

Aus der medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Zink reduziert die osteogenen Effekte von hohen
Glukosekonzentrationen

Protective effects of zinc on glucose-induced osteogenic repro-
gramming of vascular smooth muscle cells

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Laura Alina Henze

Datum der Promotion: 29.11.2024

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	iii
Abkürzungsverzeichnis.....	iv
Zusammenfassung/Abstract.....	1
1 Einleitung.....	4
1.1 Mediale Gefäßverkalkung	4
1.2 Geschichte der Entdeckung der medialen Gefäßverkalkung	5
1.3 Mechanismen der medialen Gefäßverkalkung.....	5
1.4 Regulation der medialen Gefäßverkalkung	6
1.5 Mediale Gefäßverkalkung und Hyperglykämie.....	7
1.6 Konsequenzen der medialen Gefäßverkalkung	8
1.7 Einfluss von Zink	9
1.8 Ziele der Studie	10
2 Methodik.....	11
2.1 Primary Human Aortic Smooth Muscle Cells (HAoSMCs)	11
2.2 Real-time polymerase chain reaction	11
2.3 Western Blotting	12
2.4 NF- κ B Aktivität.....	12
2.5 Osteopontin-Konzentration.....	13
2.6 Aktivität der alkalischen Phosphatase.....	13
2.7 Analyse der Kalzifizierung	13
2.8 Statistik.....	13
3. Ergebnisse	15
4. Diskussion.....	24
4.1 Ziel des Projekts.....	24
4.2 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	24
4.3 Auswirkungen.....	25

4.4	Bisheriger Wissensstand	26
4.4.1	Hyperglykämie.....	26
4.4.2	Zink.....	27
4.4.3	Inflammation, NF-kB und Gefäßverkalkung	27
4.4.4	GPR39.....	28
4.4.5	TNFAIP3.....	29
4.5	Stärken und Schwächen	30
4.6	Bedeutung und zukünftige Auswirkungen.....	31
5.	Schlussfolgerung	34
	Literaturverzeichnis	35
	Eidesstattliche Versicherung.....	41
	Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen.....	42
	Druckexemplar der Publikation	43
	Lebenslauf.....	56
	Komplette Publikationsliste	58
	Danksagung	59

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Zinksulfat hat eine hemmende Wirkung auf die HAoSMC Kalzifizierung unter hohen Glukosekonzentrationen. Seite 13
- Abbildung 2:** Zinksulfat reduziert die Expression osteo-/chondrogener Marker in HAoSMCs, die durch hohe Glukosekonzentrationen gefördert wird Seite 15
- Abbildung 3:** Zinkchlorid hemmt die Expression osteogener Marker und die Kalzifizierung von HAoSMCs, welche durch hohe Glukosespiegel induziert werden Seite 16
- Abbildung 4:** Zinksulfat unterdrückt die NF- κ B-Aktivierung, die durch hohe Glukosekonzentration in HAoSMCs gefördert wird Seite 17
- Abbildung 5:** Das Silencing von TNFAIP3 verhindert, dass Zinksulfat die durch hohe Glukosekonzentrationen induzierte NF- κ B-Aktivierung und die Expression osteogener Marker in HAoSMCs verringert Seite 18
- Abbildung 6:** Das Silencing von TNFAIP3 verringert die protektive Wirkung von Zinksulfat auf die Kalzifizierung der HAoSMCs unter hohen Glukosekonzentrationen Seite 19
- Abbildung 7:** Das Silencing von GPR39 schwächt die schützende Wirkung von Zink auf die durch hohe Glukose induzierte Expression von osteogenen Markern in HAoSMCs ab Seite 21
- Abbildung 8:** Schematische Darstellung Seite 24

Abkürzungsverzeichnis

ALPL	Alkalische Phosphatase
Calc.	Calcium
CBFA1	Core-binding factor alpha-1
CTR	Kontrollgruppe
GPR39	G protein-coupled receptor 39
HAoSMCs	Human aortic smooth muscle cells
HG	Hohe Glukosekonzentration
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
OPN	Osteopontin
siRNA	Small interfering RNA
SOX9	SRY-box transcription factor 9
TNFAIP3	TNF- α induced protein 3
VSMCs	Vascular smooth muscle cells
ZnCl ₂	Zinkchlorid
ZnSO ₄	Zinksulfat

Zusammenfassung

Mediale vaskuläre Kalzifizierung ist neben der Atherosklerose, welche die Intima betrifft, eine Form der Gefäßwandveränderung, welche das kardiovaskuläre Risiko erhöhen kann. Noch nicht lange ist bekannt, dass es sich dabei nicht um einen passiven Ablagevorgang handelt, sondern um einen aktiven Umbauprozess mit diversen induzierenden und regulierenden Faktoren. Bei diesem auch Mediasklerose genannten Prozess kommt es zum Umbau der mittleren Gefäßschicht hin zu einer kalzifizierenden Struktur, wobei glatte Gefäßmuskelzellen zentral beteiligt sind. Patienten mit Diabetes Mellitus leiden vermehrt an medialer Gefäßkalzifizierung, gleichzeitig wurden in dieser Patientengruppe reduzierte Zink-Spiegel gezeigt. Es konnte in präklinischen Studien gezeigt werden, dass Zink einen protektiven Effekt auf diese Kalzifizierung unter erhöhten Phosphatkonzentrationen hat, wie sie beispielsweise bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung vorliegen. Eine Hemmung des Transkriptionsfaktors nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) durch TNF- α induced protein 3 (TNFAIP3) spielt bei diesen Effekten von Zink eine Rolle. Ob und wie Zink diesen Effekt auch bei hohen Glukose-Konzentrationen vermitteln könnte, war Gegenstand dieses Projektes. Glukose kann den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren, womit Hyperglykämie pro-kalzifizierende Effekte hervorrufen könnte, welche möglicherweise durch Zink abgedämpft werden könnten. Im Rahmen des hier diskutierten Forschungsvorhabens wurden humane aortale glatte Gefäßmuskelzellen verwendet und mittels real-time qPCR, Western-Blotting, Färbungen und verschiedenen Assays analysiert. Es zeigte sich, dass in mit hohen Glukosekonzentrationen behandelten Gefäßmuskelzellen eine Zink-Supplementation die Expression von osteogenen Markern und die Kalzifizierung reduzieren konnte. Analog waren die Aktivität der alkalischen Phosphatase und die Freisetzung von Osteopontin unter hohen Glukosekonzentrationen erhöht und bei zusätzlicher Zink-Supplementation abgeschwächt. Durch hohe Glukosekonzentrationen kam es zu einer Aktivierung von NF- κ B, welche durch Zink-Supplementation reduziert wurde. Zugabe von Zink führte zu einer erhöhten Expression des Proteins TNFAIP3. Unter Hemmung von TNFAIP3 durch Silencing konnte unter Zink-Supplementation kein protektiver Effekt beobachtet werden, wobei keine Hemmung der Aktivierung von NF- κ B und der Expression von osteogenen Markern feststellbar war. Ebenso konnte ein Silencing des Rezeptors GPR39 die Zink-induzierte Expression von TNFAIP3 unterdrücken und die anti-kalzifizierenden Effekte von Zink ab-

schwächen. Zusammenfassend lässt sich interpretieren, dass Zink unter hohen Glukosekonzentrationen, wie bei Diabetes mellitus, eine schützende Auswirkung zur Verminderung einer vaskulären Kalzifizierung haben könnte. Dies wird wahrscheinlich vermittelt über Aktivierung von GPR39, wodurch es zur Aktivierung von TNFAIP3 und dadurch Inhibierung von NF- κ B kommt. Um die Erkenntnisse auf Patienten zu übertragen ist jedoch weitere Forschung notwendig um andere beitragende Faktoren und Signalwege zu verstehen.

Abstract

Medial vascular calcification, besides atherosclerosis, which affects the intima, is a form of alteration of the vascular wall that can increase cardiovascular risk. Not long ago it was discovered that vascular calcification is not a passive deposition process, but an active remodeling involving various inducing and regulating factors. This process, also known as media sclerosis, involves the transformation of the middle layer of the vessel into a calcifying structure, whereby vascular smooth muscle cells play an essential role. Patients with diabetes mellitus commonly suffer from medial vascular calcification and low zinc levels were observed in this patient group. Preclinical studies have shown that zinc has a protective effect on the progression of calcification during elevated phosphate concentrations, as commonly seen in patients with chronic kidney disease. An inhibition of the transcription factor nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) by TNF- α induced protein 3 (TNFAIP3) plays an important role in these effects of zinc. This project aimed to investigate the effect of zinc in high glucose concentrations. High glucose can activate NF- κ B, which could potentially lead to hyperglycemia-induced pro-calcifying effects, an effect that might be attenuated by zinc supplementation. For this project human aortic smooth muscle cells were used and analysed by real-time qPCR, Western Blotting, staining and various assays. Zinc supplementation in vascular smooth muscle cells treated with high glucose concentrations reduced the expression of osteogenic markers and calcification. Analogously, the activity of alkaline phosphatase and the release of osteopontin were increased under high glucose concentrations and reduced with additional zinc treatment. High glucose concentrations led to NF- κ B activation, which was attenuated by zinc supplementation. Zinc treatment resulted in an increased expression of the protein TNFAIP3. When TNFAIP3 was silenced, the protective effect of zinc

supplementation was not apparent anymore, no inhibition of NF- κ B activation and expression of osteogenic markers and calcification was observed. Furthermore, silencing of the receptor GPR39 suppressed the zinc-induced expression of TNFAIP3 and decreased the anti-calcifying effects of zinc. Thus, it can be concluded that in high glucose concentrations, as in diabetes mellitus, zinc could potentially have a protective effect in reducing medial vascular calcification. This could possibly be mediated through the activation of GPR39, subsequent induction of TNFAIP3 and inhibition of NF- κ B. Further research is necessary to understand other contributing factors and signaling pathways and to eventually translate these findings into clinical applications.

1 Einleitung

1.1 Mediale Gefäßverkalkung

Die mediale Gefäßverkalkung, auch bezeichnet als „Mönckeberg Mediasklerose“, wurde als ein aktiver biologischer Prozess erkannt, bei dem Kalzium und Phosphat in der medialen Schicht der Arterien abgelagert werden (1). Der Prozess weist gewisse Ähnlichkeiten zur Mineralisierung von Knochen auf (2). Ursprünglich ging man davon aus, dass es sich bei der Mediasklerose um einen passiven Degenerationsprozess handelt, wobei eine Umgebung mit hohem Phosphat und Kalzium Milieu die Ablagerung von Mineralien bedingt (3). Zahlreiche Forschungsarbeiten konnten aber zeigen, dass es sich dabei um einen aktiven biologischen Prozess handelt, an dem verschiedene Faktoren und molekulare Signalwege beteiligt sind, wodurch es zu einer regulierten Mineralisierung von Gefäßgewebe kommt (4). Ein Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-kalzifizierenden Signalen steht im Vordergrund des Pathomechanismus der Mediasklerose (3). Neben der medialen Gefäßverkalkung gibt es die Atherosklerose als andere Form der Arteriosklerose, welche primär die Intima betrifft und anderen Einflussfaktoren und Pathomechanismen unterliegt, mit Veränderungen der Media aber eng verknüpft ist (5). Während die Mediasklerose vor allem mit dem höheren Alter, Diabetes Mellitus und Niereninsuffizienz verbunden ist, besteht bei der Atherosklerose vor allem ein Zusammenhang mit Plaquebildung durch Cholesterineinlagerung und Inflammation und dadurch Gefäßverengung und Plaquerupturen, welche potenziell zu Herzinfarkten und Schlaganfällen führen (3). Die genaue Prävalenz der medialen Gefäßverkalkung ist schwer zu determinieren, weil es kein generelles Screening Verfahren gibt, die mediale Gefäßverkalkung schnell als Arteriosklerose fehldiagnostiziert werden kann und weil die Arteriosklerose auch aufgrund von vorhandenen Therapiemöglichkeiten, welche es bei Mediasklerose nicht in dem Ausmass gibt, tendenziell im Vordergrund steht. Anhand von Ergebnissen von ABI-Messungen wurde in Studien eine Prävalenz von 0,5 Prozent bei Erwachsenen gefunden (6). Bei Patienten mit Diabetes Mellitus gibt es eine Prävalenz von 17% bis 42% (6). Neben der Umwandlung der glatten Gefäßmuskelzellen, gibt es noch einen anderen Vorgang, der zu Gefäßverkalkung führt, nämlich das Einwandern von Zellen in die Media, wie beispielsweise demonstriert wurde mit mesenchymalen Stammzellen aus der Adventitia, welche sich zu Osteoblasten-artigen Zellen umwandeln (7).

1.2. Geschichte der Entdeckung der medialen Gefäßverkalkung

„In den höchsten Graden der Mediaverkalkung ist die Arterie in ein starres Rohr verwandelt. Nimmt man eine größere Strecke von solchem Gefäß aus der Leiche heraus, so kann man an dem einen Ende anfassend, das andere nach oben wenden, ohne daß das Gefäß dabei einknickt“ (8)

So beschrieb J.G. Mönckeberg in „Über die reine Mediaverkalkung der Extremitätenarterien und ihr Verhalten zur Arteriosklerose“ im Jahr 1903 die heute nach ihm benannte Gefäßverkalkung in ihrer fortgeschrittensten Form. Und obwohl diese Beschreibung mehr als 100 Jahre alt ist, sind die zugrundeliegenden Mechanismen des Phänomens noch nicht aufgeklärt. Während J.G. Mönckeberg jedoch noch von „Kalkablagerung“ (8) ausgeht, steht heute der aktive Prozess und die Wichtigkeit der Balance zwischen fördernden und hemmenden Faktoren ursächlich im Vordergrund (9). Auch Mönckeberg beschrieb schon „unter meinen 55 Fällen von reiner Mediaverkalkung finden sich 4 Fälle präseniler Kalkablagerung, wenn man das beginnende Alter vom vollendeten 50. Jahre ab rechnet“ (8), womit vielleicht schon angedeutet war, dass es mehr als einen degenerativen Alterungsprozess geben musste in der Pathogenese der medialen Gefäßverkalkung.

1.3 Mechanismen der medialen Gefäßverkalkung

Bei der medialen Gefäßverkalkung kommt es zu einer ektopen Kalzifizierung. Eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Gefäßverkalkungen spielen die glatten Gefäßmuskelzellen (6). Betroffen sind bei der medialen Gefäßverkalkung vor allem die großen Arterien (10). Bei der Gefäßverkalkung verändern die glatten Gefäßmuskelzellen ihren Phänotyp durch einen Prozess, der gewisse Parallelen zur physiologischen Knochenmineralisierung aufweist (11). Während dieser Transdifferenzierung entwickeln die VSMCs einige Eigenschaften, die Osteoblasten oder Chondroblasten ähneln (12, 13). Die VSCM wandeln sich von einem kontraktilen Phänotyp zu einem eher mesenchymalen Phänotyp mit den damit verbundenen abweichenden Eigenschaften um (1). Infolgedessen exprimieren die transdifferenzierten VSMCs vermehrt osteogene Transkriptionsfaktoren wie core-binding factor alpha 1 (CBFA1), der auch als RUNX2 (runt-related transcription factor 2) bekannt ist, oder SRY-Box transcription factor 9 (SOX 9) (13). Außerdem wird das Enzym

„tissue-nonspecific alkaline phosphatase“ (ALPL) vermehrt exprimiert, wodurch der körpereigene Hemmstoff der Kalzifizierung Pyrophosphat angebaut wird (12). Das Pyrophosphat Molekül wird dabei gespalten zu zwei Phosphat Molekülen und kann dann die Kalzifizierung nicht mehr inhibieren (14). Daher wurde eine besonders wichtige Funktion der ALPL bei Gefäßverkalkungen postuliert (13, 15). Wenn die VSMCs osteo-/chondroblastenähnliche Eigenschaften annehmen, tragen sie aktiv zu einem lokalen, die Kalzifizierung förderndem Umfeld bei und erleichtern die Ausfällung von Kalzium und Phosphat und die Bildung von Kalziumphosphatkristallen (1). Daran sind zahlreiche Mechanismen, wie die Freisetzung von exosomalen Vesikeln, Enzymen und inflammatorischen Mediatoren beteiligt (16). Zu den Kalziumablagerungen kommt es hauptsächlich in der extrazellulären Matrix der Zellen (14). Die Hyperglykämie wurde bereits als ein wichtiger Faktor für die osteogene Transdifferenzierung von VSMCs identifiziert, die zugrundeliegenden Mechanismen sind aber nicht im Detail verstanden (17-19). Weitere begünstigende Bedingungen für Gefäßverkalkungen sind unter anderem hohe Phosphatkonzentrationen, Hyperkalzämie und Inflammation (16).

1.4 Regulation der medialen Gefäßverkalkung

Wenn es zu einer ektopen Kalzifizierung kommt, besteht eine Dysbalance zwischen den die Kalzifizierung fördernden und den hemmenden Einflüssen. Diese Dysbalance kann auch durch zelluläre Mechanismen vermittelt werden, in Folge der pro-kalzifizierenden Transformation der VSMCs. Komplexe intrazelluläre Signalwege initiieren und vermitteln die Transdifferenzierungsprozesse von VSMCs, und fördern dadurch die Gefäßverkalkung (1, 13). Insbesondere inflammatorische Signalwege spielen eine wichtige Rolle, und zahlreiche inflammatorische Mediatoren und Signalwege können pro-kalzifizierende Veränderungen hervorrufen oder verstärken (14). Die damit verbundenen Signalwege sind noch nicht im Detail erforscht. Ein wichtiger Faktor, der osteogene Signalwege initiieren kann ist der nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF- κ B) (20). NF- κ B p 65 ist eine der fünf Komponenten, die die Familie der NF- κ B-Transkriptionsfaktoren bilden (21). NF- κ B p65 kann die osteogene Genexpression in VSMC aktivieren und hemmt anti-kalzifizierende Mechanismen wie beispielsweise „ankylosis protein homolog“ (20). Damit wird angenommen, dass NF- κ B eine zentrale Schaltstelle bei der Regulation von Gefäßverkalkungen sein könnte (16).

1.5 Mediale Gefäßverkalkung und Hyperglykämie

In der vorliegenden Studie haben wir uns vor allem mit dem Prozess der vaskulären Kalzifizierung unter hyperglykämischen Bedingungen befasst. Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselerkrankung, bei der es durch gestörte Insulinsekretion oder Insulinwirkung zu Hyperglykämien kommt (22). Die dadurch entstehende chronische Hyperglykämie führt langfristig über Mikro- und Makroangiopathien zu Organschäden und Funktionsstörungen (22). Komplikationen durch Gefäßpathologien sind die häufigste Todesursache bei Patienten mit Diabetes mellitus (23). Teil dieser vaskulären Pathologien ist die Gefäßverkalkung, welche bei Diabetes mellitus akzeleriert ist (24).

Wie genau es durch Hyperglykämie zu Gefäßverkalkung kommt ist Gegenstand aktueller Forschung, diverse Einflussfaktoren sind dabei wahrscheinlich (25). Durch Hyperglykämie erhöhte Osteopontin-Konzentrationen, welches mit Gefäßverkalkungen assoziiert wurde, wurden bei diabetischen Ratten gefunden (26). Neben der bei Diabetes mellitus vorliegenden Hyperglykämie spielen in der Förderung von Gefäßverkalkung auch die anderen einhergehenden Stoffwechseleränderungen eine Rolle, wie Hyperinsulinämie und erhöhte advanced glycation end products (25). Außerdem wurde eine wichtige Rolle von Hypoxie in der Entwicklung von diabetischer Gefäßverkalkung besprochen, auch in Verbindung mit der Hochregulation von Osteopontin (27). Die Hypoxie als Einflussfaktor konnte auch in einem Modell mit diabetischen Hasen beobachtet werden, unabhängig davon, ob sie mit Insulin behandelt wurden, oder nicht (28). Inflammation wurde in experimentellen Studien ebenfalls als Einflussfaktor aufgezeigt, in denen Hyperglykämie induzierte Gefäßkalzifizierung von glatten Gefäßmuskelzellen über das CD36 Antigen dargestellt wurde (29). Eine andere Studie zeigte ebenfalls den Einfluss von inflammatorischen Signalwegen auf, wobei sie fanden, dass Interleukin-1beta bei Hyperglykämie die chondrogene Transdifferenzierung anregt (30). NF-kB spielt auch eine bedeutende Rolle bei Kalzifizierung von VSMCs durch hohe Glukosekonzentrationen (13, 17). Hohe Glukosespiegel aktivieren NF-kB in VSMCs und führen dadurch zu Verkalkung (17, 31). Eine Hemmung der NF-kB-Aktivierung kann die durch Hyperglykämie initiierten osteogenen Signalkaskaden in VSMCs unterdrücken (17). Auch endoplasmatischer Retikulum Stress wurde als einflussnehmender Faktor beobachtet, in einer Studie, in der Hyperglykämie keine Gefäßkalzifizierung mehr auslösen konnte, wenn eine Behandlung mit einem en-

doplasmatischem Retikulum Stress Inhibitor vorausgegangen war (32). Advanced glycation end products, welche durch Hyperglykämie Exposition entstehen, verursachen diverse mikro- und makrovaskuläre Schäden, unter anderem über NF-kB-Erhöhung, und deren therapeutische Inhibition ist Gegenstand aktueller Forschung (33). In experimentellen Studien wurde beispielsweise nachgewiesen, dass es durch advanced glycation end products zu einer Stimulierung von Calcium-Ablagerung in glatten Gefäßmuskelzellen kommt (34).

1.6 Konsequenzen der medialen Gefäßverkalkung

Gefäßverkalkungen korrelieren mit der Gesamtmortalität und der kardiovaskulären Mortalität bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen, insbesondere bei Patienten, die eine Hämodialyse benötigen (35). Mehr als die Hälfte der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz sterben an kardiovaskulären Erkrankungen und die Mortalität ist 20 – 30 Mal höher als in der Gesamtbevölkerung (5). Gefäßverkalkungen finden bei Patienten mit Diabetes mellitus beschleunigt statt und könnten auch dort einen wichtigen zu Herz-Kreislauf-Erkrankungen beitragenden Faktor darstellen (13, 24, 36). Zu den Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehören die koronare Herzkrankheit und der Schlaganfall, und diese sind für etwa 65 % aller Todesfälle bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 verantwortlich (24). Mediale Gefäßverkalkung führt wahrscheinlich zu einer erhöhten Steifigkeit der Arterien, was wiederum die kardiovaskuläre Hämodynamik beeinträchtigt (35, 37). Weitere Auswirkungen sind beispielsweise ein erhöhter systolischer Blutdruck, ein höheres Vorkommen linksventrikulärer Hypertrophien und eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine Koronararteriendisektion nach Angioplastie (37). In Studien mit nicht insulinpflichtigen Diabetes-Patienten wurde die mediale Gefäßverkalkung als prädiktiver Marker für Versterben durch ein kardiovaskuläres Ereignis nachgewiesen, unabhängig von anderen kardiovaskulären Risikofaktoren bei mehr Herzinfarkten, Schlaganfällen und Amputation der unteren Extremitäten bei von Gefäßverkalkung betroffenen Patienten (38). Bei Diabetes mellitus tritt die Zunahme der Gefäßverkalkung vor der Entwicklung der diabetischen Nephropathie auf, wird aber durch die Erkrankung der Niere später noch beschleunigt (39). Es wurde bereits postuliert, dass die Hyperglykämie bei Diabetes Mellitus die Mediasklerose direkt beschleunigen kann (17, 25, 30).

1.7 Einfluss von Zink

Zink ist ein essentieller Faktor für die menschliche Gesundheit (40, 41), denn es ist an der Funktion zahlreichen Enzyme beteiligt, es ist für die Proteinfaltung wichtig und es reguliert die Genexpression (42). Zink stellt ein wichtiges molekulares Signal für die Zellen des Immunsystems dar und ist für viele Transkriptionsfaktoren essentiell (40). Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 wurden reduzierte Zinkspiegel im Blut festgestellt, die wahrscheinlich auf eine Malabsorption im Darm und eine hohe Ausscheidung von Zink im Urin zurückzuführen sein könnten (43). Niedrige Zinkwerte korrelieren mit Insulinresistenz; Zinkmangel ist ein wichtiger Risikofaktor für Diabetes mellitus und die damit verbundenen kardiovaskulären Komplikationen (44, 45). Darüber hinaus haben Studien gezeigt, dass in-vitro eine Zinkbehandlung die Neigung zu Kalzifizierung unterdrückt, was darauf hindeutet, dass ein niedriger Zinkspiegel ein unabhängiger Risikofaktor für Gefäßverkalkung sein könnte (46).

NF- κ B spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der durch Hyperglykämie ausgelösten osteogenen Signalwege in VSMCs (13) und Zink könnte ein hemmender Faktor in dieser Konstellation sein (11). Es hat sich gezeigt, dass bei hohen Phosphatkonzentrationen eine Zinksupplementierung die Kalzifizierung von VSMCs verringert. (11, 47). Chelierung von Zink induziert die Aktivierung von NF- κ B und aktiviert Interferon-Signale bei Virus-Infektion, was die antivirale Immunantwort verstärkt (48). Die inflammatorischen Effekte von Lipopolysaccharid in Mikroglia-Zellen werden durch Zink via NF- κ B Hemmung reduziert (49). Für diese Effekte von Zink wird eine wichtige Rolle von A20 (TNFAIP3) vermutet (49). A20 ist ein endogener Hemmer des NF- κ B Signalwegs, der durch Zink aktiviert wird (50). Auch in klinischen Studien wurde der Zusammenhang zwischen Zink und Inflammation erforscht und es wurde gezeigt, dass inflammatorische Zytokine und oxidativer Stress durch Zink-Supplementation reduziert werden konnten (50). Bezogen auf die aktuelle COVID-19 Pandemie wurde deswegen bereits eine Zink-Supplementation als adjuvante Therapie vorgeschlagen, aufgrund des Effektes der Verminderung der proinflammatorischen Zytokine, welche bei COVID-19 Erkrankung neben anderen Faktoren bis hin zum akuten Atemnotsyndrom führen (51).

1.8 Ziele der Studie

Zink wurde als protektiver Faktor bei Gefäßverkalkung in chronischer Niereninsuffizienz diskutiert (52). Eine Rolle bei der Gefäßverkalkung in Diabetes Mellitus wurde zwar vermutet, aber nicht experimentell nachgewiesen (53). Ziel der vorliegenden Studie war es die Effekte und Mechanismen der Zink-Supplementation unter diabetischen Bedingungen in glatten Gefäßmuskelzellen zu untersuchen (13). Dazu wurden primäre glatte Gefäßmuskelzellen mit hohen Glukosespiegeln mit und ohne Zinksupplementation behandelt.

2 Methodik

2.1 Primäre humane aortale Gefäßmuskelzellen (HAoSMCs)

“Primary human aortic smooth muscle cells” (HAoSMCs; Thermo Fischer Scientific und Sigma Aldrich) wurden in Waymouth`s MB 752/1 Medium und Ham`s F-12 nutrient mixture (1:1, Thermo Fisher Scientific) kultiviert, ergänzt mit 10% FBS (Thermo Fisher Scientific), 100 U/ml Penicillin und 100 ug/ml Streptomycin (Thermo Fisher Scientific) (13, 54-56). Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. HAoSMCs wurden kultiviert und bis zur Passage 11 verwendet. Wo angegeben, wurden die HAoSMCs mit 50mM Glucose (Sigma Aldrich) behandelt (17), 15 uM ZnSO₄ (Sigma Aldrich), oder 15 uM ZnCl₂ (Sigma Aldrich) (11, 13). Um eine Verkalkung hervorzurufen, wurden die Zellen in Kalzifizierungsmedium mit 10 mM beta-Glycerophosphat und 1.5 mM Kalzium-Chlorid für 11 Tage inkubiert. Eine Transfektion mit siRNA (Silencing) erfolgte durch 10 nM von TNFAIP3 (ID: s14260), GPR39 (ID: s6074) or negative control (ID: 4390843) siRNA zusammen mit dem siPORT „amine transfection reagent (Thermo Fisher Scientific) (13).

2.2 Real-time polymerase chain reaction

Die Gesamt-RNA wurde aus HAoSMCs mit Trizol Reagenz (Fisher Scientific) entsprechend den Anleitungen des Herstellers isoliert (13). Die Synthese der komplementären DNA erfolgte mit Oligo(dT)12-18-Primern sowie mit Super-Script III Reverse Transcriptase (Fisher Scientific) (13). Die real-time PCR wurde unter Verwendung von iQ Sybr Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) durchgeführt. Es wurden humane Primer mit den folgenden Sequenzen (Fisher Scientific) verwendet (11, 13, 57):

CBFA1 fw: GCCTTCCACTCTCAGTAAGAAGA;

CBFA1 rev: GCCTGGGGTCTGAAAAGGG;

SOX9 fw: AGCGAACGCACATCAAGAC;

SOX9 rev: CTGTAGGCGATCTGTTGGGG;

ALPL fw: GGGACTGGTACTCAGACAACG;

ALPL rev: GTAGGCGATGTCCTTACAGCC;

TNFAIP3 fw: TCAACTGGTGTGCGAGAAGTCC;

TNFAIP3 rev: CAAGTCTGTGTCCTGAACGC;

GPR39 fw: TCTTCGTGATGGGCCTTCTG;

GPR39 rev: ACCTCCTTCTGCAAGTATCCTTT;

GAPDH fw: GAGTCAACGGATTTGGTCGT;

GAPDH rev: GACAAGCTTCCCGTTCTCAG.

Die Genexpression wurde analysiert, und zur Bestätigung der Spezifität der PCR-Produkte wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die relative mRNA-Expression normalisiert zur Kontroll-Gruppe wurde mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode unter Verwendung von GAPDH als Housekeeping-Marker bestimmt (13).

2.3 Western Blotting

Die Proteinisolierung aus HAoSMCs wurde mit Pierce IP-Lysepuffer (Fisher Scientific) durchgeführt, der sowohl einen Protease- als auch einen Phosphataseinhibitor enthielt (13). Die Proteinkonzentration wurde mithilfe des Bradford-Assay (Bio-Rad Laboratories) quantifiziert (56, 58). Gleiche Mengen an Protein wurden in Roti-Load1 Buffer (Carl Roth) bei 100°C für 10 Minuten inkubiert und dann auf SDS-PAGE Gelen separiert und später auf PVDF-Membranen übertragen mittels Routine Western-Blot Protokollen (13). Zur Bestimmung des Proteingehalts wurden die Membranen entweder mit primären Kaninchen anti-RUNX2-Antikörpern (1:100, Cell Signaling) oder Kaninchen anti-GAPDH-Antikörpern (1:1000, Cell Signaling) über Nacht bei 4°C inkubiert (13). Als sekundäre Antikörper zum Nachweis des Proteins wurden HRP-konjugierte Kaninchen-Antikörper (1:1000, Cell Signaling) für 1 Stunde bei Raumtemperatur verwendet (13). Die Proteinbanden wurden mit ECL-Detektionsreagenz (Fisher Scientific) nachgewiesen und mit der Software ImageJ (NIH) analysiert (13). Die Daten wurden als Verhältnis des Gesamtproteins zum Housekeeping-Marker GAPDH dargestellt und in Bezug auf die Kontrollgruppe normiert (13, 47).

2.4 NF- κ B Aktivität

Die NF- κ B-Aktivität wurde mit einem Assay quantifiziert. Kernproteine wurden aus HAoSMCs mit dem NE-PER-Kern- und Zytoplasma-Extraktionskit (Fisher Scientific) extrahiert (13). Die Quantifizierung und Angleichung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bradford-Assay (Bio-Rad Laboratories) (13). Die NF- κ B-abhängige Transkriptionsaktivität wurde mit einem kolorimetrischen Assay-Kit für den Transkriptionsfaktor NF- κ B p65

bestimmt, der gemäß den Anweisungen des Herstellers (Abcam) verwendet wurde (13, 17). Die Daten wurden normalisiert zur Kontrollgruppe dargestellt.

2.5 Osteopontin-Konzentration

Der Gehalt an Osteopontin (OPN) im Medium von HAoSMCs wurde mit dem humanen OPN DuoSet ELISA-Kit (R&D Systems) und dem DuoSet ancillary Reagent Kit 2 (R&D Systems) quantifiziert (13). Zum Lysieren der HAoSMCs wurde Pierce IP-Lysepuffer mit einem Protease- und einem Phosphataseinhibitor verwendet. Die Ergebnisse wurden normalisiert auf die Gesamtproteinmenge, die mittels Bradford-Assay (Bio-Rad) gemessen wurde, und im Vergleich zur Kontrollgruppe dargestellt (13).

2.6 Aktivität der alkalischen Phosphatase

Die Aktivität des Enzyms Alkalische Phosphatase wurde mit einem kolorimetrischen ALP-Assay-Kit (Abcam) gemessen (13). Die HAoSMCs wurden mit ALP-Assay-Pufferlösung (Abcam) lysiert und die Aktivität mittels des Assays bestimmt(13). Die Ergebnisse wurden normalisiert auf die Gesamtproteinmenge, die mit dem Bradford-Test quantifiziert wurde, und normalisiert im Vergleich zur Kontrollgruppe dargestellt (13, 17).

2.7 Analyse der Kalzifizierung

Für die Analyse des Kalziumgehalts wurden die HAoSMCs über Nacht mit OsteoSense 680EX (1:250, Perkin Elmer) inkubiert (59). Die Bilder wurden mit dem ChemiDoc MP Bildgebungssystem (Bio-Rad) mit excitation/emission (bandpass) Wellenlängen von 680/715 (30) nm aufgenommen (13, 60). Die Zellen wurden in 0.6 M HCL bei 4° C entkalkt, und der Kalziumgehalt wurde mit dem QuantiChrom Calcium Assay Kit (BioAssay Systems) gemessen, die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bradford-Test gemessen (Bio-Rad Laboratories) (17). Die Ergebnisse wurden im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge normiert (13).

2.8 Statistik

Die Daten werden als Punkt-Plots mit arithmetischem Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts dargestellt (13). Die Anzahl der durchgeführten unabhängigen Versuche wird mit n angegeben. Für die Normalitätsanalyse wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet

(13). Um statistische Tests durchzuführen, wurden nicht-normale Datensätze transformiert (13). Die statistische Prüfung erfolgte mittels one-way ANOVA mit Tukey-Post-Hoc-Test für homoskedastische Daten oder Games-Howell-Post-Hoc-Test für heteroskedastische Daten und dem Steel-Dwass-Test für nicht-normale Daten (11, 13). Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen (13).

3. Ergebnisse

Ein primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war festzustellen, ob die durch Glukose verstärkten Kalzifizierungsprozesse durch Zinksupplementation gehemmt werden können. Daher wurde als erstes untersucht, ob sich die Zugabe von Zink auf die Kalzifizierung unter hohen Glukosekonzentrationen auswirkt. Dazu wurden HAoSMCs in einem Kontroll- und Kalzifizierungs-Medium behandelt, mit oder ohne zusätzlich erhöhten Glukosekonzentration und mit oder ohne Zinksulfat (ZnSO_4) (13). Die Exposition der Zellen gegenüber hohen Glukosespiegeln steigerte die Kalzifizierung der HAoSMCs signifikant, wie in Abbildung 1a dargestellt wird (13). Wurden die Zellen zusätzlich mit ZnSO_4 behandelt, kam es zu einer deutlich geringeren Kalzifizierung der HAoSMCs sowohl im pro-kalzifizierenden Medium als auch im pro-kalzifizierenden Medium mit zusätzlich hohem Glukosegehalt (13). Mit diesen Ergebnissen korrespondierend, zeigte eine Kalzifizierung darstellende Fluoreszenzbildgebung gleiche Ergebnisse, nämlich dass übermäßige Glukosekonzentrationen die Kalzifizierung von HAoSMCs in pro-kalzifizierendem Medium verstärkten, während die Behandlung mit ZnSO_4 unter den gleichen Bedingungen eine starke hemmende Wirkung hatte, wie in Abbildung 1b dargestellt (13).

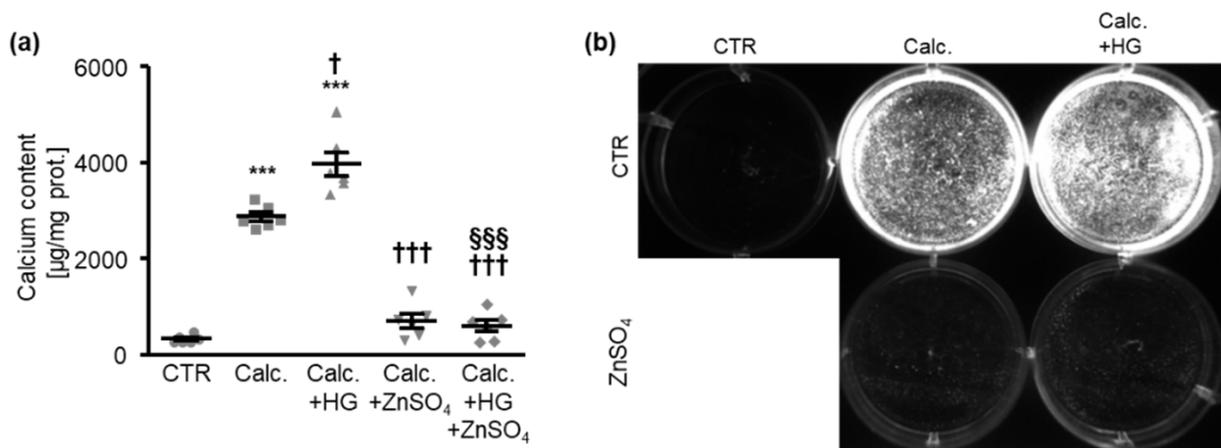


Abbildung 1 (13): Zinksulfat hat eine hemmende Wirkung auf die HAoSMC-Kalzifizierung unter hohen Glukosekonzentrationen. (a): Kalziumgehalt ($n = 6$, $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein) in HAoSMCs mit und ohne Zusatz von Zinksulfat (ZnSO_4) zum Medium, die 11 Tage lang mit Kontroll- (CTR) oder Kalzifizierungsmedium (Calc.), ohne oder mit hohem Glukosegehalt (HG). *** ($p < 0,001$) steht für einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe; † ($p < 0,05$) und ††† ($p < 0,001$) stehen für einen signifikanten Unterschied betreffend Kalziumgehalt im Vergleich zu der

Gruppe, die nur das pro-kalzifizierende Medium erhielt, §§§ ($p < 0,001$) kennzeichnet den signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe mit hoher Glukosekonzentration und pro-kalzifizierendem Medium gegenüber der Gruppe mit denselben Bedingungen aber zusätzlicher Zinkbehandlung. (b): Durch Fluoreszenzbildgebung nachgewiesene Kalzifizierungen in HAoSMCs mit und ohne Zusatz von Zinksulfat ($ZnSO_4$) zum Medium nach 11-tägiger Behandlung mit Kontroll- (CTR) oder pro-kalzifizierendem Medium (Calc.) ohne und mit hoher Glukosekonzentration (HG) (Je stärker die Aufhellung, desto stärker die Verkalkung).

Ein wichtiger Anteil der Gefäßmuskelzell-Verkalkung wird wahrscheinlich durch Aktivierung osteogener Signalwege vermittelt. Als Nächstes wurden daher die osteo-/chondrogenen Signalwege untersucht, indem die Expression und Aktivität von osteo-/chondrogenen Markern analysiert wurde. Hohe Glukosekonzentrationen im Medium erhöhten die Expression von CBFA1, SOX9 und ALPL mRNA in HAoSMCs (13). Diese Effekte wurden deutlich unterdrückt, wenn die Zellen mit $ZnSO_4$ behandelt wurden, wie in Abbildung 2a-c gezeigt (13). Darüber hinaus zeigte sich auf der Ebene der Proteine mithilfe von Western Blotting, dass die Exposition gegenüber hohen Glukosekonzentrationen die Expression des CBFA1-Proteins signifikant erhöhte, was durch die $ZnSO_4$ -Supplementierung signifikant reduziert wurde (Abbildung 2d) (13). Das Protein Osteopontin (OPN), welches in das Zellkulturmedium freigesetzt wird, war in einer Umgebung mit hoher Glukosekonzentration erhöht, ein Effekt der erneut durch die Behandlung der Zellen mit $ZnSO_4$ deutlich abgeschwächt wurde (Abbildung 2e). Die alkalische Phosphatase (ALP) wies eine signifikant höhere Aktivität auf in HAoSMCs mit einem Medium mit hohen Glukosekonzentrationen, ein Effekt, der durch eine $ZnSO_4$ -Supplementierung ebenfalls signifikant reduziert wurde (Abbildung 2f) (13).

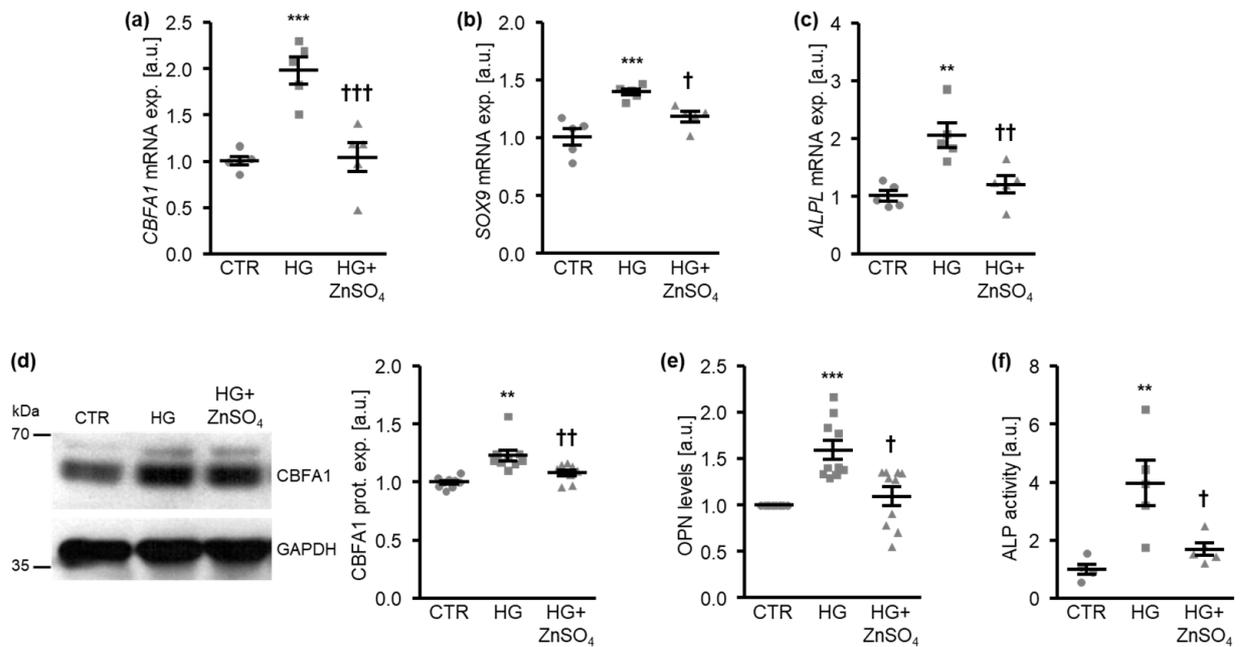


Abbildung 2 (13): Zinksulfat reduziert die Expression osteo-/chondrogener Marker in HAoSMCs, die durch hohe Glukosekonzentrationen gefördert wird. Relative mRNA-Expression der osteo-/chondrogenen Marker CBFA1 (a), SOX9 (b) und ALPL (c) (n = 5) in HAoSMCs mit und ohne Zusatz von Zinksulfat (ZnSO₄) zum Medium, die 24 Stunden lang Kontrