-L, Pingsterhaus JM, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J. Clin. Invest.* 2005;115:1210–20.

38. Li X, Yang H-Y, Giachelli CM. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circulation Research*. 2006;98:905–12.
39. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL. Apoptosis Regulates Human Vascular Calcification In Vitro. *Circulation Research*. 2000;87:1055–62.
40. Ewence AE, Bootman M, Roderick HL, Skepper JN, McCarthy G, Epple M, et al. Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells: a potential mechanism in atherosclerotic plaque destabilization. *Circulation Research*. 2008;103:e28-34.
41. Leopold JA. Vascular calcification: Mechanisms of vascular smooth muscle cell calcification. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2015;25:267–74.
42. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, et al. 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*. 2004;15:2857–67.
43. Boyle JJ. Vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis. *International Journal of Experimental Pathology*. 1999;80:197–203.
44. Dendorfer U. Molecular biology of cytokines. *Artif Organs*. 1996;20:437–44.
45. Yan J, Stringer SE, Hamilton A, Charlton-Menys V, Götting C, Müller B, et al. Decorin GAG synthesis and TGF- $\beta$  signaling mediate Ox-LDL-induced mineralization of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:608–15.
46. Botney MD, Bahadori L, Gold LI. Vascular remodeling in primary pulmonary hypertension. Potential role for transforming growth factor-beta. *Am J Pathol*. 1994;144:286–95.
47. Csernok E, Szymkowiak CH, Mistry N, Daha MR, Gross WL, Kekow J. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) expression and interaction with proteinase 3 (PR3) in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. *Clin Exp Immunol*. 1996;105:104–11.
48. Shen W, Tao G-q, Zhang Y, Cai B, Sun J, Tian Z-q. TGF- $\beta$  in pancreatic cancer initiation and progression: two sides of the same coin. *Cell Biosci*. 2017;7:1375.

49. Dzieran J, Fabian J, Maass T, Teufel A, Dooley S, Meindl-Beinker NM. Role of TGF-beta and Smad7 in HCC development and progression. *Z Gastroenterol* 2011.
50. Boström A-K, Lindgren D, Johansson ME, Axelson H. Effects of TGF- $\beta$  signaling in clear cell renal cell carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013;435:126–33.
51. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF- $\beta$  Signaling in Myocardial Infarction and Cardiac Remodeling. *Cardiovasc Res*. 2006;74:184–95.
52. Krupinski J, Kumar P, Kumar S, Kaluza J. Increased Expression of TGF- $\beta$ 1 in Brain Tissue After Ischemic Stroke in Humans. *Stroke*. 1996;27:852–7.
53. Annes JP. Making sense of latent TGFbeta activation. *Journal of Cell Science*. 2003;116:217–24.
54. Koli K, Saharinen J, Hyytiinen M, Penttinen C, Keski-Oja J. Latency, activation, and binding proteins of TGF-beta. *Microsc. Res. Tech*. 2001;52:354–62.
55. Wakefield L, Kim SJ, Glick A, Winokur T, Colletta A, Sporn M. Regulation of transforming growth factor-beta subtypes by members of the steroid hormone superfamily. *J Cell Sci Suppl*. 1990;13:139–48.
56. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *The FASEB Journal*. 1995;9:726–35.
57. Tang W-b, Ling G-h, Sun L, Liu F-Y. Smad anchor for receptor activation (SARA) in TGF-beta signaling. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2010;2:857–60.
58. Gewin L, Vadivelu S, Neelisetty S, Srichai MB, Paueksakon P, Pozzi A, et al. Deleting the TGF- $\beta$  receptor attenuates acute proximal tubule injury. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23:2001–11.
59. Loeffler I, Wolf G. Transforming growth factor- $\beta$  and the progression of renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29 Suppl 1:i37-i45.
60. Wang N, Wang X, Xing C, Sun B, Yu X, Hu J, et al. Role of TGF-beta1 in bone matrix production in vascular smooth muscle cells induced by a high-phosphate environment. *Nephron Exp Nephrol*. 2010;115:e60-8.
61. Guerrero F, Herencia C, Almadén Y, Martínez-Moreno JM, Montes de Oca A, Rodriguez-Ortiz ME, et al. TGF- $\beta$  prevents phosphate-induced osteogenesis through inhibition of BMP and Wnt/ $\beta$ -catenin pathways. *PLoS ONE*. 2014;9:e89179.



