

Aus dem
CharitéCentrum für Innere Medizin mit Gastroenterologie und Nephrologie (CC13)
Medizinische Klinik m.S. Nephrologie und Internistische Intensivmedizin
Direktor: Prof. Dr. Kai-Uwe Eckardt

Habilitationsschrift

Die Bedeutung des vaskulären „Inflammaging“ für die Pathogenese der medialen arteriellen Kalzifizierung

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Experimentelle Nephrologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. nat. Mirjam Tölle-Schuchardt

Eingereicht:	September 2022
Dekan:	Prof. Dr. med. Axel R. Pries
1. Gutachter:	Prof. Dr. med. Philip Wenzel
2. Gutachter:	Prof. Dr. med. Florian Limbourg

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1 Chronische Nierenerkrankung	4
1.2 MAC als histopathologisches Korrelat der Arteriosklerose	5
1.2.1 Die Kalzium-Phosphat-Homöostase	7
1.2.2 Inhibitoren	9
1.3 Chronisches „Inflammaging“ als Stimulator der MAC Pathogenese	11
1.3.1 Nlrp3 Inflammasom	11
1.3.2 Zelluläre Seneszenz	12
1.4 Vaskuläre Progerie und „Inflammaging“	14
1.5 Chronisch-urämisches „Inflammaging“ und urämische vaskuläre Progerie	15
1.6 Experimentelle Modelle zur Untersuchung der medialen arteriellen Kalzifizierung	17
1.7 Zielsetzung der Arbeit	18
2. Ergebnisse (Eigene Arbeiten)	19
I. Einzelzell-basierter Nachweis von Seneszenz- und Kalzifizierungsmarkern	19
II. Etablierung eines neuen ex vivo Perfusionsmodells von Nagetierarterien	32
III. Untersuchung des Einflusses von reaktivem Sauerstoffstress auf die Genese der MAC in einem in vitro Modell	40
IV. Untersuchung des Einflusses von reaktivem Sauerstoffstress auf die Genese der MAC in einem in vivo Modell	49
V. Untersuchung der Bedeutung des Stressor-induzierten „Inflammaging“, ausgelöst über die Aktivierung des Nlrp3 Inflammasoms, auf die Genese der MAC	64
3. Diskussion	78
3.1 Modelle zur Untersuchung des vaskulären „Inflammaging“ und der MAC	78
3.2 MAC als Folge einer Stressor-induzierten zellulären OBP-Transformation	81
3.2.1 Chronisches „Inflammaging“: Nlrp3 Inflammasom, ROS und DNA-Schäden	82
3.2.2 Chronische Niereninsuffizienz als Krankheitsbild der vaskulären Progerie	85
3.3 Potenzielle Therapiekonzepte der vaskulären Progerie mit Bezug zur Urämie	86
3.3.1 Therapeutische Konzepte im Rahmen der Kalzifizierung	86
3.3.2 Therapeutische Konzepte im Rahmen des chronischen „Inflammaging“	87
3.3.3 Therapeutische Konzepte im Rahmen der zellulären Seneszenz	88
3.4 Schlussfolgerung	89
3.5 Ausblick	90
4. Zusammenfassung	91
5. Summary	92
6. Literaturangaben	93
Danksagung	99
Erklärung	100

Abkürzungen

ABT263	Navitoclax
Akt	Proteinkinase B
Alp	alkalische Phosphatase
Asc	“apoptosis-associated speck-like protein”
ATM	“ataxia teleangiectasia mutated”
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	“B-cell lymphoma 2”
Bmp-2	“bone morphogenetic protein 2”
CANTOS	“canacinumab anti-inflammatory thrombosis outcome study“
CKD	“chronic kidney disease”
Crp	C-reaktives Protein
CVD	“cardiovascular disease”
DAMP	“damage-associated molecular pattern”
DDR	„DNA damage response pathways“
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eNPP	Ectonucleotid-Pyrophosphatase/Phosphodiesterase
ESRD	„end-stage renal disease“
EZM	extrazelluläre Matrix
Fgf-23	„fibroblast growth factor 23“
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
Gsdmd	Gasdermin D
HAP	Hydroxyapatit
HGPS	Hutchinson Gilford Progerie Syndrom
HPM	Hochphosphat-Medium
IIA	isoliert-inkubierte Arterie
Il	Interleukin
IPA	isoliert-perfundierte Arterie
JUPITER	„justification for the use of statins in prevention: an international trial evaluating rosuvastatin“
LDL	„low density lipoprotein“
MAC	“medial arterial calcification”
MBD	“mineral bone disease”
Mgp	Matrix-Gla-Protein
Mmp	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
mTOR	„mammalian target of rapamycin“
NFκB	“nuclear factor kappa-light chain enhancer of activated B cell”
Nlrp	NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein
OBP	Osteoblasten-ähnlicher Phänotyp
Opg	Osteopontin
Ocn	Osteocalcin
Opn	Osteopontin
ROS	„reactive oxygen species“
PPi	Pyrophosphat
PRR	„pattern-recognition receptor“
Ptx3	Pentraxin 3
Runx2/Cbfa1	“runt-related transcription-factor 2 / core-binding factor alpha”
Saa	Serum Amyloid A
SA-β-Gal	Seneszenz-assoziierte Beta-Galaktosidase
SASP	“senescence associated secretory phenotype”
Sm22α	“smooth muscle protein 22 alpha”
SNF472	Myo-Inositol-Hexaphosphat
Tlr	“toll-like receptor”
Tnf	Tumornekrosefaktor
VSMC	“vascular smooth muscle cell”

1. Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen („cardiovascular disease“, CVD) stellen weltweit die führende Todesursache, verbunden mit erheblichen Gesundheitskosten, dar.¹ Die absolute Zahl prävalenter CVD Fälle hat sich zwischen 1990 und 2019 von 271 auf 523 Millionen fast verdoppelt. Ebenso stieg die Anzahl der CVD-assoziierten Todesfälle im gleichen Zeitraum von 12,1 auf 18,6 Millionen an, wobei 50% dieser Todesfälle durch eine ischämische Kardiomyopathie bedingt sind, ca. 18% durch ischämische zerebrale Insulte und ca. 16% durch intrazerebrale Blutungen. Adjustiert nach Alter ist sowohl die Anzahl prävalenter CVD Fälle als auch die CVD-assoziierte Mortalität gesunken. Die zunehmende Alterung der Bevölkerung scheint somit ursächlich für den absoluten Anstieg der nicht-adjustierten Zahlen zu sein,² womit alterungsbedingte vaskuläre Veränderungen in den Fokus rücken.

Die Atherosklerose und die Arteriosklerose stellen die wichtigsten Entitäten systemischer Vaskulopathien dar. Die Atherosklerose ist gekennzeichnet durch eine Lipidakkumulation und Plaquebildung in der *tunica intima* der Gefäßwand, die mit einer chronischen Inflammation und einer Infiltration inflammatorischer Zellen einhergeht. Die Plaques können sekundär kalzifizieren. Bei der Arteriosklerose handelt es sich um eine Versteifung der Arterienwand infolge einer primären Kalzifizierung der *tunica media* („medial arterial calcification“, MAC). Auch wenn sich die jeweilige Pathophysiologie beider Vaskulopathien unterscheidet, gibt es gemeinsame Risikofaktoren und Signalwege, so dass beide Entitäten in einem Patienten vorliegen und sich gegenseitig beeinflussen können. Die chronische Nierenkrankheit („chronic kidney disease“, CKD) stellt für beide Entitäten einen bedeutenden Risikofaktor dar.

1.1 Chronische Nierenerkrankung

Von einer CKD sind aktuell ca. 700 Millionen Menschen betroffen, was einer geschätzten weltweiten Prävalenz von ca. 9% entspricht.² Von allen Todesursachen zeigt die CKD den stärksten Anstieg der Prävalenz, mit ca. 40% im Vergleich zu 1990.³ Im Gegensatz zur CVD nahm nicht nur die Gesamtprävalenz, sondern auch die altersadjustierte Prävalenz zu.

Die Nieren sind Hochleistungsorgane. Bei einem Gewicht, das ca. 4‰ des Körpergewichtes entspricht, verbrauchen sie ~10% des Energiebedarfs des Körpers. Hierfür ist eine Durchblutungsrate von ~20% des Herzzeitvolumens, entsprechend ca. 1.800 Litern pro Tag, notwendig.⁴ Mit einer glomerulären Filtrationsrate (GFR) von ~125 ml/min liegt das tägliche Filtrationsvolumen bei ~180 Litern, wodurch eine große Menge an Stoffwechselendprodukten aus dem Blut eliminiert wird.⁴ Nimmt die GFR ab, akkumulieren diese Stoffwechselendprodukte im Blut. Solche ohne bekannte biologische Funktion werden als urämische Retentionsprodukte und solche mit bekannter biologischer Funktion als Urämietoxine bezeichnet.⁴ Deren Retention führt zur Ausbildung des klinischen Syndroms der Urämie, das bereits Ende des 18. Jahrhunderts beschrieben wurde und dessen Name mit

„Urin im Blut“ übersetzt werden kann.⁵ Die Urämie ist ein chronisches Krankheitsbild das geprägt ist durch die schädigende Wirkung von mehr als 150 meist pro-inflammatorischer Urämietoxine. Die Plasma-Konzentration von Urämietoxinen eines Dialysepatienten kann die nierengesunder Menschen um das mehr als 200-fache übersteigen.⁶ Bedeutender als die Plasma-Konzentration eines einzelnen Urämietoxins ist jedoch das Ausmaß der gesamten Urämietoxin-Last, die von der verbleibenden GFR abhängt.^{7,8} Patienten mit dialysepflichtiger Nierenerkrankung im Endstadium („end-stage renal disease“, ESRD) weisen die höchste Urämietoxin-Last und damit das volle Ausmaß der Urämie auf. Die Gesamtmortalität von ESRD Patienten ist im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung bis zu 36-fach erhöht, so dass ein 20-jähriger Dialysepatient bis zu 40 Lebensjahre verliert.^{7,9,10} Zu bedenken ist, dass viele CKD Patienten aufgrund der ausgeprägten CVD-Mortalität das Stadium der Dialyse gar nicht erreichen. Ursache hierfür ist die urämische arterielle Vaskulopathie, deren Pathogenese komplex, multifaktoriell und unzureichend verstanden ist.¹¹ Aktuelle Therapieoptionen orientieren sich an denen nierengesunder Menschen und zielen auf die Behandlung klassischer kardiovaskulärer Risikofaktoren, z.B. Senkung von erhöhten Cholesterinwerten, ab. Studien zeigen jedoch, dass diese Behandlung bei CKD Patienten nicht in gleicherweise protektiv wirkt.¹² Die Erklärung hierfür scheint der urämische Phänotyp zu sein, der geprägt ist von einer chronisch-sterilen Inflammation und einer Vielzahl pro-inflammatorischer Urämietoxine. Hierdurch werden zahlreiche physiologische Prozesse nachhaltig beeinflusst und damit die Wirksamkeit pharmakologischer Interventionen abgeschwächt. Speziell auf diese schädigende Wirkung von Urämietoxinen ausgerichtete Therapieoptionen existieren aktuell außerhalb der Dialysetherapie und der Transplantation nicht. Das therapeutische Konzept der Dialyse ist die Elimination der Urämietoxine, um dadurch die urämische Dyshomöostase positiv zu beeinflussen. In den letzten 50 Jahren konnte trotz zahlreicher technischer Optimierungen das Überleben von Dialysepatienten nicht verbessert werden.¹⁰ Ursächlich ist zum einen die begrenzte Behandlungszeit von i.d.R. 12 Stunden pro Woche im Vergleich zur kontinuierlichen Entgiftungszeit der Nieren von 168 Stunden pro Woche und zum anderen die deutlich nachlassende therapeutische Effektivität bei der Elimination von mittelmolekularen und proteingebundenen Urämietoxinen.¹⁰ Hierdurch kann die urämische Dyshomöostase lediglich auf dem Niveau eines sehr weit fortgeschrittenen CKD Stadiums mit weiterhin deutlich erhöhter Urämietoxin-Last stabilisiert werden. Daher ist das Ausmaß der MAC bei dialysepflichtigen Patienten am größten.

1.2 MAC als histopathologisches Korrelat der Arteriosklerose

Durch Rudolph Virchow wurde 1856 der Begriff der „Arteriosklerose“ geprägt, wobei die MAC dessen pathologisches Korrelat darstellt.^{13,14} Anfänglich wurde diese als altersabhängige und vor allem passive, degenerative Ablagerung von Hydroxyapatit (HAP), insbesondere im

Bereich der *tunica media* der *Arteriae elastotypicae*, betrachtet.¹⁵ Die Folge ist eine Versteifung elastischer Gefäße mit hämodynamischen Veränderungen, v.a. eine Zunahme der Pulswellengeschwindigkeit, verbunden mit einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität (Abb. 1).

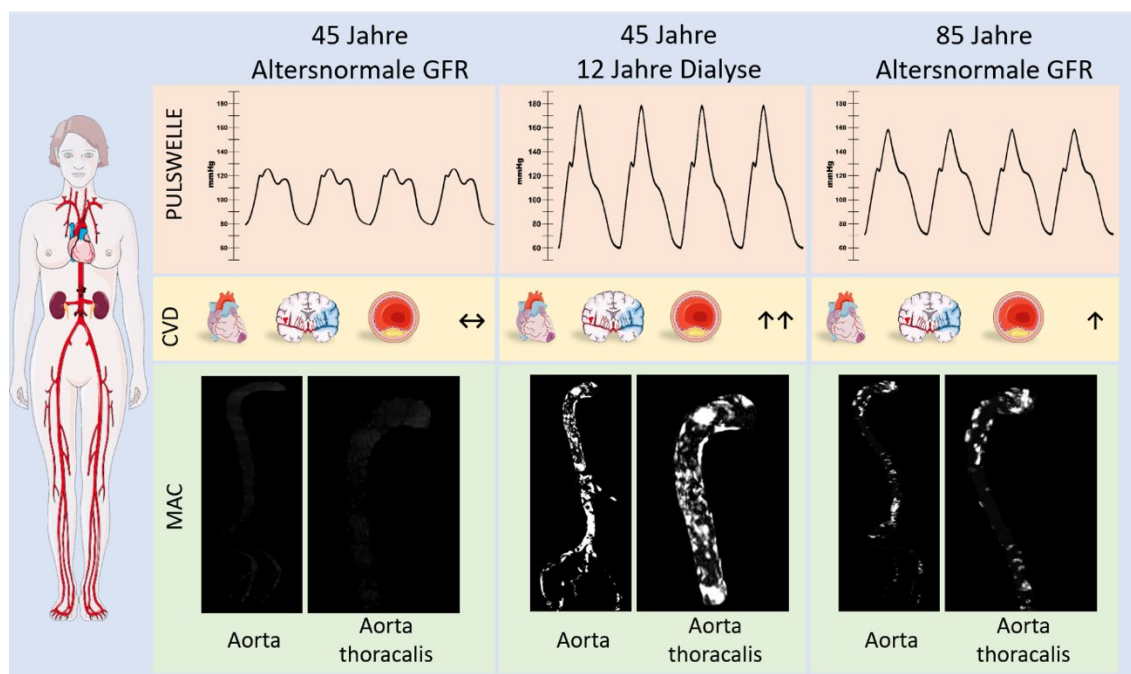


Abbildung 1. Mediale arterielle Kalzifizierung

Die mediale arterielle Kalzifizierung geht einher mit hämodynamischen Veränderungen der Gefäße, wie u.a. Zunahme der Pulswellengeschwindigkeit, die sich im Alter, aber auch durch Komorbiditäten wie u.a. einer chronischen Niereninsuffizienz (CKD) manifestiert. Dies resultiert in einem drastischen Anstieg (Pfeile) der kardiovaskulären Ereignisse in CKD Patienten, aber auch einer altersabhängigen Zunahme. Die Verkalkung der Gefäßwand kann u.a. mittels Computertomographie visualisiert werden. Dargestellt ist jeweils eine 3D Rekonstruktion der Aorta eines exemplarischen CKD Patienten, eines altersgleichen nierengesunden Probanden, sowie von einem älteren Patienten mit altersnormaler glomerulären Filtrationsrate (GFR).

Der Verlauf der Pulswelle ist schematisch dargestellt. Die medizinisch schematischen Abbildungen sind mit dem „Servier Medical Art“ System erstellt. CVD: „cardiovascular disease“, Myokardinfarkt, ischämische cerebrale Insulte, Vaskulopathien

Die glatte Gefäßmuskelzelle („vascular smooth muscle cell“, VSMC) stellt eine Schlüsselzelle für die Pathogenese der MAC dar.¹⁶ Unter physiologischen Bedingungen besitzt diese einen kontraktilen Phänotyp und exprimiert typische Markerproteine (u.a. „smooth muscle alpha actin“, „smooth muscle 22-alpha“ (Sm22 α)). Aufgrund einer phänotypischen Plastizität können VSMC ihren zellulären Phänotyp als Reaktion auf Veränderungen des Milieus verändern.¹⁷ Im Prozess der vaskulären Kalzifizierung verlieren die VSMC ihren kontraktilen Phänotyp und nehmen einen osteoblastären Phänotyp (OBP) ein, der charakterisiert ist durch eine verminderte Expression von VSMC- und eine erhöhte Expression von Osteoblasten-Markern. Zu den Osteoblasten-Markern gehören u.a. „runt-related transcription-factor 2/core-binding factor alpha 1“ (Runx2/Cbfa1), „bone morphogenetic protein 2“ (Bmp-2), Osteopontin (Opn), Osteocalcin (Ocn) und alkalische Phosphatase (Alp).^{16,18} Induktoren dieser Phänotyp-Transformation sind u.a. reaktive Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS) und eine chronische Inflammation.¹⁸⁻²¹ Diese Phänotyptransformation tritt während der Gefäßalterung auf und wird als „Inflammaging“ bezeichnet. Die MAC Pathogenese wird neben dem Alter, u.a.

auch von dem Verhältnis zwischen Mediatoren und Inhibitoren, sowie der Kalzium-Phosphat Homöostase beeinflusst (Abb. 2).

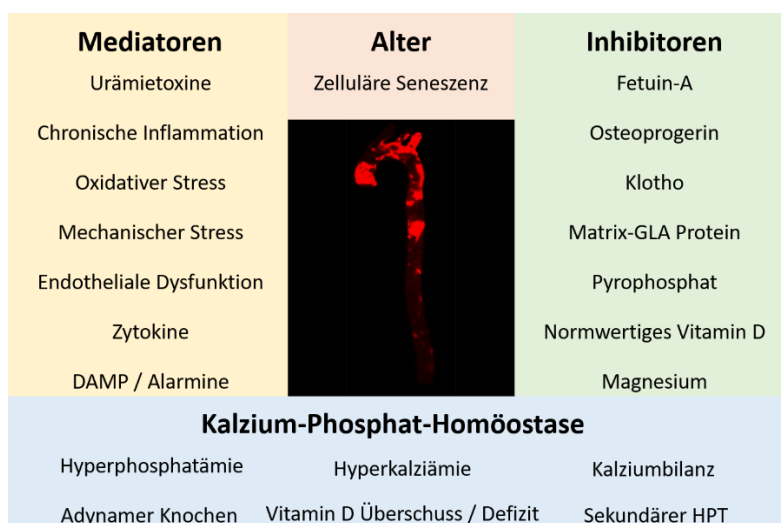


Abbildung 2. Einflussfaktoren der medialen arteriellen Kalzifizierung

Eine Vielzahl von Faktoren und deren Dysbalance beeinflussen die Gefäßkalzifizierung. Nähere Informationen sind dem Text zu entnehmen. Aorta: Visualisierung der Kalzifizierung in einer thorakalen Aorta der Ratte mittels OsteoSense™.²²

DAMP: „damage-associated molecular pattern“, HPT: Hyperparathyreoidismus

1.2.1 Die Kalzium-Phosphat-Homöostase

Molekulares Korrelat der MAC ist HAP, ein unter physiologischen Bedingungen unlösliches Kristall, bestehend aus Kalzium und Phosphat. Dessen Entstehung ist abhängig von der Kalzium-Phosphat-Homöostase und von Milieubedingungen. Bereits unter physiologischen Bedingungen liegen die Kalzium- und Phosphatkonzentrationen an der thermodynamischen Löslichkeitsgrenze, so dass deren Plasmakonzentrationen eng reguliert sind und Inhibitoren die Kristallisation verhindern. Nachdem die initiale Hypothese der MAC Entstehung von einer passiven Ausfällung von HAP bei erhöhtem Kalzium-Phosphat-Produkt ausging, zeigten weitere Untersuchungen, dass Kalzium und Phosphat eine aktive Rolle in der MAC Pathogenese einnehmen.¹⁵ Eine Hyperphosphatämie verstärkt bereits unabhängig vom Vorliegen einer CKD die kardiovaskuläre Mortalität und die koronare Kalzifizierung durch Aktivierung prokalzifizierender Signaltransduktionswege und die Initiierung einer OBP-Transformation der VSMC.²³ Erhöhte Kalzium- und Phosphatkonzentrationen bewirken darüber hinaus eine vermehrte Sekretion von Matrixvesikeln und eine verstärkte Apoptose und Nekrose von VSMC mit Bildung apoptotischer Körperchen.^{24,25} Matrixvesikel bestehen aus Kalzium, Kalziumphosphat, freier Desoxyribonucleinsäure (DNA), Chelatoren und Inhibitoren der Kalzifizierung und können abhängig vom Mikromilieu als Nidus für die Kalzifizierung dienen oder eine Phänotyp-Transformation von VSMC in einen OBP bewirken.^{24,26} Die Kalzium-Phosphat-Homöostase beeinflusst außerdem die Expression von Inhibitoren der vaskulären Kalzifizierung und die Autophagie bei funktionellen Störungen wichtiger Organellen, u.a. der Mitochondrien.^{27,28} Kalziotrope Hormone wie Calcitriol oder Parathormon (Pth) regulieren die

Kalzium-Phosphat-Homöostase und beeinflussen die vaskuläre Kalzifizierung sowie den Knochenstoffwechsel. Die Bedeutung von Calcitriol in der Pathogenese der MAC ist bislang unvollständig verstanden. Sowohl eine Hypo- als auch eine Hypervitaminose D sind mit einer vermehrten vaskulären Kalzifizierung verbunden.²⁹

Viele experimentelle Modelle bedienen sich einer erhöhten Zufuhr von Kalzium und Phosphat als Induktor der MAC.³⁰ Da diese Ionen eine Dyshomöostase induzieren, müssen neben thermodynamischen Bedingungen viele aktive, pleiotrope Effekte auf die VSMC bedacht werden.¹⁵ Die Induktion einer Hypervitaminose D wird häufig in *in vivo* Modellen zur Induktion der vaskulären Kalzifizierung verwendet. Eine dreitägige Applikation von 500.000 IU/kg/d Vitamin D₃ bewirkt in Mäusen eine schwere aortale MAC bereits nach 7 Tagen.³¹ Die Vitamin D Applikation geht einher mit einer erhöhten Kalzium- und Phosphatkonzentration im Serum und Calcitriol bewirkt außerdem direkte dosisabhängige Vitamin-D-Rezeptor abhängige Effekte in der Kalzifizierung.³² Der in *in vitro* Untersuchungen vermutete direkte Einfluss von Vitamin D auf die MAC ist *in vivo* nicht unabhängig von der begleitenden Hyperkalziämie und Hyperphosphatämie zu untersuchen, so dass keine tierexperimentellen Daten vorliegen. Neben dem Einfluss der Hypervitaminose D scheint auch eine Hypovitaminose D einen Einfluss auf die Induktion der MAC zu haben. Die inadäquate Substitution einer bestehenden Hypovitaminose D war in Wildtyp und „low density lipoprotein“ (LDL)-Rezeptor knockout Mäusen verbunden mit einer erhöhten MAC.^{33,34} Vitamin D scheint hier insbesondere eine direkte Rolle für die Inflammations-assoziierte vaskuläre Kalzifizierung zu spielen. Eine inadäquate Vitamin D Substitution geht einher mit einer erhöhten Tumornekrosefaktor (Tnf)- α Expression und ist assoziiert mit einer erhöhten Expression osteogener Markerproteine in LDL-Rezeptor knockout Mäusen.^{33,34} Vergleichbare Befunde zeigten *in vitro* Untersuchungen an VSMC, in denen aktives Vitamin D die Phosphat- und Tnf- α -induzierte Kalzifizierung vermindert.³⁵ In einem urämischen Rattenmodell bildet sich eine aortale MAC unter niedrigen Kalzium- und Vitamin D-Konzentration bei begleitend hoher Pth- und Phosphat-Konzentration aus.³⁶ Pth ist über zahlreiche direkte und indirekte Effekte ebenfalls in die Regulation der Kalzium-Phosphat-Homöostase, dem Knochenstoffwechsel und der vaskulären Kalzifizierung eingebunden.³⁷ Eine normale Pth Konzentration inhibiert und eine hohe Pth Konzentration, z.B. beim sekundären Hyperparathyreoidismus, stimuliert die vaskuläre Kalzifizierung und die Expression osteogener Markerproteine.³⁷ Nach Ausschaltung des Pth-1 Rezeptors zeigt sich eine signifikant reduzierte pro-kalzifizierende Pth Wirkung, so dass ein direkter Rezeptor-abhängiger Effekt vorzuliegen scheint.³⁸ Unter CKD Bedingungen stellt eine zu niedrige Pth Konzentration im Zusammenhang mit der Ausbildung eines adynamen Knochenstoffwechsels einen eigenständigen Risikofaktor für die Ausbildung einer vaskulären Kalzifizierung dar und ist mit einem hohen kardiovaskulären Risiko verbunden.³⁹ Der adyname Knochenstoffwechsel ist charakterisiert durch einen niedrigen Knochenumbau, ein niedriges Knochenvolumen, eine

normale Mineralisierung mit deutlich reduzierter Zellularität und minimaler bis fehlender Fibrose.³⁹ Der adyname Knochenstoffwechsel stellt bisweilen die häufigste Form der renalen Osteodystrophie dar.³⁹ Er wird ausgelöst durch eine zu starke Suppression der Pth Sekretion, begleitet von einer individuellen und multifaktoriellen Pth Resistenz des Knochens unter urämischen Bedingungen.³⁹

Die Ablagerung von HAP kann selbst nachhaltige Auswirkungen auf die weitere Kalzifizierung haben, beispielsweise durch den Effekt auf die Dysorganisation elastischer Fasern in der *tunica media* der Gefäßwand.¹⁵ Elastinfragmente der extrazellulären Matrix (EZM), die durch Matrix-Metalloproteasen (Mmp) gebildet werden, können dabei einen Nidus zur Kalzifizierung darstellen und auf parakrinem Weg das Expressionsprofil benachbarter Zellen beeinflussen.⁴⁰

1.2.2 Inhibitoren

Aufgrund physiologisch hoher Kalzium- und Phosphatkonzentrationen bedarf es potenter endogener Inhibitoren, um die extra-ossäre Bildung stabiler HAP zu verhindern.¹⁵ Das aus der Leber sezernierte Fetuin-A, das von VSMC stammende, gewebsständige Matrix Gla Protein (Mgp), „fibroblast growth factor-23“ (Fgf-23)/Klotho, Pyrophosphat (PPi), Osteoprotegerin (Opg) und Magnesium haben eine inhibierende Wirkung auf die Pathogenese der MAC.⁴¹⁻⁴⁴ Zwischen einem Inhibitor-Mangel und dem Ausmaß der MAC besteht eine klinische Assoziation.^{41,42}

Fgf-23 ist ein aus dem Knochen freigesetztes Hormon. Die Sekretion wird über Kalzium, Vitamin D und Pth reguliert.^{45,46} FGF-23 vermindert die Expression der Natrium-Phosphat-Cotransporter im proximalem Tubulus und induziert dadurch eine Phosphaturie.⁴⁵ Außerdem inhibiert Fgf-23 die 1α -Hydroxylase und stimuliert die 24-Hydroxylase, so dass die Produktion von Calcitriol reduziert wird und anstelle dessen 24,25-Dihydroxyvitamin D entsteht, was in einer weiteren Reduktion der Phosphatkonzentration resultiert.⁴⁷ In Bezug auf die direkten Auswirkungen von Fgf-23 auf die MAC Induktion bestehen kontroverse Ansichten. Unterschiedliche Arbeiten zeigten keinen direkten prokalzifizierenden Effekt von Fgf-23 in VSMC oder Aortenringen.^{48,49} In anderen Studien zeigte sich eine potentiell protektive Wirkung von Fgf-23 auf die Kalzifizierung in VSMC, die zum Teil abhängig von α -Klotho waren.⁵⁰ Auf der anderen Seite zeigte sich in VSMC die Klotho überexprimierten, eine durch Fgf-23 induzierte gesteigerte Kalzifizierung.⁴⁶

Klotho ist ein Typ I Transmembranprotein, das als Co-Rezeptor mit dem Fgf-Rezeptor 1 assoziiert und so die Bindung von Fgf-23 ermöglicht.⁵¹ Klotho wird insbesondere in der Niere, aber auch in Plazenta, Prostata, Lunge, Milz und Nebenschilddrüse exprimiert.^{51,52} Unter dem Einfluss von Klotho wird die renale Rückresorption von Phosphat vermindert, die Rückresorption von Kalzium erhöht und die Aktivierung von 25-Hydroxy-Vitamin D3 über die Hemmung der 1α -Hydroxylase gehemmt.⁵³ Klotho knockout Mäuse zeigen eine verminderte

Lebensspanne, Hyperphosphatämie sowie Hypervitaminose D, und eine damit assoziierte vorzeitige MAC und Osteopenie.⁵³ Es existieren 2 Formen von α -Klotho, eine membrangebundene Form und eine lösliche Form, die durch das Ablösen der extrazellulären Domäne aus der membrangebundenen Form gebildet wird. α -Klotho entfaltet eine endokrine Hormonwirkung auf unterschiedliche Transportsysteme.^{52,53} Alle aktuell publizierten Arbeiten deuten auf einen protektiven Effekt von α -Klotho in Bezug auf die vaskuläre Kalzifizierung hin.⁵⁴⁻⁵⁶ Die teilweise konträren Ergebnisse in Bezug auf die vaskuläre Kalzifizierung zwischen Fgf-23 und α -Klotho können mit einer fehlenden Expression des membrangebundenen α -Klotho in vaskulären Zellen erklärt werden.⁵⁷

Fetuin-A ist ein Glykoprotein, das aus der Leber und dem Fettgewebe freigesetzt wird und unter CKD und ESRD Bedingungen wesentlich zur Vermeidung der vaskulären Kalzifizierung über die Bildung von Calciprotein-Partikeln (CPP) beiträgt.⁴⁴ In ESRD Patienten ist eine niedrige Fetuin-A Plasmakonzentration mit einer erhöhten Mortalität assoziiert.⁵⁸

Mgp gehört zur Familie der Vitamin K₂ abhängigen Proteine mit Gla-Domäne.⁵⁹ Mgp beinhaltet Glutamat, das posttranslational von der γ -Glutamylcarboxylase carboxyliert wird. Dieser Vorgang ist Vitamin K-abhängig.⁵⁹ Über die Bindung von Kalzium mit hoher Affinität über die Gla-Domäne, wirkt Mgp als potenter Inhibitor der vaskulären Kalzifizierung.⁵⁹

PPi ist ein endogener Inhibitor, der die Präzipitation von Kalzium und Phosphat sowohl *in vitro* als auch *in vivo* vermindert.^{15,60,61} PPi wird durch die Ectonucleotid-Pyrophosphatase/Phosphodiesterase (eNPP) 1 und 3 durch Hydrolyse von extrazellulärem Adenosintriphosphat (ATP) gebildet. In der extrazellulären Flüssigkeit wird PPi durch die Alp zu anorganischem Phosphat degradiert.⁶¹ Mutationen die in einem Funktionsverlust von eNPP resultieren, führen zu einer signifikanten vaskulären Kalzifizierung.¹⁵

Opg ist ein Zytokin-Rezeptor und gehört zur Tnf-Rezeptor-Superfamilie. Opg wirkt als Decoy-Rezeptor für „receptor activator of nuclear factor kappa B ligand“.⁶² Hierdurch kommt es zu einer Hemmung von „nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF κ B) und damit zu einer Verminderung der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, was hemmend auf die vaskuläre Kalzifizierung wirkt.⁶²

Minerale, wie z.B. Magnesium, modulieren die Phosphat-induzierte Kalzifizierung, indem sie das Gleichgewicht von Stimulatoren und Inhibitoren beeinflussen.^{15,63,64} Über die Erhöhung der Aktivität des Magnesium Transporters „transient receptor potential melastatin 7“ und einen erhöhten intrazellulären Magnesiuminflux wird beispielsweise die Expression von Inhibitoren, wie Bmp-7, Opn und Mgp, erhöht.⁶⁵ Als Antagonist von Kalzium-Kanälen verhindert Magnesium den intrazellulären Influx von Kalzium.⁶⁵

CKD Patienten entwickeln bereits in frühen Stadien der Niereninsuffizienz relevante Veränderungen des Knochen- und Mineralstoffwechsels, die als „CKD–mineral bone disease“ (CKD-MBD) bezeichnet werden. Die CKD-MBD geht einher mit einer erhöhten Frakturrate des

Knochens und ausgeprägten vaskulären und extra-vaskulären Verkalkungen, die in einer hohen kardiovaskulären Morbidität und Mortalität resultieren.⁶⁶ Zu den wichtigsten Veränderungen zählt eine erhöhte Plasmakonzentration von Pth, Fgf-23 und anorganischem Phosphat, bei gleichzeitig verminderter Konzentration von 1,25-Dihydroxyvitamin D3, Kalzium und Klotho.⁶⁶ Durch eine verminderte Phosphaturie entsteht eine Hyperphosphatämie.⁶⁶ Durch die Beeinflussung der Kalzium-Phosphat-Homöostase bestehen viele indirekte Wirkungen auf die Pathogenese der MAC.

1.3 Chronisches „Inflammaging“ als Stimulator der MAC Pathogenese

Ein zunehmend in den Fokus rückender Induktor der MAC ist die chronische Inflammation, die bereits in zunehmendem chronologischen Alter als „Inflammaging“ auftritt und maßgeblich an assoziierten Pathologien wie CKD oder CVD beteiligt ist.^{67,68} Das „Inflammaging“ beschreibt den Prozess einer verstärkten Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren mit Induktion einer sterilen chronischen Inflammation.^{15,69,70} Diese ist gekennzeichnet durch die Sekretion von v.a. NFκB-assoziierten pro-inflammatorischen Interleukinen (IL) der IL-1 Familie als Folge einer Aktivierung von Mechanismen der Mustererkennung des angeborenen Immunsystems.^{69,70} Das Immunsystem hat evolutionär konservierte Abwehrmechanismen entwickelt, um den Organismus vor Einflüssen potentiell schädigender exogener und endogener Moleküle zu schützen.⁷¹ Eine chronische Aktivierung dieser Schutzmechanismen führt zur Maladaptation.⁷¹ Die Mustererkennung des angeborenen Immunsystems erfolgt über unterschiedliche transmembranöse und intrazelluläre Mustererkennungsrezeptoren („pattern recognition receptors“, PRR). PRR sind evolutionär von Insekten bis zu Wirbeltieren konserviert.⁷² Sie erkennen sowohl potenziell schädliche exogene Moleküle beispielsweise von Pathogenen, die als „pathogen associated molecular pattern“ bezeichnet werden, als auch potenziell schädliche endogene Moleküle, zu denen v.a. die von sterbenden Zellen freigesetzten „damage associated molecular pattern“ (DAMP) gehören. Hyperaktive Zellen sezernieren weitere endogene Moleküle, sogenannte Alarmine. Zu den PRR zählen z.B. Toll-like-Rezeptoren (TLR), die entweder transmembranös (u.a. TLR2/4) oder zytoplasmatisch (u.a. TLR9) lokalisiert sind, zytoplasmatische Inflammasomen als Multiprotein-Signalkomplexe (u.a. „NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein“ (Nlrp)1, Nlrp3) oder DNA-Detektoren.⁷² Komponenten der Mustererkennung werden in vaskulären Zellen, wie u.a. in VSMC, exprimiert.^{73,74} Deren Aktivierung induziert eine transkriptionelle pro-inflammatorische Reprogrammierung, durch die eine chronisch-sterile Inflammation induziert wird.⁷⁵ Diese ist in akuten Situationen zeitlich begrenzt nützlich, eine Chronifizierung ist aber schädlich.⁷²

1.3.1 Nlrp3 Inflammasom

Über die Aktivierung von Nlrp Inflammasomen wird v.a. die Sekretion von Zytokinen der IL-1 Familie induziert, deren Expression und Aktivierung aufgrund der starken pro-

inflammatorischen Potenz über einen mehrstufigen Prozess reguliert ist. Im kanonischen Signalweg spaltet Caspase-1 Il-1 β und Il-18 aus ihren inaktiven Pro-Peptiden.⁷⁶ Im nicht-kanonischen Signalweg wird Il-1 α freigesetzt über die Spaltung durch Caspase-4/5/11.⁷⁶ Das im vaskulären System hauptsächlich exprimierte Nlrp3 Inflammasom gehört zu den kanonischen Inflammasomen und wird insbesondere durch ROS aktiviert.^{76,77} Der mehrstufige Aktivierungsprozess wird über ein Initialisierungs- und ein Aktivierungssignal, z.B. Tlr Aktivierung und ROS Produktion, streng kontrolliert.⁷⁷ Die Sezernierung der Zytokine erfolgt über Membranporen, die durch Gasdermin D (Gsdmd) gebildet werden.⁷⁸ Die Menge an membranständigem, über Caspase 1 prozessiertem, Gsdmd ist entscheidend für das Zellschicksal.⁷⁸ Die stärkste Antwort auf eine DAMP/Alarmin Stimulation mündet in der zellulären Pyroptose, der lytischen Form des programmierten Zelltodes.⁷⁶ Ist die Gsdmd Menge unterhalb der Pyroptoseschwelle, nimmt die Zelle einen hyperaktiven Zustand an, der über die Caspase 1 Aktivität, die assoziierte Il-1 Zytokinmenge, sowie die Größe und Art der Inflammasomen determiniert wird.⁷⁶ Im Gegensatz zu myeloischen Zellen exprimieren VSMC kleine Inflammasomen mit geringer, langsam einsetzender, aber langanhaltender Aktivität mit kontinuierlicher Freisetzung niedrigkonzentrierter Il-1 Zytokine.^{77,79} Hierdurch wird v.a. eine zelluläre Hyperaktivität und chronisch-sterile Inflammation induziert, die sich im Verlauf unabhängig vom initialen Auslöser selbst unterhalten kann.^{77,79} Die Zellen behalten dabei ihre volle Viabilität und inkludieren Il-1 Zytokine in das Repertoire ihres pro-inflammatorischen Sekretoms.⁷⁵ Il-1 α/β wirken stark pro-inflammatorisch über die Aktivierung unterschiedlicher homomerer und heteromerer Rezeptoren, wodurch viele synergistische Wirkungen vermittelt werden.⁷⁵ Il-1 α ist ein v.a. aus sterbenden Zellen freigesetztes DAMP, dass die frühe Phase einer sterilen Inflammation einleitet, während Il-1 β v.a. als Alarmin von Inflammasomen gebildet wird und die chronisch-sterile Inflammation aufrecht erhält.⁷⁵ Il-1 β induziert die Expression weiterer pro-inflammatorischer Zytokine, insbesondere Il-6, und kann durch einen positiven Feedback-Mechanismus auch die eigene Expression steigern.⁸⁰ Damit werden Il-1 Zytokine unabhängig vom initialen Auslöser u.a. über Rekrutierung von Entzündungszellen oder Aktivierung von Mmp, wichtiger und autarker Teil der jeweiligen Pathogenese.⁸⁰ Parallel steigt in alternden Geweben die Anzahl seneszenten Zellen, die sowohl Folge als auch Auslöser des chronischen „Inflammaging“ sind.⁶⁷

1.3.2 Zelluläre Seneszenz

Den Begriff der zellulären Seneszenz beschrieb der Gerontologe Leonard Hayflick erstmals in den 1960er Jahren.⁸¹ Er entdeckte in Untersuchungen an humanen Fibroblasten, dass eukaryote Zellen eine endliche Anzahl an Zellteilungen durchführen können, dann in einen Zellzyklusstopp eintreten, aber weiterhin eine metabolische Aktivität zeigen.⁸¹ Man unterscheidet zwischen replikativer und nicht-replikativer zellulärer Seneszenz. In beiden

Fällen spielen Schädigungen der DNA eine bedeutende Rolle, über die „DNA damage response pathways“ (DDR) induziert werden, die u.a. eine Aktivierung beispielsweise der humanen Tumorsuppressoren p53/p21 und p16^{INK4A} bewirken. Während die replikative zelluläre Seneszenz eine wichtige Bedeutung für das Verständnis der Tumorgenese hat, spielen Mechanismen der nicht-replikativen Seneszenz in pathologischen Situationen wie beispielsweise einer chronischen Inflammation eine wichtige Rolle.⁶⁸ In diesen Situationen zeigen sich vor allem ROS-induzierte DNA- und Protein-Schädigungsmuster, über die zahlreiche Veränderungen im zellulären Transkriptom induziert werden.^{67,82,83} Senescente Zellen können hierbei einen reversiblen und potentiell nützlichen akuten oder nur partiell reversiblen und potentiell schädlichen chronisch-seneszenten Status einnehmen.^{67,82,83} Senescente Zellen zeigen relevante Doppelstrang-DNA-Schäden durch die eine Phosphorylierung von Histonen induziert wird. Durch den Einfluss der „ataxia teleangiectasia mutated“ (ATM) und „ATM-Rad3-related“ Kinase wird vor allem das Histon H2A.X phosphoryliert, aus dem die phosphorylierte Form des γ H2A.X entsteht.⁸⁴ In der Folge werden die Tumorsuppressoren p53/p21 und p16^{INK4A} als weitere Seneszenz-Marker induziert.⁸⁵ Zusätzlich zeigt sich eine erhöhte lysosomale Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase (SA- β -Gal), über die die Hydrolyse von β -Galaktosiden in Monosaccharide in seneszenten Zellen katalysiert wird.⁸⁶ Durch ihre metabolische Aktivität, u.a. über die Sekretion von Il-1 α und Il-6, haben sie parakrine Wirkung.⁸⁷ Hierbei spielen v.a. ROS eine Rolle, die über „gap junction“ zwischen den Zellen transferiert werden können.⁸⁸ Senescente Zellen verändern ihr individuelles Sekretom und nehmen einen hypersekretorischen Zustand an, der als „senescence-associated secretory phenotype“ (SASP) bezeichnet wird.⁸⁷ Das Sekretom besteht aus einer Vielzahl sekretorischer Mediatoren, darunter beispielsweise pro-inflammatorische Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, Proteasen, bioaktive Lipide und Mmp.⁸⁷ Die Eigenschaften seneszenten Zellen werden über die individuelle Zusammensetzung des SASP vermittelt.⁸⁹ Die Zusammensetzung und die Bedeutung des SASP wird wesentlich beeinflusst durch die Art und Dauer der Induktion, die Dauer der Seneszenz und des Zelltyps.⁸⁷ Zentrale Komponenten des SASP sind insbesondere NF κ B abhängige pro-inflammatorische Mediatoren, wobei u.a. Il-1 β und Il-6 konserviert vorliegen.⁸² Letztendlich bilden senescente Zellen einen pro-inflammatorischen SASP aus, der durch die Expression zahlreicher pro-inflammatorischer Zytokine, beispielsweise der Il-1 Zytokin-Superfamilie, geprägt ist. Daher besteht zwischen der Mustererkennung und der zellulären Seneszenz mechanistische Überlappungen. Für die Pathogenese der MAC in der physiologischen Gefäßalterung kommt der oben beschriebenen OBP-Transformation von VSMC mit Induktion eines SASP eine wichtige Bedeutung zu.¹⁵ Die beschriebenen Prozesse der physiologischen Gefäßalterung können bei vorzeitig einsetzenden und/oder verstärkt

vorliegenden chronischen „Inflammaging“ beschleunigt ablaufen, was zu einer vaskulären Veralterung (Progerie) mit MAC führt (Abb. 3).

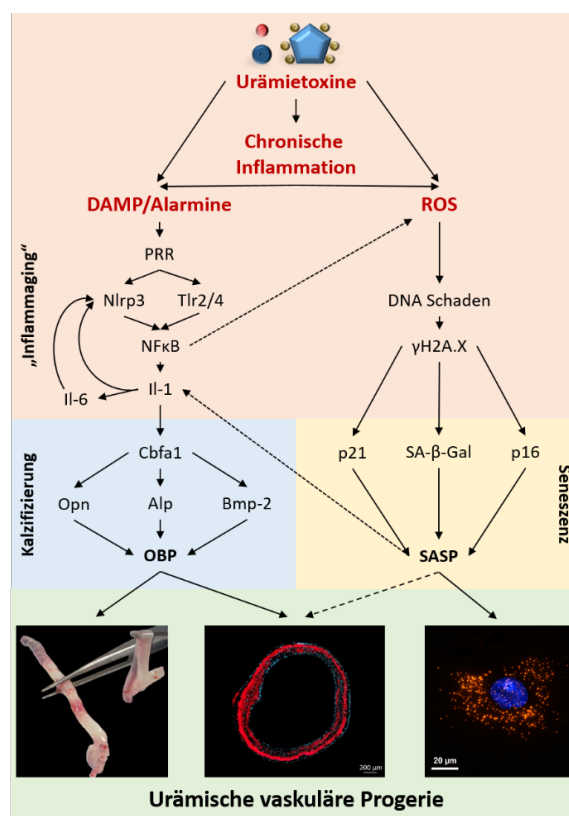


Abbildung 3. Vaskuläre Progerie mit einhergehender medialen arteriellen Kalzifizierung induziert durch chronisches „Inflammaging“

Schematische Zusammenstellung der Signalwege, nähere Informationen sind dem Text zu entnehmen. Aorten: makroskopischer Vergleich einer kalzifizierten thorakalen Rattenaorta und einer thorakalen Aorta eines Kontrolltieres. Visualisierung der Kalzifizierung mittels OsteoSense™ im histologischen Schnitt. Zelle: Fluoreszenzbasierte Visualisierung von Seneszenzmarkern in glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte. Nähere Informationen zu den fluoreszenzbasierten Färbungen sind den Publikationen zu entnehmen.^{22,90}

Alp: alkalische Phosphatase, Bmp-2: "bone morphogenetic protein 2", Cbfa1: "core binding factor alpha 1", DAMP: "damage-associated molecular pattern", Il: Interleukin, NFκB: "nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells", Nlrp3: "nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor pyrin domain containing 3" OBP: osteoblastärer Phänotyp, Opn: Osteopontin, PRR: "pattern recognition receptor", p21: "cyclin-dependent kinase inhibitor p21", p16: "cyclin-dependent kinase inhibitor 2A p16", ROS: reactive oxygen species, SA-β-Gal: Seneszenz-assoziierter beta Galaktosidase, SASP: Seneszenz-assoziierter sekretorischer Phänotyp, Tlr: "toll-like receptor"

1.4 Vaskuläre Progerie und „Inflammaging“

Bereits in der Allgemeinbevölkerung zeigt sich eine Assoziation zwischen chronischer Inflammation und CVD.⁶⁷ Geringe Erhöhungen der zirkulierenden Il-6- und C-reaktives Protein (Crp)-Konzentration sind mit einer signifikant erhöhten CVD Inzidenz assoziiert, die durch eine anti-inflammatorische Therapie reduziert werden kann.⁶⁷ In der JUPITER („justification for the use of statins in prevention: an international trial evaluating rosuvastatin“) Studie konnte durch die Therapie mit einem Cholesterinsynthese-Enzyme-Hemmer bei Patienten das Ausmaß der Inflammation und damit das kardiovaskuläre Risiko gesenkt werden und zwar unabhängig von der Cholesterin-Plasmakonzentration.⁹¹ Bei Patienten mit einer inflammatorischen Kardiomyopathie korreliert das Ausmaß der Inflammation mit der Expression des Nlrp3 Inflammasoms und der Plasmakonzentration von Il-1β und Il-18.⁹² Die CANTOS („canacinumab anti-inflammatory thrombosis outcome study“) Studie belegte erstmals die

Bedeutung der chronisch-sterilen vaskulären Inflammation.⁹³ In einem großen Patientenkollektiv wurden die positiven Effekte einer auf die Mustererkennung des angeborenen Immunsystems ausgerichteten anti-inflammatorischen Therapie mit dem Il-1 β -bindenden Antikörper Canakinumab gezeigt.⁹³ PRR nehmen somit eine mögliche Rolle als zentraler Vermittler des vaskulären „Inflammaging“ ein.⁹³ Die Verbindung zwischen chronischer Inflammation, „Inflammaging“ und vaskulärer Progerie zeigt u.a. das monogenetische Hutchinson-Gilford-Progerie Syndrom (HGPS). HGPS Patienten sterben im jungen chronologischen Alter an typischen altersbedingten CVD infolge struktureller Gefäßveränderungen, die gekennzeichnet sind durch einen erhöhten Anteil an VSMC mit OBP und einer MAC.⁹⁴ Die Prozesse sind vergleichbar mit einer fortgeschrittenen physiologischen Gefäßalterung.⁹⁴ Darüber hinaus weisen VSMC aus pluripotenten HGPS Stammzellen nukleäre Atypien und eine vorzeitige zelluläre Seneszenz auf.^{95,96} Diese sind mit einer erhöhten Vulnerabilität und Ausbildung eines pro-inflammatorischen SASP mit konsekutiver Induktion einer chronisch-sterilen Inflammation verbunden, also Prozessen, die dem „Inflammaging“ gleichen.^{94,96} In dem murinen Progeriemodell der Klotho-defizienten Maus korreliert die Anzahl seneszenten VSMC mit der OBP-Transformation und der MAC.⁹⁷ Die seneszenten Zellen exprimieren einen SASP mit erhöhter NF κ B Aktivität und erhöhter Produktion von Il-1 Zytokinen als Zeichen eines akzelerierten vaskulären „Inflammaging“.⁹⁴ Dass die Lebenserwartung in einem HGPS Mausmodell durch die Inhibition des Nlrp3 Inflammasoms verbessert werden kann, zeigt die Bedeutung der Mechanismen der Mustererkennung.⁹⁸ In LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen kann über die Ausschaltung des Nlrp3 Inflammasoms das Ausmaß der Atherosklerose gesenkt und in ApoE-defizienten Mäusen durch Inhibition der Caspase-1 die atherogene Plaquelast reduziert werden.^{92,99} Die Mechanismen der Mustererkennung im Prozess der chronisch-sterilen Inflammation stellen damit einen potenziellen Ansatz für die Therapie systemischer Gefäßerkrankungen, z.B. der urämisch vaskulären Progerie, dar.

1.5 Chronisch-urämisches „Inflammaging“ und urämische vaskuläre Progerie

Klinische Studien zeigen, dass eine klinisch relevante MAC bei 30-70% aller erwachsenen CKD Patienten vorhanden ist und das deren Ausmaß in den Koronararterien einen eigenständigen Prädiktor für das Auftreten von CVD darstellt.¹⁰⁰ Bereits jeder siebte urämische pädiatrische Patient, der in aller Regel neben der CKD keine weiteren Komorbiditäten aufweist, zeigt klinisch eine relevante MAC, was den Einfluss der chronischen Urämie untermauert.¹⁰¹

Obwohl alle oben postulierten Komponenten innerhalb der Pathogenese der MAC unter CKD nachgewiesen werden können, stellt insbesondere die chronisch-sterile urämische Inflammation einen übergreifenden Faktor dar. Dieser kann bei der Hälfte der Patienten mit fortgeschrittener CKD bereits serologisch nachgewiesen werden und korreliert mit der MAC

und einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität.^{102,103} In Arterien urämischer Patienten zeigt sich korrespondierend eine Phänotyp-Transformation der VSMC mit Ausbildung eines OBP und eines SASP.¹⁰⁴ Daher ist anzunehmen, dass unter urämischen Bedingungen die oben skizzierten Prozesse des chronischen „Inflammaging“ sowie der PRR Aktivierung akzeleriert ablaufen und im histopathologischen Korrelat der MAC münden.

Die Urämie stellt eine chronische und Toxin-induzierte systemische Dyshomöostase dar, bei der eine Vielzahl an Urämietoxinen akkumulieren, die von PRR als urämische DAMP/Alarminen erkannt werden können. Beispiele hierfür sind Serumamyloid A (Saa) oder „high-mobility group box 1“ (Hmgb1).^{72,105,106} Zum einen können urämische DAMP direkt über die Aktivierung der Mustererkennung im Sinne eines „circulus vitiosus“ die Expression weiterer pro-inflammatorischer Urämietoxine oder urämischer DAMP und Alarminen induzieren.¹⁰⁷ Zum anderen führt das toxische urämische Milieu zu einer signifikanten Beeinträchtigung der zellulären Funktion mit einer vermehrten Zelltoderate (Apoptose, Nekroptose, Pyroptose), die ihrerseits die Freisetzung von DAMP/Alarminen aus den geschädigten Zellen erhöht.¹⁰⁸

Die unter physiologischen Bedingungen restriktiv regulierte Mustererkennung ist unter der Urämie an mehreren Stellen geschädigt. Die Expression von Nlrp3, pro-Il-1 β und pro-Il-18 in mononukleären Zellen ist in der Urämie erhöht.⁷³ Die Phosphat-vermittelte MAC ist über die Aktivierung des Nlrp3 Inflammasoms gesteuert.⁷⁴ Urämisches Serum induziert in Endothelzellen in Abhängigkeit des CKD-Stadiums Tlr4-vermittelt eine Nlrp3 Inflammasom-abhängige endotheliale Dysfunktion.¹⁰⁹ Das Urämietoxin Indoxylsulfat induziert als Alarmin über mitochondriale ROS eine erhöhte Nlrp3 Inflammasom Aktivität, mit erhöhter Il-1 β Expression.¹¹⁰ Im murinen Urämiemodell ist die Caspase-1 ein wichtiger Regulator der Neointimabildung und VSMC Phänotyptransformation, die in urämischen Caspase-1-defizienten Mäusen signifikant geringer ausgeprägt ist.¹¹¹ Diese Befunde belegen die Bedeutung der Mustererkennung für das chronisch-urämische „Inflammaging“, wobei die zellulären und molekularen Mechanismen unter Urämie bislang unzureichend verstanden sind.¹⁵ Die Identifikation zentraler pathophysiologischer Signalwege ist daher notwendig, um gezielte Therapieansätze für die Behandlung der urämisch vaskulären Progerie entwickeln zu können. Die in der CANTOS Studie gezeigten positiven Effekte der Inhibition der Wirkung von Il-1 β auf die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität konnten insbesondere auch in der Subgruppe von Patienten in früheren CKD-Stadien mit einer GFR <60 ml/min pro 1,73 m² gesehen werden.¹¹² Voraussetzung hierfür ist, dass die initial erhöhte Plasmakonzentration des Crp unter Therapie auf Werte < 2 mg/dl abgesenkt werden konnte.¹¹² Dies unterstreicht den Einfluss der Il-1-Familie auf das urämische „Inflammaging“.

Aktuell kann auf eine Vielzahl unterschiedlicher experimenteller Modelle zurückgegriffen werden, um die zellulären und molekularen Mechanismen des „Inflammaging“ zu studieren

und hierdurch Schlüsselsignalwege zu identifizieren. Alle Modelle haben ihre Vor- und Nachteile.

1.6 Experimentelle Modelle zur Untersuchung der medialen arteriellen Kalzifizierung

Für die Untersuchung der MAC Signalwege kommen aktuell verschiedene Modelle zum Einsatz: (a) *in vitro* Zellkulturmodelle (v.a. primäre VSMC von Maus, Ratte, Mensch), (b) *ex vivo* Inkubations- und Perfusionsmodelle (v.a. Arterien von Ratte, Maus) und (c) *in vivo* Tiermodelle (Ratte, Maus).³⁰ Die experimentellen Modelle zur Induktion der Kalzifizierung unterscheiden sich zum Teil erheblich in der Wahl des Stimulationsmediums mit der Konzentration der verschiedenen Zusätze, in der Induktionszeit sowie den experimentellen Analysemethoden.^{30,113} Die Vor-/Nachteile der einzelnen experimentellen Methoden und deren Analysen sind in zwei Übersichtsarbeiten der Autorin zusammengefasst.^{30,113}

Alle experimentellen Modelle zeigen eine sehr hohe Sensitivität gegenüber einer Kalziumphosphatpräzipitation, die abhängig ist von der Ionenstärke von Kalzium und Phosphat und leicht von Stimulatoren oder Inhibitoren der Kalzifizierung beeinflusst werden kann.¹⁵ Supraphysiologische Kalzium- und/oder Phosphatkonzentrationen werden sowohl in *in vitro* Modellen als auch *ex vivo* und *in vivo* zur Induktion der Kalzifizierung verwendet, so dass diese in Hinblick auf die thermodynamischen Bedingungen im Versuchsansatz überprüft und angepasst werden sollten.^{15,30}

In vitro Modelle mit primären VSMC verschiedener Spezies stellen für die Durchführung, die Standardisierung und die Übertragung von Ergebnissen die vergleichsweise einfachsten Modelle dar. Ein grundsätzlicher Vorteil dieser Modelle ist die Betrachtung komplexer Mechanismen der zellulären Funktion bis auf das Einzelzell-Niveau, so dass hier pathophysiologische Signalwege studiert und potenzielle therapeutische Schlüsselziele identifiziert werden können. Ein gravierender Nachteil dieser *in vitro* Zellmodelle ist der fehlender Gewebeverbund und die damit fehlende Zell-Zell-Interaktion. In ex vivo Modellen werden präparierte Arterien in entsprechenden Medien inkubiert (isoliert-inkubierte Arterie (IIA)). Der Vorteil ist der erhaltene Gewebeverbund mit potenzieller Interaktion zwischen Endothelzellen und VSMC. Ein Nachteil ist, dass die Arterien nicht mit den Stimulationsmedien perfundiert und damit endoluminal stimuliert werden. Durch die fehlende Perfusion kommt es über die Versuchszeit zu einer Störung der endothelialen Funktion, die ihrerseits einen artifiziellen Einfluss auf den Versuchsansatz auslöst. Daher sind *ex vivo* Methoden notwendig, die die Vorteile dieses Versuchsansatzes im Sinne der 3R¹¹⁴ „reduce, refine, replace“ mit Erhaltung einer Perfusion unter sterilen Bedingungen und Schonung der endothelialen Funktion verbindet. Eine solche Methode für die Untersuchung der MAC existierte vor Beginn der experimentellen Tätigkeit für diese Habilitationsschrift nicht. In vivo Methoden stellen

weiterhin den Goldstandard für die Untersuchung des Einflusses der Urämie auf die vaskuläre Funktion dar. Die CKD Induktion kann zum einen durch die operative Entfernung von Nierengewebe (5/6 oder 7/8 Nephrektomie) oder durch die Fütterung einer nephrotoxischen Substanz, z.B. Adenin, erreicht werden.³⁰ Je nach Induktionsmethode der CKD unterscheiden sich die Modelle u.a. in der Lokalisation der Kalzifizierung (intimal vs. medial) sowie in deren Ausprägung (Mikro- vs. Makrokristalle).³⁰ Der *in vivo* Vorteil liegt in der Nachahmung des komplexen urämischen Milieus, das auch durch die (Fehl-)Funktion anderer Organsysteme während der Urämie gekennzeichnet ist, der Zell- und Organinteraktion, sowie lokaler und systemischer Effekte im Organismus. Ein Nachteil diese Modelle sind die aufwendigen Versuchsbedingungen und insbesondere das hohe Leid der Versuchstiere.³⁰

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Im Mittelpunkt dieser Habilitation steht die Charakterisierung zentraler Signalwege in VSMC innerhalb des urämischen „Inflammaging“ und der urämischen vaskulären Progerie mit Hilfe von *in vitro* und *ex vivo* Methoden, sowie experimenteller Tiermodelle. Das Ziel ist es, neue gezielte Therapieansätze zu erarbeiten und ihre Wirksamkeit in geeigneten Modellen überprüfen zu können.

Die in dieser Habilitationsschrift aufgeführten Publikationen können in 2 Abschnitte gegliedert werden. Die Arbeiten I und II des ersten Abschnitts umfassen die Etablierung neuer Methoden zur Bearbeitung zentraler Hypothesen in der MAC Pathogenese. Die Arbeiten III bis V im zweiten Abschnitt umfassen die Untersuchung zentraler Signalwege des urämischen „Inflammaging“ und der urämischen vaskulären Progerie.

Abschnitt 1 - Etablierung und Optimierung neuer Modelle zur Untersuchung zentraler pathophysiologischer Signalwege in der Genese der MAC:

- I. Einzelzell-basierter Nachweis von Seneszenz- und Kalzifizierungsmarkern (Arbeit I)
- II. Etablierung eines neuen *ex vivo* Perfusionsmodells von Nagetierarterien (Arbeit II)

Abschnitt 2 - Identifikation zentraler pathophysiologischer Signalwege in der MAC Pathogenese:

- III. Untersuchung des Einflusses von reaktivem Sauerstoffstress auf die Genese der MAC in einem *in vitro* Modell (Arbeit III)
- IV. Untersuchung des Einflusses von reaktivem Sauerstoffstress auf die Genese der MAC in einem *in vivo* Modell (Arbeit IV)
- V. Untersuchung der Bedeutung des Stressor-induzierten „Inflammaging“, ausgelöst über die Aktivierung des Nlrp3 Inflammasoms, auf die Genese der MAC (Arbeit V)

2. Ergebnisse (Eigene Arbeiten)

I. Einzelzell-basierter Nachweis von Seneszenz- und Kalzifizierungsmarkern

Originalarbeit: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32423114>

“A Novel Protocol for Detection of Senescence and Calcification Markers by Fluorescence Microscopy”

International Journal of Molecular Science, 2020, 21(10), DOI 10.3390/ijms21103475

Herrmann, J.* , Babic, M.* , Tölle, M., Eckardt, K.U., van der Giet, M., **Schuchardt, M.**



(*contributed equally)

Die Genese der MAC ist durch unterschiedliche zelluläre Prozesse und Signalwege gekennzeichnet. Das Verständnis der Interaktion zwischen diesen Signalwegen ist wichtig, um neue therapeutische Ansätze, beispielsweise für das urämische „Inflammaging“ und die urämische vaskuläre Progerie, zu finden. Für die Identifizierung dieser Signalwege und ihrer Interaktion sind verschiedene experimentelle Modelle etabliert worden. Zu diesen zählen neben humanen Studien, vor allem tierexperimentelle und zellbasierte Ansätze. Diese wurden kürzlich in zwei eigenen Review-Artikeln zusammengefasst.^{30,113} Nachteil vieler Methoden ist die fehlende Möglichkeit die bestehende interzelluläre Heterogenität im Expressionsmuster der Zelle aufzulösen, so dass neue methodische Ansätze notwendig sind, um Prozesse auf Einzel-Zell-Niveau zu untersuchen.

Das Ziel dieser Studie war es daher, eine neue „messenger“ Ribonukleinsäure (mRNA) *in situ* Detektionsmethode von Seneszenz- und Kalzifizierungsmarkern zu etablieren. Der experimentelle Ansatz beruht auf einem *in vitro* Modell mit VSMC der Ratte. Als Marker für die Seneszenz wurden im beschriebenen Modell SA- β -Gal, γ H2A.X und p21 genutzt. Als Kalzifizierungsmarker diente der Nachweis von Opn. Der auf Immunfluoreszenz-basierte Nachweis kann im Fluoreszenzmikroskop visualisiert und anschließend quantifiziert werden. Das Modell ist auf VSMC anderer Spezies (z.B. Mensch, Maus) und andere Marker für den Nachweis der Seneszenz und Kalzifizierung übertragbar. Weitere Kalzifizierungsmarker wie Bmp-2 konnten in der Arbeitsgruppe bereits erfolgreich etabliert und in den Studien angewendet werden.¹¹⁵ Im Vergleich zu mRNA Genexpressionsstudien aus Zellen, erlaubt dieses Protokoll einen Nachweis der Marker auf Einzelzellebene und kann so die interzellulären Unterschiede im Expressionsmuster der Zellen in Kultur auflösen.

*Technical Note*

A Novel Protocol for Detection of Senescence and Calcification Markers by Fluorescence Microscopy

Jaqueline Herrmann ^{1,2,†}, Milen Babic ^{1,†}, Markus Tölle ¹ , Kai-Uwe Eckardt ¹,
Markus van der Giet ^{1,*} and Mirjam Schuchardt ¹ 

¹ Department of Nephrology and Medical Intensive Care, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Hindenburgdamm 30, 12203 Berlin, Germany; Jaqueline.Herrmann@charite.de (J.H.); Milen.Babic@charite.de (M.B.); Markus.Toelle@charite.de (M.T.); Kai-Uwe.Eckardt@charite.de (K.-U.E.); Mirjam.Schuchardt@charite.de (M.S.)

² Department of Chemistry, Biochemistry and Pharmacy, Freie Universität Berlin, Königin-Luise Straße 2+4, 14195 Berlin, Germany

* Correspondence: Markus.vanderGiet@charite.de

† These authors contribute equally to this work.

Received: 14 April 2020; Accepted: 11 May 2020; Published: 14 May 2020



Abstract: Vascular calcification and stiffening of the arterial wall is a systemic phenomenon that is associated with aging and it can be increased by several risk factors. The underlying mechanisms, especially the pathways of cellular senescence, are under current investigation. Easily manageable *in vitro* settings help to study the signaling pathways. The experimental setting presented here is based on an *in vitro* model using rat vascular smooth muscle cells and the detection of senescence and osteoblastic markers via immunofluorescence and RNAscope™. Co-staining of the senescence marker p21, the osteoblastic marker osteopontin, detection of senescence-associated heterochromatin foci, and senescence-associated β -galactosidase is possible within one test approach requiring fewer cells. The protocol is a fast and reliable evaluation method for multiplexing of calcifying and senescence markers with fluorescence microscopy detection. The experimental setting enables analysis on single cell basis and allows detection of intra-individual variances of cultured cells.

Keywords: calcification; senescence; smooth muscle cell; SA- β -galactosidase; senescence-associated heterochromatin foci

1. Introduction

Aging is associated with a variety of characteristic changes of the vessel wall [1]. There are several disorders, in which patients show signs of premature aging of vessels that appear much older than their biological age e.g., in chronic kidney disease [2–4]. A hallmark of vascular aging is a stiffening of the arterial wall with increasing pulse-wave velocity and the mineralization of vascular smooth muscle cells (VSMC) in the media layer of the vessel wall [1,5]. Treatment options are currently not available [5].

Resulting from clinical and basic research, there is strong evidence that vascular calcification and aging occur jointly [4,6,7]. Several underlying mechanisms are discussed for vessel mineralization, including, but not limited to, oxidative stress from various sources and resulting DNA damage, continuous inflammation, and activation of pro-osteogenic signaling pathways [3,7,8]. However, the underlying pathophysiological mechanisms need further clarification. Currently, several hypotheses exist regarding joint or consecutive appearance of calcification and senescence in a vicious cycle in smooth muscle cells e.g., induced by uremic toxins [4,9]. In addition, the senescence level can vary within and between cells and the tissue of the same individual [10]. It has to be illuminated whether,

in one cell population, cells experience senescence and calcification jointly or consecutively, or whether aged vessels contain distinctly different cell populations of aged and calcified cells.

A better understanding of the underlying mechanisms inducing and linking calcification and senescence of VSMC in the vessel wall will be necessary for establishing promising treatment options.

Detecting cellular senescence is hampered by the heterogeneity of senescence markers. For the reliable identification of DNA damage and cell senescence, the detection of several known markers is necessary. Here, the increased messenger-ribonucleic acid (mRNA) and protein expression of the cell cycle protein and cyclin inhibitor p21 as well as the formation of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF) and the accumulation of senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) are typically used [10–12]. Additionally, the cells often undergo morphological changes that are detectable by light microscopy. Cell mineralization is accompanied by a shift in expression of a wide array of different markers e.g., osteopontin (OPN) [3,13].

The study aims to develop a fast, robust, and easy to handle protocol by detection of SA- β -Gal, SAHF, p21, OPN, and control of cell morphology, on single cell basis in vitro in order to facilitate jointly and/or consecutively activation of senescence and calcification markers within the cells in a parallel experimental setting. Therefore, the described method combines ultrasensitive RNAscope™ in situ hybridization and immunohistochemistry in a multiplex approach requiring few cells. Other currently available experimental settings with their advantages and disadvantages are summarized in the supplementary Table S1. Briefly, the in situ hybridization technique enables the detection of various nucleotide sequences in cells and tissue by radioactive, fluorescence, or immunohistochemistry labeling and it permits a multiplex approach in the right experimental setting [14]. The protocol presented here utilizes RNAscope™, a technology that applies oligonucleotide probes and immunohistochemical or fluorescence-based detection [15]. The utilized RNAscope™ kit allows for the analysis of three targets of interest in one experimental setting by fluorescence-based detection.

For the establishment and optimization of the protocol steps, the known inductor of cell senescence, doxorubicin (Dox) [16], as well as a known inducer of cell mineralization, the uremic toxin uridine-adenosine tetraphosphate (Up₄A) [17], were used. The established protocol provides reliable data while requiring fewer primary cell numbers and, therefore, fewer animals per experiment by multiplexing several markers of interest.

2. Results and Discussion

Currently, several senescence markers for cells and tissue are known [10,11]. Often, the detection of more than one marker is used for reliable detection and the senescence levels can vary between cells and tissue, respectively, within the same animal [10].

Here, we provided a staining protocol for four markers of interest to detect senescence and osteoblastic differentiation in cells. Besides, the protocol can be expanded for the detection of other markers by using a laser-scanning microscope for image acquisition. The detection via fluorescence staining allows not only the visualization in individual cells, but also quantification for statistical analysis of the results.

2.1. Detection of SA- β -Gal

SA- β -Gal was selected as marker accumulating in cells during aging, according to previous studies [6,10]. The staining of the cells with SPiDER-SA- β -Gal upon stimulation with Dox, as a known inductor of cell senescence [16], results in the accumulation of SA- β -Gal within the cytoplasm of the cell, as shown in Figure 1. In contrast, while Up₄A induces cell calcification [17], no accumulation of SA- β -Gal could be detected upon stimulation of VSMC for 72 h. For counterstaining of the nucleus, Hoechst stain was used. The quantification of the pixel sum intensity (Figure 2) confirmed the findings of the representative images that are shown in Figure 1.

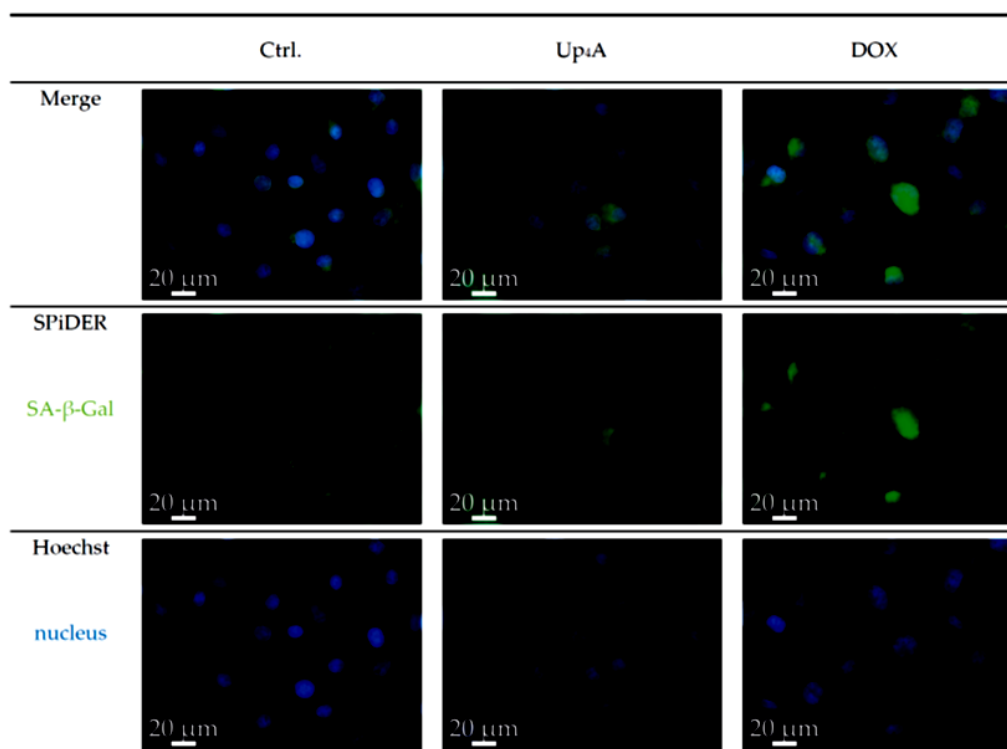


Figure 1. Detection of senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) in primary rat smooth muscle cells upon stimulation with doxorubicin (Dox, 500 nmol/L) and uridine-adenosine tetraphosphate (Up₄A, 100 μ mol/L) for 72 h. 40 \times objective. Representative images out of three independent experiments. Ctrl.: control.

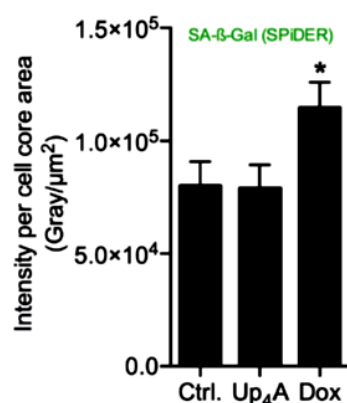


Figure 2. Quantification of senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) in primary rat smooth muscle cells upon stimulation with doxorubicin (Dox, 500 nmol/L) and uridine-adenosine tetraphosphate (Up₄A, 100 μ mol/L) for 72 h. For analysis, intensity pixel sum per channel was normalized to cell core area. Bar graph represents mean \pm SEM of three independent experiments. Ctrl.: control.

The results suggest that accumulation of SA- β -Gal in rat vascular smooth muscle cells (rVSMC) depends on the inductor and may be dependent on time for different inductors. This underlines the fact that the detection of more than one senescence marker often seems necessary [10].

2.2. OPN and p21 mRNA Detection and Detection of SAHF

OPN was selected as a calcification marker, because its gene expression was increased by stimulation with different calcification inducers in previous experiments [17]. The gene expression of the cyclin inhibitor p21 is one typical marker used for the detection of cellular senescence [6,10].

Several experimental protocols currently exist for the detection of calcification or senescence markers in vascular cells (summarized in Table S1). However, the current goal was to use a single cell-based identification of a senescence and osteoblastic marker while using RNA in situ hybridization via RNAscope™ technology. The significant advantage is the multiplexing possibility of several target genes of interest in a cell and tissue sample in a robust way with high sensitivity [15]. Dox strongly induced SAHF and mRNA expression of p21, but only slightly induced OPN mRNA expression upon 48 h of stimulation, as shown in Figure 3. In contrast, upon Up₄A stimulation, OPN mRNA expression is induced profoundly, but no SAHF could be detected and p21 mRNA expression is not induced in VSMC.

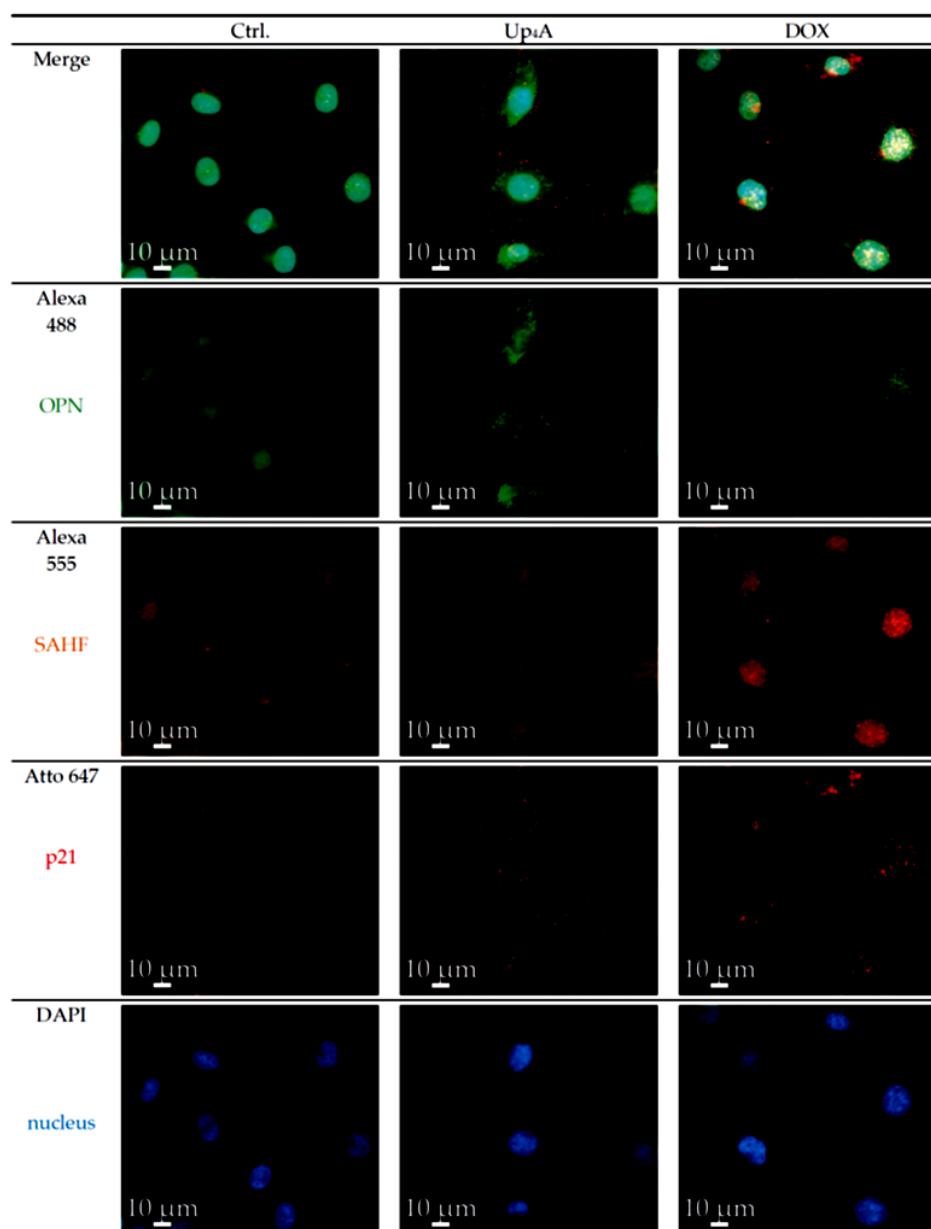


Figure 3. Detection of osteopontin (OPN), senescence-associated heterochromatin foci (SAHF), and p21 in primary rat smooth muscle cells upon stimulation with doxorubicin (Dox, 500 nmol/L) and uridine-adenosine tetraphosphate (Up₄A, 100 μmol/L) for 48 h. 40× objective. Representative images out of three independent experiments. Ctrl.: control.

The quantification of the pixel sum intensity confirmed the findings for channel Atto 647 (Figure 4). The crosstalk between the channels Alexa 488 and Alexa 555 and the resulting background impedes the quantification of OPN mRNA expression and SAHF formation with a standardized, automated, and reproducible ZEN protocol in this experimental setting. Several options exist to overcome this issue: next to the application of alternative software permitting manual identification of targets and subsequent quantification, which can be prone to researcher bias and, therefore, is not presented here, imaging with a confocal microscope could facilitate quantification by reducing cross talk and background.

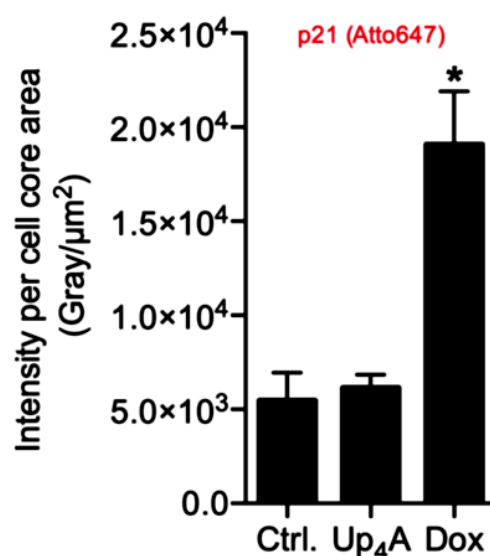


Figure 4. Quantification of p21 in primary rat smooth muscle cells upon stimulation with doxorubicin (Dox, 500 nmol/L) and uridine-adenosine tetraphosphate (Up₄A, 100 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h. For analysis, intensity pixel sum per channel was normalized to cell core area. Bar graph represents mean \pm SEM of three independent experiments. Ctrl.: control.

Stimulation with different inducers as Dox and Up₄A varies in the markers analyzed for calcification and senescence. This underlines that, often, the detection of more than one senescence and calcification marker seems to be necessary for reliable and comparable results. In addition, in our experimental setting, we observed a certain level of cell batch specific variances in the expression levels of markers that are comparable to alternative protocols, like Western Blot and polymerase chain reaction (PCR). However, representative images also illustrate differences in marker expression between individual cells, especially for the investigated calcification marker OPN. This information is critical in order to understand the mechanisms and pathways within one cell during the calcification process. This information is lost in protocols that jointly analyze cell bulks. The current protocol can allow for the analysis of co-localization analysis within one cell and differences between cells of the same cell batch.

2.3. Limitations

The experimental design that is presented here is established for an in vitro experiment. Nevertheless, a transfer from cells to tissue should be possible. The development of appropriate pre-treatment and imaging of tissue section will require further optimization steps. In the case of SA- β -Gal staining in tissue, we recommend using freshly frozen tissue and process the material immediately, as storage even at -80°C reduces enzyme activity. In a proof of concept experiment, we tested RNAscope™ staining in frozen and paraffin-embedded aortic sections (unpublished data). We found a similar background in both materials and better results in paraffin-embedded tissue, which we attribute to easier handling. Alternative targets might be of interest, according to the focus of research. Here, our protocol provides some opportunities for variation: alternative target genes can be analyzed with the RNA in situ hybridization technique. The utilized protocol allows up to three different target

genes. We used one of the available channels for immune-histological staining to make use of the optimal capacity of our microscope. If equipped with alternative hardware, combination with another secondary antibody for immune histological staining is possible, thus enriching the opportunities for multiplexing.

We are aware that there is a variety of alternative protocols. Alternative research models, such as primary cells from mouse or human, cell lines, as well as tissue sections from clinical or laboratory origin, are suitable alternatives. Next to that, a huge variety of different methods for the detection and quantification of our selected targets are possible. Each comes with its advantages and disadvantages that are shortly summarized in Table S1. In comparison to 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal/BCIG) staining, we found fluorescence staining of SA- β -Gal to be more robust, faster, and easier to image.

3. Materials and Methods

Figure 5 summarizes the complete and stepwise workflow of the experimental procedures. Primary VSMC from rat thoracic aorta was selected for experiments. Further special ordering information for kits with its components and antibodies can be found in the Supplementary Material (Tables S2 and S3).

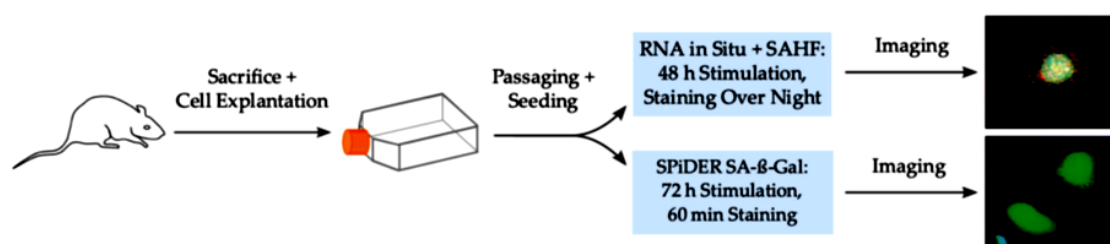


Figure 5. Scheme of the complete experimental workflow. SAHF: senescence-associated heterochromatin foci, SA- β -Gal: senescence-associated β -galactosidase.

3.1. Cell Isolation and Culturing

The study was in accordance with the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments and it was approved by the Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, Germany (T0211/02) and the animal facility of the Charité—Universitätsmedizin Berlin, Germany. The aorta of Wistar rats was prepared after euthanasia with sodium pentobarbital (400 mg/kg body weight) per intraperitoneal injection. After removal of the adventitia of rat thoracic aorta, primary rat VSMC were isolated by explant outgrowth, as described previously [17]. VSMC were cultured in Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM, Biochrom AG) containing 1 g/L glucose, supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Biochrom AG), penicillin (100 U/mL, Biochrom AG), and streptomycin (0.1 mg/mL, Biochrom AG). The cells were cultured in a humidified incubator at 37°C with 5% carbon dioxide. Cells at passages 4 were used for experiments. The cells were seeded in IBIDI 8 Well μ - Slides (ibidi GmbH) for SA- β -Gal staining and 8-well LabTec Chamber Slides (Thermo Scientific) for RNA in situ hybridization. Cells were cultured for 24 h to a confluence of 70–80%. It is essential to ensure subconfluence of cells prior stimulation, because confluence itself was described as an inducer of SA- β -Gal activity [18]. The cells were serum starved for 24 h prior stimulation in DMEM containing 4.5 g/L glucose, supplemented with 1% glutamin and antibiotics (penicillin 100 U/mL, streptomycin 0.1 mg/mL). This medium was also used for stimulation. For SA- β -Gal staining, the cells were stimulated for 72 h, whereas for mRNA and SAHF detection a stimulation time of 48 h was used.

3.2. Experimental Setting for Detection of SA- β -Galactosidase

Information regarding the kit components and ordering information are summarized in the Supplementary Material (Table S3).

3.2.1. Preparations

- Heat incubator to 37 °C (no humidity and carbon dioxide control).
- Warm 4% formalin and PBS to 37 °C.
- Prepare McIlvaine buffer: Mix 7.4 mL 0.1 mol/L citric acid solution and 12.6 mL 0.2 mol/L sodium phosphate solution and set pH to 6.0.
- Solve 20 µg SPiDER-SA-β-Gal (Gerbu Biotechnologie) in 35 µL dimethylsulfoxide (DMSO). Store aliquots at −20°C.
- Dilute McIlvaine buffer 1:5 in ultrapure water and warm dilution to 37 °C. Dilute SPiDER-SA-β-Gal 1:500 in McIlvaine buffer in order to obtain the working solution. Protect working solution from light.
- Prepare Hoechst working solution by dissolving Hoechst 33342 (Thermo Fisher) in the appropriate amount of water to obtain a stock concentration of 10 mg/mL. The stock concentration can be aliquoted and stored at −20°C. To obtain the working solution, dilute Hoechst 1:2000 in PBS. Protect working solution from light.

3.2.2. Staining Procedure

The step-by-step staining procedure according to the manufacturer's (Dojindo) recommendations is given below. Figure 6 summarizes the main steps with an incubation time less than 40 min for the whole procedure.

1. After stimulation, aspirate medium and wash cells once with PBS.
2. Add 300 µL of 4% buffered formalin to each well and fix cells for 3 min at room temperature, ensure the exact fixation time.
3. Aspirate formalin and wash three times with warm PBS.
4. Add 300 µL of working solution per well and incubate for 30 min in the incubator under light protection. Caution: Ensure the right fixation times and pH conditions—this is critical for the β-Gal staining.
5. Aspirate working solution and wash cells twice with PBS.
6. Counterstain with Hoechst working solution for 5 min under light protection.
7. Aspirate solution and wash once with PBS.
8. Add 300 µL of PBS and image within 24 h.

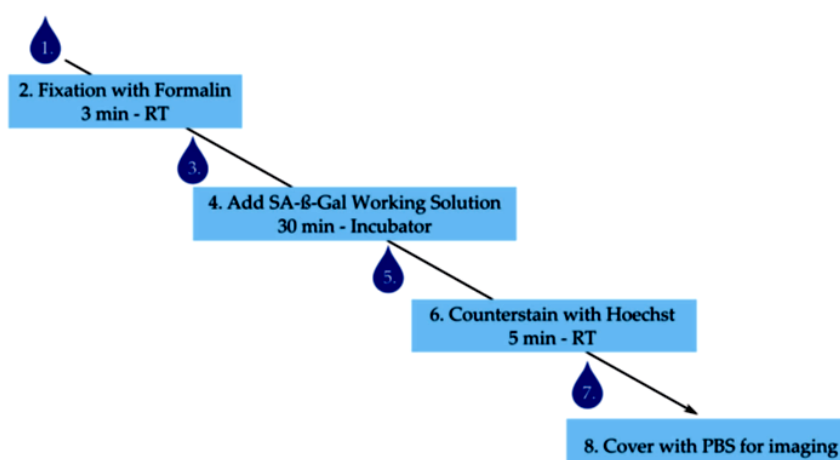


Figure 6. Staining procedure for senescence-associated-β-galactosidase (SA-β-Gal). Numbering represents steps in staining procedure. Drop corresponds to wash step. RT: room temperature.

3.3. Experimental Setting for Detection of OPN, p21 and SAHF

All kit components for staining with the ordering information are summarized in the Supplementary Material (Table S3).

3.3.1. Preparations

- Add purified water to the humidity control tray and heat oven to 40 °C.
- Thaw ProLong™ diamond antifade medium (Thermo Scientific) at room temperature.
- Prepare wash buffer (ACD Bio) according to manufacturer's instructions.
- Heat mRNA probes (ACD Bio) gently at 40 °C for 10 min in a water bath, centrifuge probes and mix according to manufacturer's instructions.
- Dilute Protease III (ACD Bio) 1:15 with PBS.
- Prepare washing dishes for PBS and wash buffer.
- Prepare 10% Roti™ImmunoBlock (Carl Roth) by diluting in PBS.
- Prepare 1:500 dilution of primary antibody anti-histone H2A.X (phosphoS139) antibody [EP854(2)Y] (abcam) in 1% Roti™ImmunoBlock/PBS.
- Prepare 1:1,000 dilution of secondary goat anti-Rabbit IgG (H+L) highly cross-adsorbed antibody, Alexa Fluor 555 (Invitrogen) in 1% Roti™ImmunoBlock/PBS.
- If applicable: Prepare Hoechst stain, as explained above.

3.3.2. Staining Procedure

The step-by-step staining procedure according to the manufactures' recommendations (ACD Bio) is given below. Figure 7 summarizes the main points with several incubation steps, including one overnight incubation time.

1. After stimulation aspirate medium and wash cells once with PBS.
2. Add 300 µL of 4% buffered formalin to each well and fix cells for 30 min at room temperature.
3. Aspirate formalin and wash twice with PBS.
4. Carefully detach the chamber from the slide according to the manufacturer's instruction and place the slide in a PBS filled washing dish. Caution: The glue is strong. Make sure to remove the glue of the chamber properly, otherwise the slide–coverslip combination becomes too thick.
5. Remove slide from the washing dish and thoroughly apply a barrier around each well with the ImmEdge™ hydrophobic barrier pen (ACD Bio) and place slide again in PBS.
6. Remove the slide from PBS, remove attaching PBS by gently inverting the slide and add 50 µL of diluted Protease III to each well. Place slide in the humidity control tray, close humidity control tray, and incubate in the oven for 15 min.
7. Remove slides from tray; remove protease from slide by inverting the slide and place slide in fresh PBS. Caution: The movement should be gently, but still removing the majority of liquid.
8. Remove slide from PBS, remove PBS by gently inverting the slide, and add 50 µL of diluted target probes or one drop of positive or negative control to the according wells, place slides in the humidity control tray, and incubate in the oven for 120 min.
9. Take slides out of the tray, inverse, and wash twice for 2 min each in wash buffer.
10. Remove attached liquid by gentle inversion and add one drop of amplifier 1-fluid (Amp 1-FL) to each well. Put slides in the humidity control tray in the oven for 30 min.
11. Take slides out of the tray, inverse, and wash twice for 2 min each in wash buffer.
12. Remove attached liquid by gentle inversion and add 1 drop of Amp 2-FL to each well, place in the humidity control tray in the oven for 15 min.
13. After 15 min take slides out of the tray, inverse and wash twice for 2 min each in wash buffer.

14. Remove attached liquid by gentle inversion and add 1 drop of Amp 3-FL to each well, place in the humidity control tray in the oven for 30 min.
15. Take slides out of the tray, inverse and wash twice for 2 min each in wash buffer.
16. Remove attached liquid by gentle inversion and add 1 drop of the selected Amp 4-FL to each well, place in the humidity control tray in the oven for 15 min. Caution: For the multiplexing protocol we used Amp 4-FL A.
17. Take slides out of the tray, inverse and wash twice for 2 min each in wash buffer.
18. Add 100 μ L of 10% RotiTMImmunoBlock/PBS to each well and block for 1 h in the closed humidity control tray at room temperature.
19. Remove attached liquid by gentle inversion and wash once with PBS.
20. Add 50 μ L 1:500 dilution of primary anti-histone H2A.X (phosphoS139) antibody [EP854(2)Y] (Abcam) in 1% RotiTMImmunoBlock/PBS per well and incubate in the closed humidity control tray in the fridge overnight.
21. Remove attached liquid by gentle inversion and wash twice with PBS.
22. Add 50 μ L 1:1,000 dilution of secondary goat anti-rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed antibody, Alexa Fluor 555 (Invitrogen) in 1% RotiTMImmunoBlock/PBS per well and incubate in the closed humidity control tray at room temperature for 60 min.
23. Remove attached liquid by gentle inversion and wash twice with PBS.
24. Add 1 drop of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) per well and incubate for 1 min at room temperature (alternatively add 50 μ L 1:2,000 Hoechst working solution and incubate for 5 min at room temperature).
25. Remove attached liquid by gentle inversion and wash once with PBS.
26. Add two drops of ProLongTM diamond antifade medium (Thermo Scientific) to each slide and gently apply the lid, make sure to gently remove all bubbles, and harden overnight in the fridge. Caution: The medium is highly viscose and can easily dry out. The cover slid is still moveable, even after drying. Be careful when cleaning the slide for imaging. Sealing the slide-lid combination with nail varnish can help in preventing the drying out and preserving the slides for later imaging.

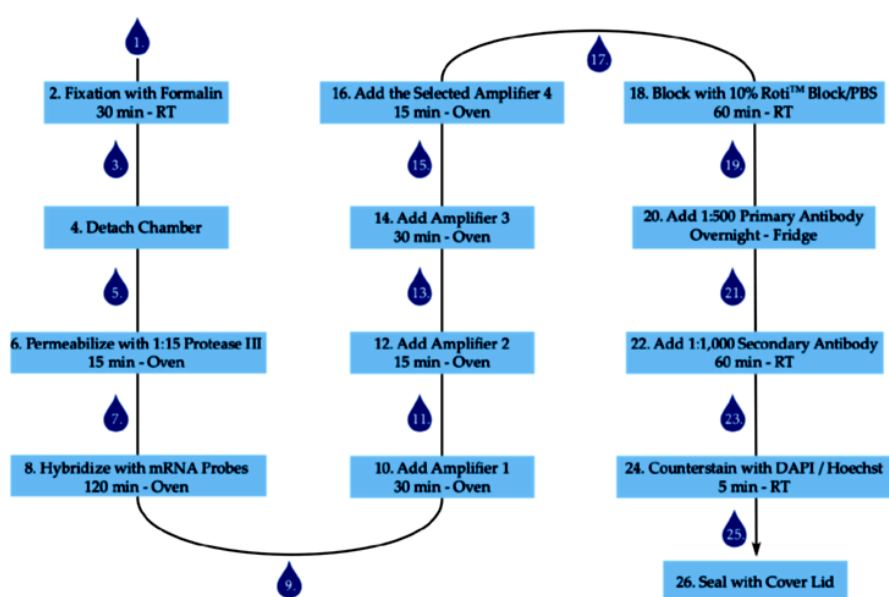


Figure 7. Staining procedure for RNAscopeTM and senescence-associated heterochromatin foci. Numbering represents steps in staining procedure. Drop corresponds with washing step. RT: room temperature.

3.4. Imaging

For imaging any fluorescence microscope with appropriate filter setting or a confocal microscope is possible. We obtained the images while using a Zeiss Axiovert 200M inverted transmitted light microscope using the filter sets, as illustrated in Table 1. For image acquisition, the 40× F-Fluar objective with Immersol™ oil and the Zen software (Zeiss, Zen2 blue edition) was used. Each experiment was done in three independent experiments with duplicates for each stimulation drug. An acquisition of five images per well was done for analysis.

Table 1. Excitation/Emission Wavelength of the Dyes and Filters Used.

Dye	SPiDER SA-β-Gal	Hoechst 33342	Alexa 488	Alexa 555	Atto 647	DAPI
Beam Splitter	532	395	495	570	660	395
Filter Ex. Wavelength	500–530	335–383	450–490	538–562	625–665	335–383
Filter Em. Wavelength	545–605	420–470	500–550	570–640	665–715	420–470
Ex. Wavelength of Dye	528	348	493	553	644	348
Em. Wavelength of Dye	547	455	517	568	670	455

3.5. Quantification of Fluorescence Intensity

The fluorescence intensity per channel was quantified while using the Zen2 software (Zeiss, blue edition). Five images per well/stimulation were analyzed for three independent experiments.

3.6. Statistical Analysis

Mean ± SEM is given in the bar graph. Statistical significance between stimulation and respective control was analyzed using the Mann-Whitney-U Test. A *p* value < 0.05 was set as statistically significant.

4. Conclusions

In conclusion, the new experimental sets that are presented here allow for multiplexing and quantification of several markers of interest for calcification and senescence analysis in primary VSMC. This might not only help to reduce animal numbers for primary cell isolation and in vivo settings with regard to the 3R (Replacement, Reduction, and Refinement) thought of Russel and Burch [19], but also allow the visualization of markers of interest on a single cell basis.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/10/3475/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, M.S., J.H. and M.B.; methodology, J.H., M.S., M.B., and M.T.; experimental design and analysis, J.H., M.B. and M.S.; writing—original draft preparation, M.S., J.H. and M.B.; writing—review and editing, M.S., M.T., K.-U.E. and M.v.d.G.; visualization, J.H. and M.S.; project administration, M.S., K.-U.E. and M.v.d.G.; funding acquisition, M.S. and M.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The Sonnenfeld Stiftung (M.T., M.S.) the Berlin Institute of Health (M.S.) funded the research.

Acknowledgments: We thank Brigitte Egbers and Katharina Kuschfeldt for excellent technical assistance. We thank Manuel Herrmann-Fiechtner for support in figure creation.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Abbreviations

Amp-FL	Amplifier fluid
Ctrl	Control
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DMEM	Dulbeccos-modified Eagle medium
Dox	Doxorubicin
FCS	Fetal calf serum
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
OPN	Osteopontin
PCR	Polymerase chain reaction
PBS	Phosphate-buffered saline
RT	Room temperature
rVSMC	Rat vascular smooth muscle cell
SA- β -Gal	Senescence-associated β -galactosidase
SAHF	Senescence-associated heterochromatin foci
SEM	Standard error of mean
Up ₄ A	Uridine adenosine tetraphosphate
VSMC	Vascular smooth muscle cell
X-Gal (BCIG)	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

References

1. Jaminon, A.; Reesink, K.; Kroon, A.; Schurgers, L. The Role of Vascular Smooth Muscle Cells in Arterial Remodeling: Focus on Calcification-Related Processes. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Nilsson, P.M.; Lurbe, E.; Laurent, S. The early life origins of vascular ageing and cardiovascular risk: The EVA syndrome. *J. Hypertens* **2008**, *26*, 1049–1057. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Voelkl, J.; Lang, F.; Eckardt, K.-U.; Amann, K.; Kuro-O, M.; Pasch, A.; Pieske, B.; Alesutan, I. Signaling pathways involved in vascular smooth muscle cell calcification during hyperphosphatemia. *Cell Mol. Life Sci.* **2019**, *76*, 2077–2091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Henaut, L.; Mary, A.; Chillon, J.M.; Kamel, S.; Massy, Z.A. The Impact of Uremic Toxins on Vascular Smooth Muscle Cell Function. *Toxins* **2018**, *10*, 218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Tolle, M.; Reshetnik, A.; Schuchardt, M.; Hohne, M.; van der Giet, M. Arteriosclerosis and vascular calcification: Causes, clinical assessment and therapy. *Eur. J. Clin. Investig.* **2015**, *45*, 976–985. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Sanchis, P.; Ho, C.Y.; Liu, Y.; Beltran, L.E.; Ahmad, S.; Jacob, A.P.; Furmanik, M.; Laycock, J.; Long, D.A.; Shroff, R.; et al. Arterial “inflammaging” drives vascular calcification in children on dialysis. *Kidney Int.* **2019**, *95*, 958–972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Herrmann, J.; Babic, M.; Tolle, M.; van der Giet, M.; Schuchardt, M. Research Models for Studying Vascular Calcification. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Burton, D.G.; Matsubara, H.; Ikeda, K. Pathophysiology of vascular calcification: Pivotal role of cellular senescence in vascular smooth muscle cells. *Exp. Gerontol.* **2010**, *45*, 819–824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Muteliefu, G.; Shimizu, H.; Enomoto, A.; Nishijima, F.; Takahashi, M.; Niwa, T. Indoxyl sulfate promotes vascular smooth muscle cell senescence with upregulation of p53, p21, and prelamin A through oxidative stress. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2012**, *303*, C126–C134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Tuttle, C.S.L.; Waaijer, M.E.C.; Slee-Valentijn, M.S.; Stijnen, T.; Westendorp, R.; Maier, A.B. Cellular senescence and chronological age in various human tissues: A systematic review and meta-analysis. *Aging. Cell* **2020**, *19*, e13083. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Carnero, A. Markers of cellular senescence. *Methods Mol. Biol. (Clifton, N.J.)* **2013**, *965*, 63–81.

12. Noren Hooten, N.; Evans, M.K. Techniques to Induce and Quantify Cellular Senescence. *J. Vis. Exp.* **2017**, *123*, 55533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Giachelli, C.M. Ectopic calcification: Gathering hard facts about soft tissue mineralization. *Am. J. Pathol.* **1999**, *154*, 671–675. [[CrossRef](#)]
14. Jensen, E. Technical review: In situ hybridization. *Anat. Rec. (Hoboken)* **2014**, *297*, 1349–1353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Wang, F.; Flanagan, J.; Su, N.; Wang, L.C.; Bui, S.; Nielson, A.; Wu, X.; Vo, H.T.; Ma, X.J.; Luo, Y. RNAscope: A novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Mol. Diagn.* **2012**, *14*, 22–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Cappetta, D.; De Angelis, A.; Sapio, L.; Prezioso, L.; Illiano, M.; Quaini, F.; Rossi, F.; Berrino, L.; Naviglio, S.; Urbanek, K. Oxidative Stress and Cellular Response to Doxorubicin: A Common Factor in the Complex Milieu of Anthracycline Cardiotoxicity. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2017**, *2017*, 1521020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Schuchardt, M.; Tolle, M.; Prufer, J.; Prufer, N.; Huang, T.; Jankowski, V.; Jankowski, J.; Zidek, W.; van der Giet, M. Uridine adenosine tetraphosphate activation of the purinergic receptor P2Y enhances in vitro vascular calcification. *Kidney Int.* **2012**, *81*, 256–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Yang, N.-C.; Hu, M.-L. The limitations and validities of senescence associated- β -galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Exp. Gerontol.* **2005**, *40*, 813–819. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Russell, W.M.S.; Burch, R.L. *The Principles of Humane Experimental Technique*; Methuen & Co Ltd.: London, UK, 1959.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

II. Etablierung eines neuen *ex vivo* Perfusionsmodells von Nagetierarterien

Originalarbeit: <https://doi.org/10.1159/000503785>

“A Novel Long-Term *ex vivo* Model for Studying Vascular Calcification Pathogenesis: The Rat Isolated-Perfused Aorta”

Journal of Vascular Research, 2020, 57(1), 46-52; DOI 10.1159/000503785

Schuchardt, M., Siegel, N.V., Babic, M., Reshetnik, A., Lützenberg, R., Zidek, W., van der Giet, M., Tölle, M.

Neben *in vitro* Modellen werden *ex vivo* Modelle, meist mit aortalen Gefäßabschnitten, in Kalzifizierungsstudien verwendet.³⁰ Diese basieren bislang auf einer Inkubation arterieller Gefäßringe im Stimulationsmedium für einige Tagen bis mehrere Wochen. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die arteriellen Gefäßringe nicht wie unter physiologischen Bedingungen endoluminal stimuliert werden, sondern eine Stimulation von allen Seiten auf das Gewebe erfolgt. Ein weiterer Nachteil ist die fehlende Perfusion und damit des physiologischen „shear stress“, der die tangentielle Kraft des fließenden Blutes beschreibt. Dieser ist für die physiologische Funktion v.a. des Endothels und des gesamten arteriellen Gefäßes essenziell. Um diese Nachteile zu überwinden, wurde ein neues Perfusionsmodell für Arterien entwickelt, mit dessen Hilfe eine Perfusion und damit eine endoluminale Stimulation arterieller Gefäße mit einem Perfusionsmedium unter sterilen Bedingungen für einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen ermöglicht wird. In der aufgeführten Arbeit wurden die Induktion einer MAC durch ein Hochphosphat-Medium (HPM) zwischen dieser neu entwickelten *ex vivo* Perfusionsmethode und der bereits etablierten *ex vivo* Inkubationsmethode verglichen.

Die Perfusion der Aorta mit einem HPM induziert die Kalzifizierung der Gefäßwand, die histologisch mittels Alizarin Red und von Kossa Färbung in der *tunica media* nachgewiesen werden konnte. Der Kalziumgehalt der mit HPM perfundierten Aorten lag im Vergleich zu den mit Kontrollmedium perfundierten Aorten signifikant höher. Korrespondierend zeigte sich in den perfundierten Aorten ein geringerer Kalziumgehalt im Vergleich zu den inkubierten Aorten, was wiederum als Zeichen einer MAC Induktion unter Verminderung des artifiziellen Effektes der Inkubationsmethode gewertet werden kann. Die Induktion der mRNA Expression des osteoblastären Markers Bmp-2 war für beide Methoden vergleichbar. Die mRNA Expression von Sm22 α hingegen ist unter Stimulation mit HPM nur im Perfusionsmodell signifikant niedriger. Das neu etablierte Modell erlaubt auch die Untersuchung anderer Spezies sowie anderer Gefäßbette. Für die Mousaorta konnte diese Methode bereits erfolgreich etabliert werden¹¹⁶ und kann somit für pharmakologische Untersuchungen unter der Umsetzung der 3R Prinzipien von Russel und Burch¹¹⁴ eingesetzt werden.

III. Untersuchung des Einflusses von reaktivem Sauerstoffstress auf die Genese der MAC in einem *in vitro* Modell

Originalarbeit: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25029363>

“Harmful effects of the azathioprine metabolite 6-mercaptopurine in vascular cells: induction of mineralization”

PLoSOne, 2014, e101709, 9(7), DOI 10.1371/journal.pone.0101709

Prüfer, J.*, **Schuchardt, M.***, Tölle, M., Prüfer, N., Höhne, M., Zidek, W., van der Giet, M.
(*contributed equally)

In diesem Teil der Habilitationsschrift sollten zentrale pathophysiologische Signalwege in der Genese der MAC untersucht werden. Ein zentrales intrazelluläres Signalsystem stellen ROS dar, die entweder zytosolisch oder mitochondrial entstehen können. Ein bekannter ROS Induktor ist Azathioprin.

Das Ziel dieser Studie war es, den Einfluss des aktiven Metaboliten des Purinanalogs Azathioprin, 6-Mercaptopurin, auf die Mineralisierung von glatten Gefäßmuskelzellen in einem *in vitro* und *ex vivo* Modell zu untersuchen. 6-Mercaptopurin wird über die Xanthinoxidase metabolisiert, wobei ROS entstehen.

6-Mercaptopurin induziert eine OBP-Transformation der VSMC, die anhand der mRNA Expressionssteigerung der osteoblastären Marker Cbfa1, Ocn, Alp, sowie einer erhöhten Alp Enzymaktivität nachgewiesen wurde. 6-Mercaptopurin stimuliert außerdem *in vitro* und *ex vivo* die Mineralisierung der VSMC.

Die OBP-Transformation der VSMC ist abhängig von einem ROS-vermittelten Signalweg. Sowohl die Hemmung der Xanthinoxidase mittels Allopurinol, als auch die Bindung von Superoxidradikalen mittels Tiron, inhibiert die 6-Mercaptopurin induzierte Radikalproduktion sowie die Alp Aktivierung.

Diese *in vitro* Daten zeigen den Effekt von 6-Mercaptopurin auf die ROS Produktion und die damit verbundene Induktion der Kalzifizierung der VSMC und Aorten.

Ob sich dieser Effekt auch in einem *in vivo* Tiermodell bestätigt, lies diese Arbeit offen.

Harmful Effects of the Azathioprine Metabolite 6-Mercaptopurine in Vascular Cells: Induction of Mineralization

Jasmin Prüfer^{1,2}*, Mirjam Schuchardt¹*, Markus Tölle¹, Nicole Prüfer^{1,3}, Matthias Höhne⁴, Walter Zidek¹, Markus van der Giet^{1*}

1 Charité – Universitätsmedizin Berlin; Charité Centrum 13, Department of Nephrology Campus Benjamin Franklin, Berlin, Germany, **2** Freie Universität Berlin, Fachbereich Biochemie, Chemie, Berlin, Germany, **3** Universität Potsdam, Department of Nutrition Science, Potsdam, Germany, **4** Novartis Germany GmbH, Nuernberg, Germany

Abstract

Vascular mineralization contributes to the high cardiovascular morbidity and mortality in patients who suffer from chronic kidney disease and in individuals who have undergone solid organ transplantation. The immunosuppressive regimen used to treat these patients appears to have an impact on vascular alterations. The effect of 6-mercaptopurine (6-MP) on vascular calcification has not yet been determined. This study investigates the effect of 6-MP on vascular mineralization by the induction of trans-differentiation of rat vascular smooth muscle cells *in vitro*. 6-MP not only induces the expression of osteochondrocyte-like transcription factors and proteins but also activates alkaline phosphatase enzyme activity and produces calcium deposition in *in vitro* and *ex vivo* models. These processes are dependent on 6-MP-induced production of reactive oxygen species, intracellular activation of mitogen-activated kinases and phosphorylation of the transcription factor Cbfa1. Furthermore, the metabolic products of 6-MP, 6-thioguanine nucleotides and 6-methyl-thio-inosine monophosphate have major impacts on cellular calcification. These data provide evidence for a possible harmful effect of the immunosuppressive drug 6-MP in vascular diseases, such as arteriosclerosis.

Citation: Prüfer J, Schuchardt M, Tölle M, Prüfer N, Höhne M, et al. (2014) Harmful Effects of the Azathioprine Metabolite 6-Mercaptopurine in Vascular Cells: Induction of Mineralization. PLoS ONE 9(7): e101709. doi:10.1371/journal.pone.0101709

Editor: Yin Tintut, University of California, Los Angeles, United States of America

Received: December 6, 2013; **Accepted:** June 10, 2014; **Published:** July 16, 2014

Copyright: © 2014 Prüfer et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from Else Kröner-Fresenius-Stiftung [M.vdG], Sonnenfeld Stiftung [J.P, M.S, M.T] and Peter and Traudl Engelhorn Stiftung [M.S]. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: M Höhne is a staff member of Novartis Pharma AG in Germany. M van der Giet and M Tölle have received research support from Novartis. M van der Giet acts as consultant for Novartis, Roche and RoxMedical. The other authors have no conflicts to report. This does not alter their adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* Email: Markus.vanderGiet@charite.de

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Pathological vascular changes and the subsequent high incidence rates of non-fatal and fatal cardiovascular events are major complications in patient cohorts with chronic renal failure and in patients who have undergone successful kidney transplantation [1,2]. The intima and media of the vessel wall may be involved in mineralization, and changes at both sites can coexist. Cardiovascular morbidity and mortality can increase due to hemodynamic differences in the stiffened vessel [2]. Risk factors that promote arteriosclerosis are similar to those known to cause atherosclerosis and include high arterial blood pressure, diabetes mellitus, advanced age and chronic kidney disease (CKD) [3–6]. Furthermore, there are several indications that oxidative stress enhances the progression of vascular mineralization and arteriosclerosis [7,8].

At present, arteriosclerosis is validated as an active cell-regulated process. One hypothesis for this process postulates that a phenotypic transformation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) occurs. VSMCs are transformed into an osteochondrogenic cell (OCC) phenotype. The cells then express OCC-specific proteins, such as core-binding factor alpha 1 (Cbfa1) or alkaline

phosphatase (ALP) [9]. The OCCs then begin to release calcium and phosphate, forming extracellular hydroxyapatite crystals. This process is commonly referred to as calcification [6].

After successful renal transplantation, cardiovascular mortality is lower compared to patients with end-stage renal disease, but mortality is still increased compared to an age-matched population with normal kidney function [1,10]. recent longitudinal study elucidated that vascular calcification in kidney transplant patients is substantial within four years [11]. There is a growing body of direct and circumstantial evidence that immunosuppressive therapy might influence the progression of vascular alterations by affecting signaling pathways in multiple cell types [1]. Some reports describe the influence of immunosuppressive drugs on the overall cardiovascular outcome [1,12,13], but only limited knowledge is available concerning the influence of immunosuppressive drugs on arteriosclerosis progression.

Among the commonly used immunosuppressive drugs investigated, 6-mercaptopurine (6-MP) has the most prominent effect on *in vitro* calcification. Here, we report that 6-MP induces mineralization of VSMCs in *in vitro* and *ex vivo* models. 6-MP stimulation leads increased calcium deposition resulting from its

capacity to induce trans-differentiation of VSMCs into cells expressing typical OCC markers. The induction of oxidative stress by 6-MP and its metabolites is a major contributor to the calcifying phenotype of VSMCs. The data reveal a possible harmful effect of 6-MP treatment that may enhance the progression of arteriosclerosis.

Methods

Please see Methods S1 for a detailed description of the methods and protocols.

Animals and cell culture

All animal experiments were conducted under the guidelines of the Protection of Animals. The protocol was approved by the Berlin Ethics Committee of Animal Experiments, The Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin, Germany (permit number O0212/02). Preparation of the aorta from Wistar rats was accomplished under sodium pentobarbital anesthesia (400 mg/kg body weight, intraperitoneal injection). All efforts were made to minimize animal suffering. The adventitia of the rat aorta was removed before further procedures were performed. The outgrowth technique was used for VSMC isolation from the rat aorta [14]. The aorta was cut into rings for *ex vivo* assays.

Human VSMCs were purchased from PromoCell, where organ preparation conformed to the Declaration of Helsinki. Cells in passages 3 to 8 were used for experiments.

Induction of *in vitro* and *ex vivo* calcification

In vitro calcification of rat VSMCs and *ex vivo* calcification of rat aortic rings were induced as described previously [15,16]. The initial day of culture in CM (10 mmol/L β -glycerophosphate, 284 μ mol/L ascorbic acid and 10 mmol/L sodium pyruvate) was defined as day 0. The medium was replaced every 3 days.

Cell stimulation

Aortic rings and VSMCs were stimulated for short-term (24–48 hours) or long-term (up to 21 days) experiments. In short-term experiments using antagonists, cells were pre-treated for 30 min with each antagonist.

Detection of mineralization

Alizarin Red staining was used to detect the mineralization status of the aortic rings and VSMCs, and quantification of the calcium content was determined either using the *o*-cresolphthalein method or by measuring the ALP activity.

mRNA expression

After stimulation, cells were harvested for RNA isolation, reverse transcription was performed, and mRNA expression was determined via quantitative real-time PCR. mRNA expression values were normalized to those of the house keeping gene β -actin.

Western blot

Protein lysates of VSMCs were separated into cytosolic and nuclear fractions. The nuclear protein fraction was separated by electrophoresis on a polyacrylamide gel, transferred to a polyvinylidene difluoride membrane, and incubated with specific antibodies, including anti-Cbfa1, anti-Cbfa1-phospho-Ser¹⁶⁵ and anti-TATA-binding protein. For protein quantification, band intensities of 3 blots from independent experiments were analyzed using Bio1D-software (Wilber Lourmat).

Statistical analysis

Results are presented as means \pm SEM, and statistical significance was determined by a Mann-Whitney test, unless otherwise indicated. A P value <0.05 was considered statistically significant.

Results

6-MP enhances mineralization *in vitro* and *ex vivo*

Previous studies have reported that medium containing β -glycerophosphate (CM) can induce calcium deposition in VSMCs [15]. This effect can be further increased by co-treatment with dexamethasone (DEX) [9]. We tested other immunosuppressive agents to determine if they could enhance calcium deposition. Cyclosporin A, tacrolimus, and rapamycin did not increase CM-induced calcium deposition after 21 days, whereas co-stimulation with 6-MP and DEX led to a dramatic increase in calcium content (Figure S1). Due to the prominent effect of 6-MP, we further investigated its effect on VSMC mineralization in *in vitro* and *ex vivo* models. 6-MP treatment for 21 days stimulated calcium foci formation, which was visualized via Alizarin Red staining (Figure 1A). Because 6-MP is known to have an anti-proliferative effect on VSMCs [17], and the reduced cell numbers observed with 6-MP treatment (Figure 1A), we measured cell viability/proliferation. Long-term treatment with 6-MP for 7 to 21 days reduced cell number relative to the controls in a dose-dependent manner (Figure 1B). A bar graph with absorbance units for the viability/proliferation assay is included as Figure S2. The calcium content was quantified after decalcification of the cell layer. In this analysis, the calcium content significantly increased upon 6-MP treatment in control media and CM-cultured cells (Figure 1C). In addition, ALP enzyme activity was significantly enhanced by 6-MP compared to cells cultured in either control medium or CM (Figure 1D). Interestingly, the increase in ALP enzyme activity was higher upon 6-MP treatment in control media-stimulated cells than in cells co-stimulated with CM. Therefore, ALP enzyme activity was also measured after 7 days of treatment (Figure S3). Here, 6-MP with or without CM co-treatment induced enzyme activity similarly. To minimize species-specific effects, we also tested the hypothesis on VSMCs from human donors. In human VSMCs, ALP enzyme activity increased upon 6-MP treatment (Figure S4). To test whether these effects could also be verified in an *ex vivo* model, we incubated aortic rings from rats in either control medium or CM in the presence or absence of 6-MP (Figure 1E, F). Histological staining of aortic slices with Alizarin Red revealed mineral deposition in the vessel media (Figure 1E). 6-MP significantly increased the calcium content of the aortic rings (Figure 1F).

6-MP promotes expression of osteogenic proteins

Mineralization of VSMCs is characterized by the expression of osteogenic proteins [9,15]. We measured the expression of specific genes after stimulation of VSMCs with 6-MP. 6-MP increased the expression of the transcription factor *cbfa1* in a dose-dependent manner (Figure 2A). Furthermore, downstream gene products of this transcription factor, such as ALP and osteocalcin (OCN), were also induced by 6-MP (Figure 2B,C). Previous studies have noted that *cbfa1* is not only an initial transcription factor in osteoblast differentiation but is also necessary for trans-differentiation of VSMCs into calcifying cells [18]. Therefore, protein expression in VSMCs was also investigated. Cbfa1 activity and DNA binding depend on phosphorylation. Therefore, we measured Cbfa1 in the nuclear protein fraction upon 6-MP treatment of VSMCs. 6-MP increased Cbfa1 and Cbfa1-phospho contents in the nucleus in a dose-dependent manner. TATA-binding protein was used as a

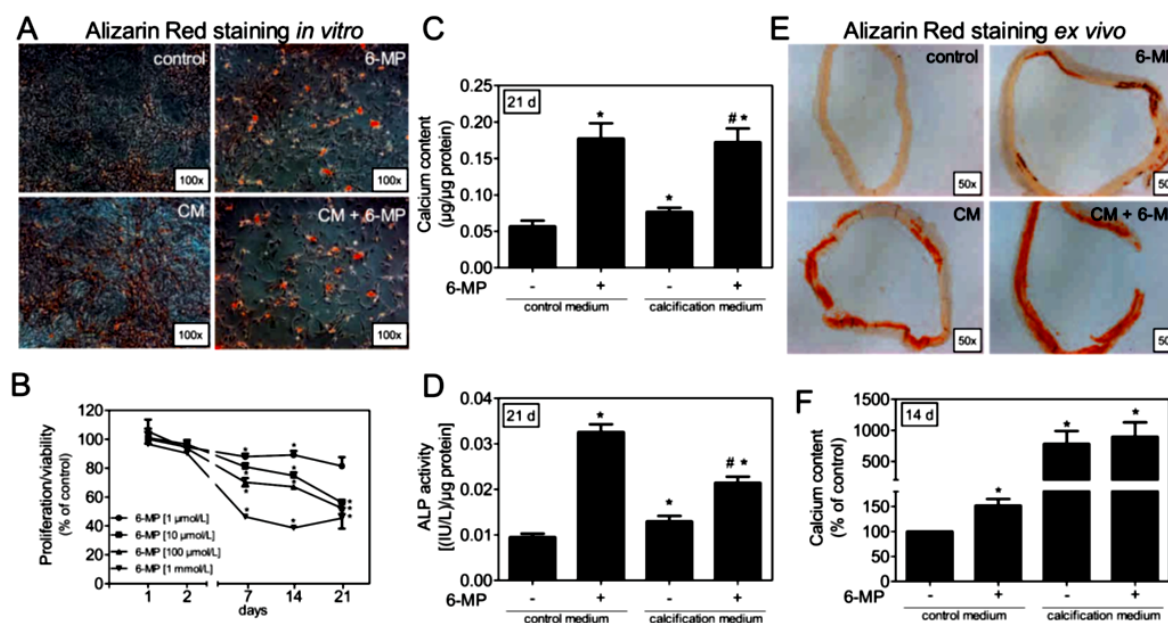


Figure 1. 6-MP-induced calcification *in vitro* and *ex vivo*. (A–D) VSMCs were cultured in control medium or CM ± 6-MP (100 μmol/L) for 21 days. (A) Mineral deposits were visualized via Alizarin red staining. One representative experiment is shown (n = 5). (B) VSMCs were treated with 6-MP (1 μmol/L–1 mmol/L) for up to 21 days and viability/proliferation was measured. (C) Calcium content (n > 6) or (D) ALP enzyme activity (n > 6) was quantified and normalized to protein content. (E, F) Rat aortic rings were incubated in control medium or CM ± 6-MP (100 μmol/L) for 14 days. (E) One aortic ring treated with each type of stimulation was used for histochemical analysis. Slices were stained with Alizarin Red to visualize calcium deposition. (F) Calcium content was quantified and normalized to the dry weight of aortic rings (n > 6). Data represent means ± SEM, *p < 0.05 vs. control. #p < 0.05 vs. CM. ALP: alkaline phosphatase, CM: calcifying medium, 6-MP: 6-mercaptopurine. doi:10.1371/journal.pone.0101709.g001

loading control (Figure 2D). The bar graph in Figure 2D shows the quantification of band intensity from 3 independent Western blots of Cbfa1-phospho. Previous studies have shown that the mitogen-activated kinases (MAPKs) MEK1 and ERK1/2 can phosphorylate Cbfa1 [19]. Therefore, we investigated the effect of 6-MP on MAPK phosphorylation. Phosphorylation of MEK1 and ERK1/2 was induced in a time-dependent manner upon 6-MP treatment (Figure 2E). Inhibition of the kinases by U0126 diminished cbfa1 expression (Figure 2F).

Effects of 6-MP metabolites

6-MP is a cleavage product of azathioprine (AZA), and this cleavage quickly occurs either non-enzymatically [20] or enzymatically via glutathione S-transferase (GST) [21]. Subsequently, different enzymatic pathways lead to further conversion of 6-MP, including the xanthine oxidase (XO), thiopurinomethyltransferase (TPMT) and hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPR1) pathways (Figure 3A) [22]. XO metabolizes more than 80% of 6-MP into 6-thio-uric acid (6-TU), and the remaining amount can be further catabolically and anabolically converted into metabolites [23]. The required enzymes for 6-MP metabolism are expressed in rat VSMCs (Figure 2B). Because the majority of 6-MP is metabolized via XO [21], we blocked this pathway and measured the effect on mineralization. As XO is a known source of reactive oxygen species (ROS), we used the inhibitors allopurinol (XO inhibitor) and tiron as scavengers for ROS [24]. To examine the effect of XO inhibition in the mineralization process, we used both inhibitors during co-stimulation with 6-MP. Allopurinol treatment resulted in a reduction of ALP expression and significantly diminished its enzymatic activity, while co-treatment

with tiron significantly diminished both ALP expression and enzyme activity (Figure 3C,D).

To determine the effect of 6-MP metabolites on calcification of VSMCs, we examined the three main metabolites of 6-MP: 6-TU, 6-thio-guanine nucleotides (6-TGNs) and 6-methyl-thio-inosine monophosphate (6-MTIMP). All investigated 6-TGNs (6-T-GMP, -GDP, -GTP) and 6-MTIMP, significantly induced cbfa1 and ALP mRNA expression, whereas 6-TU produced no change in expression (Figure 3E,F). This phenomenon could be verified by measuring calcium content and ALP activity after 21 days in culture. With the exception 6-TU, all investigated compounds (6-TGNs and 6-MTIMP) robustly induced calcium deposition (Figure 3G) and ALP enzyme activity (Figure 3H).

6-MP promotes the production of ROS

6-TU is the main metabolite of 6-MP conversion. Inhibition of this pathway by allopurinol and tiron reduced mineralization, but 6-TU itself seemed to have no effect on calcification. Therefore, the metabolic pathway and associated ROS production might be relevant. Previous evidence suggests that the ROS level might contribute to VSMC mineralization [7,8]. Here, we used several specific probes, in particular superoxide and hydrogen peroxide, to detect ROS levels after treatment of VSMCs with 6-MP and its metabolites. 6-MP increased the production of superoxide in dihydroethidium (DHE)-labeled cells in a dose-dependent manner, as shown by representative fluorescence microscopy images (Figure 4A) and quantification using a 96-well assay (Figure 4B). Superoxide is rapidly converted to hydrogen peroxide. Therefore, we measured its production via flow cytometry (Figure 4C,D). Stimulation of cells with the 6-TGNs and 6-MTIMP also

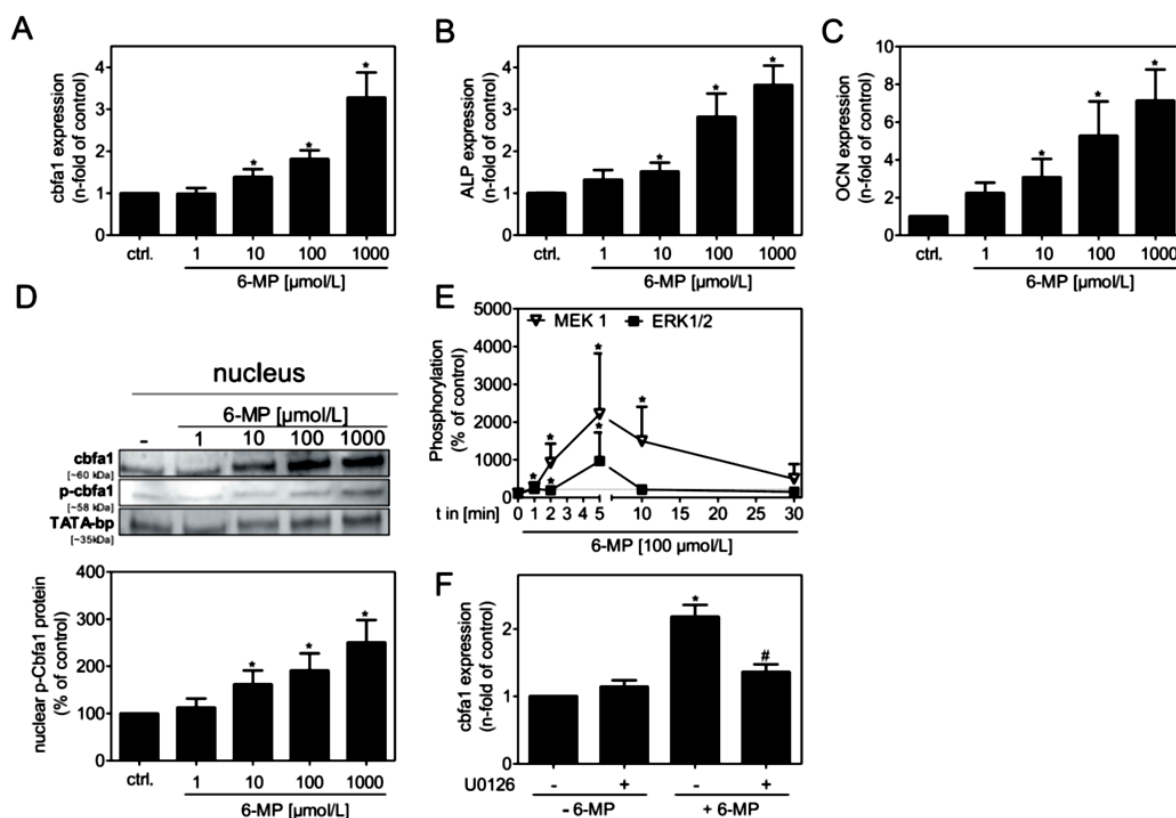


Figure 2. mRNA expression of osteogenic proteins. (A–C) VSMCs were stimulated with 6-MP as indicated and mRNA expression was detected after 48 h. Data represent means \pm SEM, $n \geq 6$, * $p < 0.05$ vs. control. (D) VSMCs were stimulated with 6-MP for 48 h. Nuclear proteins were extracted. Cbfa1, Cbfa1-phospho and TATA-bp were detected via Western blot. Representative images and relative band intensities of 3 independent blots of Cbfa1-phospho are shown. (E) MEK1 and ERK1/2 activation was detected via Bio-Plex ($n \geq 6$). Values are given as % of control and are normalized to total kinase. (F) mRNA expression of cbfa1 after 48 h treatment with 6-MP (100 μ mol/L) \pm U0126 (1 μ mol/L) ($n > 6$). Data represent means \pm SEM, * $p < 0.05$ vs. control. ALP: alkaline phosphatase, cbfa1: core binding factor alpha-1, 6-MP: 6-mercaptopurine, OCN: osteocalcin. doi:10.1371/journal.pone.0101709.g002

significantly increased superoxide production, whereas 6-TU seemed to have no effect on superoxide production (Figure 4E). Inhibition of XO by allopurinol or tiron treatment diminished the 6-MP-induced production of superoxide (Figure 4F).

Discussion

In this study, we report that 6-MP, a cleavage product of the immunosuppressive drug AZA, is a potent inducer of vascular calcification in *in vitro* and *ex vivo* models. 6-MP stimulated trans-differentiation of VSMCs into an OCC phenotype, which has been proposed as one hypothesis for vascular mineralization [18]. The generation of ROS by 6-MP could contribute to the mechanism responsible for the trans-differentiation of VSMCs.

These data unmask a potential harmful effect of 6-MP treatment for vascular disease and specifically focus on the progression of the vascular calcification observed in arteriosclerosis. AZA is commonly used, as it is a potent drug that controls many immune diseases [25,26]. During the last several years, AZA treatment has been replaced in patients who have undergone solid organ transplantation [20,25]. However, AZAs still routinely used in the treatment of several auto-immune diseases [26–28]. Currently, its application as an immunosuppressive drug has

increased due to its beneficial effects on lipid profiles and fibrinolytic parameters [12,29,30]. However, there are several indications that the cardiovascular risk in AZA-treated patients is increased [27,28], and vascular alterations could occur. The present study gives additional indications of the potentially harmful effects.

Some clinical studies have revealed relevant roles for immunosuppressive drugs on cardiovascular risk profiles [1,12,13,31]. Reasons for the increased cardiovascular morbidity and mortality are multi-factorial, but there are clear reports that immunosuppressive drugs used to control the aforementioned diseases might influence the occurrence of cardiovascular events [12]. Vascular alterations and the incidence rates of non-fatal and fatal cardiovascular events are some of the major complications in different patient cohorts, such as patients suffering from rheumatoid arthritis (RA) or systemic lupus erythematosus (SLE) [32], dialysis patients or patients who have undergone solid organ transplantation, especially kidney transplant patients (KTX) [1,2,33]. Upon AZA treatment, the risk of coronary heart disease increases in patients with SLE [27] and in KTX [31] and RA patients [28].

Generally, it has been thought that the underlying disease might induce a high cardiovascular burden in these patient groups.

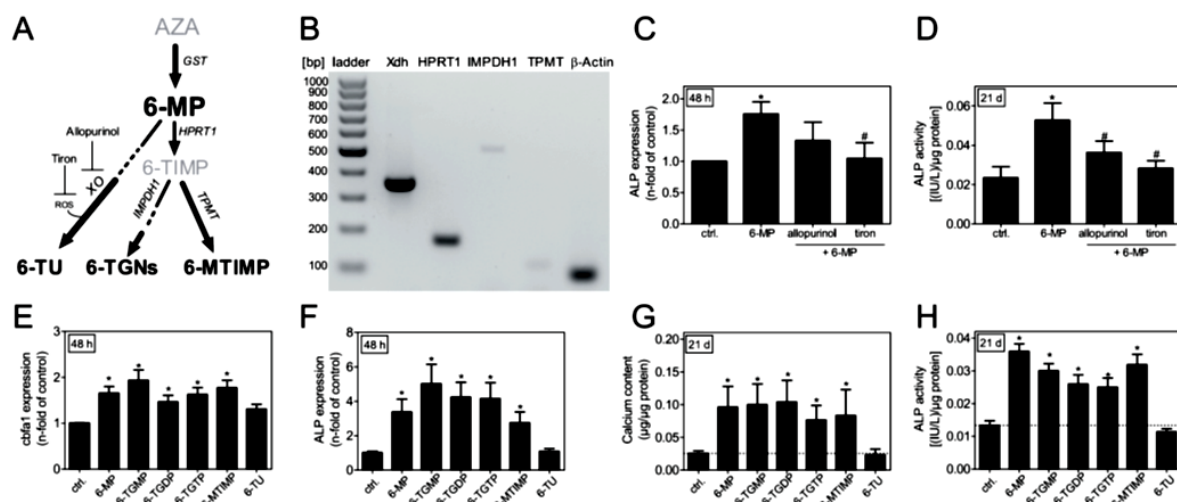


Figure 3. Effects of 6-MP metabolites. (A) Metabolism scheme of the prodrug AZA. (B) Expression of Xdh (351 bp), HPRT1 (168 bp), IMPDH1 (505 bp), TPMT (104 bp), and β -actin (76 bp) in unstimulated VSMCs. (C,D) Effect of 6-MP (100 μ mol/L) and tiron (100 μ mol/L) stimulation on VSMC (C) ALP mRNA expression and (D) ALP enzyme activity. Enzyme activity was normalized to the protein content of the cells. Data represents means \pm SEM, $n \geq 6$, $^*p < 0.05$ vs. control $^{\#}p < 0.05$ vs. 6-MP. (E,F) VSMCs were stimulated with 6-MP (100 μ mol/L), 6-TGns (each 10 μ mol/L), 6-TGMP (10 μ mol/L) or 6-TU (10 μ mol/L) for 48 h and (E) cbfa1, and (F) ALP mRNA expression levels were analyzed. Data represents means \pm SEM, $n \geq 6$, $^*p < 0.05$ vs. control. (G,H) VSMCs were incubated as indicated (100 μ mol/L 6-MP, 6-TGns [each 10 μ mol/L], 6-MTIMP or 6-TU [each 10 μ mol/L] for 21 days) and (G) calcium content and (H) ALP enzyme activity were measured. Data represents means \pm SEM, $n \geq 6$, $^*p < 0.05$ vs. control. AZA: azathioprine, cbfa1: core binding factor alpha-1, GST: glutathione S-transferase, HPRT: hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase, IMPDH1: inosine monophosphate dehydrogenase 1, 6-MP: 6-mercaptopurine, 6-MTIMP: 6-methylthioinosine monophosphate, 6-TGDP: 6-thioguanosine diphosphate, 6-TGMP: 6-thioguanosine monophosphate, 6-TGns: 6-thioguanine nucleotides, 6-TGTP: 6-thioguanosine triphosphate, 6-TIMP: 6-thioinosine monophosphate, TPMT: thiopurinemethyltransferase, 6-TU: 6-thiouric acid, Xdh: Xanthine dehydrogenase, XO: xanthine oxidase. doi:10.1371/journal.pone.0101709.g003

However, given the present results, it is possible that AZA contributes to the higher cardiovascular risk. One report states that AZA may have atheroprotective properties [34]. In this study, the authors demonstrated that in a hypercholesterolemic apoE transgenic mouse model, local delivery of 6-MP reduced atherosclerosis, mainly due to reduced activation of monocytes [34]. This effect has not yet been demonstrated by systemic application. Studies in dialysis [35,36] and KTX patients [37–39] have shown that vessel calcification due to arteriosclerosis, rather than atherosclerosis, strongly predicts all-cause mortality and cardiovascular disease.

The results of the present study demonstrate that 6-MP induces the expression of typical bone cell markers that induce mineralization in VSMCs. To our knowledge, this report is the first that examines the role of 6-MP with respect to vascular calcification. In the *in vitro* model used, 6-MP produces a stronger effect on calcium deposition in compared with DEX treatment, which has demonstrated a calcification-inducing effect in previous experimental studies [9]. This effect could be verified by measuring the calcium deposition and enzyme activity of ALP in rat and human VSMCs. Similarly, 6-MP treatment results in mineralization of the vessel media in *ex vivo* experiments. The less potent effect of 6-MP in aortic rings compared with its effect *in vitro* might be due to experimental differences between isolated VSMCs and VSMC tissue cells. To verify the observed effects of 6-MP, the expression levels of certain proteins were investigated. The osteogenic transcription factor, cbfa1, and downstream osteogenic proteins, such as OCN, were induced by 6-MP treatment. Cbfa1 is an initial transcription factor in osteogenic differentiation and also appears to play a relevant role in VSMC transformation [18]. We found

evidence of induction of the Cbfa1 protein and a phospho variant in VSMCs. Inhibition of ERK1/2 led to decreased cbfa1 mRNA expression. This result supports the known auto-regulatory function of cbfa1 expression [40].

AZA is rapidly converted to 6-MP either non-enzymatically [20] or enzymatically, via GST [21]. Subsequently, 6-MP is enzymatically cleaved into three main metabolites, including 6-TU, 6-MTIMP and 6-TGns (Figure 3A), which act as pharmacological agents [21]. Here, we investigated these three main metabolites. The investigated concentrations of all metabolites were similar, as expected in the humans after AZA treatment [22]. All 6-TGns and 6-MTIMP significantly induced osteogenic expression and VSMC mineralization, as detected by calcium deposition and ALP activity. The main metabolite of 6-MP is 6-TU (>80%) [23]. As we have shown here, 6-TU had no effect on vascular calcification, although inhibition of the metabolism of 6-MP to 6-TU via XO reduced calcification. This observation led us to the question, if ROS production, via XO, might be involved [24,41]. ROS is capable of inducing vascular mineralization [8,42,43]. A very similar effect has been previously observed in which activation of XO resulted in the progression of vascular cells to calcifying cells [42]. Furthermore, previous reports show that AZA/6-MP influences oxidative stress [44,45]. 6-MP is degraded to 6-TGns and other metabolites, which, with the exception of 6-TU effect vascular calcification and oxidative stress. ROS might contribute to various mechanisms that induce the mineralization phenotype of VSMCs. Further studies investigating the downstream signaling pathways are necessary to describe the effects of the different 6-MP metabolites on vascular calcification.

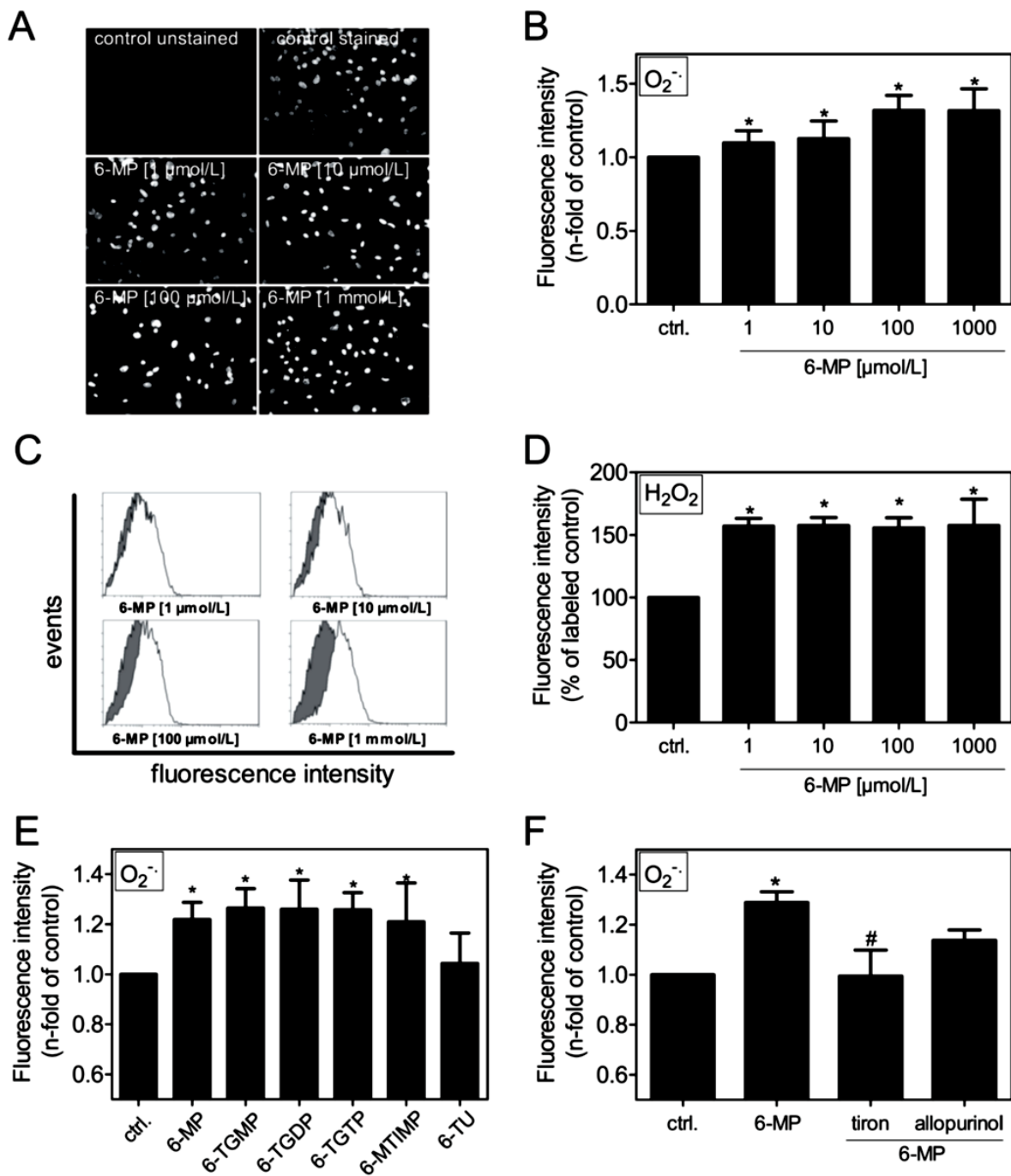


Figure 4. Involvement of ROS. (A,B,E,F) VSMCs were stimulated as indicated for 30 min before labeling cells with DHE. Superoxide production was (A) visualized via fluorescence microscopy (representative images from 3 independent experiments) or (B,E,F) quantified in a fluorescence plate reader ($n \geq 6$). (C,D) Hydrogen peroxide production is measured in H_2DCFDA -labeled cells via flow cytometry. (C) Representative histograms of flow data (grey: control, white: 6-MP). (D) Quantification of fluorescence intensity by % of labeled control ($n \geq 6$). (E) Stimulation with 6-MP (100 μmol/L) or its metabolites (each 10 μmol/L). (F) Stimulation with 6-MP (100 μmol/L) alone or costimulation with inhibitors (tiron [1 mmol/L] and allopurinol [1 μmol/L]). DHE: dihydroethidium, 6-MP: 6-mercaptopurine, 6-MTIMP: 6-methylthioinosine monophosphate, 6-TGDP: 6-thioguanosine diphosphate, 6-TGMP: 6-thioguanosine monophosphate, 6-TGN: 6-thioguanine nucleotide, 6-TGTP: 6-thioguanosine triphosphate, 6-TU: 6-thiouric acid. doi:10.1371/journal.pone.0101709.g004

In conclusion, this study provides evidence that 6-MP intake over an extended period of time in patients who undergo organ transplantation or suffer from autoimmune diseases might have harmful effects that may contribute to the progression of vascular mineralization. Nonetheless, the study has some limitations. We used *in vitro* and *ex vivo* models to show the impact of 6-MP on vascular calcification. 6-MP has anti-proliferative properties on VSMCs and decreases cell number over time relative to the unstimulated cells. At concentrations of 6-MP between 100 $\mu\text{mol/L}$ to 1 $\mu\text{mol/L}$, an inhibition of cell proliferation was observed. Most of the experiments in this study were carried out with an expected non-toxic 6-MP concentration (100 $\mu\text{mol/L}$). At the current stage, the influence of 6-MP-induced cell death or perhaps cell migration in a calcification nidus on the mineralization process *in vitro*, cannot be excluded. Animal studies and clinical prospective and retro-prospective trials are necessary to describe the effects of long-term treatment with AZA/6-MP. In humans, confounding factors, such as disease duration and disease severity, and other therapeutics might have a major influence on the progression of the calcification process. If this possibility is indeed confirmed, 6-MP therapy in any context should be examined to reduce possible harmful long-term cardiovascular effects.

Supporting Information

Figure S1 Influence of immunosuppressive drugs on *in vitro* mineralization. rVSMCs were cultured in control medium (white bar graph) or CM (black bar graphs) in the presence or absence of DEX (100 nmol/L), CYA, (100 nmol/L), FK506 (10 nmol/L), RPA (1 nmol/L), and 6-MP (100 $\mu\text{mol/L}$). Calcium deposition was quantified after 21 days and normalized to protein content of the cells. Data represent means \pm SEM, $n \geq 6$, * $p < 0.05$ vs. control, # $p < 0.05$ vs. CM. CM: calcification medium, CYA: cyclosporin A, DEX: dexamethasone, FK506: tacrolimus, RPA: rapamycin, 6-MP: 6-mercaptopurine, VSMCs: vascular smooth muscle cells. (JPG)

Figure S2 Cell viability/proliferation. rVSMCs were cultured in control medium in the presence or absence of 6-MP (1 $\mu\text{mol/L}$ –1 mmol/L) for 1 to 21 days. Data represent mean-

$s \pm$ SEM, * $p < 0.05$ vs. control, 6-MP: 6-mercaptopurine, VSMCs: vascular smooth muscle cells.

(JPG)

Figure S3 ALP enzyme activity after 7 days of treatment. rVSMCs were cultured in control medium or calcification medium in the presence or absence of 6-MP (100 $\mu\text{mol/L}$). ALP enzyme activity, normalized to protein content, was detected after 7 d of treatment. Data represent means \pm SEM, $n = 8$, * $p < 0.05$ vs. control, # $p < 0.05$ vs. CM. ALP: alkaline phosphatase, 6-MP: 6-mercaptopurine, VSMCs: vascular smooth muscle cells. (JPG)

Figure S4 Mineralization of human VSMCs. hVSMCs were cultured in control medium or calcification medium in the presence or absence of 6-MP (100 $\mu\text{mol/L}$). ALP enzyme activity, normalized to protein content of the cells, was detected after 14 d of incubation. Data represent means \pm SEM, $n = 3$, * $p < 0.05$ vs. control. ALP: alkaline phosphatase, CM: calcifying medium, 6-MP: 6-mercaptopurine, VSMCs: vascular smooth muscle cells. (JPG)

Methods S1 (PDF)

Results S1 (PDF)

References S1 (PDF)

Table S1 Primer sequences. (PDF)

Acknowledgments

We thank Simone Boes for her help with animal handling.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JP MS MT MH WZ MvdG. Performed the experiments: JP MS NP MH. Analyzed the data: JP MS MT MvdG. Contributed reagents/materials/analysis tools: MS WZ MvdG. Wrote the paper: JP MS MT WZ MvdG.

References

- Liefeldt L, Budde K (2010) Risk factors for cardiovascular disease in renal transplant recipients and strategies to minimize risk. *Transpl Int* 23: 1191–1204.
- London GM, Guerin AP, Marchais SJ, Metivier F, Pannier B, et al. (2003) Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant* 18: 1731–1740.
- Laurent S, Boutouyrie P, Asmar R, Gautier I, Laloux B, et al. (2001) Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension* 37: 1236–1241.
- Cruickshank K, Riste L, Anderson SG, Wright JS, Dunn G, et al. (2002) Aortic pulse-wave velocity and its relationship to mortality in diabetes and glucose intolerance: an integrated index of vascular function? *Circulation* 106: 2085–2090.
- Sutton-Tyrrell K, Najjar SS, Bouillon RM, Venkatchalam L, Kupelian V, et al. (2005) Elevated aortic pulse wave velocity, a marker of arterial stiffness, predicts cardiovascular events in well-functioning older adults. *Circulation* 111: 3384–3390.
- Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky E (2009) Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 20: 1453–1464.
- Shao JS, Cheng SL, Sadhu J, Towler DA (2010) Inflammation and the osteogenic regulation of vascular calcification: a review and perspective. *Hypertension* 55: 579–592.
- Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, et al. (2008) Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem* 283: 15319–15327.
- Mori K, Shioi A, Jono S, Nishizawa Y, Morii H (1999) Dexamethasone enhances *in vitro* vascular calcification by promoting osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 2112–2118.
- Bottomley MJ, Harden PN (2013) Update on the long-term complications of renal transplantation. *Br Med Bull* 106: 117–134.
- Marechal C, Coche E, Goffin E, Dragean A, Schlieper G, et al. (2012) Progression of coronary artery calcification and thoracic aorta calcification in kidney transplant recipients. *Am J Kidney Dis* 59: 258–269.
- Miller LW (2002) Cardiovascular toxicities of immunosuppressive agents. *Am J Transplant* 2: 807–818.
- Arnol M, de Mattos AM, Chung JS, Prather JC, Mittalhenkle A, et al. (2008) Late steroid withdrawal and cardiovascular events in kidney transplant recipients. *Transplantation* 86: 1844–1848.
- Ross R, Glomset JA (1973) Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 180: 1332–1339.
- Shioi A, Nishizawa Y, Jono S, Koyama H, Hosoi M, et al. (1995) Beta-glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 2003–2009.
- Schuchardt M, Tolle M, Pruffer J, Pruffer N, Huang T, et al. (2012) Uridine adenosine tetraphosphate activation of the purinergic receptor P2Y enhances *in vitro* vascular calcification. *Kidney Int* 81: 256–265.
- Pires NM, Pols TW, de Vries MR, van Tiel CM, Bonta PI, et al. (2007) Activation of nuclear receptor Nur77 by 6-mercaptopurine protects against neointima formation. *Circulation* 115: 493–500.
- Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, et al. (2001) Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res* 89: 1147–1154.

6-MP and Vascular Calcification

19. Xiao G, Jiang D, Thomas P, Benson MD, Guan K, et al. (2000) MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1. *J Biol Chem* 275: 4453–4459.
20. Karran P, Attard N (2008) Thiopurines in current medical practice: molecular mechanisms and contributions to therapy-related cancer. *Nat Rev Cancer* 8: 24–36.
21. Polifka JE, Friedman JM (2002) Teratogen update: azathioprine and 6-mercaptopurine. *Teratology* 65: 240–261.
22. Mardini HE, Arnold GL (2003) Utility of measuring 6-methylmercaptopurine and 6-thioguanine nucleotide levels in managing inflammatory bowel disease patients treated with 6-mercaptopurine in a clinical practice setting. *J Clin Gastroenterol* 36: 390–395.
23. Deshpande AR, Abreu MT (2010) Optimizing therapy with 6-mercaptopurine and azathioprine: to measure or not to measure? *Therap Adv Gastroenterol* 3: 275–279.
24. Berry CE, Hare JM (2004) Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol* 555: 589–606.
25. Halloran PF (2004) Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 351: 2715–2729.
26. Geary RB, Barclay ML (2005) Azathioprine and 6-mercaptopurine pharmacogenetics and metabolite monitoring in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 20: 1149–1157.
27. Haque S, Gordon C, Isenberg D, Rahman A, Lanyon P, et al. (2010) Risk factors for clinical coronary heart disease in systemic lupus erythematosus: the lupus and atherosclerosis evaluation of risk (LASER) study. *J Rheumatol* 37: 322–329.
28. Solomon DH, Avorn J, Katz JN, Weinblatt ME, Setoguchi S, et al. (2006) Immunosuppressive medications and hospitalization for cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54: 3790–3798.
29. van den Dorpel MA, Ghanem H, Rischen-Vos J, Man in't Veld AJ, Jansen H, et al. (1997) Conversion from cyclosporine A to azathioprine treatment improves LDL oxidation in kidney transplant recipients. *Kidney Int* 51: 1608–1612.
30. van den Dorpel MA, Veld AJ, Levi M, ten Cate JW, Weimar W (1999) Beneficial effects of conversion from cyclosporine to azathioprine on fibrinolysis in renal transplant recipients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 1555–1558.
31. Vanrenterghem YF, Claes K, Montagnino G, Fieuws S, Maes B, et al. (2008) Risk factors for cardiovascular events after successful renal transplantation. *Transplantation* 85: 209–216.
32. Symmons DP, Gabriel SE (2011) Epidemiology of CVD in rheumatic disease, with a focus on RA and SLE. *Nat Rev Rheumatol* 7: 399–408.
33. Jardine AG, Gaston RS, Fellstrom BC, Holdaas H (2011) Prevention of cardiovascular disease in adult recipients of kidney transplants. *Lancet* 378: 1419–1427.
34. Pols TW, Bonta PI, Pires NM, Otermin I, Vos M, et al. (2010) 6-mercaptopurine inhibits atherosclerosis in apolipoprotein e*3-leiden transgenic mice through atheroprotective actions on monocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 1591–1597.
35. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, London GM (2001) Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension* 38: 938–942.
36. Wang AY, Wang M, Woo J, Lam CW, Li PK, et al. (2003) Cardiac valve calcification as an important predictor for all-cause mortality and cardiovascular mortality in long-term peritoneal dialysis patients: a prospective study. *J Am Soc Nephrol* 14: 159–168.
37. Nguyen PT, Henard S, Coche E, Goffin E, Devuyst O, et al. (2010) Coronary artery calcification: a strong predictor of cardiovascular events in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 25: 3773–3778.
38. DeLoach SS, Joffe MM, Mai X, Goral S, Rosas SE (2009) Aortic calcification predicts cardiovascular events and all-cause mortality in renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 24: 1314–1319.
39. Roe P, Wolfe M, Joffe M, Rosas SE (2010) Inflammation, coronary artery calcification and cardiovascular events in incident renal transplant recipients. *Atherosclerosis* 212: 589–594.
40. Ducy P (2000) Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* 219: 461–471.
41. Taverne YJ, Bogers AJ, Duncker DJ, Merkus D (2013) Reactive oxygen species and the cardiovascular system. *Oxid Med Cell Longev* 2013: 862423.
42. Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL (2001) Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med* 31: 509–519.
43. Liberman M, Bassi E, Martinati MK, Lario FC, Wosniak J, Jr., et al. (2008) Oxidant generation predominates around calcifying foci and enhances progression of aortic valve calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 463–470.
44. McGrath LT, Treacy R, McClean E, Brown JH (1997) Oxidative stress in cyclosporin and azathioprine treated renal transplant patients. *Clin Chim Acta* 264: 1–12.
45. O'Donovan P, Perrett CM, Zhang X, Montaner B, Xu YZ, et al. (2005) Azathioprine and UVA light generate mutagenic oxidative DNA damage. *Science* 309: 1871–1874.

IV. Untersuchung des Einflusses von reaktivem Sauerstoffstress auf die Genese der MAC in einem *in vivo* Modell

Originalarbeit: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33806932>

“Long-term treatment of azathioprine in rats induces vessel mineralization”

Biomedicines, 2021, 9, 327, DOI 10.3390/biomedicines9030327

Schuchardt, M., Herrmann, J., Henkel, C., Babic, M., van der Giet, M., Tölle, M.

Um den *in vitro* gezeigten Effekt der Induktion der Kalzifizierung durch 6-Mercaptopurin zu verifizieren, wurde in dieser Arbeit der Effekt einer Langzeitbehandlung mit Azathioprin über 24 Wochen auf die Gefäßmineralisierung im Rattenmodell untersucht.



Die Azathioprin-Behandlung zeigte keine negativen Effekte auf das Körpergewicht oder das Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Therapiegruppe zeigten sich nach 24 Wochen Behandlung mit Azathioprin histologisch medial lokalisierte Kalziumablagerungen im aortalen Gefäß. Vergleichbar mit den *in vitro* Daten konnte *in vivo* eine Phänotyptransformation der VSMC im aortalen Gewebe durch Nachweis osteoblastärer Marker (Cbfa-1, Alp und Opn) nachgewiesen werden. Des Weiteren stieg die mRNA Expression der Xanthinoxidase, eines der Hauptenzyme für die Bildung von ROS in VSMC, an. Die Plasmakonzentration von 8-Oxo-desoxyguanosine, einem systemisch nachweisbaren ROS Marker, war bei den Azathioprin-behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht.

ROS stellen wichtige intrazelluläre Signalmoleküle dar, über die zelluläre Systeme, wie beispielsweise Inflammasomen als intrazelluläre PRR, aktiviert werden können. Daher wurde untersucht, ob durch die Behandlung mit Azathioprin die Aktivität des Nlrp3 Inflammasoms, als eines der wichtigsten intrazellulären Inflammasomen in VSMC, induziert werden kann. Sowohl die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine Il-1 β und Il-6 in aortalen Gewebe, als auch deren Plasmakonzentration war unter der Azathioprin Therapie signifikant erhöht. Dass diese erhöhte Il-1 β und Il-6 Expression Nlrp3 Inflammasom abhängig ist, zeigten die Ergebnisse eines experimentellen *ex vivo* Ansatzes an aortalen Gefäßringen von Nlrp3 knockout Mäusen.

Diese Ergebnisse bestätigen die *in vitro* erzielten Daten der Azathioprin-induzierten Kalzifizierung von VSMC und Induktion einer MAC. Darüber hinaus zeigte sich die Bedeutung der ROS-abhängigen Aktivierung des Nlrp3 Inflammasomes für diesen Prozess. Damit rückten Mechanismen des angeborenen Immunsystems in den Fokus der weiteren Untersuchungen.

Article

Long-Term Treatment of Azathioprine in Rats Induces Vessel Mineralization

Mirjam Schuchardt ¹, Jaqueline Herrmann ^{1,2}, Cornelia Henkel ¹, Milen Babic ¹, Markus van der Giet ^{1,*} and Markus Tölle ¹

- ¹ Department of Nephrology and Medical Intensive Care, Charité–Universitätsmedizin Berlin, 12203 Berlin, Germany; mirjam.schuchardt@charite.de (M.S.); Jaqueline.Herrmann@charite.de (J.H.); Cornelia.Henkel@charite.de (C.H.); Milen.Babic@charite.de (M.B.); Markus.Toelle@charite.de (M.T.)
² Department of Biochemistry, Chemistry and Pharmacy, Freie Universität Berlin, 14195 Berlin, Germany
* Correspondence: Markus.vanderGiet@charite.de

Abstract: Medial vascular calcification (mVC) is closely related to cardiovascular disease, especially in patients suffering from chronic kidney disease (CKD). Even after successful kidney transplantation, cardiovascular mortality remains increased. There is evidence that immunosuppressive drugs might influence pathophysiological mechanisms in the vessel wall. Previously, we have shown in vitro that mVC is induced in vascular smooth muscle cells (VSMCs) upon treatment with azathioprine (AZA). This effect was confirmed in the current study in an in vivo rat model treated with AZA for 24 weeks. The calcium content increased in the aortic tissue upon AZA treatment. The pathophysiological mechanisms involve AZA catabolism to 6-thiouracil via xanthine oxidase (XO) with subsequent induction of oxidative stress. Proinflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-1 β and IL-6, increase upon AZA treatment, both systemically and in the aortic tissue. Further, VSMCs show an increased expression of core-binding factor α -1, alkaline phosphatase and osteopontin. As the AZA effect could be decreased in NLRP3^{-/-} aortic rings in an ex vivo experiment, the signaling pathway might be, at least in part, dependent on the NLRP3 inflammasome. Although human studies are necessary to confirm the harmful effects of AZA on vascular stiffening, these results provide further evidence of induction of VSMC calcification under AZA treatment and its effects on vessel structure.

Keywords: aging; azathioprine; calcification; mineralization; senescence-associated secretory phenotype



Citation: Schuchardt, M.; Herrmann, J.; Henkel, C.; Babic, M.; van der Giet, M.; Tölle, M. Long-Term Treatment of Azathioprine in Rats Induces Vessel Mineralization. *Biomedicines* **2021**, *9*, 327. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9030327>

Academic Editor: Andreas Weber

Received: 18 February 2021

Accepted: 17 March 2021

Published: 23 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Vascular disease in general and arteriosclerosis in particular remain a major cause of cardiovascular morbidity and mortality, not only in patients suffering from chronic renal failure, but also in elderly patients. Up to now, convincing clinical therapy concepts are not available [1]. A longitudinal study with kidney transplant patients revealed substantial medial vascular calcification (mVC) within four years even when cardiovascular mortality decreases after transplantation [2,3]. Beside the influence of uremic toxins on vascular smooth muscle cell (VSMC) physiology [4] in patients with chronic kidney disease (CKD), evidence exists that immunosuppressive therapy can influence signaling pathways in vascular cells and thereby affect the progression of vascular alterations [5]. One of those potent immunosuppressive drugs is azathioprine (AZA) [6,7]. Even though AZA has been replaced in patients who have undergone solid organ transplantation [6], it is still routinely used as a treatment of several auto-immune diseases [7–9]. Several indications exist that AZA treatment has an impact on the cardiovascular risk and pathophysiology of the vessel wall [8,9]. In a previous study, we found an induction of mVC and oxidative stress upon treatment with the cleavage product of AZA, 6-mercaptopurine (6-MP), using an in vitro model with rat VSMCs [10]. Extensive research in the field of VSMC calcification revealed the involvement of several mechanisms including osteogenic, senescence and inflammatory signaling. VSMCs are characterized by a phenotype shift from a contractile

to a secreting cell called the senescence-associated secretory phenotype (SASP) [11–13]. Recently, Shanahan's group characterized the SASP of VSMCs by gene expression of several calcification markers, e.g., alkaline phosphatase (ALP), interleukin (IL)-1 β and p21 [13]. In the pathogenesis of CKD, inflammation and calcification are present in patients, even in early CKD stages [14]. A relevant role of NLRP3 inflammasome activation and IL-1 β production has been reported for the calcification process [15]. At least in vitro, IL-1 β stimulates VSMC calcification, while NLRP3 knockdown inhibits it [15]. Further, it has been shown that IL-6 induces calcification of human VSMCs in vitro [16]. In patients treated with AZA, the IL-6 plasma level and oxidative stress markers increase [17]. In the current study, the calcifying effect of AZA was investigated in an in vivo rat model treated with AZA for 24 weeks to support evidence of possible harmful effects on vessel stiffening in patients who underwent long-term AZA treatment over years.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Male Wistar rats ($n = 29$) were purchased from Janvier (Le Genest-Saint-Isle) at the age of 8 weeks. At the age of 14 weeks, rats were divided randomly into 2 groups. For 24 weeks, the treatment group ($n = 16$) received AZA (10 mg/kg body weight) orally via the drinking water and the control group ($n = 13$) received no therapy. The drinking solution for the animal treatment was prepared daily and the amount of drinking water per cage was monitored to determine the mean AZA uptake per animal and day. Health and body weight statuses were monitored in short intervals during the trial period. After 24 weeks, animals were sacrificed by intraperitoneal injection of pentobarbital (400 mg/kg body weight). Blood was obtained and organ specimens were prepared for cryofixation and formalin fixation. Heparin plasma was collected by centrifugation, aliquoted and frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. NLRP3^{+/+} and NLRP3^{-/-} mice (C57/BL6 background) were sacrificed by intraperitoneal injection of pentobarbital (200 mg/kg body weight). Blood was obtained in heparinized tubes; heparin plasma was collected by centrifugation and aliquoted frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. Rats and mice were kept on a 12 h light/dark cycle with chow and water ad libitum. The room temperature was around $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Chow was purchased from Ssniff (Soest).

2.2. Blood Parameters

Blood parameters were analyzed in heparin plasma by a blood dry chemistry analyzer (Fuji) for alkaline phosphatase (ALP), calcium (Ca) and inorganic phosphate (IP) according to the manufacture's recommendations. Parathyroid hormone (PTH) (Rat Biointact PTH ELISA, Immotopics), serum amyloid A (SAA, Rat SAA CLIA Kit, ElabScience), 8-oxo-2-deoxyguanosine (MyBioSource), Fetuin-A (LS Bio), Caspase-1 (Biorbyt) and MGP (LS Bio) plasma concentrations were measured via ELISA according to the manufacture's protocol. Plasma concentration of 23 cytokines was determined using Milliplex (Millipore) according to the manufacturer's instructions.

2.3. Histological Staining

Histological stains of the aorta were performed in $4\text{ }\mu\text{m}$ sections of paraffin-embedded tissue. Deparaffinized sections were subsequently stained using von Kossa staining. Images were acquired using a Zeiss AxioVert 200M light microscope with ZEN2 software (Zeiss, blue edition).

2.4. Quantification of the Tissue Calcium Content

Extracellular calcium content of different vascular beds was determined as previously published [10,18].

2.5. Ex Vivo Stimulation of Aortic Tissue

The thoracic aorta of NLRP3^{+/+} and NLRP3^{-/-} mice was stimulated with calcification medium: Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 4.5 g/L glucose, supplemented with 15% fetal calf serum, 1% penicillin/streptomycin, 5 mmol/L sodium hydrogen phosphate and 0.284 mmol/L ascorbic acid. In co-stimulated samples, medium supplemented with 0.1 mmol/L AZA was used. The aortic tissue was stimulated for 14 days, and the medium was changed every three days. Afterwards, the aortic tissue was decalcified for 24 h with 0.6 mol/L hydrochloric acid (HCl). The tissue was dried, and dry weight was measured for normalization.

2.6. Gene Expression

Cryoconserved tissue was homogenized using the Tissue Ruptor with disposable probes (Qiagen). RNA was isolated using Trizol[®] (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and afterwards reverse transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit[™] (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol. Quantitative determination of mRNA expression was conducted using the iQ[™] SYBR Green supermix and the CFX384 real-time PCR detection system (Biorad, CFX software version 3.1). The oligonucleotide sequences are given in Supplementary Table S1. GAPD, Ppia and Rpl13A were used as housekeeping normalization for each sample. The Ct average of the respective control mice was used for Ct normalization.

2.7. Statistical Analysis

Data are provided as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using Graph-Pad Prism software (version 6.0). To evaluate differences between treatment groups, the Mann-Whitney U test or Wilcoxon matched pairs test was applied. A *p*-value < 0.05 was considered as statistically significant.

3. Results

3.1. In Vivo Model

The AZA treatment over 24 weeks was well tolerated by all rats. Both groups, the control and treatment groups, gained significantly in weight during the observation period without any significant difference between the two groups. Furthermore, there was no significant difference between the groups in organ weight of the heart and kidney (Table 1) and in the plasma concentration of the blood parameter IP. In contrast, Ca plasma levels and ALP plasma concentration increased significantly during long-term AZA treatment. However, the calcium phosphate product was not significantly different between both groups (Table 1). The PTH plasma concentration increased upon AZA treatment for 24 weeks but did not reach statistical significance.

Table 1. Body weight, blood parameters and organ weight of rats. Heart and kidney weights are given as wet tissue weight normalized to animal weight. Mean \pm SEM.

Group	Rat N	Body Weight [g] Initial vs. Final	Heart Weight [mg/g]	Kidney Weight [mg/g]	ALP [U/L]	IP [mmol/L]	Ca [mmol/L]	Ca x IP	PTH [pg/mL]
Control	13	332.1 \pm 6.2 504.2 \pm 10.5 [#]	2.54 \pm 0.06	5.09 \pm 0.10	148.50 \pm 18.49	2.03 \pm 0.12	2.41 \pm 0.07	4.9 \pm 0.34	888.0 \pm 155.4
AZA	16	344.9 \pm 5.0 511.4 \pm 11.9 [#]	2.60 \pm 0.09	5.21 \pm 0.13	204.30 ¹ \pm 23.54 [*]	2.10 \pm 0.07	2.63 \pm 0.08 [*]	5.5 \pm 0.25	1.347.0 \pm 387.7

AZA: azathioprine, ALP: alkaline phosphatase, IP: inorganic phosphate, Ca: calcium, PTH: parathyroid hormone. ¹ Animal number 14, [#] *p* < 0.05 initial vs. final of the same group, ^{*} *p* < 0.05 control vs. AZA.

3.2. Effect of Azathioprine on Vessel Mineralization after 24 Weeks of Treatment

The degree of calcification of the Aorta (A.) thoracales and A. abdominales was determined by measurement of tissue calcium content and via von Kossa staining. The distribution and frequency of the calcium content of investigated vessels are given in Figure 1A. The majority of animals in the AZA-treated group (85%) had elevated tissue

calcium in both A. thoracales and A. abdominales. The calcium content was higher in the distal vessel part. The von Kossa-stained histological sections (Figure 1B) of AZA-treated rats demonstrate diffuse calcium deposits localized in the media of the vessel wall, indicating the progression of calcification. The plasma concentrations of the calcification inhibitors Fetuin A and MGP are not different between both groups (Table 2).

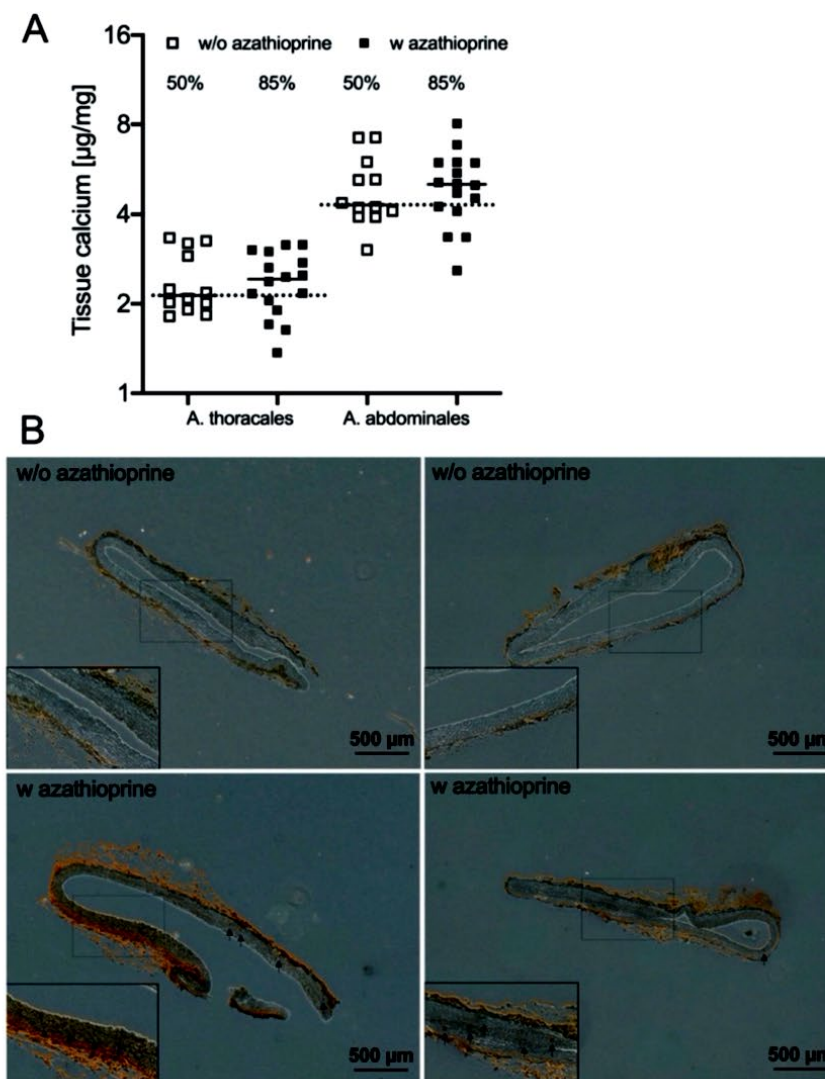


Figure 1. Quantification of mineralization of aortic tissue from rats. **(A)** Distribution and frequency of calcium content in different vessels (median). Each data point represents one animal; the dotted line represents the control median of azathioprine (AZA)-untreated animals; the % represents the number of animals above the control median (w/o AZA: $n = 12$, w AZA: $n = 16$). **(B)** Two representative images per group of von Kossa-stained aortic sections (A. abdominales). Arrow indicates vessel mineralization crystals.

Table 2. Plasma concentration of calcification inhibitors. Mean \pm SEM.

Group	Rat Number	Fetuin-A [ng/mL]	MGP [ng/mL]
Control	13	89.22 \pm 0.28	92.25 \pm 4.17
AZA	16	89.21 \pm 0.17	84.42 \pm 2.81

AZA: azathioprine, MGP: matrix Gla protein.

3.3. Azathioprine Treatment Induces Oxidative Stress and Reduces Antioxidative Capacity in Aortic Tissue

A short schema of the AZA metabolism is given in Figure 2A. The prodrug AZA is cleaved non-enzymatically or by glutathione S-transferases (GST) to 6-MP, which is then further metabolized enzymatically by xanthine oxidase (XO) and hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HRPT1) to 6-thiouracil or 6-thioinosine monophosphate. After AZA treatment, the HRPT1 mRNA in aortic tissue is significantly decreased (Figure 2B), while XO is significantly increased after AZA treatment (Figure 2C).

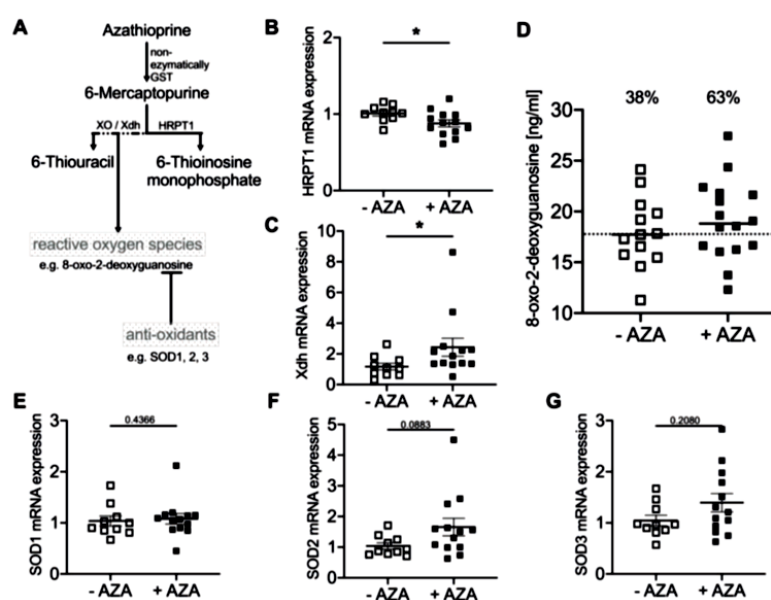


Figure 2. Oxidative and antioxidative capacity upon azathioprine (AZA) treatment. (A) Schema of AZA metabolism. (B,C,E–G) mRNA expression in aortic tissue from rats (w/o AZA: $n = 10$, w AZA: $n = 13$), Mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. control. (D) Reactive oxygen species (ROS) plasma level via detection of 8-oxo-2-deoxyguanosine. Each data point represents an animal (median, w/o AZA: $n = 13$, w AZA: $n = 16$); the dotted line represents the control median of AZA-untreated animals; the % represents the number of animals above the control median.

During AZA catabolism via XO, reactive oxygen species (ROS) are generated. Therefore, 8-oxo-2-desoxyguanosine plasma levels as a ROS marker were measured. The distribution and frequency of the ROS increase upon AZA treatment are shown in Figure 2D. To investigate the antioxidative capacity, SOD1, 2 and 3 mRNA expression was measured. SOD1 and SOD3 mRNA expression was not found to be different in the AZA-treated group compared to the untreated controls. For SOD2, the mRNA expression slightly increased upon AZA treatment; however, it did not reach statistical significance (Figure 2E–G).

3.4. Azathioprine Treatment Induces SASP: Cytokine Plasma Level

Secretion of proinflammatory cytokines is one sign of the SASP of cells [19]. Therefore, the plasma levels of different cytokines were measured as systemic markers of inflammation. Out of 23 investigated cytokines, plasma concentrations of six are increased (Figure 3A) and three are decreased (Figure 3B) upon AZA treatment compared to the control group. In the treatment group, the plasma concentration of IL-1 β , IL-6 and vascular endothelial growth factor (VEGF) significantly increased, whereas the concentration of IL-7, GM-CSF and MIP-1 α only tends to be increased. Interestingly, the plasma concentration of IL-18, RANTES and serum amyloid A (SAA) significantly decreased in the treatment group.

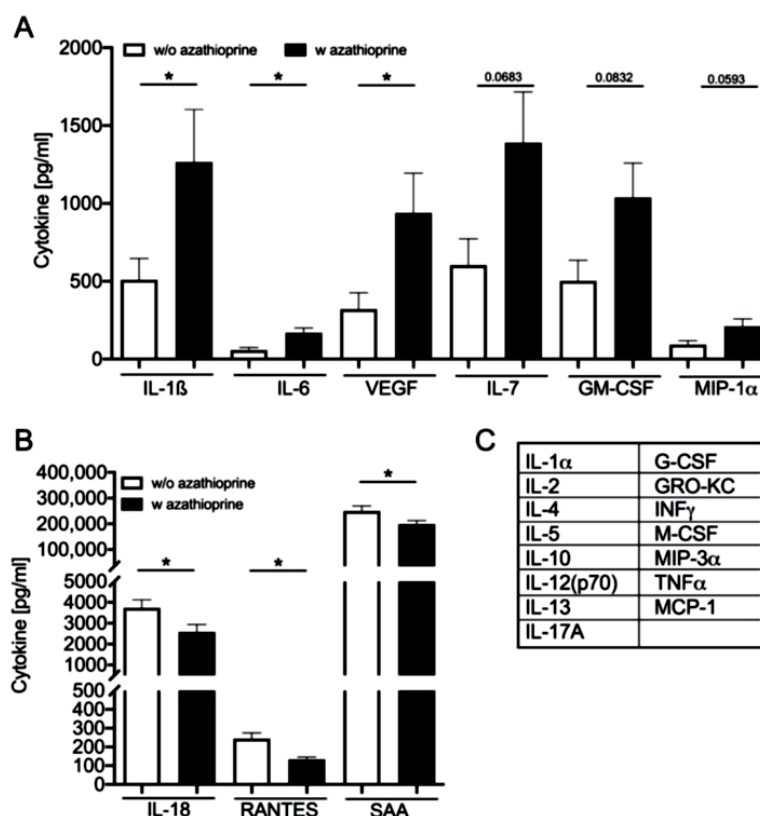


Figure 3. Cytokine plasma concentration in rats. (A) Cytokines that increase in plasma upon azathioprine (AZA) treatment and (B) that decrease compared to the untreated animals. Mean \pm SEM, * $p < 0.05$. (C) Further measured cytokines without a significant difference between AZA-untreated and -treated groups.

3.5. Azathioprine Treatment Induces SASP and Mineralization in Aortic Tissue

Cells change their expression profile during SASP response [13]. Therefore, the mRNA expression of osteoblastic, inflammatory and senescence markers in aortic tissue was determined. In the treatment group, the expression of the osteoblastic marker protein core-binding factor $\alpha 1$ (Cbfa1), the tissue non-specific ALP and osteopontin (OPN) significantly increased, whereas the expression of the VSMC marker protein SM22 α significantly decreased compared to the control group. In addition to the increased systemic expression of the proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-6, their mRNA expression in aortic tissue was significantly upregulated after 24 weeks of AZA treatment. The expression of cell cycle proteins p16, p21 and p53 was not altered (Figure 4).

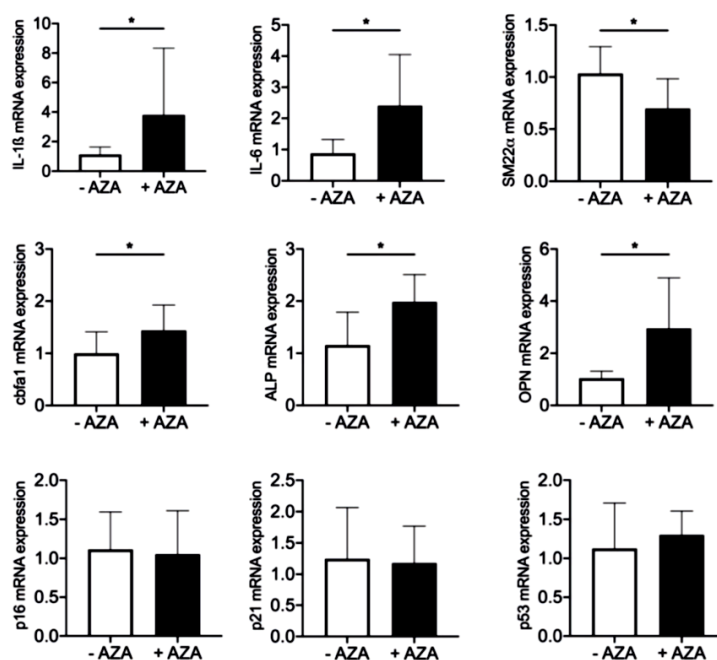


Figure 4. Expression of senescence-associated phenotype markers in aortic tissue from rats upon azathioprine treatment. mRNA expression in aortic tissue of azathioprine (AZA)-treated rats vs. control animals. Mean \pm SEM, * $p < 0.05$.

3.6. SASP Induction Is NLRP3-Dependent

There is evidence that the NLRP3 inflammasome complex is involved in mVC [15]. Therefore, we tested the mRNA expression of ASC, NLRP3 and Caspase-1, in the aortic tissue of our model. In the treatment group, the expression of NLRP3, ASC and Caspase-1 is significantly increased in the aortic tissue (Figure 5A–C). The systemic plasma concentration of Caspase-1 is not significantly different between treated and untreated rats (Figure 5D). To further investigate the pathway via NLRP3 in the calcification process, aortic rings from the A. thoracales of NLRP3^{-/-} mice and respective NLRP3^{+/+} control animals were stimulated ex vivo for 14 days with calcification medium alone and with calcification medium supplemented with AZA. The plasma levels of ALP, IP and Ca do not significantly differ between knockout and control animals. However, in aortic rings of NLRP3^{+/+} mice, calcification media significantly induce tissue calcium content, and co-stimulation with AZA further increases tissue calcium content in these animals. In NLRP3^{-/-} mice, the induction effect of AZA is significantly reduced (Figure 5H).

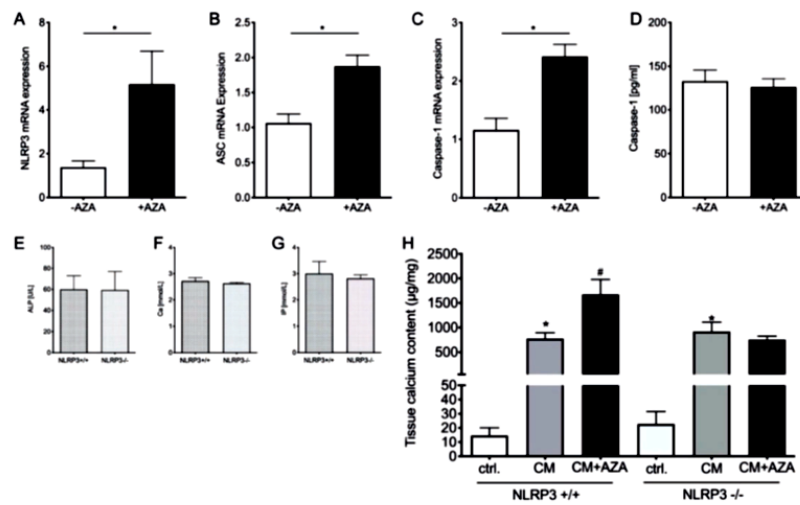


Figure 5. NLRP3-dependent induction of senescence-associated phenotype markers. (A–C) mRNA expression in aortic tissue from rats. (D) Caspase-1 plasma concentration in azathioprine (AZA)-treated and -untreated rats. (E–G) Plasma concentration of alkaline phosphatase (ALP), inorganic phosphate (IP) and calcium (Ca) in NLRP3^{+/+} and NLRP3^{-/-} mice. (H) Aortic tissue rings of NLRP3^{+/+} and NLRP3^{-/-} mice were treated for 14 days ex vivo using control and calcification media in the presence or absence of AZA (0.1 mmol/L) and tissue calcium contents were quantified. Arrows indicating calcification foci. (E–H) *n* = 6. (A–H) Mean ± SEM, * *p* < 0.05 vs. control, # *p* < 0.05 vs. CM.

4. Discussion

In the current study, we examined the in vivo long-term effect of AZA treatment on mVC in rats. In line with our in vitro data [10], we show that AZA treatment over 24 weeks induces vessel calcification and proinflammatory SASP activation in the aortic tissue. The effect is, at least in part, driven by the NLRP3 inflammasome (Figure 6).

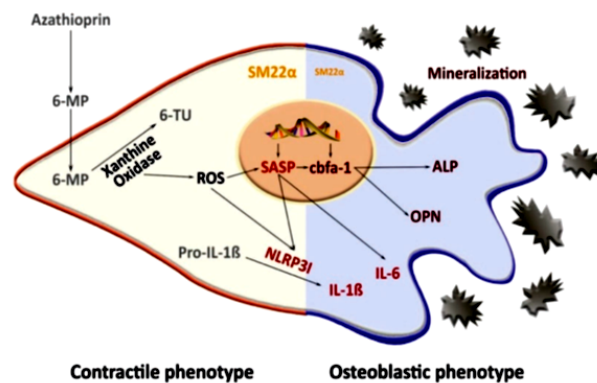


Figure 6. Proposed mechanism of azathioprine-induced vessel mineralization. 6-MP: 6-mercaptopurine, 6-TU: 6-thiouracil, ROS: reactive oxygen species, IL-1β: interleukin 1-β, IL-6: interleukin 6, SASP: senescence-associated secretory phenotype, NLRP3I: NLRP3 inflammasome, SM22α: smooth muscle protein 22 α, cbfa1: core-binding factor alpha-1, OPN: osteopontin, ALP: alkaline phosphatase.

AZA is a potent immunosuppressive drug that it is still routinely used as a treatment of several auto-immune diseases [7–9]. Evidence exists that AZA treatment increases the cardiovascular risk of patients [8,9]. Arteriosclerosis and subsequent stiffening of the vessel wall are some of the risk factors for cardiovascular events, not only in patients with CKD or after organ transplantation [2,3].

In a recent *in vitro* study, we already observed an induction of VSMC calcification upon 6-MP treatment [10]. 6-MP is the active metabolite of AZA which is cleaved non-enzymatically or via GST [8,20]. In line with the *in vitro* data, the present study shows an increased mVC of the aortic tissue in the treatment group. However, even though the calcification was induced by AZA treatment, the effect was less robust than expected from the *in vitro* data. The animals in the current study were treated with 10 mg/kg body weight for 24 weeks.

For other animal studies, the drug dose of AZA or its active metabolite 6-MP differs between 2 and 60 mg/kg body weight depending on the research question and model [21–28]. The drug dose for humans is usually 1–4 mg/kg body weight and depends on the individual indication. As the dose in animals is mostly higher than in humans, the application time in the animal experiment is relatively short compared to the treatment period of often decades in humans. In line with previous studies for different treatment periods, we found no significant difference in rat body mass upon AZA treatment [24,29].

In contrast to the *in vitro* situation, where only one cell type is typically investigated in an artificial environment, the *in vivo* situation is influenced by multiple systemic factors [30] that might contribute to differences observed *in vitro* and *in vivo*. The mechanisms in mVC are multifactorial and *in vivo* triggered by an imbalance between mineralization inducers and inhibitors [11]. First, we looked at blood parameters typically associated with mVC. Plasma concentrations of IP, PTH and the calcium phosphate product do not significantly differ between the treatment and control groups in our rat model. Under pathophysiological conditions, calcium and phosphate concentrations typically exceed their solubility. Endogenous inhibitors such as Fetuin-A and MGP are required to prevent ectopic precipitation of calcium phosphate complexes. Fetuin-A has potent inhibitory effects on calcification by protecting crystal growth and deposition [31]. MGP is highly expressed in calcified VSMCs, acts via a vitamin K-dependent pathway and has a high binding affinity to calcium ions [32]. However, plasma concentrations of Fetuin-A and MGP are not significantly different between the treatment and control groups and therefore cannot explain the observed effects.

As shown *in vitro*, the induction of calcification upon 6-MP was, at least partially, dependent on ROS generation via XO [10]. Therefore, we investigated the mRNA gene expression of HPRT-1 and XO, the main catabolic enzymes of 6-MP, in the aortic tissue. The expression of HPRT-1 was reduced, whereas the expression of XO was significantly enhanced. The increased plasma level of 8-oxodehydrogenase supports the finding of an ROS-dependent effect of AZA treatment via XO, which is in accordance with our former *in vitro* results [10]. In vessels from children on dialysis [13], 8-oxodehydrogenase could also be detected in calcified medium-sized muscular arteries, which shows the relevance of ROS for the induction of mVC as discussed elsewhere [33]. In our rat model, the expression of SOD1, 2 and 3 in aortic tissue as a measure of antioxidant capacity was not significantly altered between the groups.

The enhanced production of inflammatory cytokines/chemokines, such as IL-1, IL-6 and VEGF, is associated with the prevalence of mVC and age-related diseases [34–37]. Therefore, we first measured the systemic plasma levels of 23 potentially relevant analytes from the class of cytokines/chemokines and growth factors with potentially proinflammatory properties in our rat model. Indeed, the known SASP cytokines IL-1 β , IL-6 and VEGF are significantly increased upon AZA treatment. The activation of those SASP cytokines is in line with further research that found an induction of “paracrine senescence” in cell culture as well as mouse models [38]. Furthermore, the plasma level of IL-7, GM-CSF and MIP-1 α tends to be increased upon AZA treatment for 24 weeks. IL-7 has been shown to be

upregulated in some age-related diseases [34]. Although the main sources of origin of the cytokines are different, cells of the blood vessels such as macrophages, T cells, monocytes and platelets, as well as endothelial cells and VSMC, could also produce cytokines [39].

Beside upregulation of inflammatory cytokines, the plasma levels of IL-18, RANTES and SAA are significantly decreased in AZA-treated animals compared to their respective controls. SAA acts as a proinflammatory cytokine on VSMCs via activation of, among others, toll-like receptor (TLR) 2 and 4 to activate monocyte chemoattractant protein-1 production (MCP-1) [40]. MCP-1 and RANTES have chemoattractive properties on macrophages in the vessel wall [21]. Pols et al. found an inhibition of MCP-1 upon 6-MP treatment, whereas no significant effects could be shown on RANTES production [21]. The atheroprotective properties of 6-MP were observed in a mouse model of hypercholesterolemic apoE animals, whereby the inhibitory action was mainly triggered by a reduction in monocyte activation [21]. Beside the detection of systemic SASP markers, we investigated the SASP activation directly in aortic tissue. Here again, the mRNA expression of IL-1 β and IL-6 is significantly increased upon AZA treatment. IL-6 is known as an inducer of mineralization in VSMCs [16,41,42]. In part, IL-6 influences MPG's inhibitory action [43]. In addition, IL-6 induces bone morphogenetic protein (BMP)-2, ALP and OPN expression in VSMCs in vitro [42]. The neutralization of IL-6 reduced the osteogenic mRNA expression in an in vitro model [44]. For IL-1 β , a calcification induction in VSMCs was also shown [15]. Further, typical osteogenic markers such as the transcription factor Cbfa1 and its downstream genes ALP and OPN significantly increase in the aortic tissue of AZA-treated animals. Cbfa1, also known as Runx2, is not only a regulatory transcription factor of osteoblastic differentiation but also an initial osteoblastic differentiation factor of VSMCs that is required for medial calcification in mice [45,46]. OPN provides strong affinity for hydroxyapatite, due to its negatively charged phosphoserines, and therefore acts as an inhibitor of mVC by preventing crystal growth [47]. In healthy arteries, OPN is not detectable but was found increased in calcified tissue [48]. The inhibitory effect of OPN on mVC has been shown in vitro and in vivo [49–51]. As all of these proteins are upregulated in aortic tissue upon AZA treatment, this underlines the harmful effect on vessel physiology. Although the inductions of senescence markers such as p16, p21 and p53 are also described as SASP components, we found no significant induction of those in our model upon AZA treatment. The missing induction of the investigated senescence markers p21, p16 and p53 in the aortic tissue might be one explanation for the lesser calcification induction compared to our in vitro model [10]. Here, AZA induces p16, p21 and p53 (unpublished data). Induction of VSMC calcification by hyperphosphatemia also induces p21 [52]. However, IL-6 production itself is a sign of senescent VSMCs [53]. Furthermore, IL-1 β induces senescence of VSMCs and promotes osteogenic differentiation [35]. Several pieces of evidence exist of a vicious cycle of calcification and senescence in VSMCs; however, whether this is a conjoint or consecutive pathway is not clear up to now. Microarray analysis of senescent VSMCs reveals differential regulation of calcifying markers such as MGP, BMP2 and OPG as well as inflammation markers such as IL-1 β and tissue remodeling markers such as VEGF [36]. However, one has to keep in mind that some of the experimental settings investigate bulk cells and single-cell-based methods seem to be necessary to answer that question.

To further examine the intracellular signaling pathway of SASP induction in the aortic tissue, we investigated the NLRP3 inflammasome, which is believed to play a role in the mineralization process and contribute to age-related disease [15,34,54]. NLRP3, ASC and Caspase-1 are upregulated in calcified VSMCs and lead to a subsequent IL-1 β production [15]. The inhibition of the NLRP3 prevents calcification in vitro [15]. In the aortic tissue of AZA-treated rats, we found a significant increase in NLRP3, ASC and Caspase-1 mRNA expression, which is in line with the detected aortic IL-1 β expression. However, the systemic Caspase-1 plasma levels were not found to be significantly induced upon AZA treatment. To further verify the critical role of NLRP3 activation in our model, we studied aortic tissue in an ex vivo setting for 14 days upon AZA incubation. Our

results confirm that NLRP3 inflammasome activation may be, at least, one crucial signaling pathway in AZA-induced mVC.

Limitations of the study: The current study investigated vessel alterations such as media calcification upon AZA treatment. We wanted to investigate the effect of AZA on adult rats and therefore started the six-month treatment at the age of 14 weeks. Although only slight mineralization foci were found in the aortic tissue, a more extended treatment period was not possible due to the 3R (Reduce, Replace, Refine) thought of Russel and Burch [55] due to the increased tumor risk in older rats [56]. The current study did not investigate vessel stiffness parameters upon treatment such as pulse wave velocity, pulse pressure and systolic/diastolic blood pressure. However, the mRNA expression profile in the aortic tissue shows changes in the expression pattern of typical marker proteins for stiffened, mineralized vessels. Here, bone remodeling was not investigated. However, from other studies, it is known that AZA treatment in rats induces bone remodeling disorders by inhibiting bone formation and bone mineralization [29].

5. Conclusions

In conclusion, the current study confirmed the possible harmful effect of AZA treatment on vessel structure that was previously found in vitro using rat VSMCs [10]. Beside mineralization foci in the media of the aortic vessel wall, several changes in the SASP profile could be detected in the aortic tissue. Even though the effect seems not to be as strong as expected from our in vitro results [10], one has to keep in mind that humans are treated over years with AZA, whereas in the current model, only a smaller period could be investigated. In addition, AZA-treated patients mostly suffer from several comorbidities that could further reduce the antioxidative capacity of the organism and therefore pronounce the AZA-induced oxidative stress effect on VSMCs. However, the hypothesis has to be confirmed in human studies.

Supplementary Materials: Supplementary materials are available online at <https://www.mdpi.com/2227-9059/9/3/327/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, M.S., M.T. and M.v.d.G.; methodology, M.S., C.H., J.H., and M.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The Ernst-und-Berta Grimmke Stiftung (M.S.) and Sonnenfeld Stiftung (M.T.; J.H.) funded this research project.

Institutional Review Board Statement: The animal study was conducted according to the guidelines of the EU Directive 2010/63/EU and was approved by the Landesamt fuer Gesundheit und Soziales Berlin, Germany, and the Charité–Universitätsmedizin Berlin, Germany.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank Nathalie Siegel and the student assistants in the laboratory for their help in animal caring, tissue collection and sample preparation. We are grateful to Raissa Stayzyk for her work in the animal facility and thank, Katharina Kuschfeldt, Brigitte Egbers and Nadine Neitzel for their excellent technical assistance during the project. We thank Marcus Maurer (Charité–Universitätsmedizin Berlin) for the release of the NLRP3 mice for breeding. We acknowledge support from the German Research Foundation (DFG) and the Open Access Publication Fund of Charité—Universitätsmedizin Berlin.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Tölle, M.; Reshetnik, A.; Schuchardt, M.; Höhne, M.; van der Giet, M. Arteriosclerosis and vascular calcification: Causes, clinical assessment and therapy. *Eur. J. Clin. Investig.* **2015**, *45*, 976–985. [[CrossRef](#)]
2. Bottomley, M.J.; Harden, P.N. Update on the long-term complications of renal transplantation. *Br. Med. Bull.* **2013**, *106*, 117–134. [[CrossRef](#)]

3. Maréchal, C.; Coche, E.; Goffin, E.; Dragean, A.; Schlieper, G.; Nguyen, P.; Floege, J.; Kanaan, N.; Devuyt, O.; Jadoul, M. Progression of Coronary Artery Calcification and Thoracic Aorta Calcification in Kidney Transplant Recipients. *Am. J. Kidney Dis.* **2012**, *59*, 258–269. [[CrossRef](#)]
4. Hénaut, L.; Mary, A.; Chillon, J.-M.; Kamel, S.; Massy, Z.A. The Impact of Uremic Toxins on Vascular Smooth Muscle Cell Function. *Toxins* **2018**, *10*, 218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Liefeldt, L.; Budde, K. Risk factors for cardiovascular disease in renal transplant recipients and strategies to minimize risk. *Transpl. Int.* **2010**, *23*, 1191–1204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Halloran, P.F. Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *New Engl. J. Med.* **2004**, *351*, 2715–2729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Gearry, R.B.; Barclay, M.L. Azathioprine and 6-mercaptopurine pharmacogenetics and metabolite monitoring in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2005**, *20*, 1149–1157. [[CrossRef](#)]
8. Solomon, D.H.; Avorn, J.; Katz, J.N.; Weinblatt, M.E.; Setoguchi, S.; Levin, R.; Schneeweiss, S. Immunosuppressive medications and hospitalization for cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **2006**, *54*, 3790–3798. [[CrossRef](#)]
9. Haque, S.; Gordon, C.; Isenberg, D.; Rahman, A.; Lanyon, P.; Bell, A.; Emery, P.; McHugh, N.; Teh, L.S.; Scott, D.G.; et al. Risk Factors for Clinical Coronary Heart Disease in Systemic Lupus Erythematosus: The Lupus and Atherosclerosis Evaluation of Risk (LASER) Study. *J. Rheumatol.* **2009**, *37*, 322–329. [[CrossRef](#)]
10. Prüfer, J.; Schuchardt, M.; Tolle, M.; Prüfer, N.; Höhne, M.; Zidek, W.; van der Giet, M. Harmful Effects of the Azathioprine Metabolite 6-Mercaptopurine in Vascular Cells: Induction of Mineralization. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e101709. [[CrossRef](#)]
11. Lee, S.J.; Lee, I.-K.; Jeon, J.-H. Vascular Calcification—New Insights into Its Mechanism. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Voelkl, J.; Lang, F.; Eckardt, K.-U.; Amann, K.; Kuro, O.M.; Pasch, A.; Pieske, B.; Alesutan, I. Signaling pathways involved in vascular smooth muscle cell calcification during hyperphosphatemia. *Cell. Mol. Life Sci.* **2019**, *76*, 2077–2091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Sanchis, P.; Ho, C.Y.; Liu, Y.; Beltran, L.E.; Ahmad, S.; Jacob, A.P.; Furmanik, M.; Laycock, J.; Long, D.A.; Shroff, R.; et al. Arterial “inflammaging” drives vascular calcification in children on dialysis. *Kidney Int.* **2019**, *95*, 958–972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Benz, K.; Varga, I.; Neureiter, D.; Campean, V.; Daniel, C.; Heim, C.; Reimann, A.; Weyand, M.; Hilgers, K.F.; Amann, K. Vascular inflammation and media calcification are already present in early stages of chronic kidney disease. *Cardiovasc. Pathol.* **2017**, *27*, 57–67. [[CrossRef](#)]
15. Wen, C.; Yang, X.; Yan, Z.; Zhao, M.; Yue, X.; Cheng, X.; Zheng, Z.; Guan, K.; Dou, J.; Xu, T.; et al. Nalp3 inflammasome is activated and required for vascular smooth muscle cell calcification. *Int. J. Cardiol.* **2013**, *168*, 2242–2247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Kurozumi, A.; Nakano, K.; Yamagata, K.; Okada, Y.; Nakayamada, S.; Tanaka, Y. IL-6 and sIL-6R induces STAT3-dependent differentiation of human VSMCs into osteoblast-like cells through JMJD2B-mediated histone demethylation of RUNX2. *Bone* **2019**, *124*, 53–61. [[CrossRef](#)]
17. Alvarez-Leite, J.I.; dos Santos, L.C.; Costa, A.V.; Lopes, L.G.; Leonel, A.J.; Aguilar, E.C.; Noviello, M.D.L.M.; Ferrari, M.D.L. Combination of Azathioprine and Aminosalicilate Treatment Prevent Risk of Cardiovascular Disease in Women with Ulcerative Colitis by Reducing Inflammation. *Med. Sci. Monit.* **2015**, *21*, 2305–2315. [[CrossRef](#)]
18. Schuchardt, M.; Tölle, M.; Prüfer, J.; Prüfer, N.; Huang, T.; Jankowski, V.; Jankowski, J.; Zidek, W.; van der Giet, M. Uridine adenosine tetraphosphate activation of the purinergic receptor P2Y enhances in vitro vascular calcification. *Kidney Int.* **2012**, *81*, 256–265. [[CrossRef](#)]
19. Kim, D.H.; Bang, E.; Arulkumar, R.; Ha, S.; Chung, K.W.; Park, M.H.; Choi, Y.J.; Yu, B.P.; Chung, H.Y. Senoinflammation: A major mediator underlying age-related metabolic dysregulation. *Exp. Gerontol.* **2020**, *134*, 110891. [[CrossRef](#)]
20. Polifka, J.E.; Friedman, J. Teratogen update: Azathioprine and 6-mercaptopurine. *Teratology* **2002**, *65*, 240–261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Pols, T.W.; Bonta, P.I.; Pires, N.M.; Otermin, I.; Vos, M.; de Vries, M.R.; van Eijk, M.; Roelofsen, J.; Havekes, L.M.; Quax, P.H.; et al. 6-Mercaptopurine Inhibits Atherosclerosis in Apolipoprotein E*3-Leiden Transgenic Mice Through Atheroprotective Actions on Monocytes and Macrophages. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2010**, *30*, 1591–1597. [[CrossRef](#)]
22. Ligumsky, M.; Badaan, S.; Lewis, H.; Meirou, D. Effects of 6-mercaptopurine treatment on sperm production and reproductive performance: A study in male mice. *Scand. J. Gastroenterol.* **2005**, *40*, 444–449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kles, V.; Hyrien, O.; Poul, J.-M.; Sanders, P. Application of pharmacokinetic/pharmacodynamic and stochastic modelling to 6-mercaptopurine micronucleus induction in mouse bone marrow erythrocytes. *J. Appl. Toxicol.* **2003**, *23*, 59–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Platzek, T.; Schwabe, R. Combined prenatal toxicity of 6-mercaptopurine riboside and hydroxyurea in mice. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **1999**, *19*, 223–232. [[CrossRef](#)]
25. Chang, C.-Z.; Lin, C.-L.; Kassel, N.F.; Kwan, A.-L.; Howng, S.-L. 6-Mercaptopurine attenuates adhesive molecules in experimental vasospasm. *Acta Neurochir.* **2010**, *152*, 861–867. [[CrossRef](#)]
26. Furukawa, S.; Hayashi, S.; Usuda, K.; Abe, M.; Ogawa, I. The relationship between fetal growth restriction and small placenta in 6-mercaptopurine exposed rat. *Exp. Toxicol. Pathol.* **2011**, *63*, 89–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

27. Kanemitsu, H.; Yamauchi, H.; Komatsu, M.; Yamamoto, S.; Okazaki, S.; Uchida, K.; Nakayama, H. 6-Mercaptopurine (6-MP) induces cell cycle arrest and apoptosis of neural progenitor cells in the developing fetal rat brain. *Neurotoxicol. Teratol.* **2009**, *31*, 104–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Pires, N.M.; Pols, T.W.; de Vries, M.R.; van Tiel, C.M.; Bonta, P.I.; Vos, M.; Arkenbout, E.K.; Pannekoek, H.; Jukema, J.W.; Quax, P.H.; et al. Activation of Nuclear Receptor Nur77 by 6-Mercaptopurine Protects Against Neointima Formation. *Circulation* **2007**, *115*, 493–500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Cegiela, U.; Kaczmarczyk-Sedlak, I.; Pytlik, M.; Folwarczna, J.; Nowinska, B.; Fronczek-Sokol, J. Alendronate prevents development of the skeletal changes induced by azathioprine in rats. *Acta Pol. Pharm.* **2013**, *70*, 309–315. [[PubMed](#)]
30. Herrmann, J.; Babic, M.; Tölle, M.; van der Giet, M.; Schuchardt, M. Research Models for Studying Vascular Calcification. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Heiss, A.; du Chesne, A.; Denecke, B.; Grötzinger, J.; Yamamoto, K.; Renné, T.; Jahnen-Dechent, W. Structural Basis of Calcification Inhibition by α 2-HS Glycoprotein/Fetuin-A. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 13333–13341. [[CrossRef](#)]
32. Vassalle, C.; Iervasi, G. New insights for matrix Gla protein, vascular calcification and cardiovascular risk and outcome. *Atherosclerosis* **2014**, *235*, 236–238. [[CrossRef](#)]
33. Byon, C.H.; Heath, J.M.; Chen, Y. Redox signaling in cardiovascular pathophysiology: A focus on hydrogen peroxide and vascular smooth muscle cells. *Redox Biol.* **2016**, *9*, 244–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Rea, I.M.; Gibson, D.S.; McGilligan, V.; McNerlan, S.E.; Alexander, H.D.; Ross, O.A. Age and Age-Related Diseases: Role of Inflammation Triggers and Cytokines. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 586. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Han, L.; Zhang, Y.; Zhang, M.; Guo, L.; Wang, J.; Zeng, F.; Xu, D.; Yin, Z.; Xu, Y.; Wang, D.; et al. Interleukin-1 β -Induced Senescence Promotes Osteoblastic Transition of Vascular Smooth Muscle Cells. *Kidney Blood Press. Res.* **2020**, *45*, 314–330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Burton, D.G.; Giles, P.J.; Sheerin, A.N.; Smith, S.K.; Lawton, J.J.; Ostler, E.L.; Rhys-Williams, W.; Kipling, D.; Faragher, R.G. Microarray analysis of senescent vascular smooth muscle cells: A link to atherosclerosis and vascular calcification. *Exp. Gerontol.* **2009**, *44*, 659–665. [[CrossRef](#)]
37. Xu, D.; Zeng, F.; Han, L.; Wang, J.; Yin, Z.; Lv, L.; Guo, L.; Wang, D.; Xu, Y.; Zhou, H. The synergistic action of phosphate and interleukin-6 enhances senescence-associated calcification in vascular smooth muscle cells depending on p53. *Mech. Ageing Dev.* **2019**, *182*, 111124. [[CrossRef](#)]
38. Acosta, J.C.; Banito, A.; Wuestefeld, T.; Georgilias, A.; Janich, P.; Morton, J.P.; Athineos, D.; Kang, T.-W.; Lasitschka, F.; Andriulis, M.; et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 978–990. [[CrossRef](#)]
39. Sprague, A.H.; Khalil, R.A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *78*, 539–552. [[CrossRef](#)]
40. Schuchardt, M.; Prüfer, N.; Tu, Y.; Herrmann, J.; Hu, X.-P.; Chebli, S.; Dahlke, K.; Zidek, W.; van der Giet, M.; Tölle, M. Dysfunctional high-density lipoprotein activates toll-like receptors via serum amyloid A in vascular smooth muscle cells. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 3421. [[CrossRef](#)]
41. Hénaut, L.; Massy, Z.A. New insights into the key role of interleukin 6 in vascular calcification of chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2018**, *33*, 543–548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Sun, M.; Chang, Q.; Xin, M.; Wang, Q.; Li, H.; Qian, J. Endogenous bone morphogenetic protein 2 plays a role in vascular smooth muscle cell calcification induced by interleukin 6 in vitro. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2017**, *30*, 227–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Yao, Y.; Watson, A.D.; Ji, S.; Boström, K.I. Heat Shock Protein 70 Enhances Vascular Bone Morphogenetic Protein-4 Signaling by Binding Matrix Gla Protein. *Circ. Res.* **2009**, *105*, 575–584. [[CrossRef](#)]
44. Callegari, A.; Coons, M.L.; Ricks, J.L.; Rosenfeld, M.E.; Scatena, M. Increased Calcification in Osteoprotegerin-Deficient Smooth Muscle Cells: Dependence on Receptor Activator of NF- κ B Ligand and Interleukin 6. *J. Vasc. Res.* **2014**, *51*, 118–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Tyson, K.L.; Reynolds, J.L.; McNair, R.; Zhang, Q.; Weissberg, P.L.; Shanahan, C.M. Osteo/Chondrocytic Transcription Factors and Their Target Genes Exhibit Distinct Patterns of Expression in Human Arterial Calcification. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2003**, *23*, 489–494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Lin, M.-E.; Chen, T.; Leaf, E.M.; Speer, M.Y.; Giachelli, C.M. Runx2 Expression in Smooth Muscle Cells Is Required for Arterial Medial Calcification in Mice. *Am. J. Pathol.* **2015**, *185*, 1958–1969. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Scatena, M.; Liaw, L.; Giachelli, C.M. Osteopontin: A multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2007**, *27*, 2302–2309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Giachelli, C.M.; Speer, M.Y.; Li, X.; Rajachar, R.M.; Yang, H. Regulation of Vascular Calcification. *Circ. Res.* **2005**, *96*, 717–722. [[CrossRef](#)]
49. Wada, T.; McKee, M.D.; Steitz, S.; Giachelli, C.M. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: Inhibition by osteopontin. *Circ. Res.* **1999**, *84*, 166–178. [[CrossRef](#)]
50. Speer, M.Y.; McKee, M.D.; Guldberg, R.E.; Liaw, L.; Yang, H.-Y.; Tung, E.; Karsenty, G.; Giachelli, C.M. Inactivation of the Osteopontin Gene Enhances Vascular Calcification of Matrix Gla Protein-deficient Mice. *J. Exp. Med.* **2002**, *196*, 1047–1055. [[CrossRef](#)]

51. Paloian, N.J.; Leaf, E.M.; Giachelli, C.M. Osteopontin protects against high phosphate-induced nephrocalcinosis and vascular calcification. *Kidney Int.* **2016**, *89*, 1027–1036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Takemura, A.; Iijima, K.; Ota, H.; Son, B.-K.; Ito, Y.; Ogawa, S.; Eto, M.; Akishita, M.; Ouchi, Y. Sirtuin 1 Retards Hyperphosphatemia-Induced Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2011**, *31*, 2054–2062. [[CrossRef](#)]
53. Gardner, S.E.; Humphry, M.; Bennett, M.R.; Clarke, M.C. Senescent Vascular Smooth Muscle Cells Drive Inflammation Through an Interleukin-1 α -Dependent Senescence-Associated Secretory Phenotype. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2015**, *35*, 1963–1974. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Zhang, X.; Li, Y.; Yang, P.; Liu, X.; Lu, L.; Chen, Y.; Zhong, X.; Li, Z.; Liu, H.; Ou, C.; et al. Trimethylamine-N-Oxide Promotes Vascular Calcification Through Activation of NLRP3 (Nucleotide-Binding Domain, Leucine-Rich-Containing Family, Pyrin Domain-Containing-3) Inflammasome and NF- κ B (Nuclear Factor κ B) Signals. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2020**, *40*, 751–765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Russell, W.M.S.; Burch, R.L. *The Principles of Humane Experimental Technique*; Methuen & Co Ltd.: London, UK, 1959.
56. Otto, G.M.; Franklin, C.L.; Clifford, C.B. Biology and Diseases of Rats. *Lab. Anim. Med.* **2015**, 151–207. [[CrossRef](#)]

V. Untersuchung der Bedeutung des Stressor-induzierten „Inflammaging“, ausgelöst über die Aktivierung des Nlrp3 Inflammasoms, auf die Genese der MAC

Originalarbeit: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2021.752305/full>

“Stressor-induced “inflammaging” of vascular smooth muscle cells via Nlrp3-mediated pro-inflammatory auto-loop”

Frontiers in Cardiovascular Medicine, 2021, 8, 752305, DOI 10.3389/fcvm.2021.752305

Herrmann, J., Xia, M., Gummi, M.R., Greco, A., Schacke, A., van der Giet, M., Tölle, M., **Schuchardt, M.**

Obwohl verschiedene Signalkaskaden in die Induktion und Aufrechterhaltung des SASP involviert sind, kommt dem Nlrp3 Inflammasom, als intrazellulärem PRR in vaskulären Zellen, eine zentrale Bedeutung in der MAC Pathogenese zu. Hinweise für einen ROS- und Nlrp3-abhängigen Signalweg zeigte bereits Arbeit IV. Das Ziel der Arbeit V war es, die Stressor-induzierte Aktivierung des Nlrp3 Inflammasoms und die Rolle des Effektor-Zytokins Il-1 β auf die MAC Pathogenese weiter zu untersuchen. Hierfür wurde ein weiterer bekannter ROS Induktor in VSMC, das Anthrazyklin Doxorubicin, verwendet. Die Ergebnisse zeigten, dass ROS, DNA-Schäden und eine OBP-Transformation durch Doxorubicin induziert werden. Die Induktion der Kalzifizierung ist hierbei abhängig vom Nlrp3 Inflammasom, das zur anhaltenden inflammatorischen Reaktion durch die Sekretion von Il-1 β aus den VSMC führt. Il-1 β hält unabhängig vom initialen Auslöser die pro-inflammatorische Situation aufrecht, da durch eine Auto-Stimulation des Nlrp3 Inflammasoms die eigene Expression induziert werden kann. Die Inhibition von Nlrp3 vermindert die Mineralisierung im *in vitro* und *ex vivo* Modell.

Stressor-induzierte zelluläre Schäden scheinen zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems, insbesondere von PRR, zu führen, die ihrerseits relevante Veränderungen der zellulären Funktion nach sich ziehen. Die ROS-abhängige Aktivierung des Nlrp3 Inflammasoms induziert die Il-1 β Sekretion. Diese verstärkt die zelluläre Seneszenz und den pro-inflammatorischen SASP, was mit einer OBP-Transformation und Kalzifizierung einhergeht. Damit konnte ein zentraler Mechanismus identifiziert werden, über den viele Stressoren, wie beispielsweise DAMP/Alarmine oder ROS-Induktoren, die Funktion der VSMC nachhaltig beeinflussen können. Eine Inhibition von PRR könnte daher eine neuartige Therapieoption für die Reduktion der Kalzifizierung der Gefäßwand darstellen. In diesem Zusammenhang stehen bereits sowohl Inhibitoren des SASP als auch Il-1 β -bindenden Antikörper zur Anwendung im Menschen zur Verfügung. Deren Untersuchung auf den Einfluss der MAC Pathogenese könnte vielversprechend sein, um die kardiovaskuläre Mortalität von Patienten mit chronischem „Inflammaging“ zu senken.



Stressor-Induced “Inflammaging” of Vascular Smooth Muscle Cells via Nlrp3-Mediated Pro-inflammatory Auto-Loop

Jaqueline Herrmann^{1,2}, Mengdi Xia^{1,3}, Manasa Reddy Gummi¹, Anna Greco¹, Annika Schacke¹, Markus van der Giet^{1*}, Markus Tölle¹ and Mirjam Schuchardt¹

¹ Department of Nephrology and Medical Intensive Care, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Cooperate Member of Freie Universität and Humboldt Universität, Berlin, Germany, ² Department of Chemistry, Biochemistry and Pharmacy, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany, ³ Department of Nephrology, Second Clinical Medical Institution of North Sichuan Medical College (Nanchong Central Hospital), Nanchong, China

OPEN ACCESS

Edited by:

Masuko Ushio-Fukai,
Augusta University, United States

Reviewed by:

Delphine Gomez,
University of Pittsburgh, United States
David Anthony Tullis,
The Brody School of Medicine at East
Carolina University, United States
Margreet R. De Vries,
Leiden University Medical
Center, Netherlands

*Correspondence:

Markus van der Giet
markus.vandergiet@charite.de

Specialty section:

This article was submitted to
Atherosclerosis and Vascular
Medicine,
a section of the journal
Frontiers in Cardiovascular Medicine

Received: 02 August 2021

Accepted: 29 November 2021

Published: 20 December 2021

Citation:

Herrmann J, Xia M, Gummi MR,
Greco A, Schacke A, van der Giet M,
Tölle M and Schuchardt M (2021)
Stressor-Induced “Inflammaging” of
Vascular Smooth Muscle Cells via
Nlrp3-Mediated Pro-inflammatory
Auto-Loop.
Front. Cardiovasc. Med. 8:752305.
doi: 10.3389/fcvm.2021.752305

Calcification of the vessel wall as one structural pathology of aged vessels is associated with high cardiovascular mortality of elderly patients. Aging is linked to chronic sterile inflammation and high burden of reactive oxygen species (ROS), leading to activation of pattern recognition receptors (PRRs) such as Nlrp3 in vascular cells. The current study investigates the role of PRR activation in the calcification of vascular smooth muscle cells (VSMCs). Therefore, *in vitro* cell culture of primary rat VSMCs and *ex vivo* aortic stimulations were used to analyze osteogenic, senescence and inflammatory markers via real-time PCR, *in situ* RNA hybridization, Western Blot, photometric assays and histological staining. Induction of ROS and DNA-damage by doxorubicin induces a shift of VSMC phenotype toward the expression of osteogenic, senescence and inflammatory proteins. Induction of calcification is dependent on Nlrp3 activity. Il-1 β as a downstream target of Nlrp3 induces the synthetic, pro-calcifying VSMC phenotype. Inhibition of PRR with subsequent reduction of chronic inflammation might be an interesting target for reduction of calcification of VSMCs, with subsequent reduction of cardiovascular mortality of patients suffering from vessel stiffness.

Keywords: calcification, senescence, inflammation, Nlrp3, smooth muscle cell

INTRODUCTION

Cardiovascular disease (CVD) is the most critical age-related cause of death. Almost 70% of patients with new CVD are over 75 years old, so that the age might be the most prominent cardiovascular risk factor (1). One sign of structural pathology of the vessel wall associated with vascular aging is medial calcification, leading to increased vessel stiffness and pulse-wave velocity (2, 3). Medial calcification is common in patients with other comorbidities as e.g., chronic kidney disease (CKD) (2, 4, 5). Until now, no therapy exists to effectively reduce the increased cardiovascular risk associated with vessel calcification (3).

In particular involved in calcification of the medial layer of the vessel wall is the accumulation of senescent vascular smooth muscle cells (VSMCs) with a senescence-associated secretory phenotype (SASP) (6). Senescent cells express typical senescence markers [e.g., p53/p21, lysosomal senescence-associated β -galactosidase activity (SA- β -Gal), γ H2A.X], and show an increased

vulnerability to exogenous stressors (7–9). VSMCs physiologically have a contractile phenotype and express specific VSMC marker proteins (e.g., SM22 α , Myh11, Cnn1, Acta2). Due to phenotype plasticity, VSMCs can adapt an osteoblast-like phenotype characterized by decreased expression of VSMC markers and increased expression of osteoblast markers e.g., core binding factor alpha-1 (Cbfa-1), tissue non-specific alkaline phosphatase (Alp), osteopontin (Opn), and bone morphogenetic protein-2 (Bmp-2) (9, 10). Recently, Shanahan's group pointed out that the DNA damage-induced calcification is dependent on activation of Cbfa1 in VSMCs (11). They found Cbfa1 to be involved in DNA damage response and therefore bridging osteogenic transition and apoptosis in the mineralization process (11).

During physiological aging, a chronic sterile inflammation, known as “inflammaging,” develops. This “inflammaging” is primarily based on mechanisms of the innate immune system that involve activation of pattern recognition receptors (PRRs) (12, 13). PRRs are a link between inflammation and cellular senescence. PRRs are mainly transmembrane toll-like receptors (TLRs) and cytoplasmic Nod-like receptor (Nlr) inflammasomes (14). The Nlrp3 is the best characterized inflammasome and is expressed in VSMCs (15). The activation of Nlr inflammasomes induces the secretion of Il-1 cytokines e.g., Il-1 β (16). Il-1 β has strong pro-inflammatory effects by activating different Il-1 receptors (Il-1Rs). It induces the expression of other pro-inflammatory cytokines, especially Il-6, and can increase its own expression by a positive feedback mechanism (17). Cytokines and chemokines as major pro-inflammatory mediators can contribute to chronic inflammation and senescence (18).

Doxorubicin (DOX) is an anthracycline antitumor drug (19). DOX is known to induce several kinds of DNA damages by intercalation, generation of free radicals, DNA-binding, alkylation and cross-linking, DNA strands separation, influenced helicase activity and inhibition of topoisomerase II (19). Previous studies have not only investigated effects of DOX on stress-induced senescence (20) but also, induction of Alp activity upon DOX treatment; however, only after seven days of treatment (20). In addition, recent studies have shown the important role of DNA-damage response and the Cbfa1-dependent link to the calcification process of VSMCs (9, 11). Cobb et al. pointed out that the DNA damage-induced calcification is dependent on activation of Cbfa1 in VSMCs (11). They found Cbfa1 to be involved in DNA damage response and therefore bridging

osteogenic transition and apoptosis in the mineralization process (11).

However, there are no detailed studies on the relationship of stress-induced senescence as e.g., caused by DOX, subsequent activation of Nlrp3-dependent pro-inflammatory signaling and calcification in VSMCs. We aim to show that stressor-induced senescence in VSMCs results in a pro-inflammatory response and induction of calcification. Accordingly, we used DOX as stressor. We are aware that DOX might not reflect the whole spectrum of senescence induction in VSMCs; however, DNA damage, upregulated under treatment with DOX, is a known and well-documented inducer of cellular senescence (9, 11).

Therefore, the current study investigates the effects of the stressor DOX on the initiation of processes of acute “inflammaging” and vascular calcification. The increase in calcification upon DOX treatment was dependent on the activation of the Nlrp3 inflammasome. Il-1 β as Nlrp3 downstream effector amplifies its own expression. The initial stressor-induced acute “inflammaging” process then can be continued via a Nlrp3 inflammasome-mediated auto-inflammatory loop resulting in SASP and calcification of VSMCs.

MATERIALS AND METHODS

All cell culture components were obtained from Biochrom AG and Bio and Sell. DOX was obtained from Thermo Fisher. Recombinant rat Il-6 and Il-1 β were purchased from PeproTech. VAS2870 was obtained from Sigma Aldrich and MCC950 from Invivogen. Tiron was purchased from Biozol and TAK242 from Biomol.

Animals

All experiments with animals were done under minimal animal suffering and in accordance with the EU Directive 2010/63/EU. The experiments were approved by the Landesamt fuer Gesundheit und Soziales Berlin (T0211/02), Germany and the Charité - Universitätsmedizin Berlin, Germany.

Wistar rats were purchased from Janvier Labs. Nlrp3^{-/-} and Nlrp3^{+/+} (genetic background: C57BL/6) were bred at the Charité-Universitätsmedizin Berlin animal facility.

Euthanasia of animals was accomplished with intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (rats: 400 mg/kg body weight, mice: 200 mg/kg body weight).

VSMCs Cell Culture

Primary rat VSMCs from aortic tissue (aortic arch and thoracic aorta) of Wistar rats (mean age 4 months, male/female) were cultured by the outgrowth technique described previously (21). VSMCs at passages 3 to 7 were used for experiments. Cells were cultured in a humidified incubator at 37°C with 5% carbon dioxide. If not stated otherwise, VSMCs were cultured in Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) containing 1 g/l glucose, supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (0.1 mg/ml) (culture medium). For gene expression, ROS detection, protein secretion and immunohistology experiments, cells were serum-starved for

Abbreviations: Acta2, Actin alpha 2; Alp, Alkaline Phosphatase; Asc, Apoptosis-Associated Speck-like Protein Containing a Caspase-Recruitment Domain; ATM, Ataxia-Telangiectasia Mutated; BCA, Bicinchonnic Acid; Bmp-2, Bone Morphogenetic Protein-2; Calc M, Calcification Medium; Cbfa-1, Core Binding Factor alpha 1; Cnn1, Calponin; Ctrl M, Control Medium; CVD, Cardiovascular Disease; DAMP, Damage Associated Molecular Pattern; DHE, Dihydroethidium; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; DOX, Doxorubicin; FCS, Fetal Calf Serum; Il-1 β , Interleukin 1 β ; Il-6, Interleukin 6; Myh11, Myosin Heavy Chain 11; Nlr, Nod-like Receptor; Nlrp3, Nod-like receptor family pyrin domain containing 3; Opn, Osteopontin; PBS, Phosphate Buffered Saline; PRRs, Pattern Recognition Receptors; ROS, Reactive Oxygen Species; Tlr, Toll-like Receptor; SA- β -Gal, Senescence Associated β -Galactosidase; SASP, Senescence Associated Secretory Phenotype; Sm22 α , Smooth Muscle Protein 22-alpha; VSMCs, Vascular Smooth Muscle Cells.

24 h and stimulated using DMEM with 4.5 g/l glucose (w/o phenol red), supplemented with 1% glutamine, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (0.1 mg/ml).

Preparation of Aortic Rings for *ex vivo* Experiments

For *ex vivo* stimulation of aortic tissue, the adventitia was removed. Thoracic aortas of rats (mean age 4 months, male) or *Nlrp3*^{-/-} and *Nlrp3*^{+/+} mice (mean age 11 months, male/female) were dissected into aortic rings of equal size and incubated in a well-plate with the respective stimulation medium for 24 h or 14 days, respectively. Each stimulation contained several aortic rings from different aortic parts (aortic arch, different segments of descending aorta proximal to distal), which were equally distributed between stimulation and respective controls. The incubation procedure of the tissue took place in a humidified incubator at 37°C and 5% carbon dioxide.

In vitro and *ex vivo* Calcification

Calcification was induced by exposing VSMCs or aortic rings (rat and mice) to DMEM containing 4.5 g/l glucose, supplemented with 15% FCS, 284 μmol/l ascorbic acid and 5 mmol/l inorganic phosphate, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (0.1 mg/ml) [Calcification Medium (Calc M)]. As Control Medium (Ctrl M) served DMEM containing 4.5 g/l glucose, supplemented with antibiotics. Calcification was induced over 14 days of stimulation with Ctrl M, Calc M and in co-stimulation with DOX (10 or 100 nmol/l), Il-6 (100 ng/ml), Il-β (100 ng/ml) and MCC950 (50 μmol/l). Medium was replaced every two to three days.

Gene Expression

VSMCs were serum-starved for 24 h prior to stimulation for 48 h. Cells were washed after stimulation with phosphate buffered saline (PBS) on ice and lysed with RLT™ cell lysis buffer (Qiagen). RNA was isolated according to the RNeasy™ Mini kit protocol (Qiagen). The RNA was reverse transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit™ (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. For the quantitative determination of mRNA expression, the iQ™ SYBR Green SuperMix and the CFX384 real-time PCR detection system (Biorad, CFX software version 3.1) were used. The oligonucleotides (**Supplementary Table 1**) were synthesized by TibMolBiol. Each sample was performed as technical duplicate for real-time PCR. β-actin and Gapdh were used as housekeeper genes for normalization. Analysis was performed with the ΔΔCT-method.

Measurement of Alp Activity

After stimulation, VSMCs were lysed and scraped in 0.2% Triton X/PBS lysis buffer. Alp activity was assessed using a p-nitrophenyl phosphate-based Alp Assay Kit (Abcam) according to the manufacturer's recommendations. Protein content was determined with the bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Pierce) and was used for normalization. Photometric measurements were conducted with a Multiskan Spectrum (Thermo Electron Corporation).

Quantification of Calcium Content

For quantification of calcification, VSMCs or aortic rings were decalcified in 0.6 mol/l HCl overnight or for 24 h, respectively. After decalcification, cells were washed with PBS and lysed in 0.1 mol/l NaOH/0.1% SDS buffer. The protein content was quantified using BCA protein assay kit (Pierce). Aortic rings were dried and weighed. Calcium content was quantified using the colorimetric o-cresolphthalein method (Colorimetric Calcium Assay, ScienCell) according to the manufacturer's recommendation. Photometric measurements were conducted with a Multiskan Spektrum (Thermo Electron Corporation). Protein content (*in vitro*) or aortic dry weight (*ex vivo*) was used for normalization, respectively.

Histological Staining of Calcium Deposits

Upon stimulation of VSMCs for 14 days, the cells were fixed with 4% buffered formaldehyde, washed with PBS and distilled deionized water and treated with Alizarin Red solution (2%, pH 4.2) for 20 min, then washed again and imaged.

Upon stimulation of aortic rings for 14 days, the tissue was fixed overnight, transferred to 70% ethanol, and embedded in paraffin via automatic procedure. The aortas were serially cut into 4 μm sections, stained with Alizarin Red solution (0.5%, pH 4.2) and imaged. For all histological imaging, the Axiovert 200M microscope (Zeiss) with Zen2 software (Blue edition, Zeiss) was used.

ROS Staining

VSMCs were seeded in 8-well slides (LabTec, Thermo Fisher, μ-slide, Ibidi), serum-starved for 24 h, and stimulated for 30 min as indicated. Afterwards, cells were washed and treated with 30 μmol/l dihydroethidium (DHE) (Molecular Probes) for 30 min. Cells were fixed with cold formalin (4%) for 5 min and subsequently washed with PBS. LabTec were mounted with ProLong™ Gold antifade mount (Thermo Fisher) and stored in the dark until imaging. For μ-slides, wells were covered with PBS and immediately imaged. A more detailed description of the staining procedure and data analysis can be found in the **Supplementary Material**. For all imaging of fluorescence stainings, an Axiovert 200M microscope (Zeiss) with Zen2 software (Blue edition, Zeiss) was used.

Immunohistology and mRNA *in situ* Staining

VSMCs were stained for SA-β-Gal activity, histone γH2A.X, Bmp-2, Opn and p21 mRNA according to a previously published protocol (22) with some modifications. Briefly, cells were seeded in 8-well LabTec chamber slides (Thermo Fisher) or μ-slide (Ibidi), serum-starved for 24 h and stimulated for 48–72 h. Cells were stained for the desired target and imaged. A more detailed description of the staining procedure and data analysis can be found in the **Supplementary Material**. Quantification of fluorescence intensity was done with Zen2 (Blue edition, Zeiss) and Fiji/ImageJ.

Western Blot

VSMCs were stimulated with DOX (500 and 1,000 nmol/l) and Il-1 β (100 ng/ml) in cell culture medium for 48 h. For protein extraction, cells were washed with ice-cold PBS and lysed in cold RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific). Protein content was assessed with BCA protein assay kit (Pierce). 15–10 μ g protein per lane (p21: 15 μ g, all others 10 μ g) was applied on the respective gel. Protein samples were mixed and dissolved in 4 \times Laemmli buffer (Biorad) and heated to 95°C for 15 min. The proteins were separated on 12% TGX Gels (Biorad) and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane. The membranes were immunoblotted overnight at 4°C with primary antibodies: rabbit anti-p21 (1:2,500, ab109199, Abcam), rabbit anti-Alp (1:500, 7H11L3, Invitrogen), rabbit anti-Cbfa1 (1:1,100, sc-10758, Santa Cruz), and mouse anti- β -actin (1:5,000 8H10D10, Cell Signaling Technology). After washing five times for five min each with TBST, the membranes were incubated with conjugated fluorescent secondary antibodies [anti-rabbit-StarBright Blue700 (1:2,500, #12004162, Biorad) and anti-mouse-StarBright Blue520 (1:2,500, #12005867)]. The bands were visualized using a ChemiDoc MP Imaging System (Biorad).

Luminex™

VSMCs were serum-starved for 24 h prior to stimulation with Il-1 β (100 ng/ml) and respective antagonists [VAS2870 (10 μ M), MCC950 (50 μ M), Tiron (10 mM), TAK242 (10 μ M)] for 48 h. Rat aortic rings were stimulated with DOX (1000 nmol/l) and MCC950 (50 μ M) for 24 h. After stimulation, supernatant was collected for cytokine quantification. Cytokine concentrations in the supernatant were determined using the Milliplex™ Cytokine Kit (Millipore) according to the manufacturer's instructions. Measurements were conducted using the Bio-Plex device and respective Bio-Plex software (version 6.1, Biorad). Cells were washed with cold PBS and lysed in NP40 buffer, followed by protein quantification using BCA protein assay kit (Pierce). Aortic rings were dried and weighed for normalization.

Statistical Analysis

Data are provided as mean \pm SEM of at least 3 independent experiments. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (version 6.0). The one-way Anova with multiple comparisons or Wilcoxon matched paired test were applied to evaluate differences between treatment groups. A *p*-value < 0.05 was considered as statistically significant.

RESULTS

Stressor-Induced Calcification With Osteogenic Transition

Stimulation with calcifying medium robustly induced calcification of VSMCs after 14 d (Figure 1A). Co-stimulation with DOX significantly and dose-dependently reinforced calcification of VSMCs *in vitro*: quantification (Figure 1A) shows a significant and dose-dependent induction of calcification under co-stimulation of calcification medium and DOX. This is also visualized by Alizarin Red staining (Figure 1B). To confirm

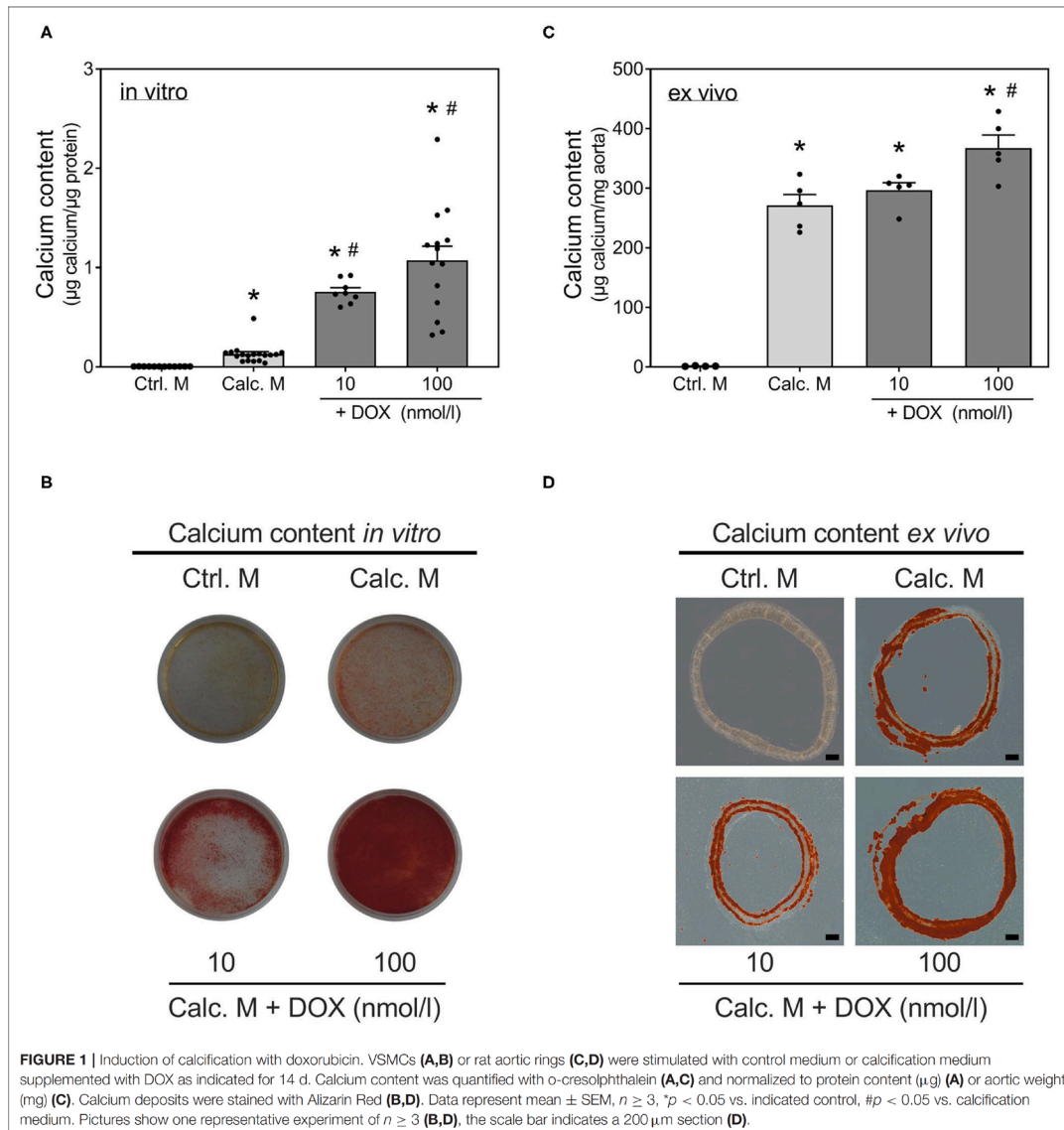
these *in vitro* findings, an *ex vivo* setting using aortic rings was conducted. Calcium content of rat aortic rings was quantified upon 14 d of stimulation, and calcification was visualized via Alizarin Red staining (Figures 1C,D). DOX stimulation in calcifying medium dose-dependently increases calcium deposition *ex vivo*.

Further evidence for the pro-calcifying potential of DOX derives from mRNA detection of osteogenic markers as Bmp-2, Cbfa1 and Opn, all of them significantly increased upon DOX stimulation. VSMC marker as Acta2, Cnn1, Myh11, and SM22 α slightly, but not significantly, decreased under stimulation with DOX (Figure 2A). The osteogenic transition is further confirmed by detection of Alp activity increase upon DOX treatment (Figure 2B). The induction of calcification markers after stimulation with DOX was confirmed by *in situ* hybridization analysis for Bmp-2 and Opn. Both markers were visualized via fluorescence staining and quantified by counting signal dots per whole image (Figure 2C). Although DOX influences cell behavior and growth, the cytotoxicity of DOX in our cell model did not reach statistical significance in the used setting (Supplementary Figure 1).

Stressor-Induced Induction of “Inflammaging”

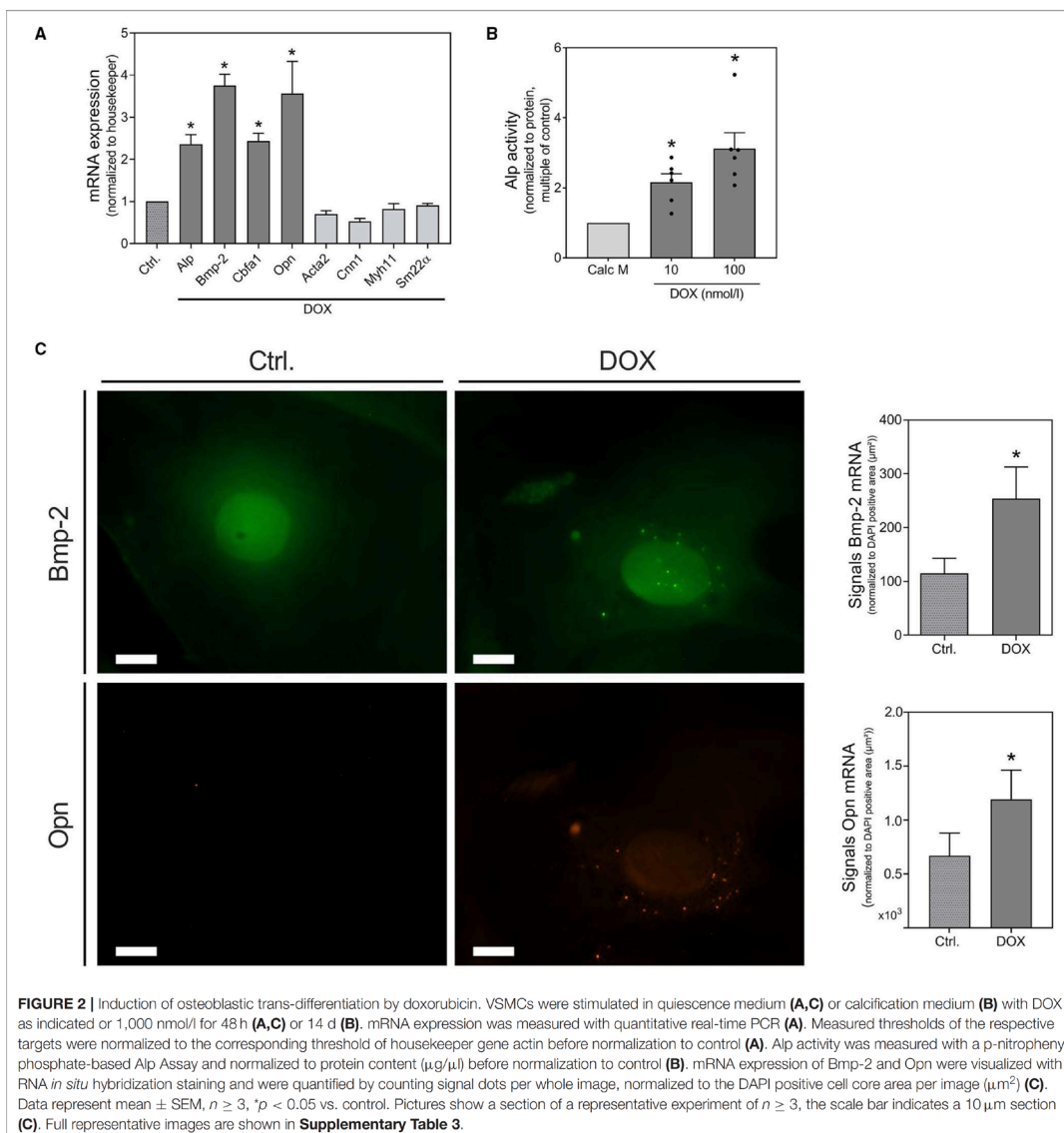
Il-1 β and Il-6 are known essential components of the SASP (23). Therefore, we investigated the effect of DOX on the expression of both cytokines. DOX induced Il-1 β and Il-6 mRNA expression in VSMCs (Figure 3A). It is already known from the literature that the Nlrp3 inflammasome is involved in the phenotype switching of VSMCs and in Il- β production (15). Therefore, we measured the mRNA expression of Nlrp3, its cofactor Asc and the associated enzyme caspase-1 that cleaves the preform of Il-1 β (pre-Il-1 β) into active Il-1 β . The mRNA expression of all three proteins was significantly increased upon DOX stimulation (Figure 3A). Also, the secretion of Il-1 β was significantly upregulated after DOX stimulation, while no significant secretion of Il-6 was found upon DOX treatment. The DOX-induced Il-1 β secretion was reduced by co-stimulation with Nlrp3 inhibitor MCC950 (Figure 3B). As Il-1 β and Il-6 are both components of the SASP, we tested the pro-calcifying potential of both substances and found Il-1 β to significantly induce calcification, whereas Il-6 did not exhibit calcifying potential in our model (Figure 3C). To validate the role of the Nlrp3 inflammasome for calcification, we used an *ex vivo* setting with aortic rings from Nlrp3^{-/-} and respective control mice (Nlrp3^{+/+}). While DOX significantly induced aortic calcification in Nlrp3^{+/+}, the effect is lost in aortas from Nlrp3^{-/-} mice (Figure 3D).

To further verify the involvement of Il-1 β as effector molecule of the Nlrp3 inflammasome and of Il-6, we investigated their effect on mRNA expression of inflammation, senescence and calcification markers using real-time PCR and *in situ* hybridization. Il-1 β significantly induces the expression of Il-6 and, in the context of a very potent pro-inflammatory auto-loop, Il-1 β itself. In addition, Il-1 β induces the expression of Nlrp3 (Figure 4A). Upon Il-1 β treatment, VSMCs release



Il-6 (Figure 4B). While the Il-1 β -induced expression of the osteogenic marker Bmp-2 increased, the VSMCs marker SM22 α , Acta2, and Cnn1 decreased upon Il-1 β (Figure 4C). The increased mRNA expression of Bmp-2 upon Il-1 β stimulation was confirmed by *in situ* hybridization technique. While for Opn mRNA expression via real-time PCR no significant effect could be detected, the *in situ* hybridization found a slight induction (Figure 4D).

As already shown in Figures 1–4, both DOX and Il-1 β induce several markers of calcification. In addition, the protein expression of Cbfa1 and Alp, detected via Western Blot, is increased upon DOX and Il-1 β , respectively (Figures 5A,B). However, the effects of Il-1 β and DOX on senescence markers differ in our experimental model. As shown in Figure 5C, ROS (superoxide production) is significantly increased by DOX and Il-1 β . ROS are one inducer of DNA damage, which can

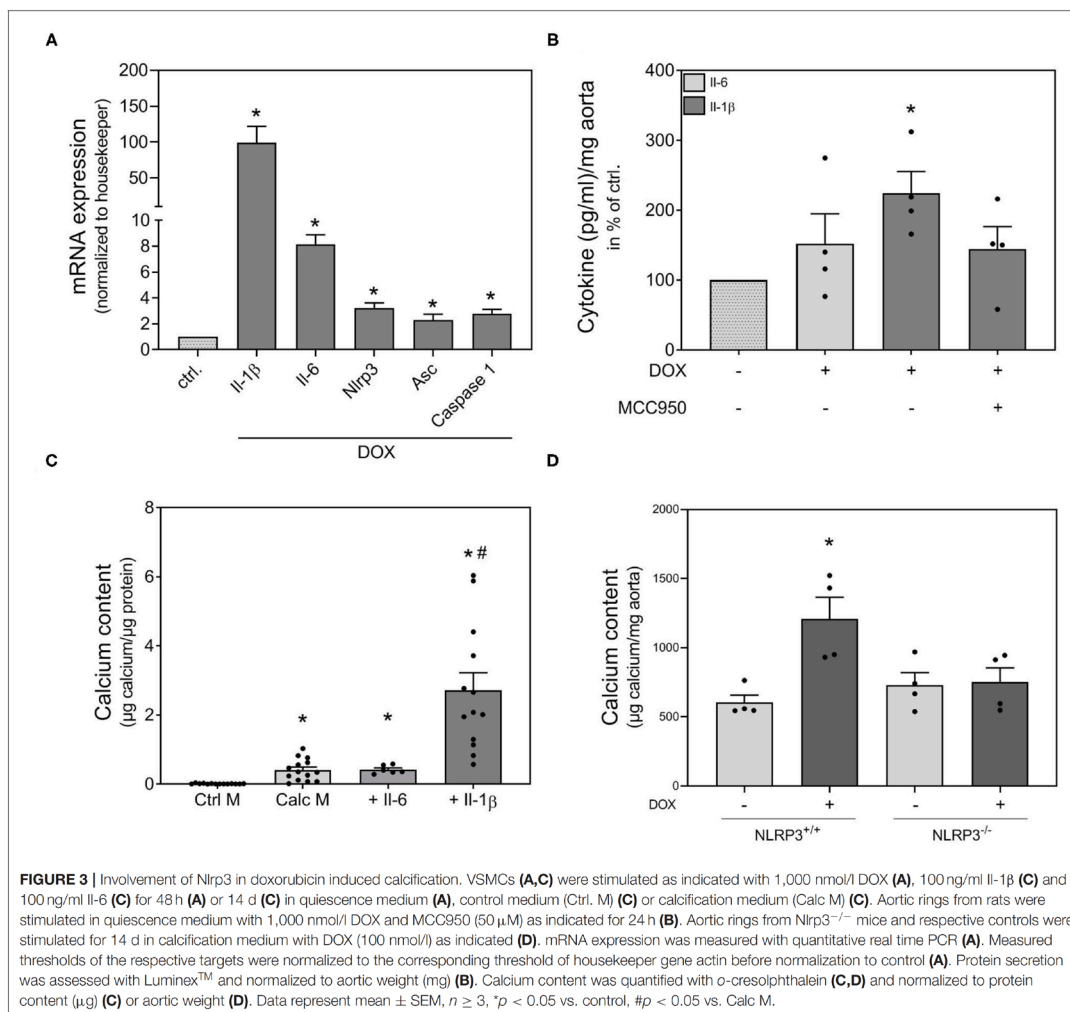


result in double-strand DNA breaks. A marker of double-strand DNA breaks, the formation of $\gamma\text{H2A.X}$, was significantly increased upon DOX treatment, while it is not affected by $\text{Il-1}\beta$ stimulation (Figure 5C). In line, while DOX stimulation results in upregulated expression of the senescence markers p21 and SA- β -Gal, both were not induced by $\text{Il-1}\beta$ (Figure 5C). This could be confirmed by p21 protein detection via Western Blot (Figure 5D). mRNA detection via real-time PCR confirmed

the findings of increased p21 mRNA expression upon DOX (Figure 5E) and no effect on p21 expression upon $\text{Il-1}\beta$ treatment (Figure 5F). Neither DOX nor $\text{Il-1}\beta$ induced p16 mRNA expression in our cell model (Figures 5E,F).

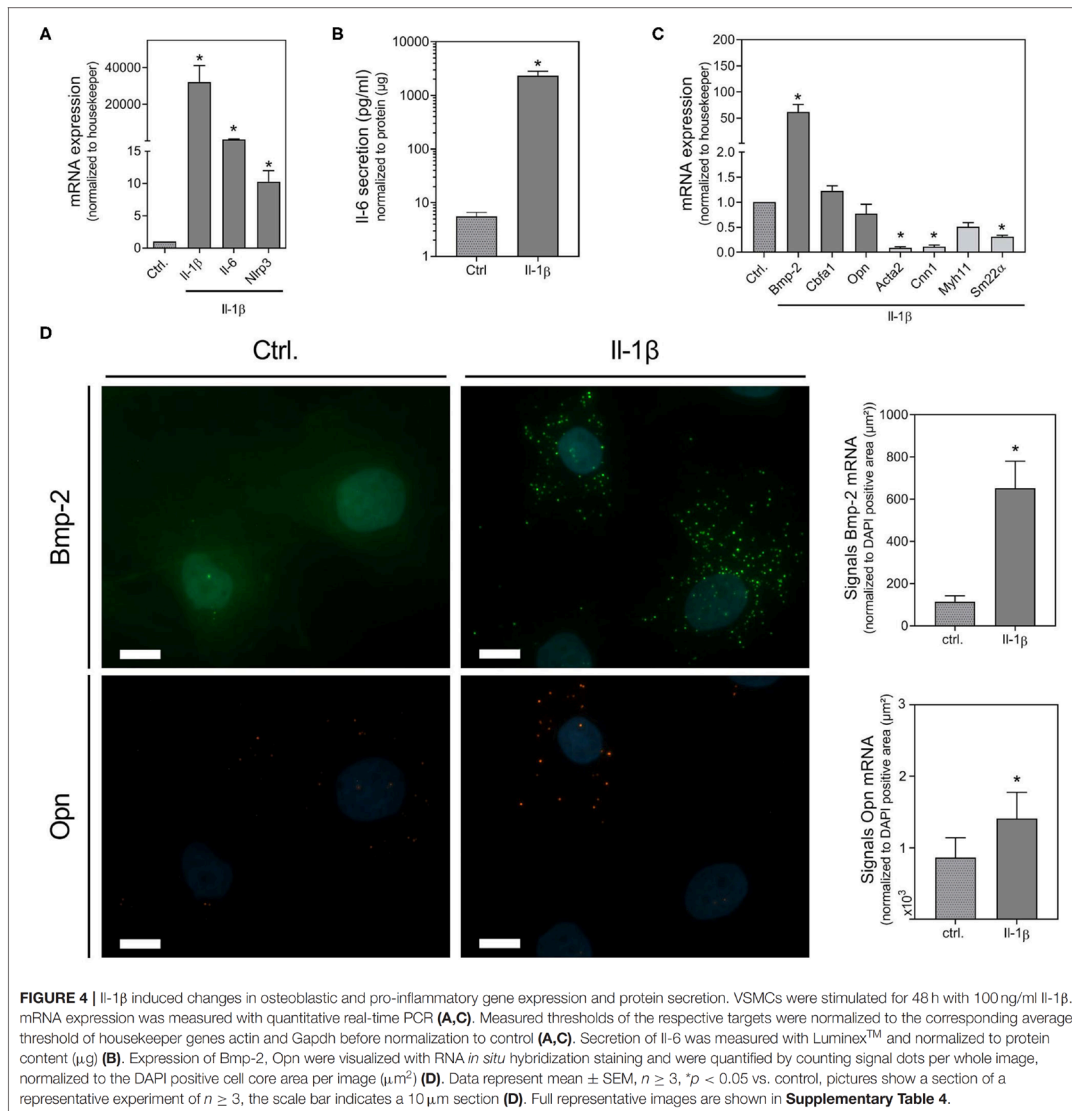
Involved Signaling Pathway

As $\text{Il-1}\beta$ strongly stimulates its own expression, we tested possible mediators of the signaling pathway involved in $\text{Il-1}\beta$ -induced



SASP activation. A schema of the Nlrp3 inflammasome activation and the therefore used antagonists is provided in **Figure 6A**. MCC950 was used as Nlrp3 inhibitor. It is already known from the literature that Tlrs work as one initial stimulus for Nlrp3 assembly and that the activation of Tlr2 and Tlr4 are involved in Il-1 β release (24, 25). A previous study by our own working group has shown that the Tlr4 is constitutively active in our VSMCs cell model, whereas the Tlr2 is subsequently activated (26). Therefore, we tested the Tlr4 inhibitor TAK242. As increased ROS production serves as second stimulus for Nlrp3 activation (25), we also tested tiron as ROS scavenger. In VSMCs, the NADPH oxidase is one of the leading ROS producers (27). Therefore, the Nox1 inhibitor VAS2870 was also used.

Both, Tlr2 as well as Tlr4 expression (first stimulus) and Nox1 expression (second stimulus), were induced in VSMCs upon Il-1 β stimulation (**Figure 6B**). Both signals for Nlrp3 assembly could be significantly diminished by co-treatment with VAS2870 and tiron (**Figures 6C,D**). Nlrp3 mRNA expression itself was also diminished by tiron and MCC950 co-treatment, while VAS2870 and TAK242 have no significant effect (**Figure 6E**). Downstream, the Il-1 β expression is significantly blocked by VAS2870, tiron, TAK242, and MCC950 (**Figure 6F**). The secretion of Il-6 could be significantly reduced by inhibition of ROS via tiron and Nlrp3 inhibition via MCC950 (**Figure 6G**). To verify the role of the Nlrp3-dependent pathway, we also tested Nlrp3 inhibition with MCC950 for calcification as endpoint. As shown in **Figure 6H**,



both the DOX- and Il- β -induced calcifications are significantly inhibited by MCC950 co-treatment.

DISCUSSION

In the current study, we investigated the effect of ROS induction, DNA damage, and inflammation on the process of cellular senescence and calcification in *in vitro* and *ex vivo* models using rat VSMCs and thoracic aortas from rats and mice. After

induction of ROS and DNA-damage by the primary stressor, the Nlrp3 inflammasome is activated with a subsequent auto-inflammatory loop driven by its effector molecule Il-1 β .

As primary stressor molecule for VSMCs the anthracycline DOX was used. It has already been shown in literature that DOX causes DNA damage via induction of double strand breaks and ROS and promotes cellular senescence (20). Bielak-Zmijewska et al. investigated several markers of senescence in VSMCs upon DOX treatment (20). Although DOX might not

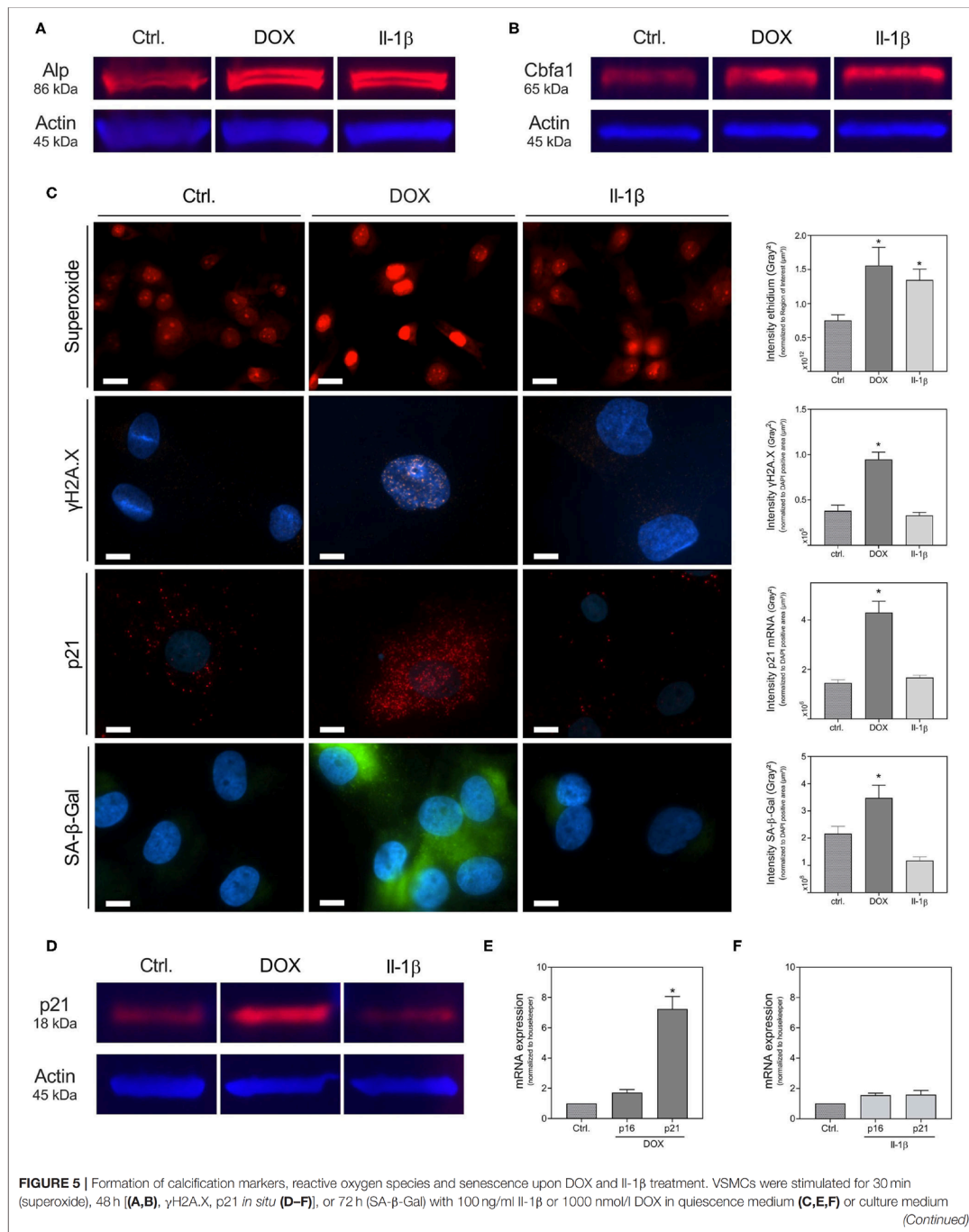
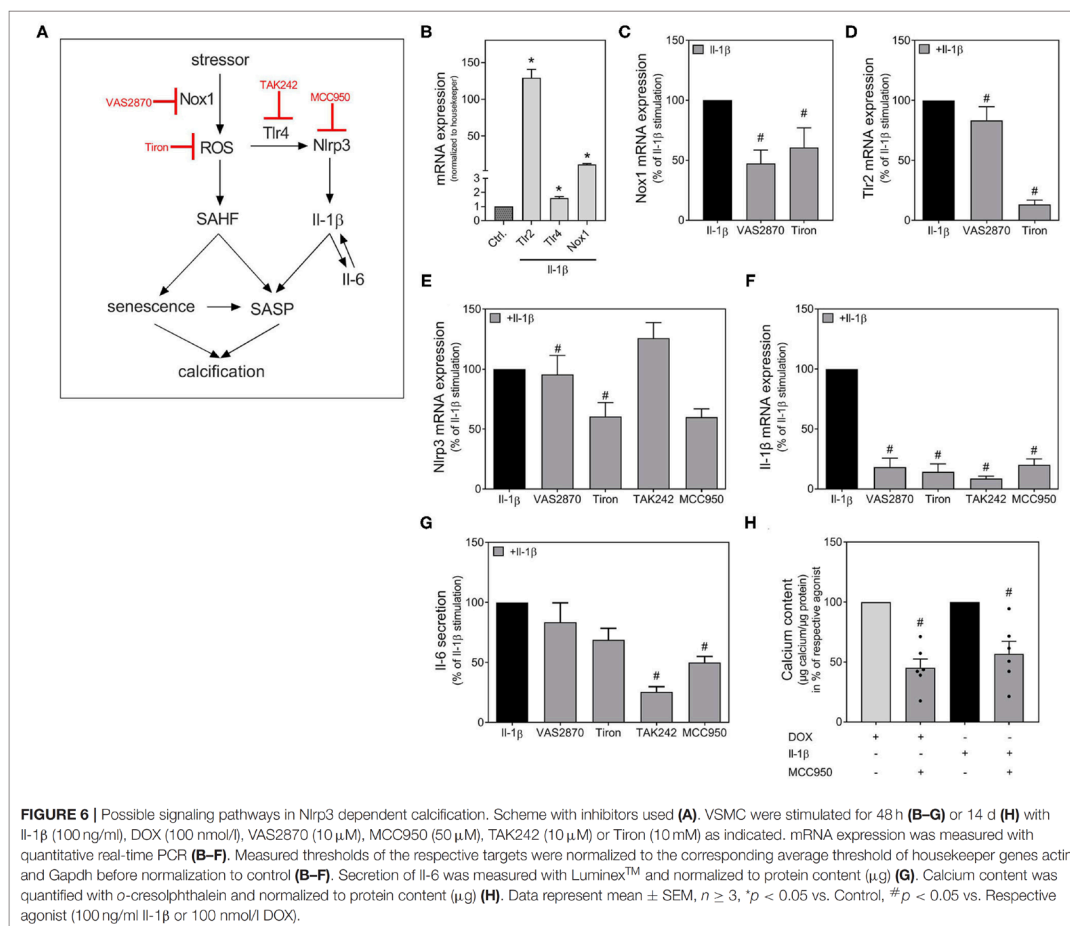


FIGURE 5 | (A,B,D). Formation of superoxide was assessed with DHE, expression of γ H2A.X was analyzed immunohistochemically, mRNA expression of p21 was assessed with RNA *in situ* hybridization and formation of SA- β -Gal was assessed with Spider staining **(C)**. For quantification of the expression of γ H2A.X, mRNA expression of p21 and formation of SA- β -Gal, intensity of the respective fluorescence signal was measured after application of a threshold procedure as described in the supplement and the signal intensity then normalized to the DAPI positive cell core area per image (μm^2). For quantification of DHE, regions of interest were detected with a threshold procedure as described in the supplement and measured intensity was normalized to the area of interest detected by the threshold procedure. Alp protein, Cbfa1 protein and p21 protein were assessed with Western Blot **(A,B,D)**. mRNA expression was measured with quantitative real-time PCR **(E,F)**. Measured thresholds of the respective targets were normalized to actin **(E)** or the corresponding average threshold of housekeeper genes actin and Gapdh **(F)** before normalization to control. Data represent mean \pm SEM, $n \geq 3$, $^*p < 0.05$ vs. Control. The Western Blots show a representative experiment of $n = 3$. Full blots are shown in **Supplementary Figures 3–5**. Pictures show a section of a representative experiment of $n \geq 3$, the scale bar indicates a $10 \mu\text{m}$ section (γ H2A.X, p21, SA- β -Gal) or a $20 \mu\text{m}$ section (superoxide). Full representative images are shown in **Supplementary Tables 3–5**.



reflect the whole spectrum of senescence induction in VSMCs, DNA damage is a known and well-documented inducer of cellular senescence (9, 11). As shown recently by Shanahan's group, the formation of nuclei positive for γ H2A.X and ATM in VSMCs is induced by calcium phosphate and correlates with the induction seen by other DNA damagers as DOX

and hydrogen peroxide treatments (9). γ H2A.X is a marker of double-strand DNA breaks, which are specific domains of facultative heterochromatin that contribute to silencing of genes promoting proliferation in senescent cells and are one known marker of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF) (28). The phosphorylation of γ H2A.X by ATM is a

key response mechanism to DNA damage, which can result in the activation of senescence pathways, including p21 (29). In line, in our experimental model treatment with DOX also induces DNA damage as γ H2A.X and increases senescence markers p21 and SA- β -Gal. SA- β -Gal catalyzes the hydrolysis of β -galactosidase to monosaccharides in senescent cells. Cellular senescence is a dynamically regulated process, with activation of the p53/p21 and p16 pathways (30). In our experimental setting the p53/p21 pathway was upregulated by DOX, whereas p16 was not significantly affected (mRNA expression). While the senescence growth arrest via the p16 pathway seems not reversible, the p53-induced growth arrest is reversible upon p53 inactivation (31).

As in the previous study by Bielak-Zmijewska et al. only limited markers and only seven days of stimulation were investigated to study induction of calcification by DOX (20), we aimed to investigate DOX as primary stressor of DNA damage and senescence in order to analyze pro-inflammatory response and induction of calcification in VSMCs. In our experimental setting using primary VSMCs from rat thoracic aortas, DOX induces mineralization of VSMCs detected via calcium quantification and Alizarin Red staining after 14 days. The calcification induction was verified in an *ex vivo* setting using thoracic aortic rings. Analysis of the mRNA expression via real-time PCR and partly also *in situ* hybridization, enzyme activity and Western Blot confirmed the findings of osteogenic transformation of VSMCs; osteogenic markers as Cbfa1, Alp, Bmp-2, and Opn increase upon DOX treatment.

Senescent cells also have a metabolic active and pro-inflammatory phenotype termed as SASP. Cytokines of the Il-1 family and Il-6 are known to be part of this SASP (32). Furthermore, the induction of senescence by cytokines of the Il-1 family, e.g., Il-1 β was investigated in cell culture and animal models (33). A microarray study has shown that senescent VSMCs reveal differential regulation of Matrix Gla Protein, Bmp-2, Osteoprotegerin, and Il-1 β (34). In our own previous work, we demonstrated that plasma concentrations of Il-1 β and Il-6 were significantly increased in rats treated with azathioprine, another known cellular stressor and ROS inducer, over a 24-weeks period of treatment (35). Increased expression of Il-1 β and Il-6 was also detected in the aortas of treated rats, which were associated with increased expression of the osteogenic proteins Bmp-2, Alp and Cbfa1 (35). Therefore, we examined the effect of DOX on the expression of Il-1 β and Il-6. The mRNA expression of Il-1 β and Il-6 were significantly increased upon DOX stimulation, with higher induction for Il-1 β . The Nlrp3 inflammasome, the most widely characterized inflammasome and known to be expressed in VSMCs (15), serves as most significant source of Il-1 β production (16). Beside Nlr inflammasomes, transmembrane Tlrs are the main types of PRRs (14). The activation of PRRs mainly induces sterile inflammation associated with extensive transcriptional pro-inflammatory cellular reprogramming (36). This is temporarily useful in acute situations, while chronic activation is detrimental (37). Due to their potent pro-inflammatory potency, the Nlrp3 activation and assembly is a strictly controlled process with an initial stimulus e.g., activation of Tlr, and a second stimulus

e.g., increased production of ROS (25). Subsequent activation of caspase-1 leads to cleavage and activation of pro-Il-1 β into its active form Il-1 β (25). PRRs are a link between the innate immune system, inflammation, and cellular senescence. VSMCs express small inflammasomes with low and slow onset, but long-lasting activity leading to a continuous release of Il-1 cytokines (15, 38). This mainly induces cellular hyperactivity and chronic sterile inflammation, which can maintain itself independently of the initial trigger (39). The cells retain their full viability and include Il-1 cytokines in the repertoire of their pro-inflammatory secretome (39). It was already shown that inflammasomes are involved in the calcification process and age-related diseases (40–42). In calcified VSMCs, Nlrp3, its cofactor Asc, and the cleavage enzyme caspase-1 are upregulated with subsequent Il-1 β production, while Nlrp3 inhibition prevents *in vitro* calcification (38). In our experimental model, the expression of Nlrp3, Asc as well as caspase-1 is significantly upregulated upon DOX stimulation in VSMCs. Simultaneously, the expression of Tlr2 and Nox1 also increases. The NADPH oxidase, with Nox1 as one subunit, is one of the major sources for superoxide anion release in VSMCs (43). In VSMCs, the Tlr4 is constitutively active, while the Tlr2 is upregulated upon an inflammatory response (26).

As already known from a previous study by Wen et al., Il-1 β can promote osteogenic differentiation and induction of calcification of VSMCs (38). In line, in our experimental setting, both Il-1 β and DOX induce VSMC calcification. The DOX-induced mineralization could be significantly reduced by MCC950. This could be confirmed in the *ex vivo* setting with Nlrp3^{-/-} mice, where the calcification induction by DOX is also inhibited compared to control mice. This finding is comparable to our previous results regarding the stressor azathioprine, whose calcifying effect could also no longer be seen in aortic rings from Nlrp3^{-/-} mice (35). Therefore, Il-1 β appears to be a very important effector cytokine, especially for the maintenance of a SASP after primary initiation of the SASP by the induction of “inflammaging” due to a cellular stressor. Thus, Il-1 cytokines might become an essential part of the respective pathogenesis by forming an auto-inflammatory loop, independent of the initial trigger.

Il-1 β increases its own expression as well as the expression and secretion of Il-6. Moreover, Il-1 β also enhances the expression of relevant components of the signaling pathway, particularly Tlr2, Nox1 and Nlrp3, also shown to be involved in DOX-mediated “inflammaging.” Yet, in contrast to the DOX-induced effects in VSMCs, Il-1 β does not affect the expression of senescence markers, such as p21 or SA- β -Gal, nor induces DNA breaks detected via γ H2A.X in our model using primary rat VSMCs. In contrast, a recent study found induction of senescence in a co-treatment of Il-1 β and phosphate in human umbilical cord VSMCs (42). Different effects on calcification were also seen for Il-6 when the origin of VSMCs differs: while pro-calcifying effects of Il-6 were found in human umbilical artery VSMCs in non-osteogenic medium (44), others found these effects only in co-stimulation with the soluble Il-6 receptor in osteogenic medium in human VSMCs (45). At least one explanation might be the different origin of VSMCs that differ in protein expression, as

demonstrated by proteomic analysis (46). Like Il-1 β , processes of cellular senescence are not affected by Il-6 in our model (Supplementary Material), whereas an Il-6 production itself is a component of the SASP and therefore a sign of VSMCs senescence (32).

This study has some limitations that might hamper the direct translational aspects of the results: It was performed only in *in vitro* and *ex vivo* settings using cells and thoracic aortas from rats and mice. Further *in vivo* studies verifying the major role of Nlrp3 and Il-1 β as a potential therapeutic target for the treatment of vessel “inflammaging” are necessary. In addition, the transferability in the current study is not shown for human aortic or other vessel beds.

In conclusion, the inhibition of PRRs could represent an essential approach for the therapy of systemic vascular diseases. The CANTOS study demonstrated for the first time in humans the importance of chronic vascular inflammation for CVD and the association of cardiovascular mortality with signs of systemic inflammation (47). The current study results provide further indications of a potential benefit of an interruption of the Nlrp3-associated auto-inflammatory loop.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, Germany.

REFERENCES

- Virani SS, Alonso A, Aparicio HJ, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, et al. Heart disease and stroke statistics-2021 update: a report from the American heart association. *Circulation*. (2021) 143:e254–743. doi: 10.1161/CIR0000000000000950
- Tolle M, Reshetnik A, Schuchardt M, Hohne M, Van Der Giet M. Arteriosclerosis and vascular calcification: causes, clinical assessment and therapy. *Eur J Clin Invest*. (2015) 45:976–85. doi: 10.1111/eci.12493
- Lanzer P, Hannan FM, Lanzer JD, Janzen J, Raggi P, Furniss D, et al. Medial arterial calcification: JACC state-of-the-art review. *J Am Coll Cardiol*. (2021) 78:1145–65. doi: 10.1016/j.jacc.2021.06.049
- Iribarren C, Sidney S, Sternfeld B, Browner WS. Calcification of the aortic arch: risk factors and association with coronary heart disease, stroke, and peripheral vascular disease. *JAMA*. (2000) 283:2810–5. doi: 10.1001/jama.283.21.2810
- Raggi P. Cardiovascular disease: coronary artery calcification predicts risk of CVD in patients with CKD. *Nat Rev Nephrol*. (2017) 13:324–6. doi: 10.1038/nrneph.2017.61
- Childs BG, Durik M, Baker DJ, Van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med*. (2015) 21:1424–35. doi: 10.1038/nm.4000
- Kooman JP, Kotanko P, Schols AM, Shiels PG, Stenvinkel P. Chronic kidney disease and premature ageing. *Nat Rev Nephrol*. (2014) 10:732–42. doi: 10.1038/nrneph.2014.185

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MS, MT, and MvdG: conceptualization, supervision, and project administration. JH, MS, and MT: methodology, writing—original draft preparation, and visualization. JH, MS, MX, MG, AG, MS, and AS: investigation. JH, MS, MT, and MvdG: data curation. JH, MT, MG, MX, AG, AS, and MvdG: writing—review and editing. MT, JH, MX, and MS: funding acquisition. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This research was funded by a grant from the Bundesministerium für Bildung und Forschung (MT, MS), the Sonnenfeld Stiftung (MS, MT, JH) and the Berlin Institute of Health (MS). MX received a research scholarship of the Nanchong school science and technology strategic cooperation project (grant number: 20SXQT0117).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Katharina Kuschfeldt, Brigitte Egbers and Nadine Neitzel for excellent technical assistance and Raissa Stayzyk for her excellent work in the animal facility. We thank Marcus Maurer (Charité – Universitätsmedizin Berlin) for the release of the Nlrp3 knockout mice for breeding.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2021.752305/full#supplementary-material>

- Munoz-Espin D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. (2014) 15:482–96. doi: 10.1038/nrm3823
- Sanchis P, Ho CY, Liu Y, Beltran LE, Ahmad S, Jacob AP, et al. Arterial “inflammaging” drives vascular calcification in children on dialysis. *Kidney Int*. (2019) 95:958–72. doi: 10.1016/j.kint.2018.12.014
- Herrmann J, Babic M, Tolle M, Van Der Giet M, Schuchardt M. Research models for studying vascular calcification. *Int J Mol Sci*. (2020) 21:2204. doi: 10.3390/ijms21062204
- Cobb AM, Yusoff S, Hayward R, Ahmad S, Sun M, Verhulst A, et al. Runx2 (Runt-Related Transcription Factor 2) links the DNA damage response to osteogenic reprogramming and apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. (2021) 41:1339–57. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.315206
- Childs BG, Li H, Van Deursen JM. Senescent cells: a therapeutic target for cardiovascular disease. *J Clin Invest*. (2018) 128:1217–28. doi: 10.1172/JCI95146
- Krainer J, Siebenhandl S, Weinhausel A. Systemic autoinflammatory diseases. *J Autoimmun*. (2020) 109:102421. doi: 10.1016/j.jaut.2020.102421
- Cao X. Self-regulation and cross-regulation of pattern-recognition receptor signalling in health and disease. *Nat Rev Immunol*. (2016) 16:35–50. doi: 10.1038/nri.2015.8
- Sun HJ, Ren XS, Xiong XQ, Chen YZ, Zhao MX, Wang JJ, et al. NLRP3 inflammasome activation contributes to VSMC phenotypic transformation and proliferation in hypertension. *Cell Death Dis*. (2017) 8:e3074. doi: 10.1038/cddis.2017.470

16. Tangi TN, Elmabout AA, Bengtsson T, Sirsjo A, Fransen K. Role of NLRP3 and CARD8 in the regulation of TNF-alpha induced IL-1beta release in vascular smooth muscle cells. *Int J Mol Med.* (2012) 30:697–702. doi: 10.3892/ijmm.2012.1026
17. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal.* (2010) 3:cm1. doi: 10.1126/scisignal.3105cm1
18. Kim DH, Bang E, Arulkumar R, Ha S, Chung KW, Park MH, et al. Senoinflammation: a major mediator underlying age-related metabolic dysregulation. *Exp Gerontol.* (2020) 134:110891. doi: 10.1016/j.exger.2020.110891
19. Cagel M, Grotz E, Bernabeu E, Moretton MA, Chiappetta DA. Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside. *Drug Discov Today.* (2017) 22:270–81. doi: 10.1016/j.drudis.2016.11.005
20. Bielak-Zmijewska A, Wnuk M, Przybylska D, Grabowska W, Lewinska A, Alster O, et al. A comparison of replicative senescence and doxorubicin-induced premature senescence of vascular smooth muscle cells isolated from human aorta. *Biogerontology.* (2014) 15:47–64. doi: 10.1007/s10522-013-9477-9
21. Schuchardt M, Tolle M, Prufer J, Prufer N, Huang T, Jankowski V, et al. Uridine adenosine tetraphosphate activation of the purinergic receptor P2Y enhances in vitro vascular calcification. *Kidney Int.* (2012) 81:256–65. doi: 10.1038/ki.2011.326
22. Herrmann J, Babic M, Tolle M, Eckardt KU, Van Der Giet M, Schuchardt M. A novel protocol for detection of senescence and calcification markers by fluorescence microscopy. *Int J Mol Sci.* (2020) 21:3475. doi: 10.3390/ijms21103475
23. Lopes-Paciencia S, Saint-Germain E, Rowell MC, Ruiz AF, Kalegari P, Ferbeyre G. The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine.* (2019) 117:15–22. doi: 10.1016/j.cyto.2019.01.013
24. Niemi K, Teirila L, Lappalainen J, Rajamaki K, Baumann MH, Oorni K, et al. Serum amyloid A activates the NLRP3 inflammasome via P2X7 receptor and a cathepsin B-sensitive pathway. *J Immunol.* (2011) 186:6119–28. doi: 10.4049/jimmunol.1002843
25. De Zoete MR, Palm NW, Zhu S, Flavell RA. Inflammasomes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* (2014) 6:a016287. doi: 10.1101/cshperspect.a016287
26. Schuchardt M, Prufer N, Tu Y, Herrmann J, Hu XP, Chebli S, et al. Dysfunctional high-density lipoprotein activates toll-like receptors via serum amyloid A in vascular smooth muscle cells. *Sci Rep.* (2019) 9:3421. doi: 10.1038/s41598-019-39846-3
27. Burtenshaw D, Hakimjavadi R, Redmond EM, Cahill PA. Nox, reactive oxygen species and regulation of vascular cell fate. *Antioxidants.* (2017) 6:90. doi: 10.3390/antiox6040090
28. Bernadotte A, Mikhelson VM, Spivak IM. Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. *Aging.* (2016) 8:3–11. doi: 10.18632/aging.100871
29. Duer M, Cobb AM, Shanahan CM. DNA damage response: a molecular lynchpin in the pathobiology of arteriosclerotic calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2020) 40:e193–202. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.313792
30. Mijit M, Caracciolo V, Melillo A, Amicarella F, Giordano A. Role of p53 in the regulation of cellular senescence. *Biomolecules.* (2020) 10:420. doi: 10.3390/biom10030420
31. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell.* (2005) 120:513–22. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.003
32. Orjalo AV, Bhaumik D, Gengler BK, Scott GK, Campisi J. Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2009) 106:17031–36. doi: 10.1073/pnas.0905299106
33. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol.* (2013) 15:978–90. doi: 10.1038/ncb2784
34. Burton DG, Giles PJ, Sheerin AN, Smith SK, Lawton JJ, Ostler EL, et al. Microarray analysis of senescent vascular smooth muscle cells: a link to atherosclerosis and vascular calcification. *Exp Gerontol.* (2009) 44:659–65. doi: 10.1016/j.exger.2009.07.004
35. Schuchardt M, Herrmann J, Henkel C, Babic M, Van Der Giet M, Tolle M. Long-term treatment of azathioprine in rats induces vessel mineralization. *Biomedicines.* (2021) 9:327. doi: 10.3390/biomedicines9030327
36. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* (2010) 10:826–37. doi: 10.1038/nri2873
37. Roh JS, Sohn DH. Damage-associated molecular patterns in inflammatory diseases. *Immune Netw.* (2018) 18:e27. doi: 10.4110/in.2018.18.e27
38. Wen C, Yang X, Yan Z, Zhao M, Yue X, Cheng X, et al. Nalp3 inflammasome is activated and required for vascular smooth muscle cell calcification. *Int J Cardiol.* (2013) 168:2242–7. doi: 10.1016/j.ijcard.2013.01.211
39. Evavold CL, Ruan J, Tan Y, Xia S, Wu H, Kagan JC. The pore-forming protein gasdermin d regulates interleukin-1 secretion from living macrophages. *Immunity.* (2018) 48:35–44 e36. doi: 10.1016/j.immuni.2017.11.013
40. Rea IM, Gibson DS, Mcgilligan V, Mcnerlan SE, Alexander HD, Ross OA. Age and age-related diseases: role of inflammation triggers and cytokines. *Front Immunol.* (2018) 9:586. doi: 10.3389/fimmu.2018.00586
41. Xu D, Zeng F, Han L, Wang J, Yin Z, Lv L, et al. The synergistic action of phosphate and interleukin-6 enhances senescence-associated calcification in vascular smooth muscle cells depending on p53. *Mech Ageing Dev.* (2019) 182:111124. doi: 10.1016/j.mad.2019.11.1124
42. Han L, Zhang Y, Zhang M, Guo L, Wang J, Zeng F, et al. Interleukin-1beta-induced senescence promotes osteoblastic transition of vascular smooth muscle cells. *Kidney Blood Press Res.* (2020) 45:314–30. doi: 10.1159/000504298
43. Tsai IC, Pan ZC, Cheng HP, Liu CH, Lin BT, Jiang MJ. Reactive oxygen species derived from NADPH oxidase 1 and mitochondria mediate angiotensin II-induced smooth muscle cell senescence. *J Mol Cell Cardiol.* (2016) 98:18–27. doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.07.001
44. Sun M, Chang Q, Xin M, Wang Q, Li H, Qian J. Endogenous bone morphogenetic protein 2 plays a role in vascular smooth muscle cell calcification induced by interleukin 6 in vitro. *Int J Immunopathol Pharmacol.* (2017) 30:227–37. doi: 10.1177/0394632016689571
45. Kurozumi A, Nakano K, Yamagata K, Okada Y, Nakayama S, Tanaka Y. IL-6 and sIL-6R induces STAT3-dependent differentiation of human VSMCs into osteoblast-like cells through JMJD2B-mediated histone demethylation of RUNX2. *Bone.* (2019) 124:53–61. doi: 10.1016/j.bone.2019.04.006
46. Regent A, Ly KH, Lofek S, Clary G, Tamby M, Tamas N, et al. Proteomic analysis of vascular smooth muscle cells in physiological condition and in pulmonary arterial hypertension: toward contractile versus synthetic phenotypes. *Proteomics.* (2016) 16:2637–49. doi: 10.1002/pmic.201500006
47. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, Macfadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med.* (2017) 377:1119–31. doi: 10.1056/NEJMoa1707914

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Herrmann, Xia, Gummi, Greco, Schacke, van der Giet, Tölle and Schuchardt. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

3. Diskussion

Das vaskuläre „Inflammaging“ und dessen histologisches Korrelat MAC stellen sowohl in der alternden Bevölkerung als auch bei CKD und ESRD Patienten einen eigenständigen kardiovaskulären Risikofaktor dar. Kausale Therapieoptionen zur Behandlung der MAC fehlen bislang in der klinischen Routine.¹⁵ Obwohl in den letzten Jahren zahlreiche potenzielle Signalwege mit Assoziation zum multifaktoriellen Prozess des „Inflammaging“ identifiziert werden konnten, ist dessen genaue Pathogenese weiterhin unzureichend verstanden. Die Identifikation neuer pharmakologischer Konzepte, gerichtet auf zentrale Schlüsselziele, ist notwendig, um diesen komplexen Prozess positiv beeinflussen und damit die Ausbildung sowie die gravierenden klinischen Folgen verhindern zu können. Hierfür sind neben adäquaten experimentellen Modellen, die die humane Situation widerspiegeln, geeignete Analysemethoden notwendig, durch die eine frühzeitige Identifikation und Quantifizierung der Kalzifizierung und deren pathophysiologischen Signalwege untersucht werden können.

Diese kumulative Habilitationsschrift umfasst fünf ausgewählte Arbeiten, die sich zum einen mit der Etablierung neuer experimenteller Modelle und Analysemethoden befassen und zum anderen einen Einblick in zentrale Signalwege in VSMC geben.

3.1 Modelle zur Untersuchung des vaskulären „Inflammaging“ und der MAC

Zur Identifikation relevanter Signalwege und möglicher therapeutischer Schlüsselziele innerhalb der Pathogenese der MAC, sind *in vitro* Studien an primären VSMC, *ex vivo* Studien an aortalen Gewebestücken und *in vivo* Studien an Tiermodellen durchgeführt worden. Die benutzten Modelle sind zum Teil sehr heterogen.¹⁵ Einen Überblick über die Eigenschaften der experimentellen Modelle und Analysemethoden wurden von der Autorin in zwei Review-Artikel zusammengefasst.^{30,113} Jedes Einzelne dieser Modelle kann nur einen Teil der humanen Situation abbilden, wodurch die Identifikation zentraler Signalwege als Grundlage für die pharmakologische Intervention erschwert wird.¹⁵ *In vitro* Modelle stellen die einfachsten Ansätze in Bezug auf Standardisierung und Durchführung dar. Ein Vorteil ist die Möglichkeit, komplexe zelluläre Signalwege bis auf das Einzelzell-Niveau untersuchen zu können. Das „Inflammaging“ ist ein komplexer zellulärer Prozess. Sowohl aus eigenen Versuchen als auch in der Literatur¹¹⁷ zeigt sich, dass die Ausprägung des SASP von Zellen in einem Gewebeverband, aber auch in Kultur, von Zelle zu Zelle verschieden ausgeprägt sein kann. Einzelzell-basierte und ggf. visualisierende Methoden sind von Vorteil für die Untersuchungen, zudem da bekannt ist, dass sich beide Prozesse in den Signalkaskaden zumindest teilweise überlappen.^{30,104} Daher war die Etablierung einer neuen *in situ* Methode zur gleichzeitigen Analyse von SASP- und Kalzifizierungsmarkern mittels Fluoreszenzmikroskopie auf VSMC Einzelzellniveau ein Ziel der Autorin. Außerdem kann so die Ressource der primären tierischen Zellen im Sinne des „refine, reduce, replace“ (3R) Gedanken von Russel und Burch¹¹⁴ optimiert

eingesetzt werden (Arbeit I der Habilitationsschrift). Am Beispiel primärer VSMC der Ratte konnte ein Multiplex-Detektionsverfahren der Expression der Seneszenzmarker SA- β -Gal, γ H2A.X und p21, sowie des osteogenen Markers Opn etabliert werden.⁹⁰ Weitere osteogene Marker, Bmp-2, Alp und Cbfa1, sind ebenfalls etabliert und kamen zum Teil in einer weiteren Arbeit zum Einsatz.¹¹⁵ Neben dem beschriebenen Modell⁹⁰ erlauben „Single-Cell Transcriptomic“ Ansätze ebenfalls die gleichzeitige Untersuchung mehrerer Analyten in einer Zelle und können so eine potenzielle Heterogenität des zellulären Phänotyps der VSMC offenlegen.¹⁵ Zudem können systemische „Omics“-Studien helfen, die biochemischen, genetische und experimentellen Ansätze der Gefäßkalzifizierung zu verstehen.¹⁵ Die Vor- und Nachteile verschiedener alternativer Protokolle zum Einzelzell-basierten Nachweis von Markern sind im Anhang des Manuskriptes von Herrmann *et al.* tabellarisch gegenübergestellt.⁹⁰ Die Ergebnisse der Arbeit I belegen, dass der osteogene Marker Opn in VSMC abhängig ist von der Anzahl der Passagen primärer VSMC, sowie zwischen verschiedenen Zellchargen in unterschiedlicher Ausprägung exprimiert wird. Zudem zeigten sich Unterschiede im Ausmaß der Expression von Kalzifizierungs- und Seneszenzmarkern in Abhängigkeit des jeweilig verwendeten Induktors,^{90,115} so dass verschiedene Signalwege hin zur MAC aktiviert werden. Die etablierte Analysemethode ist übertragbar auf andere Marker, auf andere Zellspezies und auf den Nachweis in Gewebe.

Der Vorteil der Einzelzell-Analyse ist auch gleichzeitig dessen Nachteil, denn durch die Simplifizierung der Untersuchungsumgebung auf das Niveau einer isolierten VSMC wird der interaktive Gewebeverband des arteriellen Gefäßes aufgehoben, wodurch die parakrine interzelluläre Kommunikation vaskulärer Zellen verloren geht. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, experimentelle Modelle an arteriellen Gefäßpräparaten zu nutzen. Das bislang verwendete ex vivo Modell der IIA begegnet diesem Problem durch die Aufrechterhaltung des Gewebeverbandes zumindest teilweise und wurde in zahlreichen Untersuchungen bereits angewendet.³⁰ Vorteile dieses Modells sind die leichte Präparation, die einfache Durchführung und die Möglichkeit der Standardisierung. Der Nachteil dieses Modells ist das Fehlen der Perfusion, die u.a. für die Aufrechterhaltung der physiologischen vaskulären Funktionen essenziell ist.¹¹⁸ Die arteriellen Gefäßpräparate werden über das Inkubationsmedium mit Stimulatoren/Inhibitoren des „Inflammaging“ und der MAC Bildung behandelt, so dass neben der physiologisch intraluminalen Stimulation/Inhibition über das Endothel parallel eine extraluminale Stimulation erfolgt. Daher handelt es sich hierbei um eine artifizielle Stimulationstechnik, deren Limitationen, insbesondere in Hinblick auf die Ausprägung der induzierten Kalzifizierung, berücksichtigt werden sollte. Um diesen Limitationen zu begegnen, wurde das neue ex vivo Modell der „isoliert perfundierten Arterie“ (IPA) etabliert (Arbeit II der Habilitationsschrift). Die Arterie ist dabei über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen in einem Perfusionskreislauf eingespannt, wird mit einem Perfusionsmedium endoluminal unter

definierten, sterilen Bedingungen perfundiert und ist von einem physiologischen extrazellulären Medium umgeben.¹¹⁹ Die „proof-of-concept“ Studie der IPA wurde an Rattenaorten im Vergleich zur IIA unter Nutzung eines HPM, wie es bereits in *in vitro* Studien an Zellen oder *ex vivo* Studien genutzt wurde, durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine ausgeprägte MAC in beiden Modellen, wobei signifikante Unterschiede im Ausmaß der Kalzifizierung unter Nutzung des gleichen Stimulationsmediums nachzuweisen waren. Dieser Unterschied kann durch mehrere Faktoren erklärt werden: Zum einen unterscheidet sich die Stimulationsart der Perfusion von der der Inkubation, da hier keine primäre extravaskuläre Stimulation stattfinden kann. Zum anderen können während der Perfusion endothelial sezernierte Mediatoren, wie beispielsweise Stickstoffmonoxid, einen protektiven Einfluss auf die Ausbildung der MAC haben. In beiden *ex vivo* Modellen zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression typischer zellulärer OBP Marker, wie beispielsweise Bmp-2.¹¹⁹ Die IPA Methode ist übertragbar auf andere arterielle Gefäße verschiedener Spezies, z.B. auf arterielle Gefäße gendefizienter Mäuse.¹¹⁶ Das IPA Modell erlaubt somit Untersuchungen an vaskulären Präparaten mit erhaltener interzellulärer Interaktion zwischen Endothelzellen, VSMC und EZM unter Nutzung einer physiologisch pulsatilen Perfusion und bildet somit eine Brücke zwischen dem bislang verwendeten *ex vivo* IIA Modells und den *in vivo* Studien. Im Vergleich zu anderen in der Literatur beschriebenen *ex vivo* Perfusionsansätzen, die von wenigen Stunden bis zu einem Tag durchgeführt wurden,^{120,121} ist das neu etablierte Modell explizit für die Langzeitperfusion von bis zu 14 Tagen konzipiert, wobei kürzere Perfusionszeiten über Stunden ebenfalls möglich sind. Aufgrund der Flexibilität der Perfusionskammer ist die Perfusion humaner Gefäße ebenfalls möglich, was eine translationale Anwendung im humanen System erlaubt. Die vollständige Kompatibilität zu allen aktuell etablierten Analysemethoden der vaskulären Kalzifizierung, wie z.B. Quantifizierung des Kalziumgehaltes, histopathologische und immunhistochemische Untersuchungen, sowie Expressionsstudien mittels quantitativer „real-time“ Polymerasekettenreaktion oder Western Blot Untersuchungen, ist gegeben.

Um die hochkomplexen und multifaktoriellen Interaktionen, insbesondere des vaskulären „Inflamming“ unter Krankheitszuständen, beispielsweise der chronischen Urämie, verstehen zu können, sind aktuell weiterhin *in vivo* Tiermodelle, meist der Ratte oder Maus, notwendig. Da Nagetiere gegenüber der Ausbildung einer MAC eine relative Resistenz aufweisen, muss diese durch einen erheblichen Eingriff in die Homöostase, beispielsweise über die Induktion einer Urämie oder über Nutzung genetisch veränderter Modelle, oft zusätzlich in Kombination mit einer speziellen Diät, etabliert werden.³⁰ Die Ausprägung der Urämie unterscheidet sich zwischen den CKD Tiermodellen zum Teil erheblich, was sich in einer inkonsistenten Ausprägung und Lokalisation der vaskulären Kalzifizierung in der Intima oder Media widerspiegelt. Mit diesen *in vivo* Modellen ist aufgrund des notwendigen Aufwandes für die

Induktion und Aufrechterhaltung der Urämie und der damit einhergehenden Folgen ein sehr hohes Tierleid über viele Wochen verbunden. Für die Verwendung dieser *in vivo* Modelle und auch die Etablierung weiterer Modelle sollte daher der 3R Gedanke¹¹⁴ berücksichtigt werden. Ein alternatives Modell, das möglichst nah an die Bedingungen der humanen Situation kommt, bei möglichst hoher Reproduzierbarkeit und geringer Variabilität (um Versuchszahlen gering zu halten) zum Erreichen signifikanter Unterschiede ist daher wünschenswert. Die IPA könnte hier einen wichtigen Beitrag liefern.

3.2 MAC als Folge einer Stressor-induzierten zellulären OBP-Transformation

Ein Merkmal des sich im Alterungsprozess entwickelnden chronisch sterilen „Inflammaging“ ist die Aktivierung von Mechanismen der Mustererkennung des angeborenen Immunsystems.^{72,122} Beim Altern fallen zunehmend endogene DAMP/Alarmine an, die eine kontinuierliche Aktivierung von PRR bewirken,^{72,122} was die Sekretion potenter v.a. NFκB-assoziiierter pro-inflammatorischer Zytokine mit der Ausbildung eines chronischen „Inflammaging“ zur Folge hat.^{72,122} Dieses ist u.a. charakterisiert durch das Vorhandensein seneszenten Zellen, die spezifische Seneszenz-Marker aufweisen, wie u.a. eine erhöhte p53/p21 und p16 Expression, eine lysosomale SA-β-Gal Aktivität sowie Zeichen von DNA-Schäden, wie u.a. γH2A.X.¹⁰⁴ Seneszente Zellen durchleben eine Phänotyp-Transformation hin zu einem pro-inflammatorischen SASP.¹²² Die zelluläre Seneszenz stellt somit einen Teilaspekt des chronischen „Inflammaging“ dar und ist mit zentralen Mechanismen innerhalb der MAC Entwicklung verbunden. Zu diesen zählen u.a. die chronisch-sterile Inflammation, ROS, eine gesteigerte Zelltodrate, eine gestörte Kalzium-Phosphat-Homöostase, eine Zunahme von Matrixvesikeln, die OBP-Transformation von VSMC, sowie Veränderungen der EZM.¹⁵ Auch wenn viele Teilaspekte innerhalb der Pathogenese des chronischen „Inflammaging“, der zellulären Seneszenz und der MAC bekannt sind, so ist deren Interaktion unzureichend verstanden, wodurch die Identifikation von Schlüsselsignalwegen für die therapeutische Beeinflussung erschwert ist.

Dass physiologische Alterungsprozesse durch die Mutation nur eines Schlüsselproteins akzeleriert ablaufen können, zeigen HGPS Patienten, die im jugendlichen Alter an vaskulären Erkrankungen sterben.¹²³ Auch bei anderen, primär nicht genetischen Erkrankungen, spielt das chronische „Inflammaging“ eine wichtige Rolle, wie es das Beispiel der chronischen Urämie zeigt,¹⁰⁴ die mit einer zum Teil exzessiv erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität in Abhängigkeit des Schweregrads der Urämie verbunden ist.^{7,8} In der CANTOS Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass durch die Inhibition des Nlrp3 Inflammasom Effektorzytokins Il-1β, der kombinierte primäre kardiovaskuläre Endpunkt aus nicht-fatalem Schlaganfall, nicht-fatalem Myokardinfarkt und kardiovaskulärer Mortalität in einem optimal vortherapierten kardiovaskulären Hochrisiko-Kollektiv mit erhöhter Crp Plasmakonzentration signifikant verbessert werden kann.⁹³ Diese Daten zeigten erstmals, dass eine auf die

Verminderung einer chronischen Inflammation ausgerichtete Therapie mit einer Verbesserung des kardiovaskulären Überlebens verbunden ist. Aus den oben skizzierten (patho)-physiologischen Erwägungen und den klinischen Daten heraus ergab sich die Hypothese, dass PRR als zentrale Mechanismen der Mustererkennung ein potenzielles Bindeglied zwischen chronischem „Inflammaging“, oxidativem Stress, zellulärer Seneszenz und Ausbildung einer MAC darstellen und somit maßgeblich an der Ausbildung einer vaskulären Progerie beteiligt sein könnten. Das Ziel der Arbeit III, IV und V dieser Habilitationsschrift war es daher, zentral interagierende Signalwege zu identifizieren, um mögliche therapeutische Schlüsselziele identifizieren zu können. Aufgrund seiner Bedeutung im vaskulären System wurde der Fokus primär auf das Nlrp3 Inflammasom als intrazellulären PRR gelegt,^{76,77} das als Auslöser und Vermittler einer chronischen Inflammation, u.a. resultierend aus erhöhtem oxidativem Stress, Einfluss auf die OBP-Transformation der VSMC und die Formierung des SAPS hat.

3.2.1 Chronisches „Inflammaging“: Nlrp3 Inflammasom, ROS und DNA-Schäden

Bereits in einer initialen Arbeit der Autorin mit dem purinergen Agonisten Uridin-Adenosin-Tetraphosphat konnte der Einfluss von ROS auf die Kalzifizierung nachgewiesen werden.^{124,125} Unter Nutzung des ROS Induktors Azathioprin und dessen Metaboliten 6-Mercaptopurin konnte eine zentrale Rolle des oxidativen Stresses im Prozess der Kalzifizierung bestätigt werden.^{126,127} Sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* wird eine OBP-Transformation und Kalzifizierung durch Azathioprin bzw. 6-Mercaptopurin induziert,¹²⁶ die unabhängig von einer erhöhten Phosphat-Konzentration erfolgt. Durch die anti-oxidative Wirkung von Tiron konnte die Kalzifizierung verhindert werden, was die zentrale Bedeutung von ROS in der Pathogenese der MAC verdeutlicht.¹²⁶ Die Verifikation erfolgte in einem *in vivo* Tiermodell, in dem Ratten über einen Zeitraum von 24 Wochen mit Azathioprin behandelt wurden.¹²⁷ Die Tiere zeigten systemische Zeichen eines erhöhten ROS Levels, deren Bildung u.a. durch den Abbau von 6-Mercaptopurin über die Xanthinoxidase erhöht wird und eine OBP-Transformation induzieren können.^{126,127} In der Interventionsgruppe mit Azathioprin wurde ein chronisch-systemisches „Inflammaging“ induziert, das insbesondere durch eine erhöhte Plasmakonzentration von Il-1 β und Il-6 gekennzeichnet ist.¹²⁷ Die Plasmakonzentration von Il-18, Rantes und Saa war erniedrigt und die Konzentration 17 weiterer potenziell pro-inflammatorischer Zytokine zeigte sich unverändert.¹²⁷ Die Untersuchungen an den Gefäßen ergaben in der Interventionsgruppe eine erhöhte Expression von Il-1 β und Il-6 als Marker eines SASP, sowie von Cbfa1, Alp und Opn als Marker eines OBP bei gleichzeitig verminderter Expression des VSMC Markers Sm22 α in der Interventionsgruppe.¹²⁷ Im vaskulären System wird die Il-1 β Sekretion v.a. durch das Nlrp3 Inflammasom reguliert, dessen molekularen Komponenten „apoptosis-associated speck-like protein“ (Asc) und Caspase-1 in kalzifizierenden VSMC verstärkt exprimiert sind.¹¹⁵

Eine Hemmung des Nlrp3 Inflammasoms reduziert die vaskuläre Kalzifizierung *in vitro*,^{74,128} was in eigenen Untersuchungen bestätigt werden konnte.^{115,127} Im aortalen Gewebe der Interventionsgruppe war die Expression der Nlrp3 Inflammasom Komponenten Nlrp3, Asc und Caspase-1 erhöht.¹²⁷ *Ex vivo* Versuche an Aortenringen von Nlrp3-defizienten Mäusen bestätigten die zentrale Rolle des Nlrp3 Inflammasoms im vaskulären Kalzifizierungsprozess.¹²⁷

Um den Zusammenhang zwischen der ROS Induktion, DNA-Schäden, einer zellulären Seneszenz und der Aktivierung des Nlrp3 Inflammasoms in der Pathogenese der MAC weiter zu untersuchen, wurde Doxorubicin als Induktor von ROS und DNA-Schäden verwendet.¹¹⁵ In den Untersuchungen zeigte sich eine Doxorubicin-induzierte Kalzifizierung von VSMC *in vitro* sowie *ex vivo* eine MAC Induktion in aortalen Gefäßpräparaten.¹¹⁵ Neben einer erhöhten Expression der OBP-Marker Alp, Bmp-2, Cbfa1 und Opn wurde auch die Expression der SASP-Marker Il-6 und Il-1 β und die Nlrp3 Inflammasom assoziierten Komponenten Nlrp3, Asc und Caspase-1 durch Doxorubicin stimuliert.¹¹⁵ In *ex vivo* Untersuchungen an aortalen Gefäßen von Nlrp3-defizienten Mäusen konnte die Bedeutung des Nlrp3 Inflammasoms bestätigt werden.¹¹⁵ Somit zeigen die Arbeiten der Autorin, dass das Nlrp3 Inflammasom ein potenziell zentrales pathophysiologisches Element für die ROS abhängige Induktion der Kalzifizierung von VSMC und die Ausbildung der MAC im aortalen Gewebe ist.^{115,127} Die entscheidende Rolle von Mechanismen der Mustererkennung und die Bedeutung des Nlrp3 Inflammasoms wurden auch in anderen Modellen bestätigt. Die durch Doxorubicin-induzierte myokardiale Dysfunktion und Kalzifizierung der Kardiomyocyten wurde durch MCC950 Therapie verbessert.^{128,129} Die Il-1 β vermittelten pro-inflammatorischen Prozesse bis hin zur Pyroptose sind vom Nlrp3 Inflammasom abhängig, wie in Kardiomyocyten gezeigt werden konnte.¹³⁰ In einem HGPS Mausmodell reduzierte die Inhibition von Nlrp3 mit MCC950 die chronische Inflammation und verlängerte die Lebensspanne der Tiere signifikant.⁹⁸

Da sowohl Doxorubicin als auch Azathioprin eine Il-1 β Produktion über die Aktivierung des Nlrp3 Inflammasoms induzieren,^{115,127} hat die Autorin die Effekte von Il-1 β auf die Pathogenese der Kalzifizierung in den angewandten Modellen weiter untersucht. *In vitro* Daten aus der Literatur zeigen, dass Il-1 β ein Induktor der vaskulären Kalzifizierung ist.¹³¹ In eigenen Arbeiten konnte bestätigt werden, dass Il-1 β die Ausbildung eines OBP induziert.¹¹⁵ Dieser Phänotyp ist durch die vermehrte Expression der osteogenen Marker Cbfa1, Alp, Opn und einer verminderten Expression der VSMC Marker Sm22 α , „myosin heavy-chain smooth muscle isoform“ und Calponin 1 gekennzeichnet.¹¹⁵ Il-1 β entfaltet seine pro-inflammatorische Wirkung außerdem über eigene Expressionssteigerung, sowie die anderer PRR, wie Tlr2 und Tlr4.¹¹⁵ Diese Autostimulation kann durch die Blockade der Nicotinamidadenindinukleotidphosphat Oxidase, des Tlr4 Rezeptors, des Nlrp3 Inflammasoms und durch eine anti-oxidative Behandlung gehemmt werden.¹¹⁵ Klinische Studien zeigen, dass Il-1 β , aber auch Il-6 und die

Pentraxine Crp und Pentraxin-3 (Ptx3) Prädiktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen und die Ausbildung vaskulärer Pathologien sind.¹³² Il-1 β induziert die Expression von Il-6 und Ptx3.¹³³ Il-6 und Ptx3 sind in CKD- und ESRD-Patienten starke Prädiktoren für eine erhöhte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität.¹³⁴⁻¹³⁶ Weitere Studien zeigen, dass funktionelle Varianten des Il-6-Gens das CVD Risiko bei CKD beeinflussen.^{137,138} In den eingesetzten *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* Modellen zeigt sich eine erhöhte systemische und lokale Il-6 Produktion.^{115,127} Dieser Effekt ist abhängig vom PRR Tlr4 und dem Nlrp3 Inflammasom, aber unabhängig von einer ROS Induktion.¹¹⁵ Il-6 ist somit Teil eines NF κ B-abhängigen SASP.¹³⁹ Daneben sind NF κ B-unabhängige Signalwege über p38-„mitogen-activated protein kinase“, Proteinkinase B (Akt), „mammalian target of rapamycin“ (mTOR) und ATM Kinase bekannt, die die Ausbildung eines SASP und Induktion der MAC miteinander verbinden. Für ATM ist der kausale Zusammenhang zwischen SASP und MAC bislang am besten untersucht. Eine ATM Inhibition hemmt die OBP-Transformation und Kalzifizierung der VSMC über eine Reduktion der assoziierten Inflammation, wobei Cbfa1 das Bindeglied zur ATM-abhängigen Kontrolle von DNA-Schäden zu sein scheint.^{104,140,141}

Diese beschriebenen Mechanismen haben einen bedeutenden Anteil an der vaskulären Progerie. Progressive zelluläre Schädigungsmuster münden in der Freisetzung von DAMP/Alarminen mit einer konsekutiven PRR Aktivierung. Damit werden evolutionär konservierte immunologische Mechanismen bedient.⁷² Komponenten des SASP können neben ihrer lokalen Bedeutung für die interzelluläre Kommunikation eine übergreifende Rolle als systemische pro-inflammatorische Mediatoren gewinnen und damit die Homöostase des Körpers grundlegend beeinflussen. DAMP/Alarmine können neben der Inflammation auch eine zelluläre Seneszenz induzieren, die ihrerseits die Inflammation unterhalten kann.^{142,143} Die eigenen Ergebnisse zeigen, dass sowohl Doxorubicin als auch Il-1 β ROS in VSMC induzieren.¹¹⁵ DNA-Schäden mit assoziierter Ausbildung einer zellulären Seneszenz (z.B. p21) hingegen werden zwar durch Doxorubicin, nicht aber durch Il-1 β ausgelöst.¹¹⁵ Entgegen Hinweisen in der Literatur, in denen Il-1 β auch die Seneszenz in VSMC induzieren kann,¹³¹ konnten diese Effekte in den eigenen angewandten Modellen nicht nachgewiesen werden.¹¹⁵ Abweichend von unserem Modell wurde der Effekt von Il-1 β auf die Seneszenz in der Studie von Han *et al.* in einem artifiziellen System unter Nutzung eines HPM nachgewiesen,¹³¹ wobei Phosphat selbst ein Induktor der Seneszenz sein kann.¹³² Eine ähnliche Erklärung würde auch für den in der Literatur nachgewiesenen Effekt von Il-6 auf die Induktion von Seneszenz und Kalzifizierung zutreffen,¹³² der in den von der Autorin eingesetzten Modellen ohne Nutzung eines HPM ebenfalls nicht nachgewiesen werden konnte.¹¹⁵ Die Kenntnisse über Prozesse der zellulären Seneszenz sind von Bedeutung, da durch die Elimination seneszenter Zellen die Auswirkungen der SASP vermittelten Inflammation relevant vermindert werden kann.^{142,143} Um jedoch den Stellenwert der zellulären Seneszenz in der Pathogenese der MAC beurteilen

zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen. Vorstellbar ist, dass die zelluläre Seneszenz initial einen protektiven Einfluss auf die MAC Entwicklung hat, der in Abhängigkeit des Ausmaßes oder bei Persistenz der Seneszenz den SASP und die MAC Bildung verstärkt. Die zelluläre Seneszenz kann in Abhängigkeit des jeweiligen Mediators und der zeitlichen Dimension zu einer DNA-Schädigung führen, durch die zusätzlich eine Verstärkung der zellulären Seneszenz induziert wird.

Die Arbeiten der Habilitationsschrift bestätigen den Mechanismus eines PRR-abhängigen pro-inflammatorischem SASP und OBP über das Nlrp3 Inflammasom. Insbesondere durch Il-1 β wird die Expression weiterer Inflammations- und Kalzifizierungsmarker primär unabhängig vom zellulären Status der Seneszenz aufrechterhalten, da durch Il-1 β keine direkten DNA-Schäden und zelluläre DDR induziert werden.

3.2.2 Chronische Niereninsuffizienz als Krankheitsbild der vaskulären Progerie

Die CKD ist aufgrund der Vielzahl retinierter Urämietoxine ein Musterbeispiel für eine kontinuierlich vorliegende toxische Dyshomöostase mit Freisetzung urämischer DAMP/Alarmine.^{68,144,145} Darüber hinaus wirken zahlreiche urämische Toxine, wie beispielsweise Saa oder Hmgb1, als DAMP/Alarmine, die von unterschiedlichen PRR detektiert werden.^{72,105,106} Auch das Urämietoxin Trimethylamine N-Oxid, ein Produkt des Darm-Mikrobioms, aktiviert das Nlrp3 Inflammasom.¹⁴⁶ In der Urämie besteht somit eine kontinuierliche Stimulation des angeborenen Immunsystems mit Aktivierung von Mechanismen der Mustererkennung. Zur Vermeidung der schädlichen Konsequenzen sind die Therapieziele unter Urämie entweder die Konzentration der DAMP/Alarmine durch verminderte Bildung oder erhöhte Elimination zu reduzieren oder deren Wirkung durch Blockade zentraler therapeutischer Schlüsselziele zu vermindern. Bei dialysepflichtigen Patienten kann durch die Dialysebehandlung die chronisch-urämische Inflammation dennoch nicht adäquat kontrolliert werden.¹⁴⁷ Gründe hierfür sind u.a. die intermittierende Dialysebehandlung und hiermit verbundene limitierte Therapiezeit, sowie die reduzierte therapeutische Effektivität, insbesondere im Bereich der mittelmolekularen Urämietoxine.¹⁴⁷ Das bestehende Konzept der Verminderung urämischer Toxine durch Nutzung unterschiedlicher Dialyseverfahren, stellt für CKD-Patienten ohne Dialyseindikation keine geeignete Therapieoption dar. Daher werden alternative Behandlungskonzepte benötigt, die auf zentrale Mechanismen innerhalb des urämischen „Inflammaging“ abzielen. Durch eine Inhibition der deletären Wirkungen der Urämietoxine und damit einhergehender Inhibition der vaskulären Progerie, könnte das kardiovaskuläre Risiko reduziert werden. Aufgrund der Bedeutung der dargestellten Prozesse erscheint der evolutionär konservierte Prozess der Mustererkennung, insbesondere das Nlrp3 Inflammasoms, geeignet zu sein. Die positiven

Ergebnisse der CANTOS Studie, insbesondere in der phänotypisch komplexen CKD Subpopulation, unterstützen diese Hypothese.¹¹²

3.3 Potenzielle Therapiekonzepte der vaskulären Progerie mit Bezug zur Urämie

Verschiedene neue therapeutische Konzepte zielen auf die Beeinflussung von Prozessen der Kalzifizierung, zellulären Seneszenz oder der Inflammation ab.¹⁵ Der gestörte Kalzium-Phosphat-Haushalt und eine persistierende chronische Inflammation zählen zu den wichtigen nicht-traditionellen CKD-abhängigen Risikofaktoren.¹⁴⁵ Eine therapeutische Intervention des Kalzium-Phosphat-Haushaltes zielen v.a. die Kontrolle der jeweiligen Plasmakonzentration dieser Elektrolyte, des Vitamin D₃ und des Parathormons. Zur Therapie des sekundären Hyperparathyreoidismus werden u.a. Phosphatbinder, Vitamin-D Präparate und Kalzimetika eingesetzt, durch die die Progression der MAC vermindert werden soll. Aktuell existieren keine systemischen anti-inflammatorischen Therapieoptionen, die die urämische Inflammation kausal adressieren. Dass eine kausale anti-inflammatorische Therapie der Urämie fundamentale Auswirkungen hat, demonstriert der Erfolg der Nierentransplantation, durch die eine kontinuierliche und signifikante Verminderung der Urämietoxinlast und des damit einhergehenden urämischen „Inflammaging“ durch Etablierung einer adäquaten GFR erreicht wird. Hierdurch wird die Progression der Ausbildung einer MAC vermindert oder sogar aufgehoben.¹⁴⁸ Die mit abnehmender GFR assoziierte Retention urämischer Toxine kann ohne Dialysetherapie kausal nicht beeinflusst werden, so dass der therapeutische Fokus auf der Modulation des urämischen „Inflammaging“ liegen sollte.

3.3.1 Therapeutische Konzepte im Rahmen der Kalzifizierung

Zu den therapeutischen Ansätzen mit Bezug zur Kalzifizierung zählen eine Verminderung der Phosphatkonzentration, eine Verhinderung der Ablagerung von Kalzium-Phosphat-Komplexen und eine Erhöhung der Konzentration von Inhibitoren der Kalzifizierung.

Eine Metaanalyse von 25 klinischen Studien, davon 18 Studien mit dialysepflichtigen Patienten, analysierte den Effekt der Senkung der Phosphat-Plasmakonzentration mit Hilfe von Phosphatbindern auf die Genese der MAC.¹⁴⁹ Als primärer Endpunkt wurde hauptsächlich eine kalzifizierende Koronargefäß-Arteriopathie untersucht. Die Untersuchungsergebnisse an mehr als 2.500 Patienten verblieben uneinheitlich.¹⁴⁹ Die meisten Studien untersuchten kalziumhaltige gegen kalziumfreie Phosphatbinder. Dabei war zwar die MAC bei kalziumfreien im Vergleich zu kalziumhaltigen Phosphatbindern geringer ausgeprägt, aber zu einem Placebo ergab sich kein signifikanter Nutzen,¹⁴⁹ so dass die MAC Progression dabei am ehesten durch die erhöhte Kalziumzufuhr erklärt werden kann. Eine Senkung der Phosphatkonzentration erscheint demnach keinen signifikanten Vorteil gegenüber einem Placebo zu haben.¹⁴⁹ Der Zulassungsprozess für die Therapie mit Tenapanor, einem Inhibitor des Natriumhydrogen-

Antiporters 3, der die gastrointestinale Absorption von Phosphat reduziert, wurde von der „Food and Drug Administration“ gestoppt, da die klinische Signifikanz unklar eingeschätzt wurde.

Ein weiteres therapeutisches Konzept ist die Verhinderung der Kalzium- und Phosphat-Ablagerung durch eine anti-resorptive Therapie mit Bisphosphonaten, strukturellen Analoga von PPI, oder Denosumab, einem humanisierten Antikörper. Aktuell existieren neun Studien, die anti-resorptive Therapeutika an ~350 Patienten untersucht haben.¹⁴⁹ Die Ergebnisse von sieben dieser Studien deuten auf eine Verlangsamung der MAC Entwicklung hin.¹⁴⁹ Sowohl das Studiendesign als auch die eingesetzten Bisphosphonate unterscheiden sich, was einen direkten Vergleich der Studienergebnisse erschwert und die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse erklären könnte.¹⁴⁹ Vier Studien haben das Bisphosphonat Etidronat bei dialysepflichtigen Patienten eingesetzt, wodurch eine Reduktion der MAC Ausprägung erzielt werden konnte.¹⁴⁹ Diese Daten zeigen, dass eine anti-resorptive Therapie potentiell nützliche Wirkungen haben kann. Jedoch sind Langzeitdaten notwendig, um die Auswirkungen des unter der Therapie bestehenden erheblichen Eingriffs in den Knochenstoffwechsel auf das vaskuläre System besser verstehen zu können.¹⁵⁰ Myo-Inositol-Hexaphosphat (SNF472) ist eine Substanz, die durch eine selektive Bindung an HAP dessen Wachstum inhibiert,¹⁵¹⁻¹⁵³ ohne im Tiermodell nachteilige Auswirkungen auf den Knochenmetabolismus im Vergleich zu Bisphosphonaten zu zeigen.¹⁵⁴ Der EC₅₀-Wert für die Chelatbildung mit freiem Kalzium ist 50-mal höher als die maximal wirksame SNF472-Dosis, was dessen Selektivität für HAP bestätigt.^{15,155,156} Bei dialysepflichtigen Patienten konnte durch die Behandlung mit SNF472 die Progression der MAC signifikant vermindert werden.¹⁵⁵

Ein Therapieansatz, der auf die Erhöhung der Konzentration von endogenen Inhibitoren der Kalzifizierung, wie z.B. Mgp, abzielt, ist die Substitution von Vitamin K, wobei der Effekt eine unklare klinische Signifikanz zeigt.¹⁵⁷ Sechs Studien an ~580 Patienten wurden durchgeführt, von denen nur eine Studie, in der eine Vitamin K Substitution im Dialysat genutzt wurde, einen Vorteil zeigte. In den anderen fünf Studien konnte kein Vorteil einer Vitamin K Substitution in Bezug auf die Ausprägung der MAC gesehen werden.¹⁵⁷

3.3.2 Therapeutische Konzepte im Rahmen des chronischen „Inflammaging“

Bislang gibt es experimentelle Hinweise, dass eine therapeutische Intervention des Nlrp3 Inflammasoms einen protektiven Einfluss auf die MAC Pathogenese hat. In urämischen Ratten konnte gezeigt werden, dass durch die Therapie mit Puerarin, einem natürlich vorkommenden Isoflavon, die Nlrp3 Inflammasom vermittelte vaskuläre Kalzifizierung signifikant vermindert wird.¹⁵⁸ 6-Shogaol, ein natürlicher Inhaltsstoff des Ingwerrhizoms, inhibiert die Nlrp3 Inflammasom vermittelte vaskuläre Kalzifizierung, induziert durch eine hohe Glukose-Konzentration.¹⁵⁹ Das 2012 entdeckte Myokin Irisin, dessen Plasmakonzentration bei

dialysepflichtigen Patienten signifikant vermindert ist, vermindert in einem CKD Mausmodell die Nlrp3 Inflammasom vermittelte MAC signifikant.¹⁶⁰ Weitere Inhibitoren des Nlrp3 Inflammasoms sind bekannt, mit deren Hilfe die Rolle des Nlrp3 Inflammasoms unter systemischen Bedingungen *in vivo* weiter verifiziert werden kann.¹⁶¹ MCC950 ist ein selektiver Inhibitor, der die ATPase Domäne des Nlrp3 Inflammasoms blockiert und so dessen Aktivität inhibiert.¹⁶¹ *In vitro* und *in vivo* Studien zeigen, dass das Leben von HGPS Mäusen durch eine MCC950 Therapie verlängert werden kann.¹⁶¹ Des Weiteren hat MCC950 über die Reduktion der Plaquebildung und Stabilisierung der Plaques eine anti-atherosklerotische Wirkung.^{162,163} Eigene Untersuchungen zeigen, dass MCC950 die Kalzifizierung *in vitro* vermindert.¹¹⁵

3.3.3 Therapeutische Konzepte im Rahmen der zellulären Seneszenz

Die therapeutischen Konzepte der zellulären Seneszenz umfassen die Elimination seneszenter Zellen („Senolytics“) und die Modulation des SASP („Senomorphics“).^{68,83,164,165} Durch die Senolyse p16^{Ink4a} positiver Zellen in einem transgenen Mausmodell konnte das Ausmaß der Atherosklerose reduziert und das Überleben der Mäuse verlängert werden.^{55,166} Eine vergleichbare Wirkung auf die Atherogenese kann durch das senolytisch wirksame Medikament Navitoclax (ABT263) erzielt werden. ABT263 inhibiert anti-apoptotische Proteine der „B-cell lymphoma 2“ (Bcl-2) Familie, Bcl-2 und Bcl-xl, wodurch es die Apoptose seneszenter Zellen u.a. durch Reaktivierung der pro-apoptotischen Wirkung der Proteine „Bcl-2 antagonist of cell death“ und „Bcl-2 associated x protein“ und deren Interaktion mit der äußeren mitochondrialen Membran moduliert.¹⁶⁷ Die Therapie mit ABT263 reduziert die Atherogenese im ApoE-defizienten-Mausmodell und senkt die Il-6 Plasmakonzentration als ein Marker der systemischen Inflammation.¹⁶⁸ Der nachweisbare *in vitro* Effekt von ABT263 auf die Reduktion seneszenter VSMC konnte *in vivo* nicht bestätigt werden.¹⁶⁸ Es wurden weitere senolytische Medikamente auf der Basis von natürlich vorkommenden Flavonoiden entdeckt. Eines davon ist Quercetin, das ein Polyphenol mit anti-oxidativen Eigenschaften ist und in hoher Konzentration in verschiedenen Obst- und Gemüsesorten vorkommt.¹⁶⁹ Durch Quercetin werden seneszente Zellen selektiv durch die Inhibition des Phosphoinositid-3-Kinase/Akt und p53/p21/serpine Signalweges durch Reaktivierung der Apoptose eliminiert. Durch die kombinierte senolytische Therapie mit Quercetin und Dasatinib, einem Inhibitor der Bcr-Abl-Tyrosinkinase und der Sarcoma-Tyrosinkinase, konnte die Seneszenz-assoziierte verminderte körperliche Belastbarkeit und die erhöhte Mortalität alter Mäuse verbessert werden.¹⁷⁰ Eine ähnliche Wirkung zeigte die kombinierte senolytische Therapie bei jungen Mäusen, denen seneszente Zellen transplantiert wurden.¹⁷⁰

„Senomorphics“ beeinflussen an unterschiedlichen Stellen den SASP und die zelluläre und morphologische Funktion der Zelle. Hierzu zählen Inhibitoren des Januskinase/„signal transducers and activators of transcription“ Signalwegs, von NFκB oder mTOR und Aktivatoren

von Sirtuinen, einer Gruppe von Histon-Acetylasen, Aktivatoren der Autophagie und anti-oxidative und anti-inflammatorische Moleküle, die den zellulären Metabolismus und damit den zellulären Energiehaushalt modulieren.⁶⁸ Beispiele für solche Medikamente sind der mTOR Inhibitor Rapamycin und Metformin. Eine Therapie mit Rapamycin vermindert die Entstehung einer replikativen Seneszenz, verbessert die Erneuerung hämatopoetischer Stammzellen sowie das Überleben und den Gesundheitsstatus in unterschiedlichen Tiermodellen.¹⁷¹ Eine Erklärung ist die Beeinflussung des SASP, insbesondere über einer verminderte Expression von Il-6 und Il-1 α , die mit einem reduzierten oxidativen Stress und einer erhöhten Aktivität der Adenosin-Monophosphat-abhängigen Kinase verbunden ist.^{87,171} Mit einer mTOR Inhibition sind zahlreiche Nebenwirkungen assoziiert, die insbesondere mit der immunsuppressiven und metabolischen Wirkung auf die Induktion einer Insulinresistenz und einer Hyperlipidämie verbunden sind.¹⁷² Die Therapie mit Metformin zeigt ebenfalls potenziell vorteilhafte Wirkungen auf die zelluläre Alterung und ist mit einer potenziell lebensverlängernden Wirkung über die Modulation des SASP verbunden.⁸⁷ Über anti-oxidative Eigenschaften besteht außerdem eine protektive Wirkung auf die DNA.¹⁶⁷

Diese Befunde zeigen, dass die Modulation des SASP eine wichtige Rolle für die Therapie des „Inflammaging“ einnehmen kann. Hierfür müssen zentrale pathophysiologische Mechanismen identifiziert werden, um die Nebenwirkungsrate zu minimieren. PRR scheinen zentral in das urämische „Inflammaging“ und die urämisch vaskuläre Progerie eingebunden zu sein, so dass ein auf die Interaktion zwischen urämischen DAMP und PRR ausgerichteter Ansatz eine kausale Therapie des urämischen „Inflammaging“ darstellen könnte.¹⁵

3.4 Schlussfolgerung

Für die physiologische Funktion der VSMC ist die Eigenschaft der Kontraktion essenziell. Um sich gegen äußere Stressoren behaupten zu können, wechseln Zellen ihren Phänotyp über umfangreiche Veränderungen des Transkriptoms im Sinne einer Phänotyp-Plastizität. Daher können VSMC unter den Bedingungen eines chronischen „Inflammaging“ ihren Phänotyp ebenfalls anpassen. Durch eine vermehrt anfallende Last an DAMP/Alarminen werden transmembranöse und intrazelluläre PRR aktiviert und ein SASP mit der Expression NF κ B-abhängige Il-1 Zytokine induziert. Insbesondere über Il-1 β wird ein OBP induziert und die Mechanismen der Kalzifizierung aktiviert. In Abhängigkeit von der Art des zellulären Stressors und der Menge der intrazellulären ROS können sich DNA-Schädigungsmustern ausbilden, die mit einer Aktivierung von DDR einhergehen. Hierdurch können die VSMC zusätzlich einen seneszenten Phänotyp einnehmen, der ebenfalls mit der Ausbildung bzw. Verstärkung des SASP einhergeht, welcher im Verlauf zu einer Verstärkung des OBP und der Kalzifizierung führt. Auch wenn die MAC pathophysiologisch mit erheblichen Veränderungen der vaskulären Funktion wie u.a. mit der Erhöhung der vaskulären Steifigkeit verbunden ist, so stellt diese als

Defektheilung eine Möglichkeit dar, Störungen der strukturellen vaskulären Integrität, die letal sein können, zu verhindern. Die Ergebnisse dieser Habilitationsschrift weisen darauf hin, dass unterschiedliche zelluläre Stressoren die beschriebene Phänotyp-Transformation in einen OBP v.a. über Aktivierung des Nlrp3 Inflammasoms, als einen zentralen Vermittler des SASP, induzieren können.

Die Urämie stellt ein prädestiniertes Krankheitsbild für die Ausbildung einer vaskulären Progerie aufgrund eines chronisch-urämischen „Inflammaging“ dar. Sie ist geprägt durch eine systemische Dyshomöostase, ausgelöst durch eine hohe pro-inflammatorische Urämietoxinlast. Urämietoxine können selbst als DAMP/Alarmino wirken oder die Urämietoxine führen zu einer Schädigung von Zellen, die dann DAMP/Alarmino freisetzen. Hierdurch kommt es zu einer kontinuierlichen Aktivierung von PRR, über die das chronisch-urämische „Inflammaging“ unterhalten wird und sich die oben skizzierten Phänotyp-Transformationen ausbilden können. In Abhängigkeit der Ausprägung der zellulären Schädigung und des SASP entsteht ein pro-inflammatorischer „circulus vitiosus“ v.a. über Zytokine der Il-1 Superfamilie, über den der Prozess des urämischen „Inflammaging“ sich verstetigen und verstärken kann. Das Nlrp3 Inflammasom stellt daher ein interessantes therapeutisches Ziel für die Prävention und gezielte Behandlung der urämisch vaskulären Progerie dar. Um den Zusammenhang zwischen Inflammation, Seneszenz und Kalzifizierung besser verstehen zu können, sind neue methodische Ansätze notwendig, um die multifaktorielle Pathophysiologie zum einen auf Einzelzelebene, aber auch im komplexen Gewebeverband untersuchen zu können. Die in dieser Habilitation neu etablierten methodischen Ansätze können hierfür von Nutzen sein.

3.5 Ausblick

Die Identifikation von Schlüsselzielen und die Überprüfung der Wirksamkeit pharmakologischer Intervention in geeigneten experimentellen Modellen wird helfen, neue Therapieoptionen in klinischen Studien einsetzen zu können. Hierfür ist die Etablierung weiterer methodischer Ansätze notwendig, durch die bereits das Anfangsstadium der Kalzifizierung nachgewiesen werden kann. Die Beeinflussung des chronisch-urämischen „Inflammaging“ durch Modifikation der Ausbildung des SASP und des assoziierten oxidativen Stressniveaus bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz kann ein therapeutisches Konzept für die urämische Progerie darstellen. Neben der Suche nach neuen Wirkstoffkandidaten könnten etablierte Wirkstoffe wie u.a. Il-1 β Antikörper/Antagonisten therapeutische Optionen bieten, um die hohe kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität niereninsuffizienter Patienten verbessern zu können.

4. Zusammenfassung

Stand der Forschung: Kardiovaskuläre Erkrankungen sind weltweit die führende Todesursache, wobei insbesondere altersbedingte vaskuläre Veränderungen in den Fokus rücken. Die Arteriosklerose ist eine wichtige Entität systemischer Gefäßveränderungen und gekennzeichnet durch eine Kalzifizierung der *tunica media* („medial arterial calcification“, MAC). Ein bedeutender Risikofaktor für die MAC ist die chronische Nierenkrankheit. Verschiedene Mediatoren und Inhibitoren beeinflussen die MAC Pathogenese. Hierbei rücken evolutionär konservierte Mechanismen der Mustererkennung, u.a. die Aktivierung des „NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein“ 3 (Nlrp3) Inflammasom und das einhergehende „Inflammaging“ in den Fokus der Untersuchungen.

Fragestellung: Das Ziel dieser kumulativen Arbeit ist Etablierung von geeigneten Modellen und die Charakterisierung zentraler Signalwege in glatten Gefäßmuskelzellen („vascular smooth muscle cell“, VSMC) innerhalb des urämischen „Inflammaging“.

Ergebnisse: Um die multifaktorielle MAC Genese und insbesondere die Interaktion der Signalwege untersuchen zu können, wurde in der ersten Arbeit ein Einzelzell-basiertes Modell zum Nachweis verschiedener Seneszenz- und Kalzifizierungsmarker etabliert. Durch die Etablierung des neuen *ex vivo* Modells der isoliert-perfundierten Arterie im Rahmen der zweiten Arbeit kann die MAC Pathogenese unter Perfusionsbedingungen analysiert werden. Die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im Signalweg der MAC konnte in der dritten und vierten Arbeit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden. ROS aktivieren das Nlrp3 Inflammasom als intrazellulären Mustererkennungsrezeptor. Über die Sekretion von Interleukin 1 β werden pro-inflammatorische und osteogene Signalwege in VSMC induziert, die mit einer Phänotyptransformation einhergehen und so die MAC Pathogenese beeinflussen.

Diskussion & Ausblick: Zellulärer Stress der VSMC resultiert im „Inflammaging“ und osteogenem Phänotyp, die letztendlich in Mechanismen der Kalzifizierung münden. In Abhängigkeit von der Art des Stressors nehmen die VSMC zusätzlich einen seneszenten Phänotyp an, der „Inflammaging“ und Kalzifizierung verstärkt. Das Nlrp3 Inflammasom nimmt eine zentrale Rolle im intrazellulären Signalweg der Pathogenese ein. Diese Defektheilung geht mit erheblichen strukturellen und rheologischen Veränderungen im Gefäß einher, stabilisieren aber die Gefäßintegrität. Die Urämie ist ein prädestiniertes Krankheitsbild für die Ausbildung eines chronisch-urämischen „Inflammaging“ und einer vaskulären Progerie. Die Modulation des chronisch-urämischen „Inflammaging“ kann ein therapeutisches Ziel für die urämische Progerie sein. Neben der Suche nach neuen Wirkstoffkandidaten können etablierte Wirkstoffe therapeutische Optionen bieten, um die hohe kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität von niereninsuffizienten Patienten reduzieren zu können.

5. Summary

State of the art: Cardiovascular disease is the leading cause of death worldwide and is associated with significant health care costs. Therefore, age-related vascular changes come to the fore. Arteriosclerosis is an important entity of systemic vascular changes and is characterized by calcification of the *tunica media* (medial arterial calcification, MAC). A significant risk factor for MAC is chronic kidney disease. Various mediators and inhibitors influence the MAC pathogenesis. Here, evolutionary conserved mechanisms of pattern recognition, including activation of the "NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein" 3 (Nlrp3) inflammasome and the accompanying "inflammaging" come into focus.

Purpose: The aim of this cumulative work is to establish appropriate models and characterize key signaling pathways in vascular smooth muscle cells (VSMC) within uremic "inflammaging".

Results: For investigation of the multifactorial MAC progression and in particular the interaction of signaling pathways, a single cell-based model for the detection of different senescence and calcification markers was established in the first work. The establishment of another model in the second work, the isolated-perfused artery, allows MAC pathogenesis to be analyzed under perfusion conditions. The importance of reactive oxygen species (ROS) in the MAC signaling pathway was highlighted in the third and fourth papers, both *in vitro* and *in vivo*. These ROS serve as an activation signal for an intracellular pattern recognition receptor as the Nlrp3 inflammasome. Nlrp3 maintains pro-inflammatory signaling pathways in VSMC via secretion of interleukin 1 β and influences MAC via induction of osteogenic markers and concomitant phenotype transformation of VSMC.

Discussion & Outlook: Cellular stress of VSMC results in "inflammaging" and an osteogenic phenotype, leading to calcification. Depending on the type of stressor, VSMC additionally adopt a senescent phenotype that enhances "inflammaging" and calcification. The Nlrp3 inflammasome occupies a central role in the intracellular signaling pathway of the pathogenesis. This defect healing is accompanied by significant structural and rheological changes in vessels but stabilizes the vessel integrity. Uremia is a predestined clinical picture for the development of chronic uremic "inflammaging" and vascular progeria. Modulation of chronic uremic "inflammaging" may be a therapeutic target for uremic progeria. In addition to the search for new drug candidates, established agents may offer therapeutic options to reduce the high cardiovascular morbidity and mortality of renal failure patients.

6. Literaturangaben

- 1 Vos, T. *et al.* Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet* **396**, 1204-1222, doi:10.1016/s0140-6736(20)30925-9 (2020).
- 2 Roth, G. A. *et al.* Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol* **76**, 2982-3021, doi:10.1016/j.jacc.2020.11.010 (2020).
- 3 Wang, H. *et al.* Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet* **388**, 1459-1544, doi:10.1016/s0140-6736(16)31012-1 (2016).
- 4 Taal, M. W. *et al.* *Brenner & Rector's The Kidney*. 9th edn, (2012).
- 5 Mahomed, F. A. On the Pathology of Uraemia and the Socalled Uraemic Convulsions. *Br Med J* **2**, 10-12, doi:10.1136/bmj.2.862.10 (1877).
- 6 Vanholder, R. *et al.* Biochemical and Clinical Impact of Organic Uremic Retention Solutes: A Comprehensive Update. *Toxins (Basel)* **10**, 33, doi:10.3390/toxins10010033 (2018).
- 7 Wen, C. P. *et al.* All-cause mortality attributable to chronic kidney disease: a prospective cohort study based on 462 293 adults in Taiwan. *Lancet* **371**, 2173-2182, doi:10.1016/S0140-6736(08)60952-6 (2008).
- 8 Cockwell, P. *et al.* The global burden of chronic kidney disease. *Lancet* **395**, 662-664, doi:10.1016/S0140-6736(19)32977-0 (2020).
- 9 Drey, N. *et al.* A population-based study of the incidence and outcomes of diagnosed chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* **42**, 677-684, doi:10.1016/s0272-6386(03)00916-8 (2003).
- 10 van Walraven, C. *et al.* Survival trends in ESRD patients compared with the general population in the United States. *Am J Kidney Dis* **63**, 491-499, doi:10.1053/j.ajkd.2013.09.011 (2014).
- 11 Tonelli, M. *et al.* Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review. *J Am Soc Nephrol* **17**, 2034-2047, doi:10.1681/ASN.2005101085 (2006).
- 12 Hou, W. *et al.* Effect of statin therapy on cardiovascular and renal outcomes in patients with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J* **34**, 1807-1817, doi:10.1093/eurheartj/eh065 (2013).
- 13 Virchow, R. Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. 1858. *Nutr Rev* **47**, 23-25, doi:10.1111/j.1753-4887.1989.tb02747.x (1989).
- 14 Virchow, R. Der ateromatose prozess der arterien. *Wien Med Wochenschr* **6**, 825-827 (1856).
- 15 Lanzer, P. *et al.* Medial Arterial Calcification: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol* **78**, 1145-1165, doi:10.1016/j.jacc.2021.06.049 (2021).
- 16 Durham, A. L. *et al.* Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc Res* **114**, 590-600, doi:10.1093/cvr/cvy010 (2018).
- 17 Sinha, S. *et al.* Embryonic origins of human vascular smooth muscle cells: implications for in vitro modeling and clinical application. *Cell Mol Life Sci* **71**, 2271-2288, doi:10.1007/s00018-013-1554-3 (2014).
- 18 Voelkl, J. *et al.* Signaling pathways involved in vascular smooth muscle cell calcification during hyperphosphatemia. *Cell Mol Life Sci* **76**, 2077-2091, doi:10.1007/s00018-019-03054-z (2019).
- 19 Kurozumi, A. *et al.* IL-6 and sIL-6R induces STAT3-dependent differentiation of human VSMCs into osteoblast-like cells through JMJD2B-mediated histone demethylation of RUNX2. *Bone* **124**, 53-61, doi:10.1016/j.bone.2019.04.006 (2019).
- 20 Song, E. *et al.* Network determinants of cardiovascular calcification and repositioned drug treatments. *FASEB J* **34**, 11087-11100, doi:10.1096/fj.202001062R (2020).
- 21 Byon, C. H. *et al.* Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem* **283**, 15319-15327, doi:10.1074/jbc.M800021200 (2008).
- 22 Greco, A. *et al.* Molecular imaging and quantification of smooth muscle cell and aortic tissue calcification in vitro and ex vivo with a fluorescent hydroxyapatite-specific probe. *Biomedicines* (2022).
- 23 Cozzolino, M. *et al.* The Key Role of Phosphate on Vascular Calcification. *Toxins (Basel)* **11**, 213, doi:10.3390/toxins11040213 (2019).
- 24 Reynolds, J. L. *et al.* Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol* **15**, 2857-2867, doi:10.1097/01.ASN.0000141960.01035.28 (2004).
- 25 Proudfoot, D. *et al.* Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res* **87**, 1055-1062, doi:10.1161/01.res.87.11.1055 (2000).
- 26 Chen, N. X. *et al.* Matrix vesicles induce calcification of recipient vascular smooth muscle cells through multiple signaling pathways. *Kidney Int* **93**, 343-354, doi:10.1016/j.kint.2017.07.019 (2018).
- 27 Pai, A. *et al.* Elastin degradation and vascular smooth muscle cell phenotype change precede cell loss and arterial medial calcification in a uremic mouse model of chronic kidney disease. *Am J Pathol* **178**, 764-773, doi:10.1016/j.ajpath.2010.10.006 (2011).
- 28 Dai, X. Y. *et al.* Phosphate-induced autophagy counteracts vascular calcification by reducing matrix vesicle release. *Kidney Int* **83**, 1042-1051, doi:10.1038/ki.2012.482 (2013).
- 29 Zittermann, A. *et al.* Vitamin D and vascular calcification. *Curr Opin Lipidol* **18**, 41-46, doi:10.1097/MOL.0b013e328011c6fc (2007).
- 30 Herrmann, J. *et al.* Research Models for Studying Vascular Calcification. *Int J Mol Sci* **21**, 2204, doi:10.3390/ijms21062204 (2020).

- 31 Kang, Y. H. *et al.* Bone morphogenetic protein-7 inhibits vascular calcification induced by high vitamin D in mice. *Tohoku J Exp Med* **221**, 299-307, doi:10.1620/tjem.221.299 (2010).
- 32 Jono, S. *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation* **98**, 1302-1306, doi:10.1161/01.cir.98.13.1302 (1998).
- 33 Schmidt, N. *et al.* Vitamin D receptor deficiency and low vitamin D diet stimulate aortic calcification and osteogenic key factor expression in mice. *PLoS One* **7**, e35316, doi:10.1371/journal.pone.0035316 (2012).
- 34 Schmidt, N. *et al.* Dietary vitamin D inadequacy accelerates calcification and osteoblast-like cell formation in the vascular system of LDL receptor knockout and wild-type mice. *J Nutr* **144**, 638-646, doi:10.3945/jn.113.189118 (2014).
- 35 Aoshima, Y. *et al.* Vitamin D receptor activators inhibit vascular smooth muscle cell mineralization induced by phosphate and TNF-alpha. *Nephrol Dial Transplant* **27**, 1800-1806, doi:10.1093/ndt/gfr758 (2012).
- 36 Tamagaki, K. *et al.* Severe hyperparathyroidism with bone abnormalities and metastatic calcification in rats with adenine-induced uraemia. *Nephrol Dial Transplant* **21**, 651-659, doi:10.1093/ndt/gfi273 (2006).
- 37 Gracioli, F. G. *et al.* Phosphorus overload and PTH induce aortic expression of Runx2 in experimental uraemia. *Nephrol Dial Transplant* **24**, 1416-1421, doi:10.1093/ndt/gfn686 (2009).
- 38 Carrillo-Lopez, N. *et al.* The receptor activator of nuclear factor kappaBeta ligand receptor leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 4 contributes to parathyroid hormone-induced vascular calcification. *Nephrol Dial Transplant* **36**, 618-631, doi:10.1093/ndt/gfaa290 (2021).
- 39 Bover, J. *et al.* Adynamic bone disease: from bone to vessels in chronic kidney disease. *Semin Nephrol* **34**, 626-640, doi:10.1016/j.semnephrol.2014.09.008 (2014).
- 40 Ngai, D. *et al.* Cell-Matrix Interactions and Matricrine Signaling in the Pathogenesis of Vascular Calcification. *Front Cardiovasc Med* **5**, 174, doi:10.3389/fcvm.2018.00174 (2018).
- 41 Suzuki, M. *et al.* Calcium-binding properties of fetuin in fetal bovine serum. *J Exp Zool* **270**, 501-507, doi:10.1002/jez.1402700603 (1994).
- 42 Bjorklund, G. *et al.* The Role of Matrix Gla Protein (MGP) in Vascular Calcification. *Curr Med Chem* **27**, 1647-1660, doi:10.2174/0929867325666180716104159 (2020).
- 43 Schurgers, L. J. *et al.* The circulating inactive form of matrix gla protein is a surrogate marker for vascular calcification in chronic kidney disease: a preliminary report. *Clin J Am Soc Nephrol* **5**, 568-575, doi:10.2215/CJN.07081009 (2010).
- 44 Smith, E. R. *et al.* Phosphorylated fetuin-A-containing calciprotein particles are associated with aortic stiffness and a procalcific milieu in patients with pre-dialysis CKD. *Nephrol Dial Transplant* **27**, 1957-1966, doi:10.1093/ndt/gfr609 (2012).
- 45 Scialla, J. J. *et al.* Roles of phosphate and fibroblast growth factor 23 in cardiovascular disease. *Nat Rev Nephrol* **10**, 268-278, doi:10.1038/nrneph.2014.49 (2014).
- 46 Jimbo, R. *et al.* Fibroblast growth factor 23 accelerates phosphate-induced vascular calcification in the absence of Klotho deficiency. *Kidney Int* **85**, 1103-1111, doi:10.1038/ki.2013.332 (2014).
- 47 Ben-Dov, I. Z. *et al.* The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest* **117**, 4003-4008, doi:10.1172/JCI32409 (2007).
- 48 Scialla, J. J. *et al.* Fibroblast growth factor 23 is not associated with and does not induce arterial calcification. *Kidney Int* **83**, 1159-1168, doi:10.1038/ki.2013.3 (2013).
- 49 Lindberg, K. *et al.* Arterial klotho expression and FGF23 effects on vascular calcification and function. *PLoS One* **8**, e60658, doi:10.1371/journal.pone.0060658 (2013).
- 50 Zhu, D. *et al.* A protective role for FGF-23 in local defence against disrupted arterial wall integrity? *Mol Cell Endocrinol* **372**, 1-11, doi:10.1016/j.mce.2013.03.008 (2013).
- 51 Lang, F. *et al.* Therapeutic Interference With Vascular Calcification-Lessons From Klotho-Hypomorphic Mice and Beyond. *Front Endocrinol (Lausanne)* **9**, 207, doi:10.3389/fendo.2018.00207 (2018).
- 52 Olauson, H. *et al.* Tissue expression and source of circulating alphaKlotho. *Bone* **100**, 19-35, doi:10.1016/j.bone.2017.03.043 (2017).
- 53 Druke, T. B. *et al.* Klotho spins the thread of life--what does Klotho do to the receptors of fibroblast growth factor-23 (FGF23)? *Nephrol Dial Transplant* **22**, 1524-1526, doi:10.1093/ndt/gfm122 (2007).
- 54 Zhao, Y. *et al.* Mammalian target of rapamycin signaling inhibition ameliorates vascular calcification via Klotho upregulation. *Kidney Int* **88**, 711-721, doi:10.1038/ki.2015.160 (2015).
- 55 Baker, D. J. *et al.* Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* **530**, 184-189, doi:10.1038/nature16932
<http://www.nature.com/nature/journal/v530/n7589/abs/nature16932.html#supplementary-information> (2016).
- 56 Zhang, W. *et al.* Secreted klotho protein attenuates osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in vitro via inactivation of the FGFR1/ERK signaling pathway. *Growth Factors* **33**, 356-365, doi:10.3109/08977194.2015.1108313 (2015).
- 57 Lewin, E. *et al.* The vascular secret of Klotho. *Kidney Int* **87**, 1089-1091, doi:10.1038/ki.2015.80 (2015).
- 58 Westenfeld, R. *et al.* Vascular calcification and fetuin-A deficiency in chronic kidney disease. *Trends Cardiovasc Med* **17**, 124-128, doi:10.1016/j.tcm.2007.02.005 (2007).
- 59 Luo, G. *et al.* Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* **386**, 78-81, doi:10.1038/386078a0 (1997).
- 60 Villa-Bellosta, R. *et al.* Defective extracellular pyrophosphate metabolism promotes vascular calcification in a mouse model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome that is ameliorated on pyrophosphate treatment. *Circulation* **127**, 2442-2451, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000571 (2013).
- 61 Villa-Bellosta, R. *et al.* Phosphate, pyrophosphate, and vascular calcification: a question of balance. *Eur Heart J* **38**, 1801-1804, doi:10.1093/eurheartj/ehv605 (2017).

- 62 Schoppet, M. *et al.* RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 549-553, doi:10.1161/01.atv.0000012303.37971.da (2002).
- 63 Louvet, L. *et al.* Magnesium prevents phosphate-induced calcification in human aortic vascular smooth muscle cells. *Nephrol Dial Transplant* **28**, 869-878, doi:10.1093/ndt/gfs520 (2013).
- 64 Xu, J. *et al.* Magnesium modulates the expression levels of calcification-associated factors to inhibit calcification in a time-dependent manner. *Exp Ther Med* **9**, 1028-1034, doi:10.3892/etm.2015.2215 (2015).
- 65 Zununi Vahed, S. *et al.* Vascular Calcification: An Important Understanding in Nephrology. *Vasc Health Risk Manag* **16**, 167-180, doi:10.2147/VHRM.S242685 (2020).
- 66 Mace, M. L. *et al.* New Insights to the Crosstalk between Vascular and Bone Tissue in Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder. *Metabolites* **11**, doi:10.3390/metabo11120849 (2021).
- 67 Ferrucci, L. *et al.* Inflammaging: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol* **15**, 505-522, doi:10.1038/s41569-018-0064-2 (2018).
- 68 Dai, L. *et al.* Early Vascular Ageing and Cellular Senescence in Chronic Kidney Disease. *Comput Struct Biotechnol J* **17**, 721-729, doi:10.1016/j.csbj.2019.06.015 (2019).
- 69 Franceschi, C. *et al.* Inflammaging and 'Garb-aging'. *Trends Endocrinol Metab* **28**, 199-212, doi:10.1016/j.tem.2016.09.005 (2017).
- 70 Ungvari, Z. *et al.* Endothelial dysfunction and angiogenesis impairment in the ageing vasculature. *Nat Rev Cardiol* **15**, 555-565, doi:10.1038/s41569-018-0030-z (2018).
- 71 Rubio-Ruiz, M. E. *et al.* An Evolutionary Perspective of Nutrition and Inflammation as Mechanisms of Cardiovascular Disease. *Int J Evol Biol* **2015**, 179791, doi:10.1155/2015/179791 (2015).
- 72 Roh, J. S. *et al.* Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw* **18**, e27, doi:10.4110/in.2018.18.e27 (2018).
- 73 Granata, S. *et al.* NLRP3 inflammasome activation in dialyzed chronic kidney disease patients. *PLoS One* **10**, e0122272, doi:10.1371/journal.pone.0122272 (2015).
- 74 Wen, C. *et al.* Nalp3 inflammasome is activated and required for vascular smooth muscle cell calcification. *Int J Cardiol* **168**, 2242-2247, doi:10.1016/j.ijcard.2013.01.211 (2013).
- 75 Chen, G. Y. *et al.* Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* **10**, 826-837, doi:10.1038/nri2873 (2010).
- 76 Takahashi, M. NLRP3 inflammasome as a key driver of vascular disease. *Cardiovasc Res* **118**, 372-385, doi:10.1093/cvr/cvab010 (2022).
- 77 de Zoete, M. R. *et al.* Inflammasomes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, a016287, doi:10.1101/cshperspect.a016287 (2014).
- 78 Evavold, C. L. *et al.* The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. *Immunity* **48**, 35-44 e36, doi:10.1016/j.immuni.2017.11.013 (2018).
- 79 Ruhl, S. *et al.* ESCRT-dependent membrane repair negatively regulates pyroptosis downstream of GSDMD activation. *Science* **362**, 956-960, doi:10.1126/science.aar7607 (2018).
- 80 Weber, A. *et al.* Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal* **3**, cm1, doi:10.1126/scisignal.3105cm1 (2010).
- 81 Hayflick, L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* **37**, 614-636, doi:10.1016/0014-4827(65)90211-9 (1965).
- 82 Freund, A. *et al.* Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med* **16**, 238-246, doi:10.1016/j.molmed.2010.03.003 (2010).
- 83 Childs, B. G. *et al.* Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med* **21**, 1424-1435, doi:10.1038/nm.4000 (2015).
- 84 Shiloh, Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* **3**, 155-168, doi:10.1038/nrc1011 (2003).
- 85 Duer, M. *et al.* DNA Damage Response: A Molecular Lynchpin in the Pathobiology of Arteriosclerotic Calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **40**, e193-e202, doi:10.1161/ATVBAHA.120.313792 (2020).
- 86 Herranz, N. *et al.* Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest* **128**, 1238-1246, doi:10.1172/JCI95148 (2018).
- 87 Lopes-Paciencia, S. *et al.* The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine* **117**, 15-22, doi:10.1016/j.cyto.2019.01.013 (2019).
- 88 Nelson, G. *et al.* The senescent bystander effect is caused by ROS-activated NF-kappaB signalling. *Mech Ageing Dev* **170**, 30-36, doi:10.1016/j.mad.2017.08.005 (2018).
- 89 Rodier, F. *et al.* Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* **192**, 547-556, doi:10.1083/jcb.201009094 (2011).
- 90 Herrmann, J. *et al.* A Novel Protocol for Detection of Senescence and Calcification Markers by Fluorescence Microscopy. *Int J Mol Sci* **21**, doi:10.3390/ijms21103475 (2020).
- 91 Ridker, P. M. *et al.* Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med* **359**, 2195-2207, doi:10.1056/NEJMoa0807646 (2008).
- 92 Satoh, M. *et al.* NLRP3 inflammasome activation in coronary artery disease: results from prospective and randomized study of treatment with atorvastatin or rosuvastatin. *Clin Sci (Lond)* **126**, 233-241, doi:10.1042/CS20130043 (2014).
- 93 Ridker, P. M. *et al.* Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med* **377**, 1119-1131, doi:10.1056/NEJMoa1707914 (2017).
- 94 Olive, M. *et al.* Cardiovascular pathology in Hutchinson-Gilford progeria: correlation with the vascular pathology of aging. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 2301-2309, doi:10.1161/ATVBAHA.110.209460 (2010).
- 95 Zhang, J. *et al.* A human iPSC model of Hutchinson Gilford Progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects. *Cell Stem Cell* **8**, 31-45, doi:10.1016/j.stem.2010.12.002 (2011).
- 96 Ahmed, M. S. *et al.* Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A Premature Aging Disease. *Mol Neurobiol* **55**, 4417-4427, doi:10.1007/s12035-017-0610-7 (2018).

- 97 Nakano-Kurimoto, R. *et al.* Replicative senescence of vascular smooth muscle cells enhances the calcification through initiating the osteoblastic transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**, H1673-1684, doi:10.1152/ajpheart.00455.2009 (2009).
- 98 Gonzalez-Dominguez, A. *et al.* Inhibition of the NLRP3 inflammasome improves lifespan in animal murine model of Hutchinson-Gilford Progeria. *EMBO Mol Med* **13**, e14012, doi:10.15252/emmm.202114012 (2021).
- 99 Duewell, P. *et al.* NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* **464**, 1357-1361, doi:10.1038/nature08938 (2010).
- 100 Sigrist, M. *et al.* Vascular calcification and cardiovascular function in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* **21**, 707-714, doi:10.1093/ndt/gfi236 (2006).
- 101 Civilibal, M. *et al.* Coronary artery calcifications in children with end-stage renal disease. *Pediatr Nephrol* **21**, 1426-1433, doi:10.1007/s00467-006-0159-6 (2006).
- 102 Carrero, J. J. *et al.* Inflammation in end-stage renal disease--what have we learned in 10 years? *Semin Dial* **23**, 498-509, doi:10.1111/j.1525-139X.2010.00784.x (2010).
- 103 Kooman, J. P. *et al.* Chronic kidney disease and premature ageing. *Nat Rev Nephrol* **10**, 732-742, doi:10.1038/nrneph.2014.185 (2014).
- 104 Sanchis, P. *et al.* Arterial "inflammaging" drives vascular calcification in children on dialysis. *Kidney Int* **95**, 958-972, doi:10.1016/j.kint.2018.12.014 (2019).
- 105 Schuchardt, M. *et al.* Dysfunctional high-density lipoprotein activates toll-like receptors via serum amyloid A in vascular smooth muscle cells. *Sci Rep* **9**, 3421, doi:10.1038/s41598-019-39846-3 (2019).
- 106 Falconi, C. A. *et al.* Uremic Toxins: An Alarming Danger Concerning the Cardiovascular System. *Front Physiol* **12**, 686249, doi:10.3389/fphys.2021.686249 (2021).
- 107 Sun, Y. *et al.* Uremic toxins are conditional danger- or homeostasis-associated molecular patterns. *Front Biosci (Landmark Ed)* **23**, 348-387, doi:10.2741/4595 (2018).
- 108 White, W. E. *et al.* Aging and uremia: Is there cellular and molecular crossover? *World J Nephrol* **4**, 19-30, doi:10.5527/wjn.v4.i1.19 (2015).
- 109 Martin-Rodriguez, S. *et al.* TLR4 and NALP3 inflammasome in the development of endothelial dysfunction in uraemia. *Eur J Clin Invest* **45**, 160-169, doi:10.1111/eci.12392 (2015).
- 110 Mihajlovic, M. *et al.* Protein-Bound Uremic Toxins Induce Reactive Oxygen Species-Dependent and Inflammasome-Mediated IL-1beta Production in Kidney Proximal Tubule Cells. *Biomedicines* **9**, doi:10.3390/biomedicines9101326 (2021).
- 111 Ferrer, L. M. *et al.* Caspase-1 Plays a Critical Role in Accelerating Chronic Kidney Disease-Promoted Neointimal Hyperplasia in the Carotid Artery. *J Cardiovasc Transl Res* **9**, 135-144, doi:10.1007/s12265-016-9683-3 (2016).
- 112 Ridker, P. M. *et al.* Inhibition of Interleukin-1beta by Canakinumab and Cardiovascular Outcomes in Patients With Chronic Kidney Disease. *J Am Coll Cardiol* **71**, 2405-2414, doi:10.1016/j.jacc.2018.03.490 (2018).
- 113 Herrmann, J. *et al.* Vascular Calcification in Rodent Models-Keeping Track with an Extended Method Assortment. *Biology (Basel)* **10**, doi:10.3390/biology10060459 (2021).
- 114 Russell, W. M. S. *et al.* *The principles of human experimental technique.* (London Methuen, 1959).
- 115 Herrmann, J. *et al.* Stressor-Induced "Inflammaging" of Vascular Smooth Muscle Cells via Nlrp3-Mediated Pro-inflammatory Auto-Loop. *Front Cardiovasc Med* **8**, 752305, doi:10.3389/fcvm.2021.752305 (2021).
- 116 Luong, T. T. D. *et al.* Acid sphingomyelinase promotes SGK1-dependent vascular calcification. *Clin Sci (Lond)* **135**, 515-534, doi:10.1042/CS20201122 (2021).
- 117 Tuttle, C. S. L. *et al.* Cellular senescence and chronological age in various human tissues: A systematic review and meta-analysis. *Aging Cell* **19**, e13083, doi:10.1111/accel.13083 (2020).
- 118 Murakami, M. *et al.* Regulation of vascular integrity. *J Mol Med (Berl)* **87**, 571-582, doi:10.1007/s00109-009-0463-2 (2009).
- 119 Schuchardt, M. *et al.* A Novel Long-Term ex vivo Model for Studying Vascular Calcification Pathogenesis: The Rat Isolated-Perfused Aorta. *J Vasc Res* **57**, 46-52, doi:10.1159/000503785 (2020).
- 120 Wang, X. *et al.* Polydimethylsiloxane embedded mouse aorta ex vivo perfusion model: proof-of-concept study focusing on atherosclerosis. *J Biomed Opt* **17**, 076006, doi:10.1117/1.JBO.17.7.076006 (2012).
- 121 Lysy, T. *et al.* Ex vivo isolated human vessel perfusion system for the design and assessment of nanomedicines targeted to the endothelium. *Bioeng Transl Med* **5**, e10154, doi:10.1002/btm2.10154 (2020).
- 122 Feldman, N. *et al.* DAMPs as mediators of sterile inflammation in aging-related pathologies. *Ageing Res Rev* **24**, 29-39, doi:10.1016/j.arr.2015.01.003 (2015).
- 123 Hennekam, R. C. Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype. *Am J Med Genet A* **140**, 2603-2624, doi:10.1002/ajmg.a.31346 (2006).
- 124 Schuchardt, M. *et al.* The endothelium-derived contracting factor uridine adenosine tetraphosphate induces P2Y(2)-mediated pro-inflammatory signaling by monocyte chemoattractant protein-1 formation. *J Mol Med (Berl)* **89**, 799-810, doi:10.1007/s00109-011-0750-6 (2011).
- 125 Schuchardt, M. *et al.* Uridine adenosine tetraphosphate activation of the purinergic receptor P2Y enhances in vitro vascular calcification. *Kidney Int* **81**, 256-265, doi:10.1038/ki.2011.326 (2012).
- 126 Prufer, J. *et al.* Harmful effects of the azathioprine metabolite 6-mercaptopurine in vascular cells: induction of mineralization. *PLoS One* **9**, e101709, doi:10.1371/journal.pone.0101709 (2014).
- 127 Schuchardt, M. *et al.* Long-Term Treatment of Azathioprine in Rats Induces Vessel Mineralization. *Biomedicines* **9**, doi:10.3390/biomedicines9030327 (2021).
- 128 Zhang, X. *et al.* Trimethylamine-N-Oxide Promotes Vascular Calcification Through Activation of NLRP3 (Nucleotide-Binding Domain, Leucine-Rich-Containing Family, Pyrin Domain-Containing-3) Inflammasome and NF-kappaB (Nuclear Factor kappaB) Signals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **40**, 751-765, doi:10.1161/ATVBAHA.119.313414 (2020).

- 129 Zhang, L. *et al.* MCC950 attenuates doxorubicin-induced myocardial injury in vivo and in vitro by inhibiting NLRP3-mediated pyroptosis. *Biomed Pharmacother* **143**, 112133, doi:10.1016/j.biopha.2021.112133 (2021).
- 130 Wei, S. *et al.* Involvement of ROS/NLRP3 Inflammasome Signaling Pathway in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol* **20**, 507-519, doi:10.1007/s12012-020-09576-4 (2020).
- 131 Han, L. *et al.* Interleukin-1 β -Induced Senescence Promotes Osteoblastic Transition of Vascular Smooth Muscle Cells. *Kidney Blood Press Res* **45**, 314-330, doi:10.1159/000504298 (2020).
- 132 Xu, D. *et al.* The synergistic action of phosphate and interleukin-6 enhances senescence-associated calcification in vascular smooth muscle cells depending on p53. *Mech Ageing Dev* **182**, 111124, doi:10.1016/j.mad.2019.111124 (2019).
- 133 Doni, A. *et al.* The Long Pentraxin PTX3 as a Link Between Innate Immunity, Tissue Remodeling, and Cancer. *Front Immunol* **10**, 712, doi:10.3389/fimmu.2019.00712 (2019).
- 134 Carrizzo, A. *et al.* Pentraxin 3 Induces Vascular Endothelial Dysfunction Through a P-selectin/Matrix Metalloproteinase-1 Pathway. *Circulation* **131**, 1495-1505; discussion 1505, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.014822 (2015).
- 135 Barreto, D. V. *et al.* Plasma interleukin-6 is independently associated with mortality in both hemodialysis and pre-dialysis patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* **77**, 550-556, doi:10.1038/ki.2009.503 (2010).
- 136 Roy, N. *et al.* IL-6 Is Associated with Progression of Coronary Artery Calcification and Mortality in Incident Dialysis Patients. *Am J Nephrol* **52**, 745-752, doi:10.1159/000518652 (2021).
- 137 Rosa, M. *et al.* A Mendelian randomization study of IL6 signaling in cardiovascular diseases, immune-related disorders and longevity. *NPJ Genom Med* **4**, 23, doi:10.1038/s41525-019-0097-4 (2019).
- 138 Spoto, B. *et al.* Association of IL-6 and a functional polymorphism in the IL-6 gene with cardiovascular events in patients with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* **10**, 232-240, doi:10.2215/CJN.07000714 (2015).
- 139 Rodier, F. *et al.* Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* **11**, 973-979, doi:10.1038/ncb1909 (2009).
- 140 Cobb, A. M. *et al.* Runx2 (Runt-Related Transcription Factor 2) Links the DNA Damage Response to Osteogenic Reprogramming and Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **41**, 1339-1357, doi:10.1161/ATVBAHA.120.315206 (2021).
- 141 Liu, Y. *et al.* Prelamin A accelerates vascular calcification via activation of the DNA damage response and senescence-associated secretory phenotype in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **112**, e99-109, doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.300543 (2013).
- 142 Hari, P. *et al.* The innate immune sensor Toll-like receptor 2 controls the senescence-associated secretory phenotype. *Sci Adv* **5**, eaaw0254, doi:10.1126/sciadv.aaw0254 (2019).
- 143 Huang, J. *et al.* DAMPs, ageing, and cancer: The 'DAMP Hypothesis'. *Ageing Res Rev* **24**, 3-16, doi:10.1016/j.arr.2014.10.004 (2015).
- 144 Cuevas, S. *et al.* Pyroptosis and Redox Balance in Kidney Diseases. *Antioxid Redox Signal* **35**, 40-60, doi:10.1089/ars.2020.8243 (2021).
- 145 Losappio, V. *et al.* Molecular Mechanisms of Premature Aging in Hemodialysis: The Complex Interplay Between Innate and Adaptive Immune Dysfunction. *Int J Mol Sci* **21**, 3422, doi:10.3390/ijms21103422 (2020).
- 146 Boini, K. M. *et al.* Trimethylamine-N-Oxide Instigates NLRP3 Inflammasome Activation and Endothelial Dysfunction. *Cell Physiol Biochem* **44**, 152-162, doi:10.1159/000484623 (2017).
- 147 Clark, W. R. *et al.* Uremic Toxins and their Relation to Dialysis Efficacy. *Blood Purif* **48**, 299-314, doi:10.1159/000502331 (2019).
- 148 Alappan, H. R. *et al.* Vascular Calcification Slows But Does Not Regress After Kidney Transplantation. *Kidney Int Rep* **5**, 2212-2217, doi:10.1016/j.ekir.2020.09.039 (2020).
- 149 Xu, C. *et al.* Interventions To Attenuate Vascular Calcification Progression in Chronic Kidney Disease: A Systematic Review of Clinical Trials. *J Am Soc Nephrol* **33**, 1011-1032, doi:10.1681/ASN.2021101327 (2022).
- 150 Hildebrand, S. *et al.* Is there a role for bisphosphonates in vascular calcification in chronic kidney disease? *Bone* **142**, 115751, doi:10.1016/j.bone.2020.115751 (2021).
- 151 Joubert, P. *et al.* Hypothesis: Phytate is an important unrecognised nutrient and potential intravenous drug for preventing vascular calcification. *Med Hypotheses* **94**, 89-92, doi:10.1016/j.mehy.2016.07.005 (2016).
- 152 Grases, F. *et al.* Phytate (Myo-inositol hexakisphosphate) inhibits cardiovascular calcifications in rats. *Front Biosci* **11**, 136-142, doi:10.2741/1786 (2006).
- 153 Van den Berg, C. J. *et al.* Inositol phosphates and phytic acid as inhibitors of biological calcification in the rat. *Clin Sci* **43**, 377-383, doi:10.1042/cs0430377 (1972).
- 154 Ferrer, M. D. *et al.* Characterization of SNF472 pharmacokinetics and efficacy in uremic and non-uremic rats models of cardiovascular calcification. *PLoS One* **13**, e0197061, doi:10.1371/journal.pone.0197061 (2018).
- 155 Raggi, P. *et al.* Effects of SNF472, a Novel Inhibitor of Hydroxyapatite Crystallization in Patients Receiving Hemodialysis - Subgroup Analyses of the CALIPSO Trial. *Kidney Int Rep* **5**, 2178-2182, doi:10.1016/j.ekir.2020.09.032 (2020).
- 156 Raggi, P. *et al.* Slowing Progression of Cardiovascular Calcification With SNF472 in Patients on Hemodialysis: Results of a Randomized Phase 2b Study. *Circulation* **141**, 728-739, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044195 (2020).
- 157 Lees, J. S. *et al.* Vitamin K and vascular calcification. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **30**, 430-436, doi:10.1097/MNH.0000000000000712 (2021).
- 158 Liu, H. *et al.* Puerarin inhibits vascular calcification of uremic rats. *Eur J Pharmacol* **855**, 235-243, doi:10.1016/j.ejphar.2019.05.023 (2019).
- 159 Chen, T. C. *et al.* The antagonism of 6-shogaol in high-glucose-activated NLRP3 inflammasome and consequent calcification of human artery smooth muscle cells. *Cell Biosci* **10**, 5, doi:10.1186/s13578-019-0372-1 (2020).

-
- 160 Pang, Q. *et al.* Irisin protects against vascular calcification by activating autophagy and inhibiting NLRP3-mediated vascular smooth muscle cell pyroptosis in chronic kidney disease. *Cell Death Dis* **13**, 283, doi:10.1038/s41419-022-04735-7 (2022).
- 161 Zahid, A. *et al.* Pharmacological Inhibitors of the NLRP3 Inflammasome. *Front Immunol* **10**, 2538, doi:10.3389/fimmu.2019.02538 (2019).
- 162 Zeng, W. *et al.* The selective NLRP3 inhibitor MCC950 hinders atherosclerosis development by attenuating inflammation and pyroptosis in macrophages. *Sci Rep* **11**, 19305, doi:10.1038/s41598-021-98437-3 (2021).
- 163 Sharma, A. *et al.* Specific NLRP3 Inhibition Protects Against Diabetes-Associated Atherosclerosis. *Diabetes* **70**, 772-787, doi:10.2337/db20-0357 (2021).
- 164 Lagoumtzi, S. M. *et al.* Senolytics and senomorphics: Natural and synthetic therapeutics in the treatment of aging and chronic diseases. *Free Radic Biol Med* **171**, 169-190, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2021.05.003 (2021).
- 165 Childs, B. G. *et al.* Senescent cells: a therapeutic target for cardiovascular disease. *J Clin Invest* **128**, 1217-1228, doi:10.1172/JCI95146 (2018).
- 166 Baker, D. J. *et al.* Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **479**, 232-236, doi:10.1038/nature10600 (2011).
- 167 Franzin, R. *et al.* Targeting Premature Renal Aging: from Molecular Mechanisms of Cellular Senescence to Senolytic Trials. *Front Pharmacol* **12**, 630419, doi:10.3389/fphar.2021.630419 (2021).
- 168 Garrido, A. M. *et al.* Efficacy and limitations of senolysis in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* **118**, 1713-1727, doi:10.1093/cvr/cvab208 (2022).
- 169 Garcia-Barrado, M. J. *et al.* Role of Flavonoids in The Interactions among Obesity, Inflammation, and Autophagy. *Pharmaceuticals (Basel)* **13**, doi:10.3390/ph13110342 (2020).
- 170 Xu, M. *et al.* Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med* **24**, 1246-1256, doi:10.1038/s41591-018-0092-9 (2018).
- 171 Lee, J. Y. *et al.* Mechanistic target of rapamycin signaling in mouse models of accelerated aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **75**, 64-72, doi:10.1093/gerona/glz059 (2020).
- 172 Wissing, K. M. *et al.* Obesity, metabolic syndrome and diabetes mellitus after renal transplantation: prevention and treatment. *Transplant Rev (Orlando)* **28**, 37-46, doi:10.1016/j.trre.2013.12.004 (2014).

Danksagung

„Man merkt nie was schon getan wurde,
man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt.“

Marie Curie

Trotzdem oder gerade deshalb möchte ich die Gelegenheit nutzen all denen **DANKE** zu sagen, die mich auf meinem wissenschaftlichen Weg bis hierher begleitet und unterstützt haben.

Ich danke Herrn Professor Walter Zidek, unter dessen Leitung mein wissenschaftlicher Weg in der Abteilung für Nephrologie an der Charité-Universitätsmedizin Berlin begann. Ich danke Herrn Professor Kai-Uwe Eckardt, unter dessen Leitung ich meine wissenschaftlichen Arbeiten in der Abteilung fortführen konnte. Danke für die besten Voraussetzungen und die Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeiten in den vergangenen Jahren.

Ich danke dir, lieber Markus, für die nunmehr 16-jährige Zusammenarbeit, die mit der Betreuung meiner Promotionsarbeit begann und sich in deiner steten Unterstützung auf meinen gesamten wissenschaftlichen Weg fortführte. Ich danke dir für die vielen anregenden Diskussionen, in denen aus Ideen Projekte wuchsen, deine Geduld, deine Motivation und dein Optimismus, besonders wenn der Pessimismus drohte zu siegen. Danke für deine Freundschaft!

Mein Dank gilt allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, mit denen ich im Laufe der Zeit zusammenarbeiten durfte. Ohne die geteilte Freude am wissenschaftlichen Arbeiten, eure Unterstützung, eure Aufmunterung, eure Motivation und euren Glauben daran, dass wir es gemeinsam schaffen können, wären diese hier zugrundeliegenden Arbeiten nicht entstanden.

Danke meine lieben Freunde, für eure Spontanität, wenn der Tag im Labor wie immer länger wurde als geplant, für eure Motivation, euer Lachen, eure Ablenkung.

Mein besonderer Dank geht an meine Familie: ein herzliches Dankeschön an meine Eltern und meine beiden Geschwister - Danke für eure Liebe, euer Vertrauen, eure Hilfe in allen Lebenslagen!

Dich, lieber Markus, habe ich über unsere gemeinsame Freude am wissenschaftlichen Arbeiten kennen und lieben lernen dürfen. Ich danke dir von Herzen, dass du immer an mich glaubst, dass ich mit dir gemeinsam über mich hinauswachsen kann, dein Vertrauen, dein Lachen, deine Liebe und unsere wunderbare Familie mit 3 bezaubernden Kindern. Meine lieben Wirbelwinde: Danke für eurer bedingungsloses Vertrauen, eure Liebe und dass ihr es schafft, jeden Tag mit einem einzigen Lächeln besonders werden zu lassen!

Erklärung

§ 4 Abs. 3(k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité-Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....

Datum

.....

Unterschrift