

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie (CVK)
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle der zytosolischen Serin Hydroxymethyl Transferase 1
(SHMT1) bei der Verkalkung von glatten Gefäßmuskelzellen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Beate Böhme

aus Berlin

Datum der Promotion: 04. Juni 2021

Vorwort

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert in:

Boehme B, Schelski N, Makridakis M, Henze L, Vlahou A, Lang F, Pieske B, Alesutan I, Voelkl J. Role of Cytosolic Serine Hydroxymethyl Transferase 1 (SHMT1) in Phosphate-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Calcification. *Kidney & blood pressure research*. 2018;43(4):1212-21.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	
Abkürzungsverzeichnis	5
Darstellungsverzeichnis	8
Abstract (Deutsch)	9
Abstract (Englisch).....	10
1. Einführung.....	11
1.1. Chronische Nierenkrankheit	11
1.2. Hyperphosphatämie	15
1.3. Mechanismen der vaskulären Kalzifizierung	18
1.4. Transformation glatter Gefäßmuskelzellen und assoziierte Signaltransduktionswege	21
1.5. SHMT1	28
2. Ziel der Arbeit und Fragestellung.....	33
3. Methoden	34
3.1. Zellkultur	34
3.2. Quantitative RT-PCR	35
3.3. Statistische Auswertung	38
4. Ergebnisse	39
4.1. Endogene SHMT1 mRNA Expression \pm Phosphat	39
4.2. Effekt des SHMT1 Knockdown auf mRNA Expression osteogener Marker	41
4.3. Effekt des SHMT1 Knockdown auf mRNA Level oxidativer Stress- und Apoptose-Marker	44
4.4. Antioxidantien	46
5. Diskussion.....	50
5.1. SHMT1 und osteogene Transdifferenzierung von Gefäßmuskelzellen	50
5.2. Interpretation der Ergebnisse im Kontext der gegenwärtigen Literatur	50
5.3. Bedeutung von SHMT1 in Signalwegen der osteo-/chondrogenen Transdifferenzierung von VSMCs	52
5.4. Hypothetische Effekte des SHMT1-Mangels bei vaskulärer Kalzifizierung	54

5.5. Klinische Implikationen	56
5.6. Limitationen	58
6. Fazit.....	60
7. Literaturverzeichnis	61
Eidesstattliche Erklärung.....	76
Anteilerklärung.....	78
Lebenslauf.....	80
Publikationsliste.....	81
Danksagung	82

Abkürzungsverzeichnis

ACR	Albumin/Creatinin Ratio
AER	Albuminausscheidungsrate über 24h (<i>engl. albumin excretion rate</i>)
AKT	Serin/Threonin Kinase (Gen, syn. Proteinkinase B)
ALP	Gewebeunspezifische alkalische Phosphatase (Enzym)
ALPL	Gewebeunspezifische alkalische Phosphatase (Gen)
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	Varianzanalyse (<i>engl. analysis of variance</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
BAX	Bcl-2-ähnliches Protein 4 (<i>engl. BCL2 associated X protein</i>)
BCL2	<i>engl. B-cell lymphoma 2</i> bzw. <i>B-Cell CLL/Lymphoma 2</i>
BMP2	Knochenmorphogenetisches Protein 2 (<i>engl. bone morphogenetic protein 2</i>)
BPS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>engl. phosphate-buffered saline</i>)
Ca ²⁺	Kalzium(ion)
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CBFA1	Transkriptionsfaktor (<i>engl. core binding factor alpha 1</i>), syn. RUNX2
cDNA	Komplementäre DNS (<i>engl. complementary DNA</i>)
CKD	Chronische Nierenkrankheit/-versagen (<i>engl. chronic kidney disease</i>)
cSHMT	Zytosolische Serin Hydroxymethyl Transferase, syn. SHMT1
CYBA	<i>engl. Cytochrome B-245 Alpha Chain</i> , syn. p22phox (essentielle Komponente der phagozytären NADPH-Oxidase)
DHF	Dihydrofolat
DLX5	Homöobox-Protein DLX-5 (<i>engl. distal-less homeobox 5</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat, syn. Desoxythymidylat
DTT	Dithiothreitol, syn. Clelands Reagenz
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat, syn. Desoxyuridylat
DUOX	Isoform der NADPH-Oxidase (<i>engl. dual oxidase 1</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESRD	Endstadium der chronischen Nierenerkrankung (<i>engl. end stage renal disease</i>)
FBS	Fetales Kälberserum (<i>engl. fetal bovine serum</i>)
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (<i>engl. fibroblast growth factor</i>)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (ein Haushaltsgen)
HAoSMCs	Menschliche glatte Gefäßmuskelzellen der Aorta (<i>engl. human aortic smooth muscle cells</i>)

HCl	Salzsäure
KDIGO	<i>engl. Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
Ktr.	Kontrolle
LDL	Lipoprotein niederer Dichte (<i>engl. low-density lipoprotein</i>)
MBD	<i>engl. mineral and bone disorder</i> , CKD-MDB im Sinne der renalen Osteopathie
MGP	Matrix-Gla Protein
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Boten-RNA (<i>engl. messenger RNA</i>)
mSHMT	Mitochondriale Serin Hydroxymethyl Transferase, syn. SHMT2
MSX2	<i>engl. msh homeobox 2</i>
MT	Methyltransferase
MTHFR	Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
Neg. Si	Negativ Silencing-Gruppe
NF-κB	<i>engl. nuclear factor kappa B</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NOX	Isoform der NADPH-Oxidase
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (<i>engl. non-small-cell lung carcinoma</i>)
OPN	Osteopontin
P	β-Glycerophosphat
P22phox	Essentielle Komponente der phagozytären NADPH-Oxidase, syn. CYBA
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>engl. phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>engl. polymerase chain reaction</i>)
PDGF	<i>engl. platelet-derived growth factor</i>
P _i	Inorganisches Phosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pNPP	<i>Para</i> -Nitrophenylphosphat
PO ₄ ³⁻	Phosphat-Anion
PP _i	Pyrophosphat
PTH	Parathormon
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (<i>engl. quantitative real-time polymerase chain reaction</i>)
RANKL	<i>engl. receptor activator of NF-κB ligand</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>engl. reactive oxygen species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>engl. revolutions per minute</i>)
RT-PCR	Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion, auch quantitative PCR (<i>engl. real-time polymerase chain reaction</i>)

RUNX2	<i>engl. runt related transcription factor 2, syn. CBFA1</i>
SAM	S-Adenosylmethionin, syn. AdoMet
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>engl. sodium dodecyl sulfat</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (<i>engl. standard error of the mean</i>)
SHMT1	Serin Hydroxymethyl Transferase 1
siRNA	<i>engl. silencing RNA (syn. small/short interfering RNA)</i>
SM22- α	Transgelin (syn. TAGLN, <i>engl. smooth muscle</i>)
SMC	Glatte Muskelzelle (<i>engl. smooth muscle cell</i>)
SNPs	Single-Nukleotid-Polymorphismen
SOD	Superoxiddismutase
SOX9	Transkriptionsfaktor, syn. SRY (Sex Determining Region Y)-Box 9
St.	Stadium
THF	Tetrahydrofolat
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TS	Thymidylat-Synthase
VC	Gefäßverkalkung (<i>engl. vascular calcification</i>)
VCi	Gefäßverkalkung der Intima (<i>engl. vascular calcification of the intima</i>)
VCm	Gefäßverkalkung der Media (<i>engl. vascular calcification of the media</i>)
VSMCs	Glatte Gefäßmuskelzellen (<i>engl. vascular smooth muscle cells</i>)
willk. Einh.	Willkürliche Einheiten (<i>engl.: arbitrary units, a.u.</i>)
Wnt	Wachstumsfaktor; „w“ von <i>engl. wingless</i> (nach einer flügellosen Drosophila-Mutante), „nt“ von Int-Gen

Darstellungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Stadieneinteilung nach glomerulärer Filtrationsrate.....	12
Tab. 2:	Stadieneinteilung nach Albuminurie.....	12
Tab. 3:	Prognoseeinschätzung der CKD mittels GFR und Albuminurie.....	14
Tab. 4:	Verwendete humane Primer	37

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Reaktion der Alkalischen Phosphatase.....	24
Abb. 2:	Auswirkung von oxidativem Stress bei der vaskulären Verkalkung.....	26
Abb. 3:	Apoptose im Rahmen vaskulärer Verkalkung.....	27
Abb. 4:	Prozesse vaskulärer Verkalkung bei CKD-Patienten.....	28
Abb. 5:	SHMT1 und beteiligte Reaktionswege	31
Abb. 6:	Endogene SHMT1 mRNA Expression sowie SHMT1 Silencing mit und ohne Phosphatbehandlung	39
Abb. 7:	Einfluss der Transfektion.....	40
Abb. 8:	SHMT1-Silencing und Phosphat-induzierte mRNA Expression des osteogenen Transkriptionsfaktors MSX2	41
Abb. 9:	SHMT1-Silencing und Phosphat-induzierte mRNA Expression des osteogenen Transkriptionsfaktors CBFA1	42
Abb. 10:	SHMT1-Silencing und Phosphat-induzierte mRNA Expression des osteogenen Enzyms ALPL.....	43
Abb. 11:	SHMT1-Silencing und mRNA Expression von Markern oxidativem Stress: NOX4 , (A), CYBA (B) und MMP2 (C)	44
Abb. 12:	SHMT1-Silencing und mRNA Expression der Apoptosemarker BAX und BCL2 im Verhältnis zueinander	45
Abb. 13:	SHMT1 mRNA Expression unter Zugabe von Antioxidantien.....	46
Abb. 14:	SHMT1-Silencing und mRNA Expression des osteogenen Transkriptionsfaktors MSX2 unter Zugabe von Antioxidantien.....	47
Abb. 15:	SHMT1-Silencing und mRNA Expression des osteogenen Transkriptionsfaktors CBFA1 unter Zugabe von Antioxidantien.....	48
Abb. 16:	SHMT1-Silencing und mRNA Expression des osteogenen Enzyms ALPL unter Zugabe von Antioxidantien.....	49

Abstract (Deutsch)

Hintergrund & Fragestellung: Hyperphosphatämie als Resultat einer eingeschränkten renalen Exkretionsfunktion ist ein häufiges Phänomen bei Patienten mit chronischer Nierenkrankheit. Eine entscheidende nachteilige Wirkung dieser besteht in der Ausbildung und Unterhaltung der medialen Gefäßverkalkung. Dabei kommt es unter anderem zu einer osteo-/chondrogenen Transdifferenzierung der glatten Gefäßmuskelzellen. Die komplexen Signalwege, die diese Transformation verursachen, sind bisher nur unzureichend verstanden. Diese Studie untersucht die Rolle der zytosolischen Serin Hydroxymethyl Transferase 1 (SHMT1) bei der Kalzifikation glatter Gefäßmuskelzellen.

Methodik: Die Experimente wurden an Zellkulturen von humanen glatten Gefäßmuskelzellen der Aorta (HAoSMCs) durchgeführt. Hier wurde die endogene SHMT1-Expression mittels Silencing-RNA unterdrückt und die Zellen mit und ohne Phosphat sowie Antioxidantien behandelt. Messungen der mRNA Expression verschiedener Verkalkungs-Marker wurden mittels quantitativer RT-PCR Technik realisiert.

Ergebnisse: Phosphatbehandlung führte zu einem Anstieg der SHMT1-mRNA Expression in HAoSMCs. Das Silencing von SHMT1 ging mit einem deutlichen Anstieg der mRNA Expression typischer Marker osteo-/chondrogener Transdifferenzierung (CBFA1, MSX2, ALPL) einher. Außerdem konnte ein mRNA Anstieg charakteristischer Marker von oxidativem Stress, namentlich NOX4 und CYBA als Bestandteile des NADH/NADPH-Oxidase Systems, die Matrix-Metalloproteinase MMP2 sowie Marker der Apoptose (BAX/BCL2-Ratio) in SHMT1-defizienten HAoSMC-Kulturen detektiert werden. Schließlich konnte die Zugabe der Antioxidantien TEMPOL bzw. Tiron die durch das SHMT1-Silencing verstärkte mRNA-Expression osteogener Marker aufheben.

Fazit: Reduktion von SHMT1 durch Silencing führt zu einer verstärkten osteo- und chondrogenen Transdifferenzierung der glatten Gefäßmuskelzellen, erkennbar an einem veränderten Expressionsmuster. Diese Vorgänge können zumindest teilweise auf verstärkten oxidativen Stress in diesen Zellen zurückgeführt werden. Berücksichtigt man die Zunahme der SHMT1-Expression unter Hyperphosphatämie-Bedingungen, scheinen die vorliegenden Ergebnisse eine protektive Rolle von SHMT1 in der Regulation der Phosphat-getriggerten medialen Verkalkung anzudeuten.

Abstract (Englisch)

Background & aims: Hyperphosphatemia is a frequent condition in patients with chronic kidney disease due to impaired renal excretion function. Amongst the multifaceted adverse effects of hyperphosphatemia, medial vascular calcification takes a crucial role. Therein, osteo-/chondrogenic transdifferentiation of vascular smooth muscle cells has been identified as one of the main elements, though the regulating pathways are still incompletely understood. This study aims to investigate the role of cytosolic serine hydroxymethyl transferase 1 (SHMT1) in the process of phosphate-triggered vascular calcification.

Methods: Primary human aortic smooth muscle cells (HAoSMCs) were transfected with silencing-RNA (siRNA) to suppress the endogenous SHMT1 expression. Thereafter, cells were treated with or without phosphate or additional antioxidant administration and specific mRNA expression was measured using quantitative RT-PCR.

Results: Phosphate up-regulated SHMT1 expression in HAoSMCs. Silencing of SHMT1 was followed by increased expression of markers of osteo-/chondrogenic transdifferentiation (CBFA1, MSX2, tissue-nonspecific alkaline phosphatase (ALPL)). Compared to negative control siRNA transfected HAoSMCs, SHMT1 deficient cells displayed augmented mRNA expression of markers for oxidative stress and apoptosis. This was shown by increased mRNA expression of components of NADH/NADPH oxidase system (NOX4, CYBA) and enzymes capable of degrading extracellular matrix (matrix metalloproteinase MMP2) in SHMT1-silenced cells. Furthermore, SHMT1-silenced cells exhibited an up-regulated BAX/BCL2 mRNA ratio. Additional antioxidant treatment (TEMPOL, Tiron) was able to ameliorate the SHMT1-silencing induced increase of osteogenic markers mRNA expression.

Conclusions: Reduction of endogenous SHMT1-expression by silencing augments expression of transdifferentiation markers in vascular smooth muscle cells. These effects involve, at least in part, increased oxidative stress. Since phosphate up-regulated SHMT1, these observations indicate a protective role of SHMT1 during phosphate induced medial vascular calcification.

1. Einführung

1.1. Chronische Nierenkrankheit

Die chronische Nierenerkrankung (*engl. chronic kidney disease; CKD*) zählt mit einer wachsenden Inzidenz und Prävalenz zu einem der größten Gesundheitsprobleme der Zukunft: Epidemiologische Schätzungen auf Grundlage verschiedener nationaler und internationaler Datenquellen legen Prävalenzzahlen von mindestens 2 bis 9 Millionen Patienten mit einer chronischen Nierenkrankheit in Deutschland nahe (3-5). Global gesehen waren im Jahre 2017 etwa 700 Millionen Menschen an einer chronischen Nierenerkrankung erkrankt (6), Tendenz steigend (4). Dies kann unter anderem in der relativen Symptomarmut im Anfangsstadium begründet sein. Die chronische Nierenerkrankung verläuft jahrelang schmerzlos und schleichend (7). Jedoch geht sie mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Krankheiten, Infektionen und Hospitalisationen einher (7).

Die folgende Zusammenfassung basiert grundsätzlich auf der aktuellen KDIGO Leitlinie von 2012 (8).

Die gegenwärtigen nationalen Definitionen der chronischen Nierenerkrankung orientieren sich an den internationalen und evidenzbasierten KDIGO Leitlinien (*engl. Kidney Disease: Improving Global Outcomes*) (8). Diese fordern eine Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) $<60\text{ml/min/1.73 m}^2$ (GFR Stadien G3a–G5) sowie Zeichen einer Nierenschädigung über einen Zeitraum von >3 Monaten. Diagnostische Marker für einen Nierenschaden sind (≥ 1 zur Diagnose notwendig) (8):

- Albuminurie (Albuminausscheidungsrate (AER) $\geq 30\text{mg}/24\text{ h}$; Albumin/Kreatinin Ratio (ACR) $\geq 30\text{mg/g}$ [$\geq 3\text{mg}/\text{mmol}$])
- Auffälligkeiten im Urinsediment
- Elektrolytveränderungen und andere Auffälligkeiten, die durch Tubulusschädigung bedingt sind
- histologische Veränderungen
- Strukturveränderungen sichtbar in der Bildgebung
- sowie ein Zustand nach Nierentransplantation.

Die Stadieneinteilung der CKD erfolgt anhand der drei Kategorien Ursache (*engl. cause*), GFR-Stadium (G1-G5) und Albuminurie (A1-A3) (**CGA**-Klassifizierung; siehe Tab. 1 und 2) (8).

Tab. 1: **Stadieneinteilung nach glomerulärer Filtrationsrate**

GFR Kategorie	GFR (ml/min/1.73 m²)	Beschreibung
G1	≥ 90	Normal oder hoch
G2	60-89	Mild eingeschränkt
G3a	45-59	Mild bis moderat eingeschränkt
G3b	30-44	Moderat bis schwer eingeschränkt
G4	15-29	Schwer eingeschränkt
G5	< 15	Nierenversagen

Nach (8), adaptiert

Hierbei muss berücksichtigt werden, dass ohne Hinweis auf eine Nierenschädigung die GFR Kategorien G1 und G2 die Kriterien der CKD nicht erfüllen und keinen Krankheitswert darstellen.

Tab. 2: **Stadieneinteilung nach Albuminurie**

Kategorie	AER (mg/24 hours)	ACR		Beschreibung
		(mg/mmol)	(mg/g)	
A1	< 30	< 3	< 30	Normal bis leicht erhöht
A2	30-300	3-30	30-300	Moderat erhöht
A3	> 300	> 30	> 300	Stark erhöht

Nach (8), adaptiert, AER Albuminausscheidungsrate über 24h (*engl. albumin excretion rate*); ACR Albumin/Creatinin Ratio

Die Ätiologie der chronischen Nierenerkrankung hat sich in den letzten Jahrzehnten gewandelt (9). So liegt der Fokus weltweit nun weniger bei den entzündlichen Nierenerkrankungen, sondern viel mehr bei chronischen Krankheitsbildern als Folge des metabolischen Syndroms (9, 10). Zu den Hauptursachen der CKD werden daher Diabetes mellitus (6, 9) sowie arterielle Hypertension (10) gezählt. Diese nehmen sowohl in Industrie- als auch Entwicklungsländern stetig zu und werden daher als Ursache für die wachsende Inzidenz der CKD angesehen (9, 11, 12). Risikofaktoren sind entsprechend Hypertension, Insulinresistenz, Rauchen, Alkoholkonsum, Dyslipidämie, Adipositas und ein niedriger sozioökonomischer Status (9, 13). In Industrienationen wie Deutschland wird insbesondere Diabetes mellitus als einer der Hauptfaktoren angesehen, die zum Endstadium der CKD führen (9). Dagegen sind in den Entwicklungsländern chronische Glomerulonephritiden und interstitielle Nephritiden als Ergebnis bakterieller und viraler Infektionen sowie Parasiten als

Hauptursachen weiterhin führend (14). Ebenso zu nennen sind polyzystische Nierenerkrankungen, thrombotische Mikroangiopathien, Nephrolithiasis, Tumore und andere strukturelle Nierenerkrankungen sowie genetische Syndrome, welche vor allem bei Kindern mit CKD bedeutende Ursachen sind (15).

Therapeutische Strategien richten sich neben der Behandlung der Grunderkrankung wie Hypertension und Diabetes vor allem nach dem Ausgleich von Störungen des inneren Milieus, die durch die eingeschränkte Nierenfunktion entstehen (8). Des Weiteren sollte eine Reduktion individueller Risikofaktoren angestrebt werden (siehe Ätiologie). Bereits in den Anfangsstadien einer chronischen Nierenerkrankung sollten Komorbiditäten behandelt sowie patientenadaptierte Strategien zur Verlangsamung der Progression entwickelt werden (16). Um das Voranschreiten der Erkrankung frühzeitig zu erkennen, werden jährliche Messungen der GFR und der Albuminurie empfohlen, bei Vorliegen von Risikofaktoren oder ähnlichem häufiger (8). Da die arterielle Hypertonie sowohl Ursache als auch Folge der Erkrankung darstellt, ist eine regelmäßige Überprüfung und individuelle Anpassung des Blutdrucks von zentraler Bedeutung. Vorzugsweise sollte die Einstellung mittels Angiotensin-Rezeptorblockern oder ACE-Hemmern durchgeführt werden. Eine intensive Blutdrucksenkung wirkt protektiv gegen die Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz von CKD Patienten (17).

Weitere therapeutische Maßnahmen sind (8):

- Blutzuckerkontrollen mit dem Ziel-HbA_{1c} ~7,0% (53 mmol/mol) (>7,0% bei Komorbiditäten oder Hypoglykämierisiko)
- eine Salzrestriktion auf <90mmol (<2 g) pro Tag
- eine Verringerung der täglichen Proteinzufuhr auf 0,8 g/kg/d bei einer GFR Kategorie von G4 oder G5
- Förderung von Bewegung und Lifestyle-Veränderungen, soweit unter Berücksichtigung der individuellen Komorbiditäten möglich
- eine Ernährungsberatung

Die Planung einer Nierenersatztherapie wird für Patienten mit einem Risiko von ≥10-20% für die Entwicklung eines Nierenversagens innerhalb eines Jahres empfohlen. Bei Entwicklung von Symptomen des Nierenversagens wie Pruritus, Serositis, Störungen des Elektrolyt- oder Säure-Basen-Haushalt wird die Empfehlung zur Einleitung der Dialyse ausgesprochen. Ab einer GFR von < 20 ml/min/ 1.73 m² sowie Evidenz für Progression und Irreversibilität der CKD über die nächsten 6-12 Monate sollte auch die Möglichkeit einer Nierentransplantation berücksichtigt werden. (8)

Eine solide Prognoseabschätzung zieht die drei Klassifikationssysteme (Ursache, GFR, Albuminurie) sowie weitere Risikofaktoren/Komorbiditäten mit ein. Als Hilfe kann Tabelle 3 dienen. Hier erfolgt die Einteilung der Patienten in vier Risikokategorien, welche mit steigender Albuminurie bzw. sinkender GFR eine schlechtere Prognose erwarten lassen. Prädiktoren für eine weitere Progression sind unter anderem arterielle Hypertonie, Hyperglykämie, Dyslipidämie, Nikotinabusus und Übergewicht. (8)

Tab. 3: **Prognoseeinschätzung der CKD mittels GFR und Albuminurie**

		Albuminurie		
		A1	A2	A3
GFR Kategorien	G1	Grün	Gelb	Orange
	G2	Grün	Gelb	Orange
	G3a	Gelb	Orange	Rot
	G3b	Orange	Rot	Rot
	G4	Rot	Rot	Rot
	G5	Rot	Rot	Rot

Nach (8), adaptiert

Grün: Niedriges Risiko (wenn keine anderen Hinweise für Nierenerkrankungen vorliegen, kein Krankheitswert)

Gelb: Moderat erhöhtes Risiko

Orange: Hohes Risiko

Rot: Sehr hohes Risiko

Das Vorliegen einer chronischen Nierenerkrankung geht mit einer Vielzahl an Komplikationen einher:

- Patienten mit CKD sollten als Risikopersonen für die Entwicklung eines akuten Nierenversagen eingestuft werden. Dies ist insbesondere bei potentiell nierenschädigenden diagnostischen und therapeutischen Verfahren zu berücksichtigen (8).
- Ebenso kommt es im Verlauf häufig zu einer renalen Anämie (als Hb-Grenzwerte werden angesehen: Männer: <13,0 g/dl (<130 g/l); Frauen: <12,0 g/dl (<120 g/l)) (8)
- Auch kommt es bei CKD-Patienten schneller zur Entwicklung einer Azidose. Diese soll mit oraler Bicarbonat-Supplementation bei einem Serum-Bikarbonat <22 mmol/l therapiert werden (8).
- Des Weiteren besteht ein erhöhtes Risiko für Infektionen (18) sowie Hospitalisierung (19).
- Das GFR-Stadium ist ein unabhängiger Risikofaktor für atherosklerotisch-bedingte Herz-Kreislauf-Erkrankungen (20). So haben CKD-Patienten u.a. ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Myokardinfarkten, Herzinsuffizienz und Schlaganfall (21). Es konnte gezeigt werden, dass diese Verbindung bereits lange vor dem Dialyse-pflichtigem Endstadium der CKD besteht (22).