62. Alesutan I, Musculus K, Castor T, Alzoubi K, Voelkl J, Lang F. Inhibition of Phosphate-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Osteo-/Chondrogenic Signaling and Calcification by Bafilomycin A1 and Methylamine. *Kidney Blood Press Res.* 2015;40:490–9.
63. Pardali E, Dijke P ten. TGF $\beta$  signaling and cardiovascular diseases. *Int J Biol Sci.* 2012;8:195–213.
64. Schulick AH, Taylor AJ, Zuo W, Qiu CB, Dong G, Woodward RN, et al. Overexpression of transforming growth factor beta1 in arterial endothelium causes hyperplasia, apoptosis, and cartilaginous metaplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:6983–8.
65. Hyman KM, Seghezzi G, Pintucci G, Stellari G, Kim JH, Grossi EA, et al. Transforming growth factor-beta1 induces apoptosis in vascular endothelial cells by activation of mitogen-activated protein kinase. *Surgery.* 2002;132:173–9.
66. Jian B, Narula N, Li Q-y, Mohler ER, Levy RJ. Progression of aortic valve stenosis: TGF- $\beta$ 1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *The Annals of Thoracic Surgery.* 2003;75:457–65.
67. Watson KE, Boström K, Ravindranath R, Lam T, Norton B, Demer LL. TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J. Clin. Invest.* 1994;93:2106–13.
68. Stracke S, Konner K, Köstlin I, Friedl R, Jehle PM, Hombach V, et al. Increased expression of TGF-beta1 and IGF-I in inflammatory stenotic lesions of hemodialysis fistulas. *Kidney Int.* 2002;61:1011–9.
69. Wang X. Circulating transforming growth factor  $\beta$ 1 and coronary artery disease. *Cardiovasc Res.* 1997;34:404–10.
70. Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Dérijard B, Davis RJ. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.* 1996;15:2760–70.
71. Minden A, Karin M. Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1333:F85-104.
72. Johnson GL, Nakamura K. The c-Jun Kinase/Stress-activated Pathway: Regulation, Function and Role in Human Disease. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773:1341–8.
73. Hou M, Song Y, Li Z, Luo C, Ou J-S, Yu H, et al. Curcumin attenuates osteogenic differentiation and calcification of rat vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem.* 2016;420:151–60.

74. Wu Y, Han X, Wang L, Diao Z, Liu W. Indoxyl sulfate promotes vascular smooth muscle cell calcification via the JNK/Pit-1 pathway. *Renal Failure*. 2016;38:1702–10.
75. Zhang X, Zhou C, Zha X, Xu Z, Li L, Liu Y, et al. Apigenin promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through JNK and p38 MAPK pathways. *Mol Cell Biochem*. 2015;407:41–50.
76. Brück K, Stel VS, Gambaro G, Hallan S, Völzke H, Ärnlöv J, et al. CKD Prevalence Varies across the European General Population. *JASN*. 2016;27:2135–47.
77. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2019;139:e56-e528.
78. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, et al. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 2003;108:2154–69.
79. Yang H-C, Zuo Y, Fogo AB. Models of chronic kidney disease. *Drug Discov Today Dis Models*. 2010;7:13–9.
80. Alzmann N, Binder R, Grimm H, editors. *Wissenschaftliche Verantwortung im Tierversuch: Nomos Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG*; 2013.
81. Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circulation Research*. 2011;109:697–711.
82. Klotz O. Calcification of the aorta in rabbits after the inoculation of adrenalin. Calcification of the media of arteries of the elastic tissue type. *J Exp Med*. 1906;8:322–36.
83. Blumenthal HT, Lansing AI, Wheeler PA. Calcification of the Media of the Human Aorta and Its Relation to Intimal Arteriosclerosis, Ageing and Disease. *Am J Pathol*. 1944;20:665–87.
84. Leibrock CB, Alesutan I, Voelkl J, Pakladok T, Michael D, Schleicher E, et al. NH<sub>4</sub>Cl Treatment Prevents Tissue Calcification in Klotho Deficiency. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26:2423–33.

85. Borland SJ, Morris TG, Borland SC, Morgan MR, Francis SE, Merry CLR, Canfield AE. Regulation of vascular smooth muscle cell calcification by syndecan-4/FGF-2/PKC $\alpha$  signalling and cross-talk with TGF $\beta$ . *Cardiovasc Res.* 2017;113:1639–52.
86. Guntani A, Matsumoto T, Kyuragi R, Iwasa K, Onohara T, Itoh H, et al. Reduced proliferation of aged human vascular smooth muscle cells--role of oxygen-derived free radicals and BubR1 expression. *J Surg Res.* 2011;170:143–9.
87. Monk BA, George SJ. The Effect of Ageing on Vascular Smooth Muscle Cell Behaviour-- A Mini-Review. *Gerontology.* 2015;61:416–26.
88. Nakano-Kurimoto R, Ikeda K, Uraoka M, Nakagawa Y, Yutaka K, Koide M, et al. Replicative senescence of vascular smooth muscle cells enhances the calcification through initiating the osteoblastic transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297:H1673-84.
89. Lin Y, Zhang B, Liang H, Lu Y, Ai XI, Zhang B, Chen X. JNK inhibitor SP600125 enhances TGF- $\beta$ -induced apoptosis of RBE human cholangiocarcinoma cells in a Smad-dependent manner. *Molecular Medicine Reports.* 2013;8:1623–9.
90. Gui T, Sun Y, Shimokado A, Muragaki Y. The Roles of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in TGF- $\beta$ -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *J Signal Transduct.* 2012;2012:289243.
91. Zi Z, Chapnick DA, Liu X. Dynamics of TGF- $\beta$ /Smad signaling. *FEBS Lett.* 2012;586:1921–8.
92. Nagata S. Apoptosis by Death Factor. *Cell.* 1997;88:355–65.
93. Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 1995;95:2266–74.
94. Isner JM, Kearney M, Bortman S, Passeri J. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation.* 1995;91:2703–11.
95. Ciceri P, Galassi A, Alfieri C, Messa P, Cozzolino M. Uremic Patients with Increased Vascular Calcification Score Have Serum with High Calcific Potential: Role of Vascular Smooth Muscle Cell Osteoblastic Differentiation and Apoptosis. *Blood Purif.* 2019;48:142–9.

96. Rahabi-Layachi H, Ourouda R, Boullier A, Massy ZA, Amant C. Distinct Effects of Inorganic Phosphate on Cell Cycle and Apoptosis in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Cell. Physiol.* 2015;230:347–55.
97. Cazaña-Pérez V, Ciudad P, Donate-Correa J, Martín-Núñez E, López-López JR, Pérez-García MT, et al. Phenotypic Modulation of Cultured Primary Human Aortic Vascular Smooth Muscle Cells by Uremic Serum. *Front. Physiol.* 2018;9:1161.
98. Shi X, Guo L-W, Seedial SM, Si Y, Wang B, Takayama T, et al. TGF- $\beta$ /Smad3 inhibit vascular smooth muscle cell apoptosis through an autocrine signaling mechanism involving VEGF-A. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1317-e1317.
99. Undevia NS, Dorscheid DR, Marroquin BA, Gugliotta WL, Tse R, White SR. Smad and p38-MAPK signaling mediates apoptotic effects of transforming growth factor-beta1 in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;287:L515-24.
100. Atfi A, Djelloul S, Chastre E, Davis R, Gespach C. Evidence for a role of Rho-like GTPases and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) in transforming growth factor beta-mediated signaling. *J Biol Chem.* 1997;272:1429–32.
101. Ventura J-J, Kennedy NJ, Flavell RA, Davis RJ. JNK regulates autocrine expression of TGF-beta1. *Mol Cell.* 2004;15:269–78.
102. Speer MY, Li X, Hiremath PG, Giachelli CM. Runx2/Cbfa1, but not loss of myocardin, is required for smooth muscle cell lineage reprogramming toward osteochondrogenesis. *J. Cell. Biochem.* 2010;110:935–47.
103. Hortells L, Sur S, St. Hilaire C. Cell Phenotype Transitions in Cardiovascular Calcification. *Front. Cardiovasc. Med.* 2018;5:58.
104. Yutzey KE, Demer LL, Body SC, Huggins GS, Towler DA, Giachelli CM, et al. Calcific aortic valve disease: a consensus summary from the Alliance of Investigators on Calcific Aortic Valve Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:2387–93.
105. Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, et al. Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation.* 2003;107:2181–4.
106. Patel JJ, Bourne LE, Davies BK, Arnett TR, MacRae VE, Wheeler-Jones CP, Orriss IR. Differing calcification processes in cultured vascular smooth muscle cells and osteoblasts. *Exp Cell Res.* 2019;380:100–13.

107. Miyazaki-Anzai S, Levi M, Kratzer A, Ting TC, Lewis LB, Miyazaki M. Farnesoid X receptor activation prevents the development of vascular calcification in ApoE<sup>-/-</sup> mice with chronic kidney disease. *Circ Res.* 2010;106:1807–17.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir die Anfertigung meiner Doktorarbeit ermöglicht haben.

Zuallererst gilt mein herzlicher Dank meiner Doktormutter Prof. Dr. Sylvia Stracke, die mich für die experimentelle Arbeit in Ihr Laborteam aufnahm und mir trotz teils großer räumlicher Distanz immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Vielen Dank für die allzeit herzliche Betreuung, tolle Arbeitsatmosphäre und hervorragende Förderung.

An dieser Stelle möchte ich mich auch ganz besonders bei Norina Loth für Ihre tatkräftige Unterstützung aus der Nähe und Ferne vor allem beim Ein- und Erarbeiten meiner Laborergebnisse bedanken.

Ich möchte der gesamten AG Prof. Dr. med. Stracke sowie der AG Dr. rer. nat Weiß für die freundliche Aufnahme im Labor, sowie deren Hilfe bei anfallenden Fragen, meinen Dank aussprechen.

Ganz besonders danke ich meinem einzigartigen Freund, Mitdoktoranden und ständigem Wegbegleiter Jonas Engeßer, der mich nicht nur für den Beginn und die Durchführung dieser Arbeit sondern überhaupt erst für das Fach Medizin begeistert hat. Ohne seine Vorarbeit, ständige Unterstützung und Mitarbeit bei Versuchen, mentale Stütze, kritische Hinterfragung und außerordentliche Hingabe für dieses Projekt wäre diese Doktorarbeit nicht zustande gekommen. Ich freue mich auf alles was noch kommt.

Für die Hilfe bei der Anfertigung von Graphiken und die Durchsicht meiner Arbeit, sowie für andauernde mentale Unterstützung während meines Studiums, möchte ich mich sehr bei Hannah Mogel bedanken.

Abschließend danke ich ganz besonders meinen Eltern für ihre bedingungslose Unterstützung während meines gesamten Studiums und andauernde Förderung, ohne die mein Studium und somit diese Arbeit nie möglich gewesen wäre.