- CKD ist assoziiert mit erhöhter Morbidität, kardiovaskulärer sowie Gesamtmortalität und Senkung der Lebensqualität (22, 23).

Besondere Bedeutung erlangt in diesem Zusammenhang die renale Osteopathie (syn. renale Osteodystrophie). Daher hat die KDIGO eine eigene Leitlinie zu diesem Thema veröffentlicht (Stand 2017, (24)): Die als CKD-MBD (*engl. mineral and bone disorder*) bezeichnete Störung äußert sich unter anderem in Muskel- und Knochenschmerzen, einer Erhöhung des Frakturrisikos bei Osteoporose sowie Gefäß- und Bindegewebsverkalkungen. Die Pathogenese der renalen Osteopathie ist im folgenden Kapitel näher erläutert. Diagnostisch sollen regelmäßige Messungen des Serum-Kalziums und -Phosphats, des Parathormons (PTH), der alkalischen Phosphatase sowie eventuell 25(OH)D (Kalzidiol) ab Stadium G3a erfolgen. Die Verlaufsbeobachtung dieser Parameter ist entscheidend für die Therapie. Knochendichtemessungen sollen ab Stadium G3a sowie bei Vorliegen von Risikofaktoren für Osteoporose vorgenommen werden, in Einzelfällen kommt eine Biopsie in Frage. Therapeutisch stehen ab Stadium G3a die Einhaltung der jeweiligen Referenzbereiche für Phosphat und Kalzium im Vordergrund, z.B. durch Reduktion der alimentären Phosphataufnahme. Ab Stadium G4/5 kommen auch Kalzitriol und Vitamin D-Analoga in Betracht. Diese können auch zu einer PTH-Verminderung bei Hyperparathyreoidismus gegeben werden. Wenn dieser nicht konservativ in den Griff zu bekommen ist, wird auch die Empfehlung einer Parathyreoidektomie ausgesprochen. Die Therapie einer Osteoporose erfolgt wie in der übrigen Bevölkerung. (8, 24)

Viele der genannten Komplikationen sind direkt prognoseentscheidend (8).

1.2. Hyperphosphatämie

Physiologie

Der Phosphat-Haushalt wird durch die intestinale Phosphat-Aufnahme (~950mg/d), renale und intestinale Phosphat-Ausscheidung sowie der ossären Reservoir-Funktion bestimmt. Der so aufrechterhaltene austauschbare Phosphat-Pool besteht vorwiegend (~70%) aus intrazellulärem Phosphat, welches zu einem Großteil organisch gebunden vorliegt, sowie das an der Ossifikationszone des Knochens gelöste Phosphat (~29%). Weniger als 1% sind im Blut gelöst und stellen das Serum-Phosphat dar. Die Hauptmasse des Phosphats befindet sich im Knochen. Der Serum-Phosphat Spiegel kann über 3 Wege gesenkt werden: via ossärer Einlagerung oder intestinaler oder renaler Exkretion. Dabei ist die renale Ausscheidung der wahrscheinlich bedeutendste Faktor. Bei gesunden Erwachsenen entspricht die Menge der in den Knochen neu eingelagerten Phosphatsalze auch in etwa der der Abgabe aus dem

Knochen. Während die Phosphat-Sekretion des Darms etwa 150 mg/d beträgt, kommt das über den Urin ausgeschiedene Phosphat auf etwa 800 mg/d. Eine intakte Nierenfunktion ist somit essentiell für die Aufrechterhaltung physiologischer Serum-Spiegel. Ein Verlust der Exkretionsfunktion, wie sie im Rahmen einer CKD auftritt, führt zu einer gestörten Phosphat-Homöostase und durch Phosphatretention zu einer Hyperphosphatämie. (25)

Sekundärer Hyperparathyreoidismus und weitere Gegenregulationsmechanismen

Kalzium- und Phosphatstoffwechsel sind eng miteinander verbunden (26): So führt neben einem erniedrigten Serum-Kalzium auch Hyperphosphatämie zu einer Parathormonsynthese in den Nebenschilddrüsen (27). Parathormon (PTH) wiederum induziert eine verstärkte Mobilisation von Kalzium aus dem Knochen, um der vermeintlichen Hypokalzämie entgegenzuwirken. Da Kalzium nur zusammen mit Phosphat aus dem ossären Speicher mobilisiert werden kann, kommt es zu einer weiteren Steigerung der Hyperphosphatämie. Physiologischerweise hemmt Parathormon auch die renale Reabsorption von Phosphat im proximalen Tubulus, womit einer Hyperphosphatämie entgegengewirkt wird. Da dieser Mechanismus bei CKD-Patienten gestört ist, kommt es zu einer Anreicherung von Phosphat. Die konsekutive PTH-Synthese zur Reduktion der Hyperphosphatämie kann bei eingeschränkter Nierenfunktion nicht wirken. Im Gegenteil verstärkt es das Problem, ein Circulus vitiosus entsteht. (26)

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Patienten mit CKD zu einem Großteil parallel einen Mangel an Calcidiol und Calcitriol aufweisen (28). Dieser tritt auch schon in frühen Krankheitsstadien in Erscheinung (29). In der Gruppe der Dialyse-Patienten sollen 50-90% eine Vitamin D Defizienz zeigen (30). Ursache dafür ist unter anderem eine Hyperphosphatämie-induzierte Zunahme des Fibroblast Growth Factor 23, welcher die Aktivität der 25-Hydroxyvitamin D-1 α -Hydroxylase vermindert und direkt die Phosphatausscheidung steigert (31). Calcitriol führt über die bekannten Mechanismen (gesteigerte intestinale und renale Kalzium- und Phosphat-Re(ab)sorption) unter anderem zu einer Anhebung des Kalziumspiegels (32). CKD Patienten weisen daher häufig eine Hypokalzämie auf (33). Diese Hypokalzämie verstärkt den bereits dargestellten sekundären Hyperparathyreodismus mit konsekutiver Hyperphosphatämie (25).

In den letzten Jahren kam es zu beachtlichen Fortschritten im Verständnis des sekundären Hyperparathyreodismus bei CKD-Patienten. Neben den bereits erwähnten Mechanismen spielen intrinsische Veränderungen der Nebenschilddrüsen, Resistenz des Skelettsystems auf PTH und andere Mechanismen eine Rolle (34).

Veränderungen des Knochenstoffwechsels

In der Tat wird von einer „*skeletal resistance*“ gegenüber PTH gesprochen (34): Es konnte gezeigt werden, dass es zu einer reduzierten cAMP-Freisetzung (cyclisches Adenosinmonophosphat) als Antwort auf PTH in urämischen Tieren mit chronischer Niereninsuffizienz kommt. Daher wird eine PTH-induzierte Down-Regulation des PTH-Rezeptor Adenylatzyklase Systems angenommen (35). Gut untersucht ist, dass im Endstadium der CKD höhere PTH-Spiegel notwendig sind, um eine normale Rate an Knochenumbau sicherzustellen, als in den KDIGO-Leitlinien für PTH empfohlen werden (25).

Des Weiteren wird vermutet, dass es parallel zu einer Resistenz des Skelettsystems gegenüber Kalzitriol kommt. Diese scheint in der Anwesenheit von Urämietoxinen begründet zu sein. (36)

Die physiologische Funktion des Knochens als Speicherort für Kalzium und Phosphat ist CKD-bedingt gestört (25). Ein PTH-assoziiertes erhöhter Knochenumbau resultiert in einer verminderten Sekretion von Typ-1-Kollagen sowie verstärkter RANKL-Produktion (*engl. receptor activator of NF- κ B ligand*), wodurch die verstärkte Knochen-Bildung von einer noch stärker erhöhten Knochen-Resorption überholt wird (25). Außerdem sind die Umbauprozesse charakterisiert von der Bildung eines atypisch geformten Knochens mit gestörtem Kollageneinbau und endostealer Fibrose (37). Somit ist selbst bei erhaltener Knochenmasse die Funktionalität des Skelettsystems herabgesetzt (25). Osteopenie und später Osteoporose sind die Folge (25). Es kommt zu der im vorangegangenen Kapitel beschriebenen renalen Osteopathie. Diese tritt bereits zu frühen Krankheitsstadien und unter physiologischen Kalzium- und Phosphat-Spiegeln auf (29). Oft wird sie daher lediglich durch erhöhte PTH-Spiegel auffällig (29). Klinisch kommt es zu einer Erhöhung der Prävalenz von Osteoporose bei CKD-Patienten im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung (38). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass bereits geringe Erhöhungen des Serum-Phosphats innerhalb der von den Leitlinien empfohlenen Referenzbereichen die pathologischen Veränderungen bewirken (39). Es hat sich gezeigt, dass erhöhte Phosphatspiegel mit der Entwicklung von Herzinsuffizienz und kardiovaskulären Ereignissen assoziiert sind (39). Insbesondere konnte gezeigt werden, dass erhöhte Phosphatspiegel unabhängig von anderen Risikofaktoren mit einer erhöhten Sterblichkeitsrate verbunden sind (40). Das Mortalitätsrisiko erhöht sich proportional mit den Serum-Phosphat Spiegeln bei Patienten mit CKD (40).

Die aktuellen KDIGO CKD-MBD Leitlinien weisen daher bereits früh auf eine Phosphat-senkende Therapie hin (24). Diese kann durch Phosphat-Binder, Reduktion der alimentären Phosphataufnahme oder Dialyse realisiert werden (24). Die Pufferfunktion, welche unter physiologischen Umständen das Skelettsystem bei einer positiven Phosphatbilanz ausübt, wird gestört. Auf diese Weise wird bei CKD-Patienten eine heterotope Mineralisation getriggert (25).

Dieses neue Phosphat-Reservoir liegt hauptsächlich im Weichteilgewebe, inklusive der Blutgefäße (25).

Zusammengefasst: In Patienten mit chronischer Nierenkrankheit kommt es zu Störungen des Phosphat-, Kalzium-, Parathormon- und Vitamin D-Metabolismus mit mannigfachen Verknüpfungen. Deren Auswirkungen greifen in komplexer Weise in den Knochenstoffwechsel und das kardiovaskuläre System ein. Es kommt zu renaler Osteopathie inklusive Osteoporose auf der einen und heterotoper Verkalkung auf der anderen Seite. Folgend soll dargestellt werden, welche pathologischen Veränderungen am Blutgefäßsystem stattfinden und welche Mechanismen bei dieser heterotopen Verkalkung eine Rolle spielen.

1.3. Mechanismen der vaskulären Kalzifizierung

Vor allem im Endstadium der chronischen Nierenerkrankung (*engl. end stage renal disease*, ESRD) werden die Folgen einer chronischen Hyperphosphatämie deutlich und zeigen sich in einer zunehmenden Verkalkung des Gefäßsystems, des Myokards und der Herzklappen (41). Bei den Kalzium-Phosphat-Ablagerungen handelt es sich hauptsächlich um Apatit (42). Es werden zwei Formen der vaskulären Kalzifizierung (*engl. vascular calcification*, VC) unterschieden, die sich in Lokalisation und Pathomechanismus unterscheiden: die intimale Gefäßverkalkung (*engl. vascular calcification of the intima*, VCI) im Rahmen atherosklerotischer Plaques auf der einen und die Gefäßverkalkung der Media (*engl. vascular calcification of the media*, VCM) auf der anderen Seite (43).

Die Verkalkung der Intima (VCI) ist fokal, mit Inflammation assoziiert und vor allem in den großen Gefäßen wie der Aorta und deren großen Abgängen sowie der Koronargefäße lokalisiert (25). Eine Kalzifikation der atheromatösen Plaques erfolgt meist erst zu späteren Krankheitsstadien (44). Des Weiteren spielen hier die traditionellen Risikofaktoren (Alter, arterielle Hypertension, Diabetes mellitus, Dyslipidämie, Rauchen) eine ursächliche Rolle (44, 45). Aufmerksamkeit erlangt sie besonders durch die Bildung neointimaler Plaques, welche durch die modernen Bildgebungstechniken dargestellt werden können (25).

Die Verkalkung der Media (VCM) wird unter anderem durch Alterungsprozesse, Diabetes mellitus und die chronische Nierenerkrankung hervorgerufen (41). An der Pathogenese scheinen sowohl traditionelle Risikofaktoren (siehe oben) als auch andere "nicht-traditionelle" Faktoren wie Hyperphosphatämie, Hyperparathyreoidismus und Hämodialyse-Dauer beteiligt zu sein (44, 46). Wichtig ist auch zu erwähnen, dass die VCM bereits in frühen Krankheitsstadien in Patienten jungen bis mittleren Alters mit chronischer Nierenerkrankung auftritt (44). Sie ist charakterisiert durch eine diffuse Ablagerung von Mineralstoffen vor allem in

den großen Arterien vom elastischen Typ, Viszeral- und Nierengefäßen bis zu kleineren Arterien mit einem Durchmesser von mindestens 0,5 mm (44, 47). Die VCm ist mit einer erhöhten Arteriensteifheit (*engl. stiffness*) assoziiert (objektivierbar an einer erhöhten Pulswellengeschwindigkeit der Aorta (*engl. aortic pulse-wave velocity*)) (48). Diese führt zu einer verminderten Dehnbarkeit der Gefäße, einem steigenden systolischen und erniedrigten diastolischen Blutdruck, einer Erhöhung der Nachlast und folgender Einschränkung der Koronardurchblutung während der Diastole (41). Folgen sind linksventrikuläres Remodelling und Hypertrophie, welche das Risiko für Herzversagen und Myokardinfarkt sowie einer allgemein erhöhten kardiovaskulären Mortalität erhöhen (49). Die in manchen Arbeiten erwähnte Mönckeberg Mediasklerose ist besonders an der Aorta und den Extremitätenarterien lokalisiert (44, 50). Die Kalzium-Ablagerungen können hier die gesamte Zirkumferenz einnehmen und zu sogenannten Pfeifenrohr-Arterien (*engl. pipestem arteries*) führen (50). Die verdickten und rigiden Arterienwände führen primär nicht zu einer Okklusion des Gefäßes, da das Lumen offen bleibt (50).

In Patienten mit ESRD kommen beide Formen der VC vor, wobei die VCm deutlich stärker ausgeprägt zu sein scheint (51). Diese Erkenntnis, obwohl alt, schien ein gutes Jahrhundert in den Hintergrund gerückt worden zu sein: Ein Blick in die Geschichte zeigt, dass bereits Pathologen des 19. Jahrhunderts Knochen-ähnliches Gewebe innerhalb arteriosklerotisch veränderter Arterien erkannten. Rudolf L. K. Virchow verglich 1858 die von ihm gefundenen Strukturen in der mittleren Schicht der Arterienwand mit realem Knochen (52). Durch einen Prozess der „Ossification“ würden die „Faserzellen der Ringfaserhaut in Kalksäulchen verwandelt“ (52). Bereits er unterschied diese von den Fettzellen-enthaltenden und mit Inflammation assoziierten Plaques der Arterienwände (52). Ein halbes Jahrhundert später studierte Johann G. Mönckeberg die Mediaverkalkung der Extremitätenarterien genauer (53). Dennoch galt der Prozess der VC über die meiste Zeit des 20. Jahrhunderts als ein passiver, degenerativer und unregulierter Vorgang, der innerhalb atherosklerotischer Plaques abläuft (54).

Anhand der aktuellen Literatur zeigt sich diese Ansicht als überholt: Die VCm wird beschrieben als ein komplexer, aktiv zell-vermittelter und streng regulierter Prozess, der mit einer Reprogrammierung und Transdifferenzierung kontraktile glatter Gefäßmuskelzellen (*engl. vascular smooth muscle cells, VSMCs*) zu einem Osteoblasten-ähnlichen Phänotyp einhergeht (55). Einige der beteiligten Prozesse zeigen Parallelen mit der physiologischen Ossifikation des Skelettsystems (56). Am Ende dieses Vorgangs generiert die umgewandelte Gefäßmuskelzelle die Ablagerung von Hydroxylapatit in die extrazelluläre Matrix der Media (55).

Histologisch kann dieser Prozess der Kalzifizierung für die Mönckeberg-Sklerose in vier Stadien eingeteilt werden (44): Nach einer initialen feinkörnigen/granulären Kalzium-Ablagerung in Nachbarschaft der VSMC und entlang der inneren elastischen Membran der Gefäßwände (besonders Anlagerung an Elastin) (Stadium 1) folgt eine Konfluenz der Ablagerungen bis hin zu zwei Dritteln des Gefäßquerschnitts (Stadium 2). Ein Fortschreiten der Kalzifikation führt zu soliden Hydroxylapatit-enthaltenden Plättchen innerhalb der Media, die später die gesamte Zirkumferenz umfassen (Stadium 3). Außerdem wird eine Hyperplasie der subendothelialen Intima beobachtet. Schließlich können Zentren der Knochenbildung innerhalb der Media gefunden werden, welche trabekuläre Strukturen sowie Markräume mit hämatopoetischen Zellen und Adipozyten aufweisen können (Stadium 4). Welche pathologischen Prozesse hier genau ablaufen, ist noch nicht abschließend geklärt und Gegenstand intensiver Forschung. (44, 50)

Hyperphosphatämie scheint bei der medialen Gefäßverkalkung eine zentrale Bedeutung einzunehmen. Hinweise darauf, dass Hyperphosphatämie direkt und unabhängig von anderen Faktoren wie Hyperkalzämie etc. an der Genese der VCm beteiligt ist, liefern klinische Studien an Patienten mit CKD sowie Patienten mit genetischen Syndromen (z.B. Mutationen des Fibroblast Growth Factor 23 (FGF-23)) (57). So konnte klinisch gezeigt werden, dass eine Senkung der Serum-Phosphat Konzentration mittels kalziumfreiem Phosphatbinders eine weitere Progression der vaskulären Kalzifizierung in ESRD Patienten vermindert (41). Des Weiteren konnten *in-vitro* Studien zeigen, dass sowohl Aorta von Ratten als auch Kulturen humaner glatter Muskelzellen (*engl. smooth muscle cell, SMC*) unter Hyperphosphatämie-Bedingungen einen Dosis-abhängigen Anstieg der Kalzium-Phosphat-Ablagerungen als auch eine verstärkte Expression von Markern der osteogenen Differenzierung aufweisen (58, 59). Hyperphosphatämie kann über verschiedene Wege direkt die vaskuläre Verkalkung beeinflussen:

- Eine passive Ausfällung von Kalzium-Phosphat Salzen kommt durch Erhöhung des Kalzium-Phosphat Produkts ($Ca \times P$) zustande: oberhalb des Löslichkeitsprodukts kommt es zur Ausfällung und Bildung von Präzipitaten im extrazellulären Raum. (Tatsächlich ist dies bereits unter physiologischen Serum-Kalzium und -Phosphat Konzentrationen der Fall, jedoch verhindern pH, Temperatur und andere Inhibitoren (vorrangig Pyrophosphat und antikalzifizierende Proteine; siehe unten) die Ausfällung im Weichgewebe des gesunden Organismus. Während alleinige Hyperkalz- und Hyperphosphatämie im Gesunden zu keiner Kalzifizierung führen, sind sie doch der Schlüssel und Auslöser weiterer zell-vermittelter Prozesse und triggern so die Initiierung und Progression der VC bei CKD-Patienten.) (47, 60)
- Hyperphosphatämie löst eine osteo-/chondrogene Transdifferenzierung der glatten Gefäßmuskelzellen aus (56).

- Unter Hyperphosphatämie kommt es zum Verlust von Mineralisierungs-Inhibitoren wie MGP (Matrix-Gla Protein, ein Transkriptionsfaktor, welcher die VSMC Transdifferenzierung inhibiert und die Kalzium-Bindung an die extrazelluläre Matrix verringert), Osteopontin (OPN, Binder von Hydroxylapatit und Förderer der Osteoklasten-Funktion), Fetuin-A (einer der stärksten Inhibitoren ektopter Verkalkung und SMC-Apoptose), Osteoprotegerin, Pyrophosphat (ein potenter Inhibitor der Hydroxylapatit-Kristallisierung) und weitere, verhindern in der normalen Gefäßmuskelschicht aktiv die Verkalkung (61-64).
- Es wird die Induktion von Apoptose der Gefäßmuskelzellen gefördert (56, 64, 65).
- Erhöhte Phosphatspiegel führen zu gesteigertem oxidativem Stress (66).
- Es kommt zum Umbau und Untergang von Extrazellulärmatrix, sowie Zerstörung elastischer Fasern (67), assoziiert mit der Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen (68).

Trotz zunehmender Bemühungen und vermehrter Forschung zu diesem Thema bleiben viele Fragen zu den multiplen Faktoren und Mechanismen der vaskulären Kalzifizierung bei Patienten mit CKD offen. Die vorherrschende Hypothese zur Entstehung der medialen Gefäßverkalkung legt ein Zusammenspiel verschiedener Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Dyslipidämie, Inflammation und Urämie im Zusammenhang mit Hyperphosphatämie nahe, die einen Prozess initiieren und verstärken, bei dem es zu einer osteo-/chondrogenen Transformation der glatten Gefäßmuskelzellen kommt. Veränderungen der Expression verschiedener osteogener Transkriptionsfaktoren und Enzyme spielen in diesem Prozess eine entscheidende Rolle und führen zur aktiven Mineralisierung der Gefäße durch die Gefäßmuskelzellen. Eine Auswahl der relevanten Signalwege soll im Folgenden näher erläutert werden.

1.4. Transformation glatter Gefäßmuskelzellen und assoziierte Signaltransduktionswege

Die glatten Gefäßmuskelzellen (*engl. vascular smooth muscle cells, VSMCs*) sind mesenchymalen Ursprungs und können unter bestimmten Bedingungen zu anderen Zelltypen mesenchymalen Ursprungs transdifferenzieren (56). Dazu zählen Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten (56).

Unter zellulärem Stress können die glatten Gefäßmuskelzellen einen morphologischen Wandel durchmachen, wodurch diese einen sekretorischen osteoblasten-ähnlichen Phänotyp annehmen (56, 69). Dieser Prozess geht mit einer Hochregulation mineralisierungsfördernder Faktoren und Enzyme einher (56). Dazu zählen unter anderem (56, 63):

- RANKL (*engl. receptor activator of nuclear factor kappa B ligand*): Es handelt sich um ein trans-membran Protein, welches von T-Zellen und Osteoblasten exprimiert wird. Es steigert Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten und fördert direkt die vaskuläre Kalzifizierung (70).
- BMP2 (*engl. bone morphogenetic protein 2*): Als ein Schlüsselfaktor in der Entstehung Osteoblasten-ähnlicher Zellen ist er für die osteogene Differenzierung mesenchymaler Zellen bedeutsam. Er reguliert sowohl osteogene (MSX2, DLX5, Osterix) als auch chondro-osteogene (CBFA1, SOX9) Transkriptionsfaktoren (siehe unten). (71, 72)
- die alkalische Phosphatase (siehe unten).

Die Expression dieser Faktoren zeigt eine osteo-/chondrogene Transdifferenzierung der zuvor kontraktionsfähigen VSMC an (63). Gleichzeitig exprimieren diese Zellen weniger Marker glatter Gefäßmuskelzellen wie Alpha-Actin-2 und SM22- α /Transgelin (73). Im Folgenden soll näher auf die genannten Transkriptionsfaktoren CBFA1 und MSX2 sowie assoziierter Signalwege eingegangen werden.

CBFA1

CBFA1 (*engl. core binding factor alpha 1*) wird in die RUNX Familie von Transkriptionsfaktoren eingeordnet und auch unter dem Namen RUNX2 (*engl. runt related transcription factor 2*) gefunden (74). Er hat eine Schlüsselrolle bei der Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten (74). Versuche mit CBFA1-defizienten Mäusen zeigten ein völliges Fehlen der Mineralisation des Skelettsystems (75). Diese Mäuse wiesen schwerwiegende Fehler bei der Ossifikation bei fast normal ausgebildetem Knorpelgewebe auf (75). Des Weiteren konnte CBFA1 als starker anti-apoptotischer Faktor identifiziert werden, der ein Gegenspieler von p53 zu sein scheint (76). Schließlich wird er von einigen Autoren als Onkogen angesehen, indem er unter anderem mit Zellzyklus-regulierenden Faktoren interagiert, wie etwa dem Retinoblastom-Protein (74). Neben seiner entscheidenden Rolle bei der Ossifikation kommt ihm so ein Stellenwert bei der „DNA-Damage Response“ zu (74).

Phosphat führt zu einer Hochregulation der CBFA1 Expression und Aktivität in kultivierten VSMCs (73). CBFA1 wird positiv reguliert durch FGF (*engl. fibroblast growth factor*), Retinsäuren sowie indirekt über BMP-Mitglieder (wie BMP-2) und wahrscheinlich gehemmt durch Vitamin D₃ (77, 78). Des Weiteren beeinflusst TNF- α die Expression dieses Transkriptionsfaktors (79, 80). Für die Differenzierung von osteogenen Vorläuferzellen wird die CBFA1-Genexpression direkt via Wnt-Signalweg (Wnt: Wachstumsfaktor; „w“ von *engl. wingless* (nach einer flügellosen Drosophila-Mutante), „nt“ von Int-Gen) aktiviert und reguliert so den Eintritt undifferenzierter mesenchymaler Zellen in die osteogene Zelllinie (81). Durch CBFA1 regulierte Proteine sind u.a. Osteocalcin (*engl. bone Gla protein*), Osteopontin,

Matrixmetalloproteinasen (MMP), die alkalische Phosphatase sowie Kollagen Typ 1 (62, 82, 83).

MSX2

MSX2 (*engl. msh homeobox 2*) ist ein osteogener Transkriptionsfaktor, welcher für die kraniofaziale Mineralisation entscheidend ist (84). In Mausmodellen wurde gezeigt, dass ein Fehlen von MSX2 zu verschiedenen Defekten der Verknöcherung der Kalotte und zu persistierenden Foramina führt (85). Daneben wurden auch Pathologien der enchondralen Ossifikation, Zähnen, Haarfollikel und anderen gefunden (85). Ein Zielgen von diesem Transkriptionsfaktor ist Osteocalcin (62). Des Weiteren kann MSX2 die Aktivität von CBFA1 modifizieren (86).

Es konnte gezeigt werden, dass atherogene Stimuli wie Interleukin-1 β und einige aus oxidiertem LDL entstandene Lipidabkömmlinge in mesenchymalen Zellen zu einer vermehrten vaskulären Aktivität von MSX2 führen (87, 88). Der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) induziert ebenso die MSX2-Expression via NF- κ B-Signalweg in VSMCs (80). Des Weiteren wird durch TNF- α sowie oxidierte Lipide die BMP-2 Expression in VSMCs und Endothelzellen stimuliert (89). BMP-2 wiederum reguliert osteogene Transkriptionsfaktoren wie MSX2 via BMP2-MSX2-Wnt-Signalweg hoch (71, 72). MSX2 führt zu einer Aktivierung des parakrinen Wnt-Signalweges. Es führt zu einer verstärkten Transkription von Wnt3a- und Wnt7a-mRNA als auch zu einer Hemmung von Inhibitoren dieses Signalweges. Es folgt die Akkumulation von β -Catenin im Zellkern und eine verstärkte Transkription von Genen, welche Zellteilung und Differenzierung der glatten Gefäßmuskelzelle regulieren. Es kommt zu einer Verstärkung der osteo-/chondrogenen Transdifferenzierung der Zellen. (72)

Unter den durch CBFA1 und den MSX2-Wnt-Signalweges beeinflussten Genen ist auch die alkalische Phosphatase, welche über im Folgenden beschriebene Prozesse die Mineralisation fördert (72, 83).

Alkalische Phosphatase

Ein wirkungsvoller Inhibitor und Regulator der Bildung von Hydroxylapatit aus Kalzium und Phosphat ist Pyrophosphat (PP_i) (90). Es fällt bei der Hydrolyse von ATP zu AMP an, ein Vorgang, der durch die Ectonucleotide-Pyrophosphatase-1 vermittelt wird (91, 92). Es konnte gezeigt werden, dass Zellkulturen von aortalem Gewebe PP_i freisetzen und dass eine Kalzifikation dieser selbst bei hohen Konzentrationen von Phosphat und Kalzium nur auftritt, wenn PP_i entzogen wird (93).

Der Abbau von PP_i wird mittels Hydrolyse durch Pyrophosphatasen bestimmt (94). Hier ist besonders die gewebeunspezifische alkalische Phosphatase (ALP) zu nennen (94). Dieses Ektoenzym wird durch das *ALPL*-Gen kodiert (92).

Bei dem seltenen Krankheitsbild der Hypophosphatasie liegt ein Mangel von ALP vor, welcher in einer Anreicherung von PP_i und in einer gestörten Knochen-Mineralisation resultiert (95). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Niereninsuffizienz *in vitro* zu einer gesteigerten Aktivität und Vorkommen von ALP in Gefäßgewebe führt (94).

Eine Erhöhung der ALP führt also zu einer Verminderung des mineralisierungshemmenden PP_i , zum anderen wird direkt das Substrat für die weitere Hydroxylapatit-Bildung bereitgestellt (92). Die alkalische Phosphatase stellt somit ein Schlüsselenzym für die ektope Kalzifikation in VSMCs im Prozess der vaskulären Verkalkung dar (92), siehe Abbildung 1.

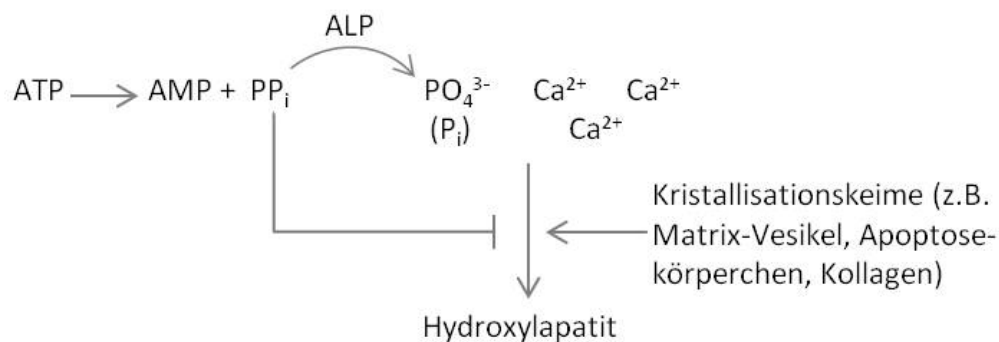


Abb. 1: **Reaktion der Alkalischen Phosphatase**

Vereinfachte Darstellung, Quellen siehe Text.

ATP Adenosintriphosphat AMP Adenosinmonophosphat PP_i Pyrophosphat

ALP Gewebeunspezifische alkalische Phosphatase PO_4^{3-} Phosphat-Anion

Oxidativer Stress

Neben den bereits angesprochenen Punkten spielt oxidativer Stress besonders bei der Gefäßverkalkung in CKD-Patienten eine große Rolle (96). Oxidativer Stress bezeichnet ein Ungleichgewicht zwischen antioxidativen Faktoren und oxidativen Produkten zugunsten von letzteren (97). Die Akkumulation von Oxidantien wie reaktiven Sauerstoffspezies (*engl. reactive oxygen species*; ROS) führt zu Oxidation von DNA, Proteinen, Kohlenhydraten sowie Lipiden und in der Folge zu Apoptose und Zell- beziehungsweise Organdysfunktion (97). Im Folgenden sollen die für diese Arbeit interessanten Modulatoren und wichtigen Zusammenhänge kurz erläutert werden.

Werden VSMCs oxidativem Stress in Form von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zugeführt, wird bei ihnen unter anderem via PI3K/AKT Signalweg (PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; AKT: eine Serin/Threonin Kinase) eine verstärkte Expression von CBFA1 registriert (83). In der Folge wird die osteoblastäre Differenzierung von VSMCs durch H_2O_2 stimuliert (66). Dieses und

andere ROS sind neben ihren verschiedenen Funktionen in der Immunabwehr und zellulären Signaltransduktion auch an vielfältigen Pathologien des Körpers beteiligt (98). Ein wichtiger Produzent von ROS ist die NADPH-Oxidase (98). Es handelt sich um einen membrangebundenen Enzymkomplex (99). Beim Menschen gibt es 7 Isoformen (NOX1-5, DUOX1-2) (98). VSMCs exprimieren vor allem die Isoformen NOX1 und NOX4 (100, 101). NOX4 kann im Gegensatz zu anderen NOX Proteinen große Mengen H_2O_2 konstitutiv erzeugen (102). P22phox ist eine essentielle Komponente der phagozytären NADPH-Oxidase und wird auch als CYBA (*engl. Cytochrome B-245 Alpha Chain*) bezeichnet (98, 103). Verschiedene Faktoren wie TNF- α , Angiotensin und PDGF (*engl. platelet-derived growth factor*) sind bisher identifiziert worden, die in glatten Muskelzellen zu einer Steigerung der Aktivität der NADPH-Oxidase führen (66). NOX Enzyme reduzieren molekularen Sauerstoff zu Superoxid ($\cdot O_2^-$), welches dann zu weiteren ROS-Vertretern umgewandelt werden kann (104). Diese induzieren auch die Expression von Matrix-Metalloproteasen wie MMP-2 in VSMCs (99). MMP-2 als downstream-Effektor von oxidativem Stress ist ein essentieller Faktor für die phänotypischen Veränderungen, wie sie bei der VCm gefunden werden (105). Es führt zu einem Remodelling von Extrazellulärmatrix und Zerstörung von elastischen Fasern, aber auch via Hochregulation von BMP-2 zu einer gesteigerten Expression von MSX2 und CBFA1 (105). Die dargestellten Vorgänge sind in Abbildung 2 zusammengefasst.

Ferner scheint oxidativer Stress Apoptosevorgänge in VSMCs zu induzieren (106).

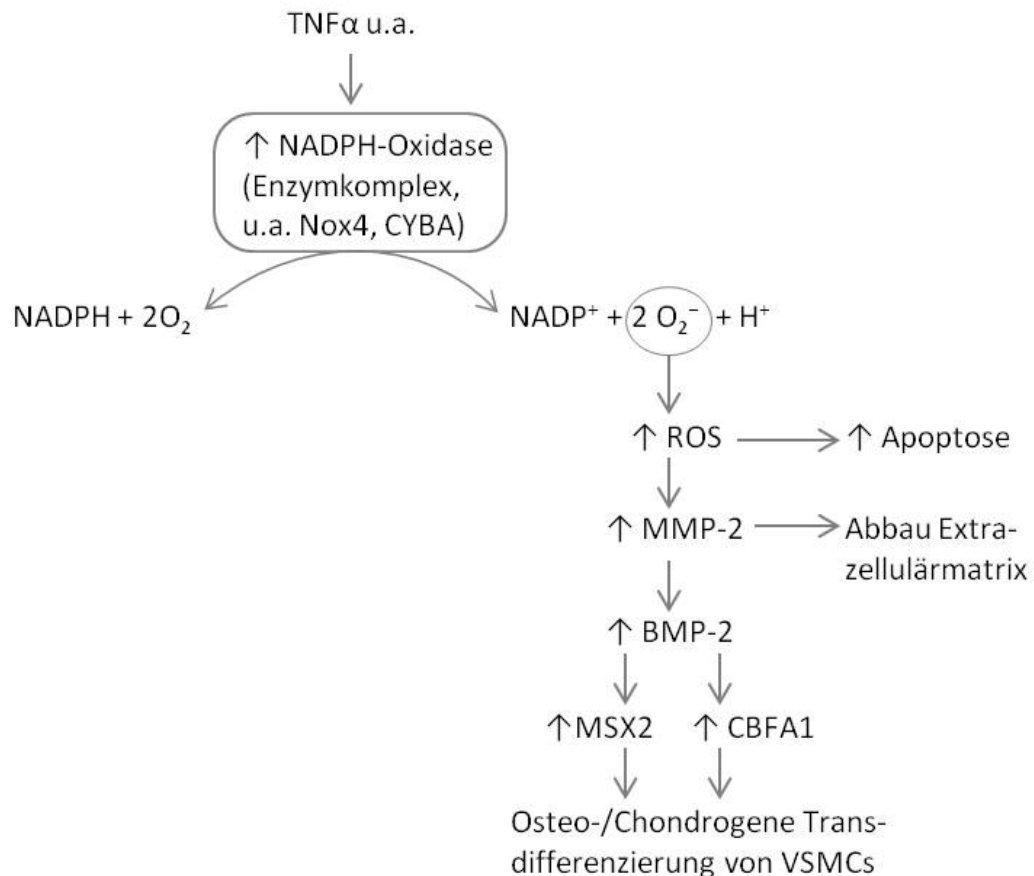


Abb. 2: **Auswirkung von oxidativem Stress bei der vaskulären Verkalkung**

Vereinfachte Darstellung, Quellen siehe Text.

Apoptose

Veränderungen der extrazellulären Kalzium- und Phosphat-Konzentration scheinen für die Freisetzung extrazellulärer Vesikel von umgebenden, lebenden VSMCs verantwortlich zu sein (107). Diese können, ähnlich den bei der Mineralisation von Knochen physiologischerweise abgeschnürten Matrix-Vesikeln, neben vorgeformten kristallinem Hydroxylapatit, Kalzium und alkalischer Phosphatase auch MMP-2 enthalten (108). Eine Freisetzung der in diesen Vesikeln enthaltenen Stoffe, vor allem der Hydroxylapatit-Kristalle, stellen Kristallisationskeime für die umgebene extrazelluläre Matrix dar (107).

Davon zu unterscheiden sind die etwas größeren, ebenfalls mit Kalzium angereicherten Körperchen, welche von apoptotischen VSMCs abgeschnürt werden (107). Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Apoptosevorgänge der Kalzifikation von VSMCs vorausgehen (109). Sie werden unter anderem durch hohe extrazelluläre Phosphat- und Kalziumlevel sowie oxidativen Stress ausgelöst (56, 65). Die entstehenden Apoptosekörperchen stellen Kristallisationskeime für die umgebende extrazelluläre Matrix dar (107). Eine Verringerung funktionsfähiger VSMCs führt zwangsläufig auch zu einer reduzierten Bildung von Mineralisierungs-Inhibitoren (64). Im

Rahmen von Apoptosevorgängen wird verstärkt Kalzium aus den untergehenden Zellen freigesetzt, welches die angestoßenen Apoptoseprozesse aggraviert (56). Apoptotische Vorgänge fördern damit die Verkalkung im Gefäß (64).

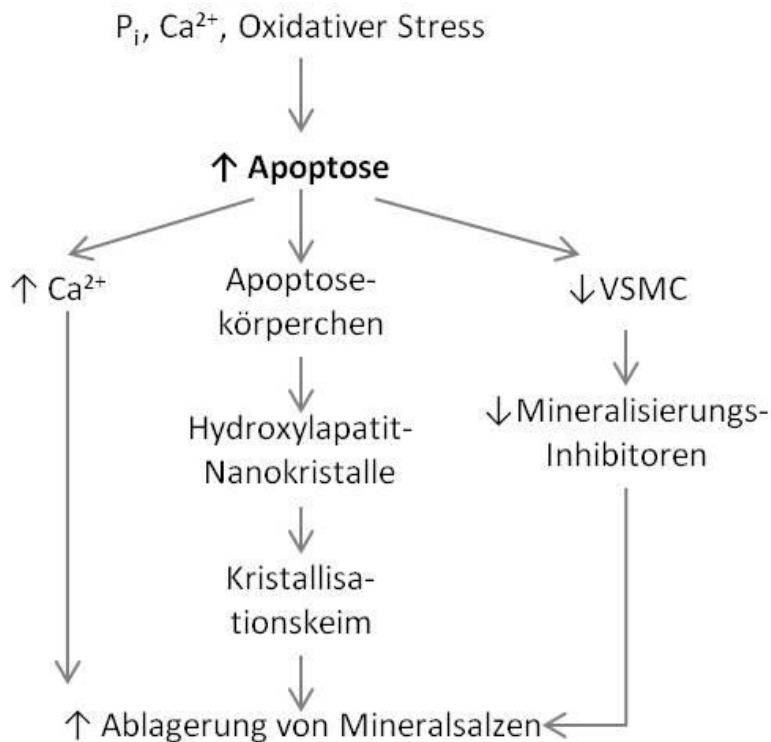


Abb. 3: **Apoptose im Rahmen vaskulärer Verkalkung**

Vereinfachte Darstellung, Quellen siehe Text.

Zusammenfassung

Im Rahmen der Gefäßverkalkung ist der Weg der glatten Gefäßmuskelzelle der Media hin zu einer Osteoblasten-ähnlichen Zelle mit entsprechender sekretorischer Funktion gekennzeichnet von der Expression typischer Markerproteine: MSX2 und CBFA1 als Transkriptionsfaktoren sowie die alkalische Phosphatase wurden hier als wichtige Vertreter der osteo-/chondrogenen Transdifferenzierungsprozesse beleuchtet. Oxidativer Stress und Apoptosevorgänge sind an den komplexen Signalwegen der vaskulären Verkalkung beteiligt.

Durch chronische Nierenerkrankung und Hyperphosphatämie initial ausgelöst und unterhalten, handelt es sich somit um einen aktiven und sich selbst verstärkenden Vorgang. Einen Überblick über die beteiligten Prozesse soll Abbildung 4 geben. Die Signalwege, die an der osteogenen Transdifferenzierung beteiligt sind, sind aber nur teilweise bekannt. (25, 56)

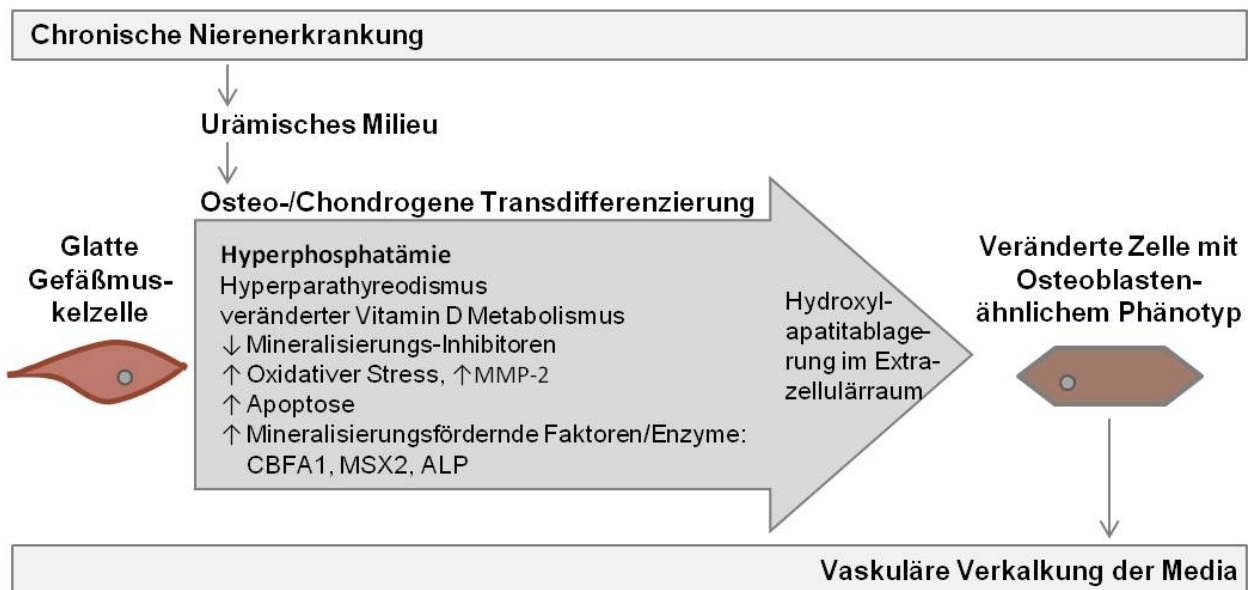


Abb. 4: Prozesse vaskulärer Verkalkung bei CKD-Patienten

Vereinfachte Darstellung, Quellen siehe Text.

1.5. SHMT1

Die Serin Hydroxymethyl Transferasen (SHMT) sind evolutionär hoch-konservierte Proteine (110). In Säugetieren existieren zwei Isoformen, die im Zytosol lokalisierte SHMT1 (cSHMT) als auch die mitochondriale Isoform SHMT2 (mSHMT) (SHMT2 kodiert auch für ein zweites Transkript, dem die mitochondriale Import-Sequenz fehlt. Dieses als SHMT2 α bezeichnete Enzym ist vorwiegend in Zytoplasma und Nucleus lokalisiert (2)) (111). Die diese Enzyme kodierenden Gene konnten identifiziert sowie auf den Chromosomen 17p11.2 (SHMT1) und 12q13 (SHMT2) lokalisiert werden. Beide Isoformen ähneln sich sehr in ihren kinetischen Eigenschaften und weisen einen hohen Anteil (63%) identischer Nukleotid-Sequenzen auf (110). Es wird angenommen, dass die entsprechenden Regionen auf Chromosom 12 und 17 durch einen Duplikationsprozess entstanden sind (110).

Während SHMT2 relativ konstant und ubiquitär in Säugerzellen exprimiert wird, zeigt SHMT1 ein gewebsspezifisches Expressionsmuster (112). Dieses wird durch alternatives Splicing verwirklicht, welches ebenso eine wichtige und konservierte Eigenschaft der SHMT1 Expression in Säugern zu sein scheint (112). SHMT1 findet sich in erster Linie in Niere und Leber, weniger im Skelettmuskel (112). Die Gegenwart alternativ-gesplicter Isoformen sowie Hinweise auf gewebsspezifische Variationen in den Splicing-Mustern legen ein komplexes Expressionsmuster von SHMT1 nahe, welches entscheidend für die Aufrechterhaltung eines funktionstüchtigen Folatmetabolismus in den verschiedenen Geweben zu sein scheint (112).

Entgegen dieser Ansicht existieren verschiedene Studien mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen. Analysiert wurden unter anderem SHMT1 defiziente Mäuse (*SHMT1*^{-/-}) bzw. *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm)-Mutanten. Die Untersuchungsbefunde reichen von letalem Ausgang bis zu einem nur geringfügig veränderten Phänotyp der Untersuchungstiere (113, 114). In den letzten Jahren scheint sich ein Konsens in der Literatur herauszuarbeiten, dass SHMT1 zumindest kein essentielles House-Keeping Gen darstellt und die Isoformen bis zu einem gewissen Anteil funktional redundant sind. Des Weiteren wird von einer regulierenden Rolle von SHMT1 im Folatezyklus und den damit verbundenen Reaktionswegen (siehe unten) gesprochen (2, 112, 113).

Die zytosolische Serin Hydroxymethyl Transferase 1 katalysiert die reversible Umwandlung von Tetrahydrofolat (THF) zu 5,10-Methylen-tetrahydrofolat (1, 112). Infolge dieser Pyridoxalphosphat (\cong aktiviertes Vitamin B₆) -abhängigen Reaktion kommt es zu einer Übertragung der β -C1-Einheit von Serin auf THF (112). Als weiteres Produkt entsteht Glycin (112).

SHMT1 ist damit zentraler Bestandteil des Folatezyklus. Die Reaktion ist für die Übertragung von C1-Einheiten im zellulären Stoffwechsel von entscheidender Bedeutung. Es werden so Ein-Kohlenstoffeinheiten unter anderem für die Synthese von Thymidylat, Purinen sowie Methionin bereitgestellt (112).

SHMT1 wird vor allem in Verbindung mit der *de novo* Thymidylat-Synthese genannt. Während der Pyrimidinnukleotid-Biosynthese wird Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) mittels Thymidylat-Synthase zu Desoxythymidinmonophosphat (dTMP) methyliert (115). Das von SHMT1 generierte 5,10-Methylen-THF steuert die Methylgruppe bei (115). Das dTMP kann dann weiter zu Desoxythymidintriphosphat (dTTP) phosphoryliert und für die DNA-Synthese verwendet werden (116). Störungen der SHMT1-Expression scheinen über diesen Reaktionsweg unter anderem für die Entstehung von Neuralrohrdefekten verantwortlich zu sein (117).

Bezüglich der Purin-Synthese wird angenommen, dass die von SHMT1-stammenden C1-Einheiten nur einen kleinen Anteil bilden. Der Grund hierfür soll in der reduzierenden Umgebung des Zytoplasmas liegen (NADPH/NADP⁺-Verhältnis), welches eine Umwandlung von 5,10-Methylen-THF zu 10-Formyl-THF nicht unterstützt. (Entscheidend für die Synthese von Purinen und Formiaten ist das mitochondriale SHMT2.) (118)

Methionin ist die initiierende Aminosäure bei der Synthese von Proteinen in Eukaryoten (119). Ferner kann es zu S-Adenosylmethionin (SAM; AdoMet) umgebaut werden (1, 120). Dieser Kofaktor wird in verschiedenen Reaktionen benötigt, zum Beispiel für die Methylierung von Proteinen, Phospholipiden, RNA und DNA (119, 121). Das bei der Abgabe der Methylgruppen entstehende Homocystein wird mittels 5-Methyl-THF wieder zu Methionin

remethyliert (Methioninzyklus) (120). Bei diesem Schritt wird ebenso THF regeneriert (1). Alternativ wird Methionin über Homocystein zu Cystein umgebaut (119). Dieser Prozess ist irreversibel und trägt dazu bei, dass das aus Homocystein regenerierte Methionin nicht ausreicht, um den täglichen Bedarf zu decken (119). Methionin muss daher mit der Nahrung zugeführt werden und gilt als essentielle Aminosäure (119). Als Beispiel für die klinische Relevanz seien hier das erhöhte Risiko für die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit und Schlaganfällen bei erhöhten Homocystein-Konzentrationen als unabhängigen Risikofaktor genannt (122). Der Methylgruppen-Donor SAM spielt auch eine Rolle bei epigenetischen Regulationsprozessen. In diesem Zusammenhang konnten SHMT1-Polymorphismen als Risikofaktor für Multiple Sklerose identifiziert werden (123).

Die zwei Reaktionswege (Thymidylat-Synthese und Methionin-Zyklus) scheinen um das Produkt der von SHMT1-katalysierten Reaktion, 5,10-Methylen-THF, zu konkurrieren (116). Die Methylengruppe kann entweder in die Folat-abhängige Thymidylat-Synthese eingespeist oder für die Remethylierung von Homocystein zu Methionin verwendet werden. Der daraus ableitbare Kofaktor SAM kann dann Methylgruppen für andere Reaktionen im Körper bereitstellen. SHMT1 scheint hier eine vermittelnde Rolle einzunehmen (116). Siehe hierfür auch Abbildung 5.

SHMT1 katalysiert noch eine zweite Reaktion, die irreversible Hydrolyse von 5,10-Methylen-THF zu 5-Formyl-THF (Folinsäure/Leucovorin). 5-Formyl-THF bleibt an das Enzym gebunden und wirkt als Inhibitor von SHMT1 *in vivo* und *in vitro*, obwohl unklar ist, welche Bedeutung diese Reaktion im Stoffwechsel hat (112, 124, 125). Neben 5-Formyl-THF ist auch 5-Methyl-THF ein wirkungsvoller Inhibitor und an der Regulation von SHMT1 beteiligt (126).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass SHMT1 neben seiner enzymatischen Funktion als Gerüstprotein (engl. *scaffold protein*) bei der Synthese von Desoxythymidinmonophosphat (dTMP) eine maßgebliche Rolle übernimmt (115). SHMT1 führt zusammen mit SHMT2 α zu einer Verankerung des Thymidylatsynthese-Multienzymkomplexes an der nukleären Lamina (115).

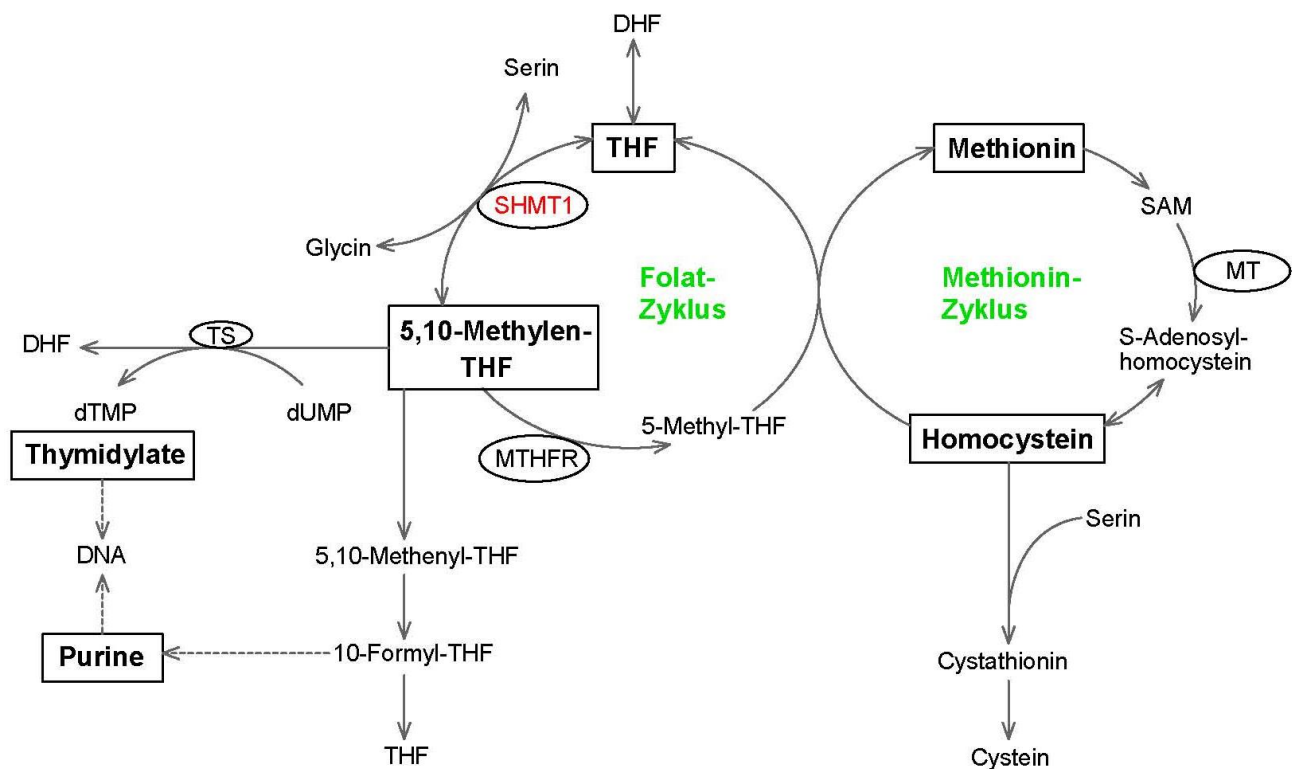


Abb. 5: **SHMT1 und beteiligte Reaktionswege**

SHMT1 katalysiert die reversible Transformation von Tetrahydrofolsäure zu 5,10-Methylen-tetrahydrofolsäure. Serin überträgt dabei eine C1-Einheit und verlässt als Glycin die Reaktion. So werden Methylgruppen unter anderem für die Synthese von Thymidylaten und den Methionin-Zyklus bereitgestellt.

DHF Dihydrofolat, THF Tetrahydrofolat, MTHFR Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, MT Methyltransferase, TS Thymidylat-Synthase, dTMP Desoxythymidinmonophosphat, dUMP Desoxyuridinmonophosphat

Modell modifiziert nach Hebbing 2012 (1) und Anderson 2009 (2), weitere Quellen siehe Text.

Weitreichend wurde der Zusammenhang zwischen SHMT1 und Tumorerkrankungen untersucht. Als Beispiele seien hier hepatozelluläre Karzinome (via DNA Methylierung) (127), Ovarial-Tumore (128), B-Zell Lymphome (129) und akute Lymphatische Leukämien (130) genannt. So ist Folat am Tumorzellwachstum beteiligt, beeinflusst zelluläre antioxidative Vorgänge und Methylierungsprozesse und unterhält damit die Tumorphomöostase (131, 132). Es konnte gezeigt werden, dass SHMT1 in einigen Tumortypen wie dem Bronchial-Karzinom (NSCLC) überexprimiert wird (133). Andere Studien zeigten, dass SHMT1-Knockdown zu Zellzyklusarrest in Bronchialkarzinom-Zellkulturen wie auch zu p53-vermittelter Apoptose führt (132). Diese sei nicht, wie vorher angenommen, durch Serin/Glyzin-Entzug, sondern vielmehr durch Uracil-Fehleinbau in die DNA, hervorgerufen (132).

Über die Bedeutung der SHMT1 geben auch Analysen von Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) des SHMT1 Gens Aufschluss. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass Polymorphismen des SHMT1 Gens mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen assoziiert sind (134). Dies gilt insbesondere für Kombinationen von SHMT1-Polymorphismen mit genetischen Varianzen anderer für den Folat-Metabolismus wichtiger Gene (135, 136). Weiterhin konnten die SNPs-Analysen eine Assoziation zwischen SHMT1-Polymorphismen und dem Risiko für die Entwicklung ischämischer Schlaganfälle (137) sowie eine Korrelation mit der Intima-Media-Dicke als Marker für Arteriosklerose (138) aufzeigen. Schließlich konnte eine jüngere Studie zeigen, dass SHMT1 Promoter-Hypermethylierung das Risiko für essentielle Hypertonie potenziert (139).

2. Ziel der Arbeit und Fragestellung

Die oben genannten SNPs-Analysen liefern erste Daten, die auf eine Assoziation zwischen SHMT1-Expressionsmuster und kardiovaskulärem Risiko hindeuten. Aufgrund dieser Assoziationen könnte die SHMT1 einen beteiligten Faktor bei Gefäßverkalkungen darstellen. Bislang ist die Rolle der SHMT1 bei der osteo-/chondrogenen Transdifferenzierung von Gefäßmuskelzellen nicht bekannt.

Ziel dieser Studie war daher die Rolle der zytosolischen Serin Hydroxymethyl Transferase 1 im Rahmen der Verkalkung glatter Gefäßmuskelzellen und ihre Beteiligung an osteo- und chondrogenen Transdifferenzierungsvorgängen unter Hyperphosphatämie-Bedingungen *in-vitro* zu untersuchen. Ebenso sollte festgestellt werden, durch welche Mechanismen eine Beeinflussung der Kalzifizierungsprozesse möglich ist.

3. Methoden

3.1. Zellkultur

Die Experimente wurden an primären humanen glatten Gefäßmuskelzellen der Aorta (*engl. human aortic smooth muscle cells*, HAoSMCs) durchgeführt, welche von Thermo Fisher Scientific bezogen wurden. HAoSMCs wurden in Waymouth's MB 752/1 Medium und Ham's F-12 nutrient mixture (Nährlösung; Thermo Fisher Scientific) in einem Verhältnis von 1:1 kultiviert. Weitere Bestandteile des Nährmediums waren 10% FBS (Fetales Kälberserum; Thermo Fisher Scientific) sowie zur antibiotischen Abschirmung 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Thermo Fisher Scientific). Es wurden Inkubationsbedingungen von 37°C und 5% CO₂ aufrechterhalten.

Die Zellen wurden bis zur Konfluenz gezüchtet, passagiert und nur die Passagen 4 bis 11 für Experimente verwendet. Das Passagieren (Splitten) konfluenten Kulturen erfolgte nach Waschen mit PBS-Lösung (Phosphate Buffered Saline, phosphatgepufferte Salzlösung; Thermo Fisher Scientific) mittels Trypsinieren: Zugabe von Trypsin/EDTA-Lösung (Ethylendiamintetraessigsäure; Thermo Fisher Scientific) führte zur Resuspendierung der am Boden der Zellkulturflasche anhaftenden Zellen. Nach einer kurzen Inkubation (2 Minuten) konnte unter dem Mikroskop der Resuspensionserfolg abgeschätzt werden. Zur Deaktivierung des Trypsins wurde nun erneut Medium zugefügt und eine Zell-Medium-Suspension gewonnen. In einem weiteren Säuberungsschritt wurde nach Zentrifugation (12000 rpm, 1 Minute, Raumtemperatur) und Entfernung des alten Mediums das entstandene Zellpellett mit frischem Medium aufgebrochen. Es folgte die Bildung von Aliquots in 6-Well Platten (~2x10⁵ Zellen/Well). Medium sowie Agenzien wurden alle 2-3 Tage gewechselt.

Transfektion der Zellen erfolgte mit 10 nM SHMT1 siRNA (Pre-Designed siRNA, ID: s12820; Thermo Fisher Scientific) oder mit 10 nM negative control siRNA (Thermo Fisher Scientific). Hier wurde siPORT *Amine* Transfection Agent (Thermo Fisher Scientific) entsprechend Herstellerangaben verwendet. Nachdem alle Reagenzien auf Zimmertemperatur gebracht wurden, konnte das siPORT *Amine* Transfection Agent in OPTI-MEM I Medium (Thermo Fisher Scientific) verdünnt (1:10) und bei Zimmertemperatur 10 Minuten inkubiert werden. Es wurde eine Verdünnung der siRNA bis zu einer endgültigen Konzentration von 10 nM siRNA je Probe in OPTI-MEM I Medium hergestellt. Nun folgte die Mischung des verdünnten siPORT Transfection Agent mit der verdünnten siRNA sowie eine weitere Inkubation für 10 Minuten. Die so entstandenen Transfektionskomplexe wurden den HAoSMCs zugefügt. Die Zellen konnten 48 Stunden nach der Transfektion für Experimente verwendet

werden. Effektivität des RNA-Silencings wurde mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR; siehe unten) überprüft.

HAoSMCs wurden mit 2 mM β -Glycerophosphat (Sigma-Aldrich) zur Induktion der osteogenen Differenzierungsvorgänge behandelt. Als Antioxidantien fanden 10 μ M TEMPOL (4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy) oder 4-Hydroxy-TEMPO, gelagert in DMSO [Dimethylsulfoxid]; Sigma-Aldrich) bzw. 10 μ M TIRON (Brenzcatechin-3,5-disulfonsäure Dinatriumsalz; Sigma-Aldrich) Verwendung. Um die Vergleichbarkeit der Gruppen zu erhalten, wurde die gleiche Menge des entsprechenden Vehikels als Kontrolle eingesetzt. Mit diesen Substanzen wurden die Zellen für 24 Stunden vor weiterer Verarbeitung für qRT-PCR behandelt.

3.2. Quantitative RT-PCR

RNA-Isolierung

Um Veränderungen der Genexpression in den verschiedenen Behandlungsgruppen bestimmen zu können, musste der mRNA-Gehalt ausgewählter Gene gemessen werden. Entsprechend wurden die Zellen nach Abschluss der Behandlung gewaschen (PBS) und es folgte die Isolation der Gesamt-RNA der Zellen mittels Trizol-Reagenz (Thermo Fisher Scientific) entsprechend den Herstellerangaben: Nach Zugabe von 500 μ l Trizol-Reagenz pro Well wurden die Zellkulturplatten 5 min inkubiert. Mit der Pipette wurde zusätzlich mechanisch die Homogenisation unterstützt und das gewonnene Lysat in neue Mikroreaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von 100 μ l Chloroform folgte eine weitere kurze Inkubation (2-3 min) sowie Zentrifugation (12000 rpm, 15 min, 4°C). So konnte eine obere, wässrige und klare RNA-enhaltende von einer Intermediärphase und einer unteren, roten und organischen Phase (Phenol und Chloroform) getrennt und in neue Gefäße gebracht werden. Eine Präzipitatbildung der Gesamt-RNA dieser wässrigen Phase konnte mittels Zugabe von je 250 μ l Isopropanol und 10-minütiger Inkubation realisiert werden. Nach weiterer Zentrifugation (12000 rpm, 10 min, 4°C), Waschung mit 600 μ l 75%igen Ethanol und Vortexen konnte erneut zentrifugiert (7500 rpm, 5 min, 4°C) werden. Nach Entfernen der Flüssigkeit und 12-minütiger Trocknungsphase an der Luft konnten die RNA-Präzipitate mittels 13 μ l Nuklease-freiem destillierten Wasser resuspendiert werden. Messungen der optischen Dichte der verdünnten Proben unter Verwendung von Biophotometer Plus (Eppendorf) erlaubten die Bestimmung der totalen RNA-Konzentration.

cDNA-Synthese

Die Synthese der komplementären DNA (cDNA) erfolgte unter Verwendung des SuperScript™ III Reverse Transcriptase Kit (Thermo Fisher Scientific). Zwischen 1 und 3 µg der isolierten RNA wurde in kleinere 0,2 ml Mikroreaktionsgefäße pipettiert. Entsprechend der jeweiligen Konzentrationen wurden sie mit destilliertem, DNase- und RNase-freiem Wasser bis auf 12 µl aufgefüllt. Da die verwendeten Substanzen und Reaktionen temperaturempfindlich sind, wurden die Reagenzien stets bei -20°C gelagert, die RNA-Proben bei -80°C, und die folgenden Pipettierschritte über Eis durchgeführt. Es erfolgte die Zugabe von 1 µl (Oligo)dT (Primer) und 1 µl dNTP-Mischung (Desoxyribonukleosidtriphosphate). Nach Mixen und Zentrifugation folgte eine 5-minütige Inkubation bei 65°C im Thermocycler (Bio-Rad T100 PCR / Thermal Cycler) sowie eine Minute über Eis. Nun wurden nacheinander jeweils 4 µl 5x konzentrierter First-Strand Buffer (Puffer; 250 mM Tris-HCl [pH 8.3 bei Zimmertemperatur], 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1 µl 0,1 M DTT (Dithiothreitol/Clelands Reagenz) sowie 1 µl SuperScript III Reverse Transcriptase beigegeben. Die Ansätze mit einem Endvolumen von 20 µl wurden im Reaktionsgefäß kräftig gemischt, zentrifugiert und eine Stunde bei 50°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10-minütiger Erhitzung auf 70°C beendet, in welcher das Enzym inaktiviert wurde.

qRT-PCR

Der mRNA-Gehalt der Proben wurde nun mittels quantitativer Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (*engl. quantitative real-time PCR*, qRT-PCR) bestimmt. Für jedes der untersuchten Gene wurde ein Master Mix angefertigt, welcher je Probe

- 6 µl Nuklease-freies, destilliertes Wasser,
- 1 µl Primer (forward, verdünnt [1:10] mit Nuklease-freiem destillierten Wasser),
- 1 µl Primer (reverse, verdünnt [1:10] mit Nuklease-freiem destillierten Wasser),
- 10 µl iQ™ Sybr Green Supermix (enthält u. a. dNTPs, iTaq™ DNA Polymerase, MgCl₂ und SYBR® Green I, Fluorescein; Bio-Rad Laboratories) enthält.

Zu den verwendeten Primern siehe Tabelle 4.

Für eine Probe wurden 2 µl gewonnene cDNA (verdünnt 1:2 mit Nuklease-freiem destillierten Wasser) und 18 µl Master Mix verwendet und auf eine 96-Well PCR-Platte aufgebracht. Die Platten wurden bei 4°C und 2000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Mittels iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories) erfolgte eine Erhitzung auf 95°C für 2 Minuten zur Denaturierung und Aktivierung der Polymerase. Anschließend wurden 40 Zyklen bestehend aus 15 Sekunden bei 95°C (Denaturierung) und 45 Sekunden bei 55°C (Annealing, Extension) durchgeführt. Nach jedem Zyklus wurde das emittierte grüne Licht ($\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$) gemessen.

Tab. 4: **Verwendete humane Primer**

(5'→3' Orientierung, Thermo Fisher Scientific), fw forward, rev reverse

Gen	Ausrichtung	Nukleotidsequenz	Alias
ALPL	fw	GGGACTGGTACTCAGACAACG	Alkalische Phosphatase
	rev	GTAGGCGATGTCCTTACAGCC	
BAX	fw	CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG	<i>engl. Bcl-2-associated X protein</i>
	rev	CCAGCCCATGATGGTTCTGAT	
BCL2	fw	GGTGGGGTCATGTGTGTGG	<i>engl. B-cell lymphoma 2</i>
	rev	CGGTTCAGGTA CT CAGTCATCC	
CBFA1	fw	GCCTTCCACTCTCAGTAAGAAGA	<i>engl. Core-binding factor subunit alpha-1 (auch RUNX2)</i>
	rev	GCCTGGGGTCTGAAAAGGG	
CYBA	fw	CCCAGTGGTACTTTGGTGCC	<i>engl. Cytochrome B-245 Alpha Chain (auch p22-phox)</i>
	rev	GCGGTCATGTA CT TCTGTCCC	
GAPDH	fw	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
	rev	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG	
MMP2	fw	TACAGGATCATTGGCTACACACC	Matrix-Metalloproteinase-2
	rev	GGTCACATCGCTCCAGACT	
MSX2	fw	TGCAGAGCGTGCAGAGTTC	<i>engl. Msh homeobox 2</i>
	rev	GGCAGCATAGGTTTTGCAGC	
NOX4	fw	TGACGTTGCATGTTTCAGGAG	NADPH Oxidase 4
	rev	AGCTGGTTCGGTTAAGACTGAT	
SHMT1	fw	TTGCCTCGGAGAATTTCCGCC	Serin Hydroxymethyl Transferase 1
	rev	GTCCCGCCATAGTATCTCTGG	

Jede Probe wurde in doppelter Ausführung angefertigt und in der Datenanalyse der Mittelwert verwendet, um den Einfluss von unter anderem Pipettierungenauigkeiten auszugleichen. Pro untersuchtem Gen und Master Mix wurde ebenso eine Negativkontrolle mit destilliertem Wasser durchgeführt. Die relative mRNA-Bildung wurde mittels der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode mit *GAPDH* als konstitutiv exprimierten Haushaltsgen ermittelt. Analysen der Schmelzkurven sicherten eine ausreichende Spezifität. Die Ergebnisse wurden auf die Negativ-Kontroll-Silencing-Gruppe genormt.

3.3. Statistische Auswertung

Angegeben ist das arithmetische Mittel \pm Standardfehler (SEM, engl. *standard error of the mean*). Veränderungen des SEM sind in der gegebenen Versuchsanordnung weniger auf biologische Varianz (geringe genetische Variabilität der HAoSMCs) als auf Messungenauigkeiten etc. zurückzuführen (140).

Die Anzahl unabhängiger Experimente, die in unterschiedlichen Zellpassagen durchgeführt worden sind, wurde mit n beschrieben. Zur Testung auf Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet. Nicht-normal verteilte Datensätze wurden vor der statistischen Analyse transformiert (Logarithmus, Quadratwurzel, Kehrwert), um Normalverteilung entsprechend Shapiro-Wilk-Test zu erzielen. Statistische Analysen wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (engl. *one-way analysis of variance*, one-way ANOVA) gefolgt von Tukey-Test (bei homoskedastischen Datensätzen) oder Games-Howell Test (heteroskedastische Daten) durchgeführt. Nicht normalverteilte Datensätze wurden mit der Steel-Dwass Methode untersucht. Vergleich zweier Gruppen konnte mit dem ungepaarten, zweiseitigen t-Test erreicht werden. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Es wurde eine Darstellung mittels Streudiagrammen gewählt, genauer ausgedrückt Punktdiagrammen (engl. *scatter dot plot*). Auf diese Weise lassen sich eindimensional Verteilungen der Variablen (z.B. Expression einzelner Gene) darstellen und übersichtlich mit anderen Gruppen vergleichen. In Bezug auf die mRNA Expression der untersuchten Gene wurde eine Angabe in willkürlichen Einheiten (engl. *arbitrary units*, willk. Einh.) gewählt. Auf diese Weise kann der relative mRNA Gehalt angegeben werden, da für unsere Zielsetzung die Angabe des absoluten Gehaltes nicht relevant ist. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von IBM SPSS Statistics 22 sowie der JMP 12 Software.

4. Ergebnisse

4.1. Endogene *SHMT1* mRNA Expression \pm Phosphat

Um den Effekt des *SHMT1*-Silencings in unseren Experimenten zu beurteilen, sollte in einem ersten Schritt die endogene *SHMT1* mRNA Expression der HAoSMCs (Neg.Si) gemessen und mit der *SHMT1* Silencing Gruppe (*SHMT1*Si) verglichen werden. Im selben Experiment sollte außerdem die Wirkung von Phosphat auf die Gruppen beurteilt werden. Dazu wurden HAoSMCs nach Transfektion mit Silencing RNA (siRNA) mit Kontrolle oder 2 mM β -Glycerophosphat (P) behandelt.

Wie Abbildung 6 zu entnehmen ist, führte Silencing von *SHMT1* in HAoSMCs zu einer signifikanten Reduktion der *SHMT1* mRNA Expression. Die reduzierte mRNA Expression von *SHMT1* konnte unabhängig von der Behandlung mit Kontrollmedium oder phosphatreichem Medium festgestellt werden. Dieses erste Experiment im Rahmen einer internen Qualitätskontrolle des Silencing-Vorgangs sollte als Grundlage der weiteren Untersuchungen dienen.

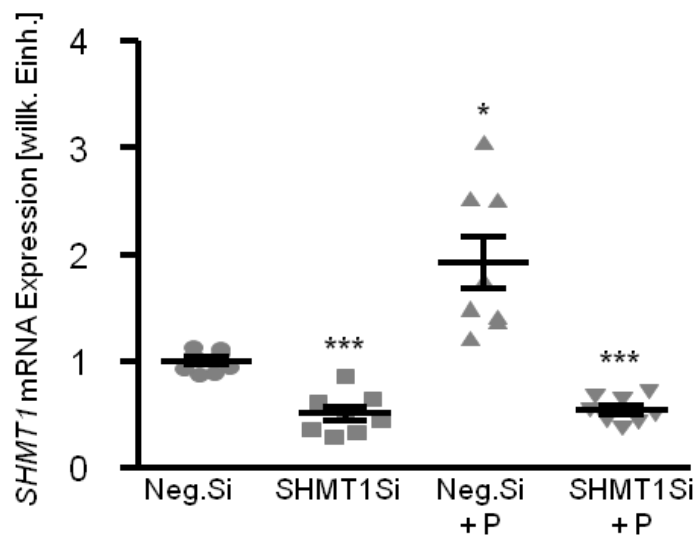


Abb. 6: Endogene *SHMT1* mRNA Expression sowie *SHMT1* Silencing mit und ohne Phosphatbehandlung

Punktdiagramm und arithmetisches Mittel \pm Standardfehler (n=8; willkürliche Einheiten) der *SHMT1* mRNA Expression in HAoSMCs behandelt mit negativ siRNA (Neg.Si) oder *SHMT1* siRNA (*SHMT1*Si) und ohne oder mit Phosphatbehandlung (+P) *(p<0,05), ***(p<0,001) statistisch signifikant im Vergleich mit der negativ Silencing Kontrollgruppe.

Überraschenderweise konnte bei der Zugabe von Phosphat-reichem Medium eine signifikante Zunahme der mRNA Expression in der negativ Silencing Gruppe verglichen mit der negativ Silencing Gruppe ohne Phosphat-Zugabe beobachtet werden (Abb. 6).

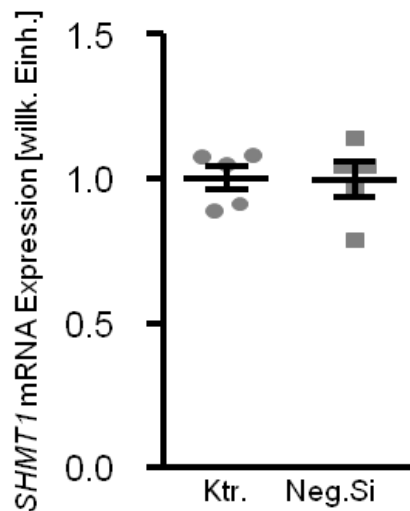


Abb. 7: **Einfluss der Transfektion**

Punktdiagramm und arithmetisches Mittel \pm Standardfehler (n=5; willkürliche Einheiten) der *SHMT1* mRNA Expression in HAoSMCs behandelt ohne Transfizierung (Ktr.) oder mit negativ siRNA (Neg.Si).

Der Einfluss der Transfektion selbst (negative control siRNA) wurde gesondert untersucht, indem die *SHMT1* mRNA Expression der negativ Silencing Kontrollgruppe (Neg.Si) mit einer Gruppe von HAoSMCs ohne Transfektion verglichen wurde (Ktr.) (Abb. 7). Diesen Daten zufolge zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollgruppen mit oder ohne negative control siRNA. Alle folgenden Experimente wurden mit negative control siRNA als Kontrollgruppe (Neg.Si) durchgeführt.

4.2. Effekt des SHMT1 Knockdown auf mRNA Expression osteogener Marker

Um den Einfluss des SHMT1 Knockdowns auf die osteo-/chondrogene Transdifferenzierung zu untersuchen, wurden die HAoSMCs nach Silencing für 24 Stunden mit Kontrollmedium oder 2 mM β -Glycerophosphat (P) behandelt. Anschließend wurde die mRNA Expression osteogener Marker mittels real-time PCR bestimmt.

Silencing von SHMT1 zeigte sich dabei als ausreichend, um eine signifikante Zunahme der mRNA Expression des osteogenen Transkriptionsfaktors *MSX2* herbeizuführen. Die Zunahme der *MSX2* Expression unter SHMT1-Silencing entsprach ungefähr dem Effekt einer Phosphatbehandlung. Eine gemeinsame Phosphatbehandlung mit SHMT1-Silencing tendierte dazu, die *MSX2* mRNA Expression weiter zu erhöhen, ein Effekt der keine statistische Signifikanz erreichte (Abb.8).

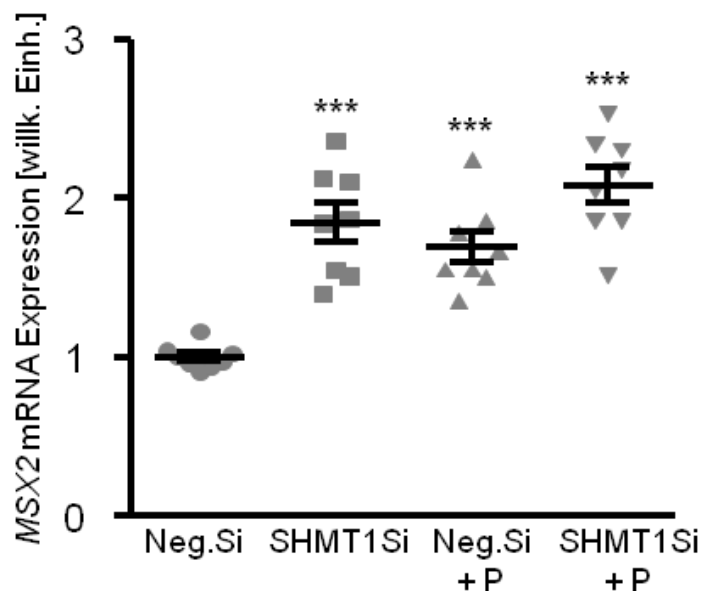


Abb. 8: **SHMT1-Silencing und Phosphat-induzierte mRNA Expression des osteogenen Transkriptionsfaktors *MSX2***

Punktdiagramm und arithmetisches Mittel \pm Standardfehler (n=8, willkürliche Einheiten) der relativen *MSX2* mRNA Expression in HAoSMCs behandelt mit negativ siRNA (Neg.Si) oder SHMT1 siRNA (SHMT1Si) und Behandlung mit Kontrollmedium oder phosphatreichem Medium (+P) ***($p < 0,001$) statistisch signifikant verglichen mit der negativ Silencing Kontrollgruppe.

Ebenso wurde die mRNA Expression des osteogenen Transkriptionsfaktors *CBFA1* in Gefäßmuskelzellen nach Silencing von SHMT1 mit und ohne Phosphatzugabe bestimmt. Auch die mRNA Expression von *CBFA1* zeigte sich in Folge des SHMT1-Silencings erhöht, verglichen mit den negativ-Silencing behandelten Zellen. Wiederum wurde eine ähnlich hohe Expression von *CBFA1* mRNA unter Phosphatbehandlung verglichen mit SHMT1-Silencing festgestellt. Unter Phosphatbehandlung mit gleichzeitigem Silencing von SHMT1 zeigte sich erneut eine Tendenz zu einer weiter erhöhten *CBFA1* mRNA Expression, ein Effekt der keine statistische Signifikanz erreichte (Abb. 9).

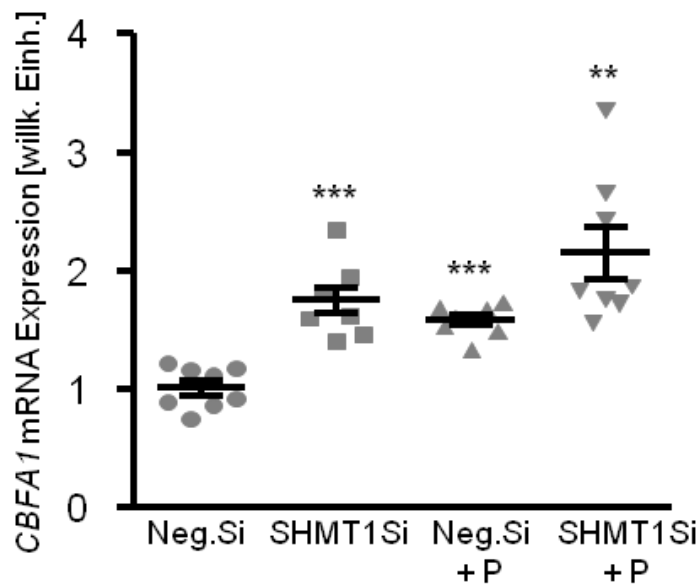


Abb. 9: **SHMT1-Silencing und Phosphat-induzierte mRNA Expression des osteogenen Transkriptionsfaktors *CBFA1***

Punktdiagramm und arithmetisches Mittel \pm Standardfehler (n=8, willkürliche Einheiten) der relativen *CBFA1* mRNA Expression in HAOsmCs behandelt mit negativ siRNA (Neg.Si) oder SHMT1 siRNA (SHMT1Si) und Behandlung mit Kontrollmedium oder phosphatreichem Medium (+P) ** (p<0,01), *** (p<0,001) statistisch signifikant verglichen mit der negativ Silencing Kontrollgruppe.

Als weiterer Indikator für osteogene Transdifferenzierung wurde die mRNA Expression des Enzyms gewebsspezifische alkalische Phosphatase (*ALPL*) bestimmt. Es zeigte sich wieder eine Zunahme der *ALPL* mRNA Expression unter dem SHMT1-Silencing Manöver verglichen mit den Kontrollzellen. Auch unter Phosphatbehandlung kam es zur Zunahme der *ALPL* mRNA Expression, mit vergleichbaren Effekten zu Bedingungen von SHMT1-Silencing. Unter gleichzeitiger Behandlung mit Phosphat und SHMT1-Silencing zeigte sich die mRNA Expression von *ALPL* weiter erhöht (Abb. 10).

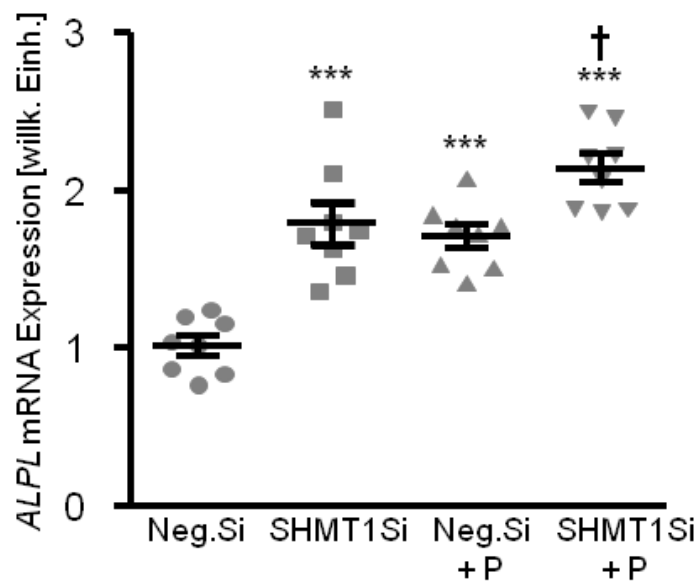


Abb. 10: **SHMT1-Silencing und Phosphat-induzierte mRNA Expression des osteogenen Enzyms *ALPL***

Punktdiagramm und arithmetisches Mittel \pm Standardfehler ($n=8$, willkürliche Einheiten) der relativen *ALPL* mRNA Expression in HAoSMCs behandelt mit negativ siRNA (Neg.Si) oder SHMT1 siRNA (SHMT1Si) und Behandlung mit Kontrollmedium oder phosphatreichem Medium (+P) **($p<0,01$), ***($p<0,001$) statistisch signifikant verglichen mit der negativ Silencing Kontrollgruppe; †($p<0,05$) statistisch signifikant zur negativ Silencing Kontrollgruppe mit β -Glycerophosphat (P).

Dies weist darauf hin, dass Silencing von SHMT1 eine osteogene Transdifferenzierung von Gefäßmuskelzellen fördern könnte, sowie dass derartige Effekte durch Phosphatbehandlung verstärkt werden könnten.

4.3. Effekt des SHMT1 Knockdown auf mRNA Level oxidativer Stress- und Apoptose-Marker

Um Indikatoren für oxidativen Stress zu untersuchen, wurde die mRNA Expression der Marker NADPH Oxidase 4 *NOX4*, Cytochrome B-245 Alpha Chain *CYBA* und Matrix Metalloproteinase 2 *MMP2* bestimmt. Dabei zeigte sich eine deutliche Zunahme der mRNA Expression des oxidativen Markers *NOX4* (Abb. 11 A) unter SHMT1-Silencing Bedingungen. Gleichermäßen zeigte die mRNA von *CYBA* (Abb. 11 B) eine Zunahme unter Bedingungen des SHMT1-Silencing. Ebenso zeigten HAoSMCs nach SHMT1 Knockdown eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression der Matrix Metalloproteinase 2 (*MMP2*) (Abb. 11 C), verglichen mit Zellen ohne SHMT1 Knockdown.

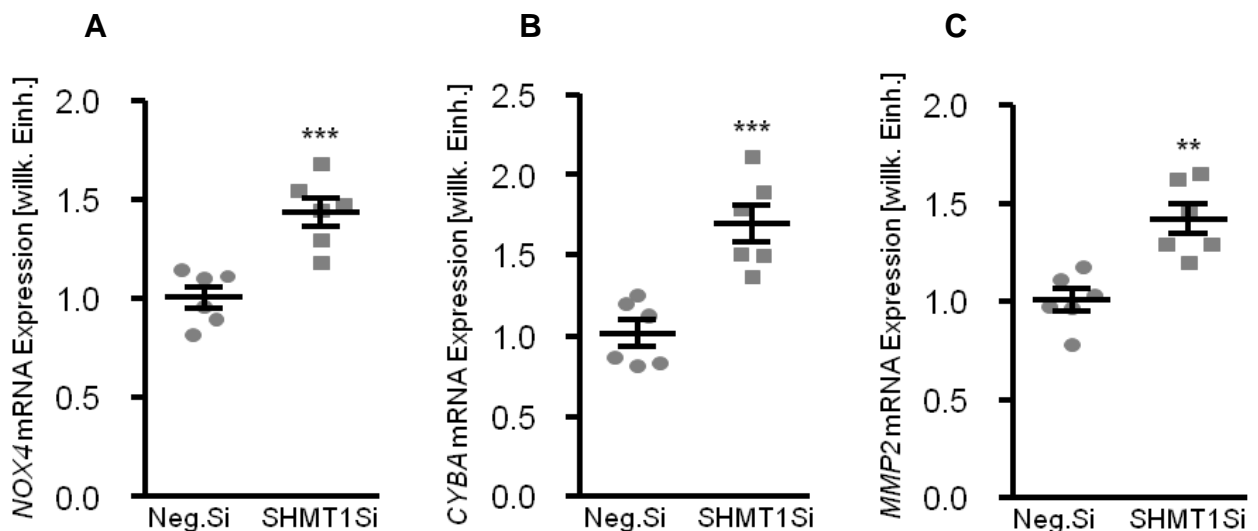


Abb. 11: **SHMT1-Silencing und mRNA Expression von Markern oxidativem Stress: *NOX4* (A), *CYBA* (B) und *MMP2* (C)**

Punktdiagramm und arithmetisches Mittel \pm Standardfehler (n=6, willkürliche Einheiten) der relativen mRNA Expression von *NOX4* (A), *CYBA* (B) und *MMP2* (C) in HAoSMCs behandelt mit negativ siRNA (Neg.Si) oder SHMT1 siRNA (SHMT1Si). **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$) statistisch signifikant verglichen mit der negativ Silencing Kontrollgruppe.

In weiterer Folge wurden Versuche durchgeführt, um einen möglichen Einfluss des Knockdowns von SHMT1 auf Apoptoseprozesse in HAoSMCs abzuschätzen. Zu diesem Zweck wurde die *BAX/BCL2* mRNA Ratio in den beiden Gruppen bestimmt. Dabei fand sich eine signifikant höhere *BAX/BCL2* mRNA Ratio in der SHMT1 Silencing Gruppe verglichen mit der negativ Silencing Gruppe (Abb. 12), ein Befund, der hinweisend auf vermehrte Apoptosevorgänge sein könnte.

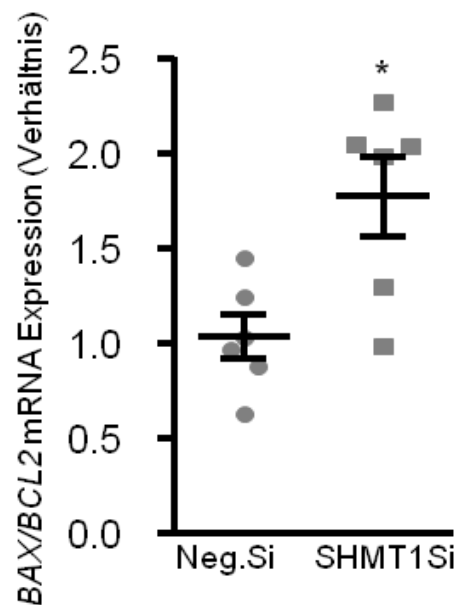


Abb. 12: **SHMT1-Silencing und mRNA Expression der Apoptosemarker *BAX* und *BCL2* im Verhältnis zueinander**

Punktdiagramm und arithmetisches Mittel \pm Standardfehler (n=6, willkürliche Einheiten) der *BAX/BCL2* Expressions-Ratio in HAoSMCs behandelt mit negativ siRNA (Neg.Si) oder SHMT1 siRNA (SHMT1Si). *(p<0,05) statistisch signifikant verglichen mit der negativ Silencing Kontrollgruppe.

Diese Beobachtungen der Zunahme von Markern für oxidativen Stress und Apoptose sowie proapoptotischer Faktoren deuteten auf eine Zunahme des oxidativen Stresses in SHMT1-Knockdown Gefäßmuskelzellen hin.

4.4. Antioxidantien

In einem letzten Schritt sollte eruiert werden, inwieweit eine mögliche Entstehung von oxidativem Stress an den pro-kalzifizierenden Effekten des SHMT1-Silencing beteiligt sein könnte. Zu diesem Zweck erfolgte die Zugabe von zwei antioxidativ wirkenden Substanzen TEMPOL (4-Hydroxy-TEMPO) und TIRON (Brenzcatechin-3,5-disulfonsäure Dinatriumsalz) nach dem SHMT1-Silencing. In der Folge wurde bestimmt, ob die Zugabe von Antioxidantien die osteo- und chondrogenen Transdifferenzierungsvorgänge glatter Gefäßmuskelzellen, gemessen anhand der mRNA Expression der osteogenen Marker, aufheben kann.

Die Auswirkungen der Zugabe von TEMPOL und TIRON unter SHMT1-Silencing auf die *SHMT1* mRNA Expression der HAoSMCs sind in Abbildung 13 dargestellt. Es zeigte sich wie erwartet eine signifikante Reduktion der *SHMT1* mRNA-Expression durch das SHMT1-Silencing. Ein modifizierender Einfluss der Antioxidantien auf die *SHMT1* Expression in der SHMT1-Silencing Gruppe konnte nicht festgestellt werden.

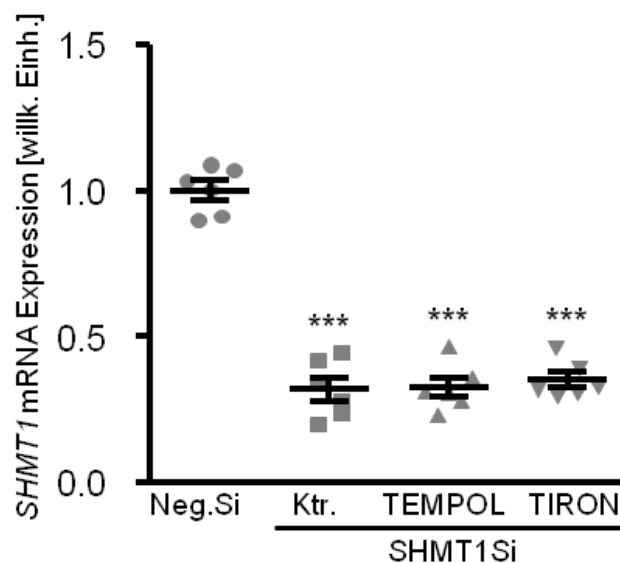


Abb. 13: **SHMT1 mRNA Expression unter Zugabe von Antioxidantien**

Punktdiagramm und arithmetisches Mittel \pm Standardfehler (n=6, willkürliche Einheiten) der relativen *SHMT1* mRNA Expression in HAoSMCs behandelt mit negativ siRNA (Neg.Si) oder SHMT1 siRNA (SHMT1Si) und ohne oder mit zusätzlicher Behandlung mit den Antioxidantien TEMPOL oder TIRON. ***(p<0,001) statistisch signifikant verglichen mit der negativ Silencing Kontrollgruppe.

In weiterer Folge wurde die mRNA Expression der bereits beschriebenen osteogenen Marker bestimmt. Erneut zeigte sich eine Zunahme der mRNA Expression des osteogenen Transkriptionsfaktors *MSX2* nach SHMT1-Silencing, verglichen mit negativem Kontroll-Silencing. Allerdings konnte sowohl durch Zugabe von TEMPOL als auch TIRON eine statistisch signifikante Reduktion der erhöhten mRNA-Expression von *MSX2* herbeigeführt werden, wie in Abbildung 14 dargestellt ist. Des Weiteren kann angemerkt werden, dass TEMPOL in dieser Versuchsanordnung tendenziell die *MSX2* mRNA Expression stärker absenken konnte als TIRON, ein Effekt, der aber keine statistische Signifikanz aufwies.

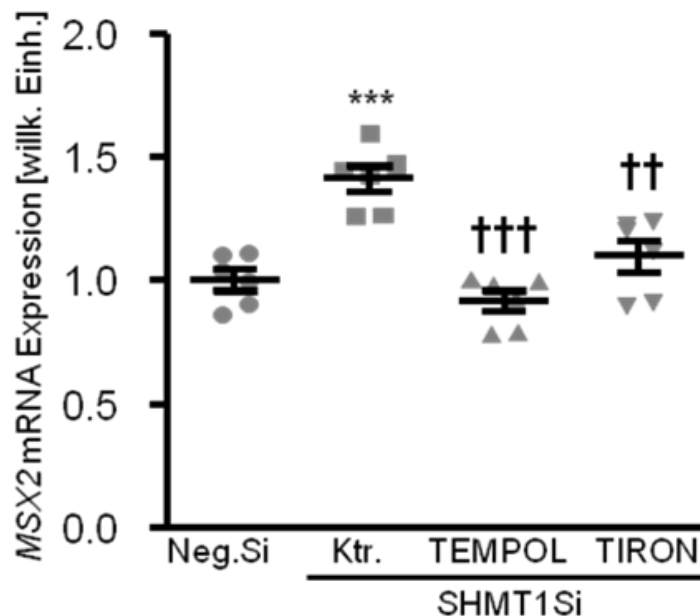


Abb. 14: **SHMT1-Silencing und mRNA Expression des osteogenen Transkriptionsfaktors *MSX2* unter Zugabe von Antioxidantien**

Punktdiagramm und arithmetisches Mittel \pm Standardfehler (n=6, willkürliche Einheiten) der relativen *MSX2* mRNA Expression in HAoSMCs behandelt mit negativ siRNA (Neg.Si) oder SHMT1 siRNA (SHMT1Si) und ohne oder mit zusätzlicher Behandlung mit den Antioxidantien TEMPOL oder TIRON. *** (p<0,001) statistisch signifikant verglichen mit der negativ Silencing Kontrollgruppe; †† (p<0,01), ††† (p<0,001) statistisch signifikant zur SHMT1 Silencing Kontrollgruppe.

Ebenso wurde unter Behandlung mit SHMT1-Silencing und gleichzeitiger Antioxidantien-Behandlung durch Zugabe von TEMPOL und TIRON die Expression des osteogenen Transkriptionsfaktors *CBFA1* bestimmt. Dabei bestätigte sich die zuvor beobachtete Erhöhung der *CBFA1* mRNA Expression durch SHMT1-Silencing verglichen mit der Kontrollgruppe. Zugabe der Antioxidantien TEMPOL und TIRON konnten wiederum die erhöhte mRNA Expression von *CBFA1* unter SHMT1-Silencing Bedingungen absenken, sodass die mRNA Expression von *CBFA1* unter Zugabe der Antioxidantien signifikant reduziert wurde verglichen mit den kontrollbehandelten Zellen nach SHMT1-Silencing (Abb.15).

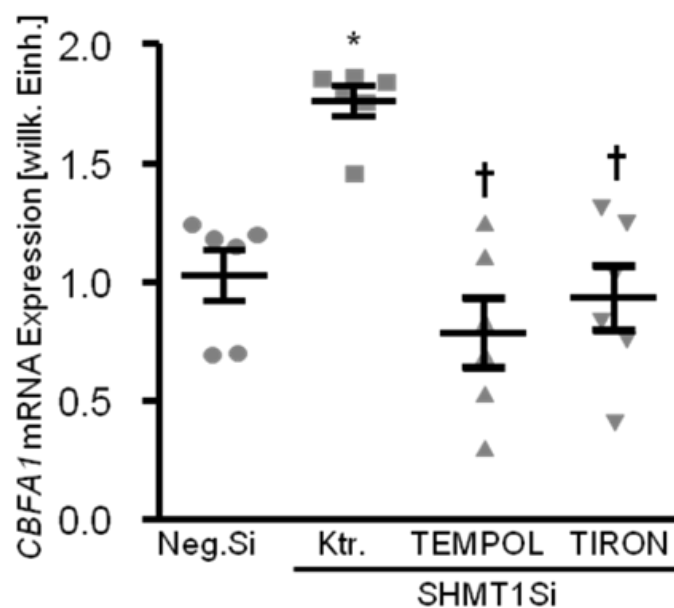


Abb. 15: **SHMT1-Silencing und mRNA Expression des osteogenen Transkriptionsfaktors *CBFA1* unter Zugabe von Antioxidantien**

Punktdiagramm und arithmetisches Mittel ± Standardfehler (n=6, willkürliche Einheiten) der relativen *CBFA1* mRNA Expression in HAOsmCs behandelt mit negativ siRNA (Neg.Si) oder SHMT1 siRNA (SHMT1Si) und ohne oder mit zusätzlicher Behandlung mit den Antioxidantien TEMPOL oder TIRON. *(p<0,05) statistisch signifikant verglichen mit der negativ Silencing Kontrollgruppe; †(p<0,05) statistisch signifikant zur SHMT1 Silencing Kontrollgruppe.

Auch wurde erneut die Expression des osteogenen Enzyms *ALPL* bestimmt, das wie bereits beschrieben einen entscheidenden Faktor bei Gefäßverkalkungen darstellt. Wiederum zeigte sich, verglichen mit der Kontrollgruppe, eine Erhöhung der *ALPL* mRNA Expression unter SHMT1-Silencing. Vergleichbar mit den zuvor beobachteten Effekten für *MSX2* und *CBFA1* wurde die erhöhte *ALPL* mRNA Expression unter SHMT1-Silencing Bedingungen durch zusätzliche Zugabe der Antioxidantien TEMPOL oder TIRON wieder abgeschwächt (Abb. 16).

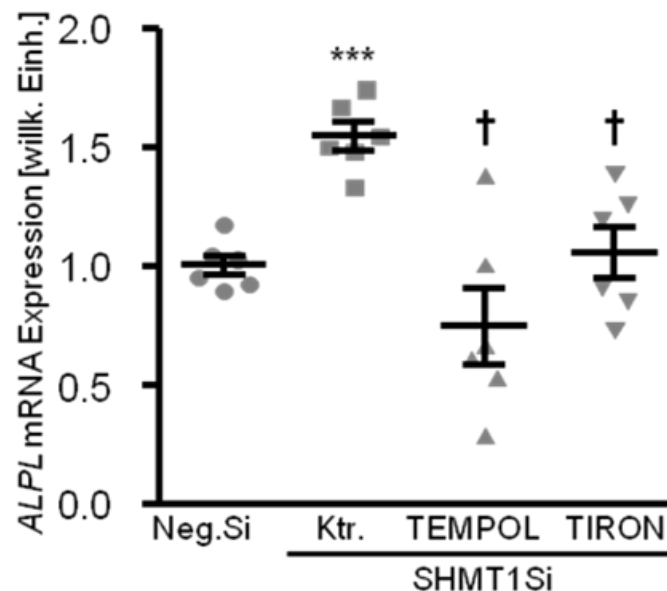


Abb. 16: **SHMT1-Silencing und mRNA Expression des osteogenen Enzyms *ALPL* unter Zugabe von Antioxidantien**

Punktdiagramm und arithmetisches Mittel \pm Standardfehler (n=6, willkürliche Einheiten) der relativen *ALPL* mRNA Expression in HAoSMCs behandelt mit negativ siRNA (Neg.Si) oder SHMT1 siRNA (SHMT1Si) und ohne oder mit zusätzlicher Behandlung mit den Antioxidantien TEMPOL oder TIRON. ***(p<0,001) statistisch signifikant verglichen mit der negativ Silencing Kontrollgruppe; †(p<0,05) statistisch signifikant zur SHMT1 Silencing Kontrollgruppe.

5. Diskussion

5.1. SHMT1 und osteogene Transdifferenzierung von Gefäßmuskelzellen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass SHMT1 in osteo-/chondrogenen Transdifferenzierungsvorgängen der glatten Gefäßmuskelzelle eine Rolle spielen könnte. Die SHMT1 mRNA Expression wurde durch Phosphatbehandlung gesteigert. Unterdrückung der SHMT1-Expression durch Silencing führte zu einer vermehrten mRNA Expression der osteogenen Transkriptionsfaktoren MSX2 und CBFA1. Ebenso wurde die Expression der alkalischen Phosphatase ALPL erhöht. Diese Effekte sind hinweisend auf eine vermehrte osteogene Reprogrammierung der glatten Gefäßmuskelzellen. Diese Beobachtungen wurden durch weitere Versuche unserer Arbeitsgruppe bestätigt. So zeigte sich unter SHMT1 Silencing und Phosphatbehandlung ebenso eine erhöhte Aktivität der alkalischen Phosphatase (141). Ebenso konnte in den weiterführenden Studien gezeigt werden, dass der Kalzium-Gehalt als Indikator der Verkalkung von Zellkulturen unter Kalzifikationsbedingungen durch das Silencing von SHMT1 erhöht wurde (141). Diese Ergebnisse unterstützen die Beobachtungen dieser Arbeit und zeigen eine Rolle der SHMT1 bei der Verkalkung glatter Gefäßmuskelzellen auf.

Mechanistisch greift SHMT1 wahrscheinlich in Signaltransduktionswege von Apoptose und oxidativem Stress der VSMC ein: die Expression spezifischer Marker für oxidativen Stress und vermehrtes Apoptose-Signaling wurde durch Silencing von SHMT1 verstärkt. Ferner sind Antioxidantien in der Lage, die durch SHMT1-Silencing hervorgerufenen osteoinduktiven Effekte abzumildern. Die Beteiligung von oxidativem Stress an den Folgeeffekten von SHMT1 Silencing wird durch weitere Versuche unterstützt, bei denen sich eine reduzierte antioxidative Kapazität der Zellen nach SHMT1-Silencing zeigte (141). In Zusammenschau deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass SHMT1 in Gefäßmuskelzellen eine protektive Rolle, die vor Gefäßverkalkungen schützt, einnehmen könnte.

5.2. Interpretation der Ergebnisse im Kontext der gegenwärtigen Literatur

Eine Verkalkung der vaskulären Media (VCm) wird besonders durch Hyperphosphatämie und dadurch induzierte Fehlfunktion der glatten Gefäßmuskelzellen hervorgerufen (34, 56). *In vivo*- und *in vitro*-Experimente konnten bestätigen, dass eine Erhöhung der extrazellulären Phosphatlevel die phänotypischen Veränderungen der VSMC hin zu einer osteoblasten-ähnlichen Zelle fördert (41). Diese ist durch eine veränderte Genexpression gekennzeichnet (56). Unter der Vielzahl der an diesen Prozessen beteiligten und bereits identifizierten Faktoren sind insbesondere die Transkriptionsfaktoren CBFA1 und MSX2 zu nennen (56). Sie spielen wie eingangs erläutert eine wesentliche Rolle sowohl in der

Osteogenese von Knochen als auch bei der extraossären Verkalkung (56). Als frühester Marker in Osteoblasten ist insbesondere CBFA1 für die Initiierung der osteoblastären Differenzierung unabdingbar und wurde daher als Master-Transkriptionsfaktor der Osteogenese beschrieben (81, 142). Zusammen mit MSX2 als Vertreter des BMP2-Signalweges stellen diese beiden Transkriptionsfaktoren valide Messparameter zur Erfassung der angestoßenen osteogenen Transdifferenzierungsvorgänge dar (143). Dies steht im Einklang mit der gegenwärtigen Literatur, da sie auch als dementsprechende Marker in zahlreichen anderen Studien in diesem Gebiet verwendet werden (73, 142, 143). Dasselbe gilt für die Messung der alkalischen Phosphatase (ALPL), die aufgrund der Spaltung von Pyrophosphat als anerkanntes Schlüsselenzym der Hydroxylapatit-Bildung angesehen wird (94).

Im Rahmen der veränderten Expressionsmuster der VSMC kommt es zu einer Hochregulation von CBFA1 und MSX2, welche über verschiedene Mechanismen zu einer gesteigerten Expression und Aktivität der alkalischen Phosphatase und schließlich zu extrazellulären Hydroxylapatitablagerungen führen (56). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass SHMT1 einen Einfluss auf diese Phosphat-induzierten Veränderungen hat: Ein Knockdown von SHMT1 führt zu einer Erhöhung der Expression der osteogenen Transkriptionsfaktoren (CBFA1, MSX2) als auch der ALPL. SHMT1-Silencing scheint also eine Verstärkung der osteo-/chondrogenen Signalwege herbeizuführen. Auch konnte eine vermehrte Kalziumablagerung unter SHMT1-Silencing nachgewiesen werden (141). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass glatte Gefäßmuskelzellen auf eine Phosphat-Behandlung mit einer verstärkten SHMT1-mRNA-Bildung reagieren. Daraus könnte interpretiert werden, dass erhöhte SHMT1-Level in Phosphat-behandelten VSMCs anscheinend nötig sind, um das Ausmaß der Verkalkung zu limitieren. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass SHMT1 eine protektive Rolle in den Prozessen der vaskulären Verkalkung spielen könnte.

Interessanterweise reagieren die Gefäßmuskelzellen bereits auf alleiniges SHMT1-Silencing mit einer gesteigerten mRNA-Expression der genannten osteogenen Marker. Eine gesteigerte Kalzium-Ablagerung zeigte sich in den weiterführenden Versuchen jedoch erst unter Erhöhung von Kalzium und Phosphat im Medium, ohne die kein ausreichendes Substrat für die Mineralisierung vorhanden ist (141). Diese Beobachtung steht im Einklang mit anderen Verkalkungs-Modellen in VSMCs, bei denen ebenso Kalzium- und Phosphat-Supplementation im Zellkultur-Medium für eine maximale Mineralisation benötigt werden (144). Die in dieser Studie untersuchten Reaktionswege stellen unter anderem eine Verbindung zu oxidativem Stress und Apoptosevorgängen her.

5.3. Bedeutung von SHMT1 in Signalwegen der osteo-/chondrogenen Transdifferenzierung von VSMCs

Oxidativer Stress spielt eine bekannte und entscheidende Rolle in der Pathogenese der intimalen vaskulären Verkalkung (VCi) (145). Er scheint aber ein ebenso wichtiger Mediator für die Entwicklung der medialen Form der VC zu sein (83, 146), wie sie bei der chronischen Nierenerkrankung auftritt (69, 147). Oxidativer Stress moduliert die osteoblastäre Differenzierung von VSMCs (66) und stimuliert in SMC-Kulturen die Expression von CBFA1 (83). In der vorliegenden Arbeit wurde die mögliche Assoziation von SHMT1 mit oxidativem Stress untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Silencing von SHMT1 eine Imbalance zwischen antioxidativen Faktoren und oxidativen Produkten induziert: Während einerseits eine Reduktion der antioxidativen Kapazität gemessen wurde (141), konnte andererseits eine Zunahme der NOX4- und CYBA-mRNA-Expression erfasst werden. Letztere sind entscheidende Komponenten der ROS-erzeugenden NADPH-Oxidase (102, 103). Diese wird als Reaktion auf Stimuli wie Urämie und Hyperphosphatämie in VSMCs hochreguliert (148, 149).

Oxidativer Stress kann über verschiedene Mechanismen zur VCm beitragen (83, 99, 106, 150). Ein möglicher Mechanismus liegt in der Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen (99), welche u.a. an den phänotypischen Veränderungen der glatten Gefäßmuskelzelle sowie Matrix-Degradation beteiligt sind (68, 105). Die aktuellen Ergebnisse zeigen, dass SHMT1-Silencing zu einer erhöhten mRNA-Expression der MMP-2 führte. In anderen Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass im Verlauf der chronischen Nierenerkrankung Expression und Aktivität von Matrix-Metalloproteasen zunehmen (68).

Das Antioxidans TEMPOL (4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy oder 4-Hydroxy-TEMPO) ist ein zell-permeables Nitroxid. Es schützt Mitochondrien gegen oxidativen Schaden und erhöht die Bioverfügbarkeit von NO, einem funktionellen Antagonisten von Superoxid (148, 151). Nitroxide metabolisieren Superoxid-Anionen (O_2^-) zu H_2O_2 und werden daher auch als SOD (Superoxiddismutase)-Mimetika angesehen (152). Außerdem katalysieren sie den Metabolismus verschiedener ROS und reduzieren damit deren Anhäufung im Gewebe als auch innerhalb der Zellen (151). TEMPOL verlängert das Leben von Ratten, wenn es ihnen von Geburt an gegeben wird (151). In verschiedenen Untersuchungen konnte der protektive Effekt von TEMPOL auf zahlreiche Organsysteme (Herz, Gehirn u.a.) und in verschiedenen Pathologien gezeigt werden (Diabetes mellitus, Dyslipidämie, Ischämie, Schock u.a.) (151).

Der Superoxid-Scavenger Tiron (Brenzcatechin-3,5-disulfonsäure Dinatriumsalz) ist ein Metall-Chelator (153). Er bildet mit Metall-Ionen einen wasserlöslichen Komplex, der als Vitamin E-Analogon ein potentes Antioxidans darstellt (154). Er scheint in den Mitochondrien zu

akkumulieren und so reaktive Sauerstoffspezies direkt an der Quelle zu eliminieren (154). Ferner wird es als Antidot zur Behandlung von Metallvergiftungen angewandt (154).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die osteoinduktiven Effekte des SHMT1-Silencings mit oxidativem Stress verknüpft sind: Die Zugabe der Antioxidantien reduzierte die Expression der Marker osteogener Transdifferenzierung (MSX2, CBFA1) sowie die alkalische Phosphatase unter SHMT1-Silencing Bedingungen. Die bedeutende Rolle von oxidativem Stress bei der vaskulären Verkalkung wird auch durch andere Beobachtungen unterstützt. So wurde gezeigt, dass die Administration von TEMPOL die mRNA-Expression von CBFA1 und Osteocalcin reduziert und somit die phänotypischen Veränderungen der VSMC inhibiert (149). Eine weitere Möglichkeit, wie TEMPOL die VCm positiv beeinflussen kann, liegt in der Vermeidung von Apoptosevorgängen (155). Obwohl die vorliegende Arbeit diesen Bereich nicht detailliert adressiert, konnten andere Autoren in Tiermodellen nachweisen, dass TEMPOL-Gabe Apoptose in VSMCs nach Gefäßverletzung inhibiert (155). Es gibt damit bereits mehrfach Hinweise, die andeuten, dass Antioxidantien in glatten Gefäßmuskelzellen protektiv gegen Mechanismen der vaskulären Verkalkung wirken. Diese Beobachtungen werden durch die hier durchgeführten SHMT1-Silencing-Experimente unterstützt.

Oxidativer Stress kann als Trigger für Apoptosevorgänge wirken (106). Bei Apoptose werden Kristallisationskeime für die weitere Hydroxylablagerungen gebildet und es kommt zum Untergang benachbarter VSMCs (107, 109). Um auf molekularer Ebene Apoptosevorgänge zu messen, bietet sich die BAX/BCL2-Ratio an. Die Bcl2-Familie von Proteinen spielt eine zentrale Rolle in der zellulären Regulation von Apoptose (156). Sie umfassen pro-apoptotische (Bax, Bak, Bok, Bim etc.) und anti-apoptotische (Bcl2, Bcl-W, Mcl-1 etc.) Faktoren, wobei weniger die Konzentration einzelner als das Zusammenspiel bzw. deren Verhältnis ausschlaggebend zu sein scheint (156).

Die hier durchgeführten Versuche zeigen, dass SHMT1-Silencing die BAX/BCL2-Ratio anhebt. Dies deutet darauf hin, dass es in den Zellen zu einer Anreicherung apoptosefördernder Faktoren gekommen sein könnte. Ob das eine Folge des bereits dargestellten vermehrten oxidativen Stresses in den Zellen oder eine direkte Folge des SHMT1-Silencing darstellt, bleibt unklar. Es konnte in anderen Arbeiten aber gezeigt werden, dass SHMT1-Knockdown p53-vermittelte Apoptosevorgänge in Krebszellen induziert (132). Dabei führte eine SHMT1 Depletion zu einem Zellzyklusarrest sowie Uracil-Fehleinbau (132). Vermutet wurde, dass ein Knockdown der Transferase zu einer herabgesetzten Thymidylat-Synthese führt, in deren Folge sich dUMP ansammelt und ein Mangel an dTMP entsteht (132). Es wurde angenommen, dass dieses Missverhältnis Ursache für den festgestellten Uracil-Fehleinbau sein könnte (132). Hier könnte auch die eingangs erwähnte Rolle von SHMT1 als Gerüstprotein und Bestandteil des Thymidylatsynthese-Multienzymkomplexes wichtig sein (115). Die *de novo* Thymidylat-

Synthese findet im Zellkern statt und SHMT1 wird für die Verankerung des Enzymkomplexes an der nukleären Lamina verantwortlich gemacht (115).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kann nicht abgeschätzt werden, welche Bedeutung die angezeigten Apoptosevorgänge für die verstärkte Transdifferenzierung SHMT1-Silencing und Kalzifizierung hat. Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass sowohl apoptotische Körperchen als auch Matrix-Vesikel als Nidus für die weitere Mineralisation dienen (56, 107). Des Weiteren führen die zunehmende osteo-/chondrogene Transdifferenzierung als auch eine Erhöhung der Apoptoserate zu einem Untergang funktionstüchtiger glatter Gefäßmuskelzellen, welche Mineralisierungs-Inhibitoren wie Fetuin-A oder MGP produzieren könnten (64). Diese Arbeit konnte zeigen, dass SHMT1-Silencing sowohl die mRNA-Expression der Matrix-Metalloproteinase-2 anhebt als auch apoptosefördernd (gemessen an der BAX/BCL2-Ratio) wirken könnte. Dies ist aber eine reine Assoziation und kann keine Kausalität darstellen. Dennoch konnten andere Studien zeigen, dass die von VSMCs abgeschnürten Matrix-Vesikel unter anderem mit MMP-2 angereichert waren, Vorgänge, die bei der Verkalkung eine wichtige Rolle spielen (108).

Es kann zusammengefasst werden, dass Hyperphosphatämie-Bedingungen in VSMCs zu einer vermehrten Expression von SHMT1 führen. Die genauen Mechanismen, die diesen Effekt verursachen, sind noch unklar. Des Weiteren kann angenommen werden, dass die vermehrte SHMT1 mRNA Produktion als Schutzmechanismus der Zelle zu verstehen ist, da ein Mangel an SHMT1 die vaskuläre Verkalkung aggraviert (gemessen an gesteigerten osteogenen Transkriptionsfaktoren und höherem Kalziumgehalt) (141). Als Effektoren der osteogenen Effekte von SHMT1-Mangel konnten oxidativer Stress und Apoptoseinduktion identifiziert werden, obwohl unklar bleibt, welche Signaltransduktionswege im Einzelnen ablaufen.

5.4. Hypothetische Effekte des SHMT1-Mangels bei vaskulärer Kalzifizierung

Bezüglich seiner Rolle im Folatzyklus ist SHMT1 sehr gut untersucht. Aufgrund der zahlreichen Verknüpfungen mit anderen Stoffwechselwegen gibt es eine Vielzahl potentieller Mechanismen, wie SHMT1 direkt oder indirekt via einen seiner Metaboliten Einfluss auf den Zellstoffwechsel nehmen kann. Die hier gewonnen Erkenntnisse stellen einen ersten Einblick in die Funktion von SHMT1 dar, die genauen mechanistischen Effekte können aber nur vermutet werden. Hypothetischerweise könnten mehrere Signalwege dabei eine Rolle spielen:

- 1) SHMT1 reguliert das Verhältnis zwischen Tetrahydrofolat (THF) und 5,10-MethylenTHF im Rahmen des Folatstoffwechsels (1, 112). Dieser ist, wie oben erläutert, eng mit dem Methioninzyklus verknüpft (1). SHMT1 könnte in diesem Rahmen Einfluss auf den

Homocystein-Metabolismus nehmen. Homocystein ist unter anderem ein Induktor von oxidativem Stress, denn es stimuliert die Bildung von Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen (157). Hyperhomocysteinämie ist assoziiert mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen und es gibt starke Hinweise dafür, dass dies in einem kausalen Zusammenhang steht (158). Ebenso scheint Homocystein über die Aktivierung von CBFA1 bei der vaskulären Kalzifizierung eine Rolle zu spielen (159). Inwieweit Homocystein an den pro-kalzifizierenden Effekten des SHMT1-Silencings beteiligt ist, bleibt aber unklar.

- 2) Wie eingangs erläutert, wird bei der durch SHMT1 katalysierten Reaktion auch Glycin gebildet (1, 112). Neue Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, dass Glycin selbst auch eine Rolle bei den Prozessen der Arteriosklerose spielt: Glycin ist ein wichtiger Bestandteil von Kollagen und es konnte festgestellt werden, dass abnorm geschaffenes Kollagen einen weiteren Faktor in der Initiation und Progression medialer Verkalkung darstellt (160, 161). Hypoglycinämie könnte sowohl bei Diabetikern als auch bei Patienten mit CKD die vaskuläre Verkalkung antreiben und in der Folge das kardiovaskuläre Risiko erhöhen (161). Es wurden auch anti-atherogene Effekte von Glycin beschrieben, welche über endotheliale Glycin-aktivierte Chlorid-Kanäle eine Reihe von Reaktionen auslösen, die zu einer Down-Regulation der NADPH-Oxidasen und letztlich verminderter Superoxidproduktion führen (162). Angemerkt werden muss hier jedoch, dass der Metabolismus insbesondere bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen in einer Weise verändert ist, dass es eine Vielzahl möglicher Ursachen für Veränderungen des Glycinspiegels gibt und die Bildung via SHMT1 natürlich nicht die einzige Quelle für Glycin ist. Einschränkend kommt hinzu, dass obwohl in diesen Quellen auch von medialer Verkalkung gesprochen wurde, die Arbeiten hauptsächlich intimale atherosklerotische Plaques untersuchten. Ebenso lassen die aktuell vorliegenden Beobachtungen keine direkten Schlüsse auf eine Beteiligung von Glycin bei vaskulärer Verkalkung zu.
- 3) Eine weitere Vermutung stellt die Beteiligung von apoptotischen Vorgängen an den pro-kalzifizierenden Effekten des SHMT1-Silencings dar, wie bereits im vorigen Kapitel erläutert wurde. Ob die apoptotischen Prozesse die pro-kalzifizierende Wirkung von SHMT1-Silencing vermitteln, kann aktuell aber nicht gezeigt werden.
- 4) Ferner könnte SHMT1 über die Methylierung von Proteinen, RNA und DNA in Mechanismen der vaskulären Verkalkung eingreifen. Ein denkbarer Zusammenhang besteht in der Beeinflussung der Methylierung von DNA im Rahmen epigenetischer

Prozesse (163). Es gibt noch nicht viele Kenntnisse über die Bedeutung der DNA-Methylierung bei Prozessen arterieller Verkalkung. Jedoch konnte gezeigt werden, dass Inkubation von VSMCs unter hohen Phosphat-Konzentrationen mit einer verstärkten DNA-Methyltransferase Aktivität und Methylierung der Promotorregion von SM22 α einhergeht (164). Dieser Effekt wurde von einer verminderten SM22 α -Expression sowie einer verstärkten CBFA1-Expression und Kalzifikation begleitet (164). SM22 α könnte als ein Markerprotein für die Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen angesehen werden und ist auch unter dem Namen Transgelin bekannt (165, 166). Der Verlust dieses SMC-spezifischen Proteins ist typisch im Verlauf der osteo-/chondrogenen Transdifferenzierung (73). Ob diese Methylierungsreaktionen in einem Zusammenhang mit den im Folatzyklus bereitgestellten C1-Einheiten stehen und damit durch SHMT1 reguliert werden können, ist bisher nicht bekannt. Manche Autoren gehen auch so weit, SHMT1 als metabolischen Weichensteller zu bezeichnen, welcher den Fluss der C1-Einheiten entweder zum Weg der Thymidylat-Synthese oder zu Methylierungsprozessen beeinflussen könnte (116). Wiederum ist unklar, ob diese Prozesse bei den prokalkifizierenden Effekten des SHMT1-Silencings beteiligt sind.

Aufgrund der zellulären Funktion von SHMT1 sind also eine Reihe von Reaktionswegen denkbar, die die Verkalkung beeinflussen könnten. Die hier beschriebenen möglichen Mechanismen können aber keinen Anspruch auf Vollständigkeit stellen.

5.5. Klinische Implikationen

Es finden sich in der Literatur Hinweise darauf, dass SHMT1 auch eine Rolle im menschlichen Patienten vermitteln könnte. Wie bereits eingangs erläutert, gibt es eine Reihe von Studien, welche Assoziationen zwischen Polymorphismen des SHMT1 Gens und Herz-Kreislauf-Erkrankungen beschreiben (134-138). Es wurden hierbei vor allem Single-Nukleotid-Polymorphismen untersucht.

SHMT1 scheint, wie oben erläutert, auch oxidative Prozesse zu beeinflussen. Dies könnte insbesondere für CKD Patienten, die Hochrisikogruppe für mediale VC, bedeutsam sein. CKD-Patienten entwickeln bereits in frühen Krankheitsstadien ein Ungleichgewicht von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und antioxidativen Schutzmechanismen, welches sich mit Verschlechterung der Nierenfunktion verstärkt (167). Hämodialyse-Behandlung per se (wie auch Peritonealdialyse und Hämofiltration) scheinen diese Imbalanz zu verstärken (167). Der aus oxidativem Stress entstehende Circulus vitiosus führt neben den Nebenwirkungen systemischer Inflammation auch zu einer Verstärkung der Nierenschädigung (168).

Ferner gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass oxidativer Stress und Inflammation Schlüsselemente in der Entwicklung und Progression vaskulärer Verkalkung sowie Gesamt- und kardiovaskulärer Mortalität in CKD-Patienten sind (147, 169). So ist eine Erhöhung der NADPH-Oxidase Aktivität und die damit einhergehende verstärkte ROS-Bildung mit dem Auftreten von Verkalkungen der Herzkranzgefäße bei asymptomatischen Personen assoziiert (170). Wenn die wichtige Rolle von oxidativem Stress in der Pathogenese der vaskulären Verkalkung in CKD-Patienten bedacht wird, ist es naheliegend, an die Möglichkeit einer Antioxidantiengabe als Therapiemöglichkeit zu denken. In der Tat konnte TEMPOL *in vitro* als auch *in vivo* bei urämischen Ratten die VCm verbessern (149). Bisher gibt es jedoch noch keine sicheren klinischen Erfahrungen bezüglich des Einsatzes von Tempol zur Reduktion von oxidativem Stress oder dem Fortschreiten der Arteriosklerose. Die exogene Aufnahme verschiedener anderer Antioxidantien hat sich dagegen in mehreren Studien als erfolgversprechend erwiesen. Während Vitamin E keine bzw. gegenteilige Effekte zeigte (167, 171), sind die Ergebnisse zu L-Carnitin, Curcumin, grünem Tee, Spurenelementen wie Selen, mehrfach ungesättigten Omega-3-Fettsäuren, Statinen, Flavanoiden und dem viel untersuchten Vitamin C uneindeutig und es bedarf weiterer Studien, bevor sie zur Therapie empfohlen werden könnten (97, 167, 171). Die Anwendung von L-Arginin (97) und besonders N-Acetylcystein (97, 167, 171) scheint hingegen vielversprechend, da sowohl oxidativer Stress, Inflammation, Urikämie als auch das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse bei CKD- und Dialyse-Patienten vermindert werden könnte. Ferner wurde der positive Effekt aeroben Ausdauertrainings sowie Kalorien-reduzierter Diäten diskutiert (168). Die Erkenntnis über eine mögliche Beteiligung von SHMT1 bei der Entstehung von oxidativem Stress und medialer VC könnte dabei helfen, die komplexen beteiligten Signalwege besser zu verstehen und damit auch neue Therapieansätze zu finden.

Aufgrund der zentralen Bedeutung von Inflammation bei der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen könnte SHMT1 durch Beeinflussung von oxidativem Stress und Apoptosevorgängen auch in anderen systemischen Krankheitsbildern als der vaskulären Verkalkung involviert sein (167, 168). Um diese potentielle Beteiligung aufzudecken, sind weitere Studien nötig.

Neben vaskulären Effekten sind auch andere Krankheitsprozesse mit SHMT1 assoziiert worden. Häufige in der Literatur immer wieder im Zusammenhang mit SHMT1 erwähnte Erkrankungen sind Neoplasien, vor allem gastrointestinale Tumore und Brustkrebs, aber auch Leukämien und Lymphome sowie kongenitale Herzfehler und neurologische Krankheitsbilder inkl. multiple Sklerose, Neuralrohrdefekte sowie Autismus. Dies gilt für Untersuchungen von genetischen Variationen des SHMT1-Gens (135) als auch für epigenetische Regulationsmechanismen (127). SHMT1 könnte nicht nur epigenetische Methylierungsprozesse steuern, sondern auch selber Ziel eben jener DNA-Methylierungen sein. Besonders bezüglich

Tumorerkrankungen konnten Promotor-Hypermethylierungen des SHMT1-Gens identifiziert werden (127). Diese führten zu einer Repression des Gens und waren mit einem verstärkten Auftreten des entsprechenden Tumors assoziiert (127). Wenn die Reversibilität epigenetischer Modifikationen bedacht wird, stellt sich hier ein weiteres Feld therapeutischer Interventionsmöglichkeiten (Ernährung, medikamentös, etc.) dar (127), die auch für die VCm interessant werden können.

5.6. Limitationen

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Erkenntnisse basieren alle auf Silencing Experimenten (SHMT1-Silencing). Bei dieser Methode kann durch Transfektion von Zellen mit Silencing-RNA (siRNA) eine Suppression des gewünschten Gens auf transkriptioneller oder translationaler Ebene erreicht werden (172). Durch methodische Fortschritte kann heute eine beachtliche Reduktion (=Knockdown, nicht Knock-out) der Gen-Expression erzielt werden, welche in ihrer Effektivität jedoch potentiell sehr variabel ist (172). Der Silencing-Erfolg der vorliegenden Experimente kann anhand der ebenfalls durchgeführten *negativ silencing* Gruppen abgeschätzt werden. Obwohl keine vollständige Suppression der SHMT1 mRNA-Expression erreicht werden konnte, war das Ausmaß der Reduktion ausreichend, um signifikante Unterschiede in den erhobenen Parametern widerzuspiegeln. Weitere potentielle Fehlerquellen bei Silencing-Experimenten liegen in der RNA-induzierten Immunstimulation und der unbeabsichtigten Suppression anderer Gene (*Off-target effects*) (173). Diese sind schwer messbar und deren Einfluss kaum vorherzusagen. Jedoch konnte ein Effekt der Transfektion der HAoSMCs selbst bezüglich der SHMT1 mRNA Expression im Vergleich mit einer Kontrollgruppe weitgehend ausgeschlossen werden. Letzten Endes ist diese vergleichsweise einfache Methode des Gen-Silencing, die es erlaubt, Knockdown-Modelle von nahezu jedem Gen zu untersuchen, eine gemeinhin akzeptierte Technik (174).

In dieser Arbeit wurde die Rolle der SHMT1 in der Phosphat-induzierten vaskulären Verkalkung untersucht. Daher wurden in den Zellkultur-Experimenten Hyperphosphatämiebedingungen erzeugt, wie sie auch beim chronischen Nierenversagen häufig sind. Neben Phosphat gibt es jedoch noch weitere Trigger der VC wie beispielsweise Kalzium oder Glucose, sowie von Adipozyten stammende Faktoren wie Leptin (175-177). Es bleibt unklar, welche Bedeutung SHMT1 bei osteoinduktiven Prozessen unter solchen Triggern innehat.

Arbeiten mit Zellkulturen birgt zahlreiche Risiken, wie beispielsweise Kontamination und Selektion von Zellen mit genetischen oder epigenetischen Alteration (178).

Die dargestellten Interpretationen sind auch dadurch limitiert, dass die *in vitro*-Vorgänge nicht direkt die vaskuläre Verkalkung *in vivo* widerspiegeln (32, 34). *In vitro*-Experimente lassen sich nicht ohne Weiteres auf den Menschen übertragen. Die gefundenen Zusammenhänge können durch zahlreiche Interaktionen im Organismus verfälscht werden und sollten daher nicht überinterpretiert werden. Weitere *in vivo* Studien sind zur Bestätigung der postulierten Effekte nötig. Die aktuellen Ergebnisse liefern erste Erkenntnisse zu der Rolle von SHMT1 in der vaskulären Verkalkung, eine direkte Übertragung dieser auf den Patienten ist momentan nicht möglich.

6. Fazit

Die Resultate dieser Arbeit zeigen eine Beteiligung von SHMT1 an der Phosphat-induzierten osteo-/chondrogenen Transdifferenzierung der glatten Gefäßmuskelzellen *in vitro* auf. Unter Hyperphosphatämie-Bedingungen kommt es zu einer Erhöhung der SHMT1-mRNA Expression. Ein Knockdown von SHMT1 führt zu einer vermehrten Expression osteogener Transkriptionsfaktoren und Enzyme. Ferner werden durch SHMT1-Mangel Signalwege aktiviert, die oxidativen Stress in glatten Gefäßmuskelzellen induzieren. Weiterhin scheint SHMT1 an der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen pro- und antiapoptotischen Faktoren beteiligt zu sein. Daher liegt die Vermutung nahe, dass SHMT1 eine regulierende Rolle in den Prozessen der Phosphat-induzierten vaskulären Verkalkung ausübt.

Besonders in Hinblick auf die schlechte therapeutische Beeinflussung vaskulärer Verkalkung, die im Rahmen der chronischen Nierenerkrankung und anderen Krankheitsbildern auftritt, kommt dem Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen eine besondere Bedeutung zu. Es ist bedeutsam, an der Verkalkung beteiligte Hauptsignaltransduktionsketten zu erkennen, dadurch könnten neue therapeutische Optionen ermöglicht werden. In dieser Arbeit wurden erste Verbindungen zwischen SHMT1 und einigen Schlüsselmechanismen der vaskulären Verkalkung der Media dargestellt. Obwohl festgestellt werden konnte, dass ein Mangel an SHMT1 oxidativen Stress, Apoptosevorgänge und osteogene Transdifferenzierung der VCMC fördert, ist noch nicht bekannt, welche Mechanismen genau diesem Effekt zugrunde liegen.

Diese Arbeit beschreibt SHMT1 als Komponente der osteochondrogenen Signalwege der glatten Gefäßmuskelzelle. Sie trägt somit zum Verständnis der komplexen Vorgänge bei, welche die vaskuläre Verkalkung bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung vermitteln.

7. Literaturverzeichnis

1. Hebring SJ, Chai Y, Ji Y, Abo RP, Jenkins GD, Fridley B, Zhang J, Eckloff BW, Wieben ED, Weinshilboum RM. Serine hydroxymethyltransferase 1 and 2: gene sequence variation and functional genomic characterization. *Journal of neurochemistry*. 2012;120(6):881-90.
2. Anderson DD, Stover PJ. SHMT1 and SHMT2 are functionally redundant in nuclear de novo thymidylate biosynthesis. *PloS one*. 2009;4(6):e5839.
3. Girndt M, Trocchi P, Scheidt-Nave C, Markau S, Stang A. Prävalenz der eingeschränkten Nierenfunktion. *Dtsch Arztebl International*. 2016;113(6):85-91.
4. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015;385(9963):117-71.
5. e.V. DGfN. 2019 [cited 2019 24. Januar]. Available from: <https://www.dgfn.eu/>.
6. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392(10159):1789-858.
7. The hidden epidemic: Worldwide, over 850 million people suffer from kidney diseases [Pressemeldung der internationalen Nierengesellschaften (ASN, ISN und ERA-EDTA)] [press release]. 2018, June 27.
8. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney inter, Suppl*. 2013;3:1-150.
9. Thawornchaisit P, de Looze F, Reid CM, Seubsman SA, Tran TT, Sleigh A. Health-Risk Factors and the Prevalence of Chronic Kidney Disease: Cross-Sectional Findings from a National Cohort of 87,143 Thai Open University Students. *Global journal of health science*. 2015;7(5):59-72.
10. Taal MW. Chronic kidney disease in older people - diagnosis, aetiology and consequences. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2015;24(6):475-9.
11. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004;27(5):1047-53.
12. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*. 2005;365(9455):217-23.
13. Steenkamp R, Caskey F. UK Renal Registry 18th Annual Report: Chapter 6 Comorbidities and Current Smoking Status amongst Patients starting Renal

- Replacement Therapy in England, Wales and Northern Ireland from 2013 to 2014. *Nephron*. 2016;132 Suppl 1:145-54.
14. Barsoum RS. Chronic kidney disease in the developing world. *N Engl J Med*. 2006;354(10):997-9.
 15. Becherucci F, Roperto RM, Materassi M, Romagnani P. Chronic kidney disease in children. *Clinical kidney journal*. 2016;9(4):583-91.
 16. Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, Hogg RJ, Perrone RD, Lau J, Eknoyan G. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med*. 2003;139(2):137-47.
 17. Lv J, Ehteshami P, Sarnak MJ, Tighiouart H, Jun M, Ninomiya T, Foote C, Rodgers A, Zhang H, Wang H, Strippoli GF, Perkovic V. Effects of intensive blood pressure lowering on the progression of chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *CMAJ*. 2013;185(11):949-57.
 18. Contou D, d'Ythurbide G, Messika J, Ridel C, Parrot A, Djibre M, Hertig A, Rondeau E, Fartoukh M. Description and predictive factors of infection in patients with chronic kidney disease admitted to the critical care unit. *J Infect*. 2014;68(2):105-15.
 19. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med*. 2004;351(13):1296-305.
 20. Manjunath G, Tighiouart H, Ibrahim H, MacLeod B, Salem DN, Griffith JL, Coresh J, Levey AS, Sarnak MJ. Level of kidney function as a risk factor for atherosclerotic cardiovascular outcomes in the community. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(1):47-55.
 21. Dumaine RL, Montalescot G, Steg PG, Ohman EM, Eagle K, Bhatt DL. Renal function, atherothrombosis extent, and outcomes in high-risk patients. *Am Heart J*. 2009;158(1):141-8.e1.
 22. Vanholder R, Massy Z, Argiles A, Spasovski G, Verbeke F, Lameire N. Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20(6):1048-56.
 23. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culeton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Parfrey P, Pfeffer M, Raij L, Spinosa DJ, Wilson PW. 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(17):2154-69.
 24. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Update Work Group. KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation,

- Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl.* 2017;7:1-59.
25. Hruska KA, Mathew S, Lund R, Qiu P, Pratt R. Hyperphosphatemia of chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2008;74(2):148-57.
 26. Wagner CA. Novel insights into the regulation of systemic phosphate homeostasis and renal phosphate excretion. *Journal of nephrology.* 2007;20(2):130-4.
 27. Kates DM, Sherrard DJ, Andress DL. Evidence that serum phosphate is independently associated with serum PTH in patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis.* 1997;30(6):809-13.
 28. Gorriz JL, Molina P, Bover J, Barril G, Martin-de Francisco AL, Caravaca F, Hervas J, Pinera C, Escudero V, Molinero LM. Characteristics of bone mineral metabolism in patients with stage 3-5 chronic kidney disease not on dialysis: results of the OSERCE study. *Nefrologia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia.* 2013;33(1):46-60.
 29. Craver L, Marco MP, Martinez I, Rue M, Borrás M, Martín ML, Sarro F, Valdivielso JM, Fernández E. Mineral metabolism parameters throughout chronic kidney disease stages 1-5--achievement of K/DOQI target ranges. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22(4):1171-6.
 30. Shroff R, Knott C, Rees L. The virtues of vitamin D--but how much is too much? *Pediatr Nephrol.* 2010;25(9):1607-20.
 31. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007;357(3):266-81.
 32. Molina P, Carrero JJ, Bover J, Chauveau P, Mazzaferro S, Torres PU. Vitamin D, a modulator of musculoskeletal health in chronic kidney disease. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle.* 2017;8(5):686-701.
 33. Shroff R, Wan M, Nagler EV, Bakkaloglu S, Cozzolino M, Bacchetta J, Edefonti A, Stefanidis CJ, Vande Walle J, Ariceta G, Klaus G, Haffner D, Schmitt CP. Clinical practice recommendations for treatment with active vitamin D analogues in children with chronic kidney disease Stages 2-5 and on dialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2017;32(7):1114-27.
 34. Gonzalez EA, Martin KJ. Renal osteodystrophy. *Rev Endocr Metab Disord.* 2001;2(2):187-93.
 35. Olgaard K, Arbelaez M, Schwartz J, Klahr S, Slatopolsky E. Abnormal skeletal response to parathyroid hormone in dogs with chronic uremia. *Calcif Tissue Int.* 1982;34(4):403-7.
 36. Patel SR, Ke HQ, Vanholder R, Koenig RJ, Hsu CH. Inhibition of calcitriol receptor binding to vitamin D response elements by uremic toxins. *J Clin Invest.* 1995;96(1):50-9.
 37. Malluche HH, Ritz E, Lange HP, Kutschera L, Hodgson M, Seiffert U, Schoeppe W. Bone histology in incipient and advanced renal failure. *Kidney Int.* 1976;9(4):355-62.

38. Rix M, Andreassen H, Eskildsen P, Langdahl B, Olgaard K. Bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in patients with predialysis chronic renal failure. *Kidney Int.* 1999;56(3):1084-93.
39. Tonelli M, Sacks F, Pfeffer M, Gao Z, Curhan G, Cholesterol, Recurrent Events Trial I. Relation between serum phosphate level and cardiovascular event rate in people with coronary disease. *Circulation.* 2005;112(17):2627-33.
40. Kestenbaum B, Sampson JN, Rudser KD, Patterson DJ, Seliger SL, Young B, Sherrard DJ, Andress DL. Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(2):520-8.
41. Giachelli CM. The emerging role of phosphate in vascular calcification. *Kidney Int.* 2009;75(9):890-7.
42. Verberckmoes SC, Persy V, Behets GJ, Neven E, Hufkens A, Zebger-Gong H, Muller D, Haffner D, Querfeld U, Bohic S, De Broe ME, D'Haese PC. Uremia-related vascular calcification: more than apatite deposition. *Kidney Int.* 2007;71(4):298-303.
43. Schlieper G, Schurgers L, Brandenburg V, Reutelingsperger C, Floege J. Vascular calcification in chronic kidney disease: an update. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(1):31-9.
44. Lanzer P, Boehm M, Sorribas V, Thiriet M, Janzen J, Zeller T, St Hilaire C, Shanahan C. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *Eur Heart J.* 2014;35(23):1515-25.
45. Covic A, Kanbay M, Voroneanu L, Turgut F, Serban DN, Serban IL, Goldsmith DJ. Vascular calcification in chronic kidney disease. *Clin Sci (Lond).* 2010;119(3):111-21.
46. Chertow GM, Raggi P, Chasan-Taber S, Bommer J, Holzer H, Burke SK. Determinants of progressive vascular calcification in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19(6):1489-96.
47. Jablonski KL, Chonchol M. Vascular calcification in end-stage renal disease. *Hemodialysis international International Symposium on Home Hemodialysis.* 2013;17 Suppl 1:S17-21.
48. Guerin AP, Blacher J, Pannier B, Marchais SJ, Safar ME, London GM. Impact of aortic stiffness attenuation on survival of patients in end-stage renal failure. *Circulation.* 2001;103(7):987-92.
49. London GM. Alterations of arterial function in end-stage renal disease. *Nephron.* 2000;84(2):111-8.
50. Janzen J, Vuong PN. Arterial calcifications: morphological aspects and their pathological implications. *Z Kardiol.* 2001;90 Suppl 3:6-11.

51. Schwarz U, Buzello M, Ritz E, Stein G, Raabe G, Wiest G, Mall G, Amann K. Morphology of coronary atherosclerotic lesions in patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15(2):218-23.
52. Virchow R. Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre, Sechszehnte Vorlesung. Verlag von August Hirschwald, Berlin. 1858:325-9.
53. Mönckeberg J. Über die reine Mediaverkalkung der Extremitätenarterien und ihr Verhalten zur Arteriosklerose. *Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie, und für klinische Medicin*, Berlin. 1903;171:141–67.
54. Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(7):1161-70.
55. Leopold JA. Vascular calcification: Mechanisms of vascular smooth muscle cell calcification. *Trends Cardiovasc Med*. 2015;25(4):267-74.
56. Shroff R, Long DA, Shanahan C. Mechanistic insights into vascular calcification in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(2):179-89.
57. Benet-Pages A, Orlik P, Strom TM, Lorenz-Depiereux B. An FGF23 missense mutation causes familial tumoral calcinosis with hyperphosphatemia. *Hum Mol Genet*. 2005;14(3):385-90.
58. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res*. 2000;87(7):E10-7.
59. Lomashvili K, Garg P, O'Neill WC. Chemical and hormonal determinants of vascular calcification in vitro. *Kidney Int*. 2006;69(8):1464-70.
60. Ketteler M, Brandenburg V, Jahn-Dechent W, Westenfeld R, Floege J. Do not be misguided by guidelines: the calcium x phosphate product can be a Trojan horse. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20(4):673-7.
61. Kendrick J, Chonchol M. The role of phosphorus in the development and progression of vascular calcification. *Am J Kidney Dis*. 2011;58(5):826-34.
62. Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(3):489-94.
63. Chen NX, Moe SM. Pathophysiology of Vascular Calcification. *Current osteoporosis reports*. 2015;13(6):372-80.
64. Shroff RC, McNair R, Figg N, Skepper JN, Schurgers L, Gupta A, Hiorns M, Donald AE, Deanfield J, Rees L, Shanahan CM. Dialysis accelerates medial vascular calcification in part by triggering smooth muscle cell apoptosis. *Circulation*. 2008;118(17):1748-57.

65. Mansfield K, Rajpurohit R, Shapiro IM. Extracellular phosphate ions cause apoptosis of terminally differentiated epiphyseal chondrocytes. *J Cell Physiol.* 1999;179(3):276-86.
66. Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(4):509-19.
67. Aikawa E, Aikawa M, Libby P, Figueiredo JL, Rusanescu G, Iwamoto Y, Fukuda D, Kohler RH, Shi GP, Jaffer FA, Weissleder R. Arterial and aortic valve calcification abolished by elastolytic cathepsin S deficiency in chronic renal disease. *Circulation.* 2009;119(13):1785-94.
68. Chen NX, O'Neill KD, Chen X, Kiattisunthorn K, Gattone VH, Moe SM. Activation of arterial matrix metalloproteinases leads to vascular calcification in chronic kidney disease. *Am J Nephrol.* 2011;34(3):211-9.
69. Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky E. Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(7):1453-64.
70. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev.* 1999;20(3):345-57.
71. Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1998(346):26-37.
72. Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus JM, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1210-20.
73. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res.* 2001;89(12):1147-54.
74. Wysokinski D, Pawlowska E, Blasiak J. RUNX2: A Master Bone Growth Regulator That May Be Involved in the DNA Damage Response. *DNA Cell Biol.* 2015;34(5):305-15.
75. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 1997;89(5):755-64.
76. Blyth K, Vaillant F, Hanlon L, Mackay N, Bell M, Jenkins A, Neil JC, Cameron ER. Runx2 and MYC collaborate in lymphoma development by suppressing apoptotic and growth arrest pathways in vivo. *Cancer research.* 2006;66(4):2195-201.
77. Komori T. Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development. *J Cell Biochem.* 2002;87(1):1-8.

78. Lee MH, Kim YJ, Kim HJ, Park HD, Kang AR, Kyung HM, Sung JH, Wozney JM, Kim HJ, Ryoo HM. BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-beta 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(36):34387-94.
79. Gilbert L, He X, Farmer P, Rubin J, Drissi H, van Wijnen AJ, Lian JB, Stein GS, Nanes MS. Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(4):2695-701.
80. Lee HL, Woo KM, Ryoo HM, Baek JH. Tumor necrosis factor-alpha increases alkaline phosphatase expression in vascular smooth muscle cells via MSX2 induction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391(1):1087-92.
81. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyanyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(39):33132-40.
82. Jimenez MJ, Balbin M, Lopez JM, Alvarez J, Komori T, Lopez-Otin C. Collagenase 3 is a target of Cbfa1, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation. *Mol Cell Biol*. 1999;19(6):4431-42.
83. Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, McDonald JM, Chen Y. Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(22):15319-27.
84. Wilkie AO, Tang Z, Elanko N, Walsh S, Twigg SR, Hurst JA, Wall SA, Chrzanowska KH, Maxson RE, Jr. Functional haploinsufficiency of the human homeobox gene MSX2 causes defects in skull ossification. *Nat Genet*. 2000;24(4):387-90.
85. Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heaney S, Peters H, Tang Z, Maxson R, Maas R. Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet*. 2000;24(4):391-5.
86. Shirakabe K, Terasawa K, Miyama K, Shibuya H, Nishida E. Regulation of the activity of the transcription factor Runx2 by two homeobox proteins, Msx2 and Dlx5. *Genes Cells*. 2001;6(10):851-6.
87. Taylor J, Butcher M, Zeadin M, Politano A, Shaughnessy SG. Oxidized low-density lipoprotein promotes osteoblast differentiation in primary cultures of vascular smooth muscle cells by up-regulating Osterix expression in an Msx2-dependent manner. *J Cell Biochem*. 2011;112(2):581-8.

88. Al-Aly Z, Shao JS, Lai CF, Huang E, Cai J, Behrmann A, Cheng SL, Towler DA. Aortic Msx2-Wnt calcification cascade is regulated by TNF-alpha-dependent signals in diabetic Ldlr-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(12):2589-96.
89. Cola C, Almeida M, Li D, Romeo F, Mehta JL. Regulatory role of endothelium in the expression of genes affecting arterial calcification. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;320(2):424-7.
90. Russell RG, Bisaz S, Fleisch H. Pyrophosphate and diphosphonates in calcium metabolism and their possible role in renal failure. *Arch Intern Med.* 1969;124(5):571-7.
91. Kunitz M. Hydrolysis of adenosine triphosphate by crystalline yeast pyrophosphatase. Effect of zinc and magnesium ions. *J Gen Physiol.* 1962;45(4)Pt 2:31-46.
92. Sheen CR, Kuss P, Narisawa S, Yadav MC, Nigro J, Wang W, Chhea TN, Sergienko EA, Kapoor K, Jackson MR, Hoylaerts MF, Pinkerton AB, O'Neill WC, Millan JL. Pathophysiological role of vascular smooth muscle alkaline phosphatase in medial artery calcification. *J Bone Miner Res.* 2015;30(5):824-36.
93. Lomashvili KA, Cobbs S, Hennigar RA, Hardcastle KI, O'Neill WC. Phosphate-induced vascular calcification: role of pyrophosphate and osteopontin. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(6):1392-401.
94. Lomashvili KA, Garg P, Narisawa S, Millan JL, O'Neill WC. Upregulation of alkaline phosphatase and pyrophosphate hydrolysis: potential mechanism for uremic vascular calcification. *Kidney Int.* 2008;73(9):1024-30.
95. Russell RG, Bisaz S, Donath A, Morgan DB, Fleisch H. Inorganic pyrophosphate in plasma in normal persons and in patients with hypophosphatasia, osteogenesis imperfecta, and other disorders of bone. *J Clin Invest.* 1971;50(5):961-9.
96. Stenvinkel P, Pecoits-Filho R, Lindholm B. Coronary artery disease in end-stage renal disease: no longer a simple plumbing problem. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(7):1927-39.
97. Roumeliotis S, Roumeliotis A, Dounousi E, Eleftheriadis T, Liakopoulos V. Dietary Antioxidant Supplements and Uric Acid in Chronic Kidney Disease: A Review. *Nutrients.* 2019;11(8).
98. Bedard K, Attar H, Bonnefont J, Jaquet V, Borel C, Plastre O, Stasia MJ, Antonarakis SE, Krause KH. Three common polymorphisms in the CYBA gene form a haplotype associated with decreased ROS generation. *Hum Mutat.* 2009;30(7):1123-33.
99. Valentin F, Bueb JL, Kieffer P, Tschirhart E, Atkinson J. Oxidative stress activates MMP-2 in cultured human coronary smooth muscle cells. *Fundam Clin Pharmacol.* 2005;19(6):661-7.
100. Manea A, Tanase LI, Raicu M, Simionescu M. Jak/STAT signaling pathway regulates nox1 and nox4-based NADPH oxidase in human aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(1):105-12.

101. Wolin MS. Subcellular localization of Nox-containing oxidases provides unique insight into their role in vascular oxidant signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(4):625-7.
102. Martyn KD, Frederick LM, von Loehneysen K, Dinauer MC, Knaus UG. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal.* 2006;18(1):69-82.
103. Dinauer MC, Pierce EA, Bruns GA, Curnutte JT, Orkin SH. Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J Clin Invest.* 1990;86(5):1729-37.
104. Sumimoto H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *The FEBS journal.* 2008;275(13):3249-77.
105. Zhao YG, Meng FX, Li BW, Sheng YM, Liu MM, Wang B, Li HW, Xiu RJ. Gelatinases promote calcification of vascular smooth muscle cells by up-regulating bone morphogenetic protein-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;470(2):287-93.
106. Gomez C, Martinez L, Mesa A, Duque JC, Escobar LA, Pham SM, Vazquez-Padron RI. Oxidative stress induces early-onset apoptosis of vascular smooth muscle cells and neointima formation in response to injury. *Biosci Rep.* 2015;35(4).
107. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, Jahnchen-Dechent W, Weissberg PL, Shanahan CM. 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(11):2857-67.
108. Kapustin AN, Davies JD, Reynolds JL, McNair R, Jones GT, Sidibe A, Schurgers LJ, Skepper JN, Proudfoot D, Mayr M, Shanahan CM. Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization. *Circ Res.* 2011;109(1):e1-12.
109. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res.* 2000;87(11):1055-62.
110. Garrow TA, Brenner AA, Whitehead VM, Chen XN, Duncan RG, Korenberg JR, Shane B. Cloning of human cDNAs encoding mitochondrial and cytosolic serine hydroxymethyltransferases and chromosomal localization. *The Journal of biological chemistry.* 1993;268(16):11910-6.
111. Stover PJ, Chen LH, Suh JR, Stover DM, Keyomarsi K, Shane B. Molecular cloning, characterization, and regulation of the human mitochondrial serine hydroxymethyltransferase gene. *The Journal of biological chemistry.* 1997;272(3):1842-8.

112. Girgis S, Nasrallah IM, Suh JR, Oppenheim E, Zanetti KA, Mastri MG, Stover PJ. Molecular cloning, characterization and alternative splicing of the human cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase gene. *Gene*. 1998;210(2):315-24.
113. MacFarlane AJ, Liu X, Perry CA, Flodby P, Allen RH, Stabler SP, Stover PJ. Cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase regulates the metabolic partitioning of methylenetetrahydrofolate but is not essential in mice. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(38):25846-53.
114. Vatcher GP, Thacker CM, Kaletta T, Schnabel H, Schnabel R, Baillie DL. Serine hydroxymethyltransferase is maternally essential in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(11):6066-73.
115. Anderson DD, Woeller CF, Chiang EP, Shane B, Stover PJ. Serine hydroxymethyltransferase anchors de novo thymidylate synthesis pathway to nuclear lamina for DNA synthesis. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(10):7051-62.
116. Herbig K, Chiang EP, Lee LR, Hills J, Shane B, Stover PJ. Cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase mediates competition between folate-dependent deoxyribonucleotide and S-adenosylmethionine biosyntheses. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(41):38381-9.
117. Beaudin AE, Abarinov EV, Noden DM, Perry CA, Chu S, Stabler SP, Allen RH, Stover PJ. Shmt1 and de novo thymidylate biosynthesis underlie folate-responsive neural tube defects in mice. *The American journal of clinical nutrition*. 2011;93(4):789-98.
118. Christensen KE, MacKenzie RE. Mitochondrial one-carbon metabolism is adapted to the specific needs of yeast, plants and mammals. *Bioessays*. 2006;28(6):595-605.
119. Brosnan JT, Brosnan ME. The sulfur-containing amino acids: an overview. *The Journal of nutrition*. 2006;136(6 Suppl):1636s-40s.
120. Kalhan SC. One carbon metabolism in pregnancy: Impact on maternal, fetal and neonatal health. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;435:48-60.
121. Crider KS, Yang TP, Berry RJ, Bailey LB. Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. *Adv Nutr*. 2012;3(1):21-38.
122. Homocysteine Studies C. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA*. 2002;288(16):2015-22.
123. Andlauer TF, Buck D, Antony G, Bayas A, Bechmann L, Berthele A, Chan A, Gasperi C, Gold R, Graetz C, Haas J, Hecker M, Infante-Duarte C, Knop M, Kumpfel T, Limmroth V, Linker RA, Loleit V, Luessi F, Meuth SG, Muhlau M, Nischwitz S, Paul F, Putz M, Ruck T, Salmen A, Stangel M, Stellmann JP, Sturner KH, Tackenberg B, Then Bergh F, Tumani H, Warnke C, Weber F, Wiendl H, Wildemann B, Zettl UK, Ziemann U, Zipp F, Arloth J, Weber P, Radivojkov-Blagojevic M, Scheinhardt MO, Dankowski T, Bettecken T, Lichtner P, Czamara D, Carrillo-Roa T, Binder EB, Berger K, Bertram L, Franke A, Gieger C,

- Herms S, Homuth G, Ising M, Jockel KH, Kacprowski T, Kloiber S, Laudes M, Lieb W, Lill CM, Lucae S, Meitinger T, Moebus S, Muller-Nurasyid M, Nothen MM, Petersmann A, Rawal R, Schminke U, Strauch K, Volzke H, Waldenberger M, Wellmann J, Porcu E, Mulas A, Pitzalis M, Sidore C, Zara I, Cucca F, Zoledziwska M, Ziegler A, Hemmer B, Muller-Myhsok B. Novel multiple sclerosis susceptibility loci implicated in epigenetic regulation. *Science advances*. 2016;2(6):e1501678.
124. Girgis S, Suh JR, Jolivet J, Stover PJ. 5-Formyltetrahydrofolate regulates homocysteine remethylation in human neuroblastoma. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(8):4729-34.
125. Stover P, Schirch V. 5-Formyltetrahydrofolate polyglutamates are slow tight binding inhibitors of serine hydroxymethyltransferase. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(3):1543-50.
126. Fox JT, Stover PJ. Folate-mediated one-carbon metabolism. *Vitam Horm*. 2008;79:1-44.
127. Udali S, Guarini P, Ruzzenente A, Ferrarini A, Guglielmi A, Lotto V, Tononi P, Pattini P, Moruzzi S, Campagnaro T, Conci S, Olivieri O, Corrocher R, Delledonne M, Choi SW, Friso S. DNA methylation and gene expression profiles show novel regulatory pathways in hepatocellular carcinoma. *Clinical epigenetics*. 2015;7:43.
128. Gupta R, Yang Q, Dogra SK, Wajapeyee N. Serine hydroxymethyl transferase 1 stimulates pro-oncogenic cytokine expression through sialic acid to promote ovarian cancer tumor growth and progression. *Oncogene*. 2017;36(28):4014-24.
129. Ducker GS, Ghergurovich JM, Mainolfi N, Suri V, Jeong SK, Hsin-Jung Li S, Friedman A, Manfredi MG, Gitai Z, Kim H, Rabinowitz JD. Human SHMT inhibitors reveal defective glycine import as a targetable metabolic vulnerability of diffuse large B-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(43):11404-9.
130. Bahari G, Hashemi M, Naderi M, Sadeghi-Bojd S, Taheri M. Association of SHMT1 gene polymorphisms with the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia in a sample of Iranian population. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*. 2016;62(2):45-51.
131. Schulze A, Harris AL. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature*. 2012;491(7424):364-73.
132. Paone A, Marani M, Fiascarelli A, Rinaldo S, Giardina G, Contestabile R, Paiardini A, Cutruzzola F. SHMT1 knockdown induces apoptosis in lung cancer cells by causing uracil misincorporation. *Cell death & disease*. 2014;5:e1525.
133. Zhang WC, Shyh-Chang N, Yang H, Rai A, Umashankar S, Ma S, Soh BS, Sun LL, Tai BC, Nga ME, Bhakoo KK, Jayapal SR, Nichane M, Yu Q, Ahmed DA, Tan C, Sing WP, Tam J, Thirugananam A, Noghabi MS, Pang YH, Ang HS, Mitchell W, Robson P, Kaldis

- P, Soo RA, Swarup S, Lim EH, Lim B. Glycine decarboxylase activity drives non-small cell lung cancer tumor-initiating cells and tumorigenesis. *Cell*. 2012;148(1-2):259-72.
134. Wernimont SM, Clark AG, Stover PJ, Wells MT, Litonjua AA, Weiss ST, Gaziano JM, Vokonas PS, Tucker KL, Cassano PA. Folate network genetic variation predicts cardiovascular disease risk in non-Hispanic white males. *The Journal of nutrition*. 2012;142(7):1272-9.
135. Wernimont SM, Raiszadeh F, Stover PJ, Rimm EB, Hunter DJ, Tang W, Cassano PA. Polymorphisms in serine hydroxymethyltransferase 1 and methylenetetrahydrofolate reductase interact to increase cardiovascular disease risk in humans. *The Journal of nutrition*. 2011;141(2):255-60.
136. Lim U, Peng K, Shane B, Stover PJ, Litonjua AA, Weiss ST, Gaziano JM, Strawderman RL, Raiszadeh F, Selhub J, Tucker KL, Cassano PA. Polymorphisms in cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase and methylenetetrahydrofolate reductase affect the risk of cardiovascular disease in men. *The Journal of nutrition*. 2005;135(8):1989-94.
137. Low HQ, Chen CP, Kasiman K, Thalamuthu A, Ng SS, Foo JN, Chang HM, Wong MC, Tai ES, Liu J. A comprehensive association analysis of homocysteine metabolic pathway genes in Singaporean Chinese with ischemic stroke. *PLoS one*. 2011;6(9):e24757.
138. Sun K, Song J, Liu K, Fang K, Wang L, Wang X, Li J, Tang X, Wu Y, Qin X, Wu T, Gao P, Chen D, Hu Y. Associations between homocysteine metabolism related SNPs and carotid intima-media thickness: a Chinese sib pair study. *Journal of thrombosis and thrombolysis*. 2017;43(3):401-10.
139. Xu G, Wang C, Ying X, Kong F, Ji H, Zhao J, Zhang X, Duan S, Han L, Li L. Serine hydroxymethyltransferase 1 promoter hypermethylation increases the risk of essential hypertension. *J Clin Lab Anal*. 2018:e22712.
140. Altman DG, Bland JM. Standard deviations and standard errors. *BMJ (Clinical research ed)*. 2005;331(7521):903.
141. Boehme B, Schelski N, Makridakis M, Henze L, Vlahou A, Lang F, Pieske B, Alesutan I, Voelkl J. Role of Cytosolic Serine Hydroxymethyl Transferase 1 (SHMT1) in Phosphate-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Calcification. *Kidney & blood pressure research*. 2018;43(4):1212-21.
142. Cai T, Sun D, Duan Y, Wen P, Dai C, Yang J, He W. WNT/beta-catenin signaling promotes VSMCs to osteogenic transdifferentiation and calcification through directly modulating Runx2 gene expression. *Exp Cell Res*. 2016;345(2):206-17.
143. Andrade MC, Carmo LS, Farias-Silva E, Liberman M. Msx2 is required for vascular smooth muscle cells osteoblastic differentiation but not calcification in insulin-resistant ob/ob mice. *Atherosclerosis*. 2017;265:14-21.

144. Villa-Bellosta R, Millan A, Sorribas V. Role of calcium-phosphate deposition in vascular smooth muscle cell calcification. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011;300(1):C210-20.
145. Wolf D, Ley K. [Immunity and inflammation in atherosclerosis]. *Herz*. 2019.
146. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res*. 2006;99(10):1044-59.
147. Agharazii M, St-Louis R, Gautier-Bastien A, Ung RV, Moka S, Lariviere R, Richard DE. Inflammatory cytokines and reactive oxygen species as mediators of chronic kidney disease-related vascular calcification. *Am J Hypertens*. 2015;28(6):746-55.
148. Kennedy JA, Hua X, Mishra K, Murphy GA, Rosenkranz AC, Horowitz JD. Inhibition of calcifying nodule formation in cultured porcine aortic valve cells by nitric oxide donors. *Eur J Pharmacol*. 2009;602(1):28-35.
149. Yamada S, Taniguchi M, Tokumoto M, Toyonaga J, Fujisaki K, Suehiro T, Noguchi H, Iida M, Tsuruya K, Kitazono T. The antioxidant tempol ameliorates arterial medial calcification in uremic rats: important role of oxidative stress in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease. *J Bone Miner Res*. 2012;27(2):474-85.
150. Luong TTD, Schelski N, Boehme B, Makridakis M, Vlahou A, Lang F, Pieske B, Alesutan I, Voelkl J. Fibulin-3 Attenuates Phosphate-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Calcification by Inhibition of Oxidative Stress. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(4):1305-16.
151. Wilcox CS. Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacol Ther*. 2010;126(2):119-45.
152. Wilcox CS, Pearlman A. Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. *Pharmacol Rev*. 2008;60(4):418-69.
153. Herscher LL, Krishna MC, Cook JA, Coleman CN, Biaglow JE, Tuttle SW, Gonzalez FJ, Mitchell JB. Protection against SR 4233 (Tirapazamine) aerobic cytotoxicity by the metal chelators desferrioxamine and tiron. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1994;30(4):879-85.
154. Abdel-Magied N, Abdel-Aziz N, Shedid SM, Ahmed AG. Modulating effect of tiron on the capability of mitochondrial oxidative phosphorylation in the brain of rats exposed to radiation or manganese toxicity. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019.
155. Jagadeesha DK, Lindley TE, Deleon J, Sharma RV, Miller F, Bhalla RC. Tempol therapy attenuates medial smooth muscle cell apoptosis and neointima formation after balloon catheter injury in carotid artery of diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(3):H1047-53.
156. Vucicevic K, Jakovljevic V, Colovic N, Tosic N, Kostic T, Glumac I, Pavlovic S, Karan-Djurasevic T, Colovic M. Association of Bax Expression and Bcl2/Bax Ratio with Clinical and Molecular Prognostic Markers in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Med Biochem*. 2016;35(2):150-7.

157. Chang L, Zhao J, Xu J, Jiang W, Tang CS, Qi YF. Effects of taurine and homocysteine on calcium homeostasis and hydrogen peroxide and superoxide anions in rat myocardial mitochondria. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004;31(4):237-43.
158. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed)*. 2002;325(7374):1202.
159. Zhu L, Zhang N, Yan R, Yang W, Cong G, Yan N, Ma W, Hou J, Yang L, Jia S. Hyperhomocysteinemia induces vascular calcification by activating the transcription factor RUNX2 via Krüppel-like factor 4 up-regulation in mice. *The Journal of biological chemistry*. 2019;294(51):19465-74.
160. Hutcheson JD, Goettsch C, Bertazzo S, Maldonado N, Ruiz JL, Goh W, Yabusaki K, Faits T, Bouten C, Franck G, Quillard T, Libby P, Aikawa M, Weinbaum S, Aikawa E. Genesis and growth of extracellular-vesicle-derived microcalcification in atherosclerotic plaques. *Nature materials*. 2016;15(3):335-43.
161. Adeva-Andany M, Souto-Adeva G, Ameneiros-Rodriguez E, Fernandez-Fernandez C, Donapetry-Garcia C, Dominguez-Montero A. Insulin resistance and glycine metabolism in humans. *Amino Acids*. 2018;50(1):11-27.
162. McCarty MF, Barroso-Aranda J, Contreras F. The hyperpolarizing impact of glycine on endothelial cells may be anti-atherogenic. *Med Hypotheses*. 2009;73(2):263-4.
163. Esteller M. Cancer Epigenetics for the 21st Century: What's Next? *Genes Cancer*. 2011;2(6):604-6.
164. Montes de Oca A, Madueno JA, Martinez-Moreno JM, Guerrero F, Munoz-Castaneda J, Rodriguez-Ortiz ME, Mendoza FJ, Almaden Y, Lopez I, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E. High-phosphate-induced calcification is related to SM22alpha promoter methylation in vascular smooth muscle cells. *J Bone Miner Res*. 2010;25(9):1996-2005.
165. Lees-Miller JP, Heeley DH, Smillie LB. An abundant and novel protein of 22 kDa (SM22) is widely distributed in smooth muscles. Purification from bovine aorta. *Biochem J*. 1987;244(3):705-9.
166. Yang M, Jiang H, Li L. Sm22alpha transcription occurs at the early onset of the cardiovascular system and the intron 1 is dispensable for its transcription in smooth muscle cells during mouse development. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2010;2(1):12-9.
167. Poulianiti KP, Kaltsatou A, Mitrou GI, Jamurtas AZ, Koutedakis Y, Maridaki M, Stefanidis I, Sakkas GK, Karatzaferi C. Systemic Redox Imbalance in Chronic Kidney Disease: A Systematic Review. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:8598253.
168. Tucker PS, Scanlan AT, Dalbo VJ. Chronic kidney disease influences multiple systems: describing the relationship between oxidative stress, inflammation, kidney damage, and concomitant disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:806358.

169. Liakopoulos V, Roumeliotis S, Gorny X, Dounousi E, Mertens PR. Oxidative Stress in Hemodialysis Patients: A Review of the Literature. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:3081856.
170. Beloqui O, Moreno MU, San Jose G, Pejenaute A, Cortes A, Landecho MF, Diez J, Fortuno A, Zalba G. Increased phagocytic NADPH oxidase activity associates with coronary artery calcification in asymptomatic men. *Free Radic Res*. 2017;51(4):389-96.
171. Liakopoulos V, Roumeliotis S, Bozikas A, Eleftheriadis T, Dounousi E. Antioxidant Supplementation in Renal Replacement Therapy Patients: Is There Evidence? *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:9109473.
172. Mocellin S, Provenzano M. RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology. *Journal of translational medicine*. 2004;2(1):39.
173. Whitehead KA, Dahlman JE, Langer RS, Anderson DG. Silencing or stimulation? siRNA delivery and the immune system. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*. 2011;2:77-96.
174. Hood E. RNAi: What's all the noise about gene silencing? *Environ Health Perspect*. 2004;112(4):A224-9.
175. Parhami F, Tintut Y, Ballard A, Fogelman AM, Demer LL. Leptin enhances the calcification of vascular cells: artery wall as a target of leptin. *Circ Res*. 2001;88(9):954-60.
176. Sage AP, Tintut Y, Demer LL. Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Nat Rev Cardiol*. 2010;7(9):528-36.
177. Bartoli-Leonard F, Wilkinson FL, Schiro A, Inglott FS, Alexander MY, Weston R. Suppression of SIRT1 in Diabetic Conditions Induces Osteogenic Differentiation of Human Vascular Smooth Muscle Cells via RUNX2 Signalling. *Scientific reports*. 2019;9(1):878.
178. Shannon M, Capes-Davis A, Eggington E, Georghiou R, Huschtscha LI, Moy E, Power M, Reddel RR, Arthur JW. Is cell culture a risky business? Risk analysis based on scientist survey data. *International journal of cancer*. 2016;138(3):664-70.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Beate Böhme, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Die Rolle der zytosolischen Serin Hydroxymethyl Transferase 1 (SHMT1) bei der Verkalkung von glatten Gefäßmuskelzellen/ Role of Cytosolic Serine Hydroxymethyl Transferase 1 (SHMT1) in Phosphate-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Calcification selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung

Beate Böhme hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Boehme B, Schelski N, Makridakis M, Henze L, Vlahou A, Lang F, Pieske B, Alesutan I, Voelkl J. **Role of Cytosolic Serine Hydroxymethyl Transferase 1 (SHMT1) in Phosphate-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Calcification.** *Kidney & blood pressure research.* 2018;43(4):1212-21.

B Böhme führte mit Unterstützung und Einarbeitung durch N Schelski und I Alesutan eigenständig cDNA-Synthese und RT-PCR Versuche durch, aus denen die Abbildungen 6-12 entstanden. Ebenso führte B Böhme eigenständig die cDNA-Synthese und RT-PCR Versuche durch, aus denen die Abbildungen 13-16 entstanden. Die Zellkultur und Assays für diese Arbeit wurde mit N Schelski, L Henze und I Alesutan durchgeführt, unter technischer Assistenz von A. Lange. Die Konzeption, Auswertung und Interpretation der Ergebnisse erfolgte durch B Boehme, M Makridakis, A Vlahou, F Lang, B Pieske, I Alesutan und J Voelkl.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Schanstra JP, Luong TT, Makridakis M, Van Linthout S, Lygirou V, Latosinska A, Alesutan I, Boehme B, Schelski N, Von Lewinski D, Mullen W, Nicklin S, Delles C, Feuillet G, Denis C, Lang F, Pieske B, Bascands JL, Mischak H, Saulnier-Blache JS, Voelkl J, Vlahou A, Klein J. **Systems biology identifies cytosolic PLA2 as a target in vascular calcification treatment.** JCI insight. 2019;4(10).

Luong TTD, Estepa M, Boehme B, Pieske B, Lang F, Eckardt KU, Voelkl J, Alesutan I. **Inhibition of vascular smooth muscle cell calcification by vasorin through interference with TGFbeta1 signaling.** Cell Signal. 2019;64:109414.

Henze LA, Luong TTD, Boehme B, Masyout J, Schneider MP, Brachs S, Lang F, Pieske B, Pasch A, Eckardt KU, Voelkl J, Alesutan I. **Impact of C-reactive protein on osteo-/chondrogenic transdifferentiation and calcification of vascular smooth muscle cells.** Aging (Albany NY). 2019;11(15):5445-62.

Voelkl J, Luong TT, Tuffaha R, Musculus K, Auer T, Lian X, Daniel C, Zickler D, Boehme B, Sacherer M, Metzler B, Kuhl D, Gollasch M, Amann K, Muller DN, Pieske B, Lang F, Alesutan I. **SGK1 induces vascular smooth muscle cell calcification through NF-kappaB signaling.** J Clin Invest. 2018;128(7):3024-40.

Luong TTD, Schelski N, Boehme B, Makridakis M, Vlahou A, Lang F, Pieske B, Alesutan I, Voelkl J. **Fibulin-3 Attenuates Phosphate-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Calcification by Inhibition of Oxidative Stress.** Cell Physiol Biochem. 2018;46(4):1305-16.

Boehme B, Schelski N, Makridakis M, Henze L, Vlahou A, Lang F, Pieske B, Alesutan I, Voelkl J. **Role of Cytosolic Serine Hydroxymethyl Transferase 1 (SHMT1) in Phosphate-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Calcification.** Kidney & blood pressure research. 2018;43(4):1212-21.

Danksagung

Herzlich möchte ich mich bedanken bei Herrn Prof. Dr. Jakob Völkl und Frau PD Dr. Ioana Alesutan für die Überlassung des Themas und die enge und zuverlässige Betreuung während der Arbeit.

Ebenso danke ich dem gesamten Team unserer Arbeitsgruppe für die Unterstützung bei dieser Arbeit und einer guten gemeinsamen Zeit.

Ferner möchte ich mich bei meiner Familie bedanken für die Hilfe bei den Korrekturen, das Rücken-Freihalten und die vielen wertvollen Stunden ungestörten Arbeitens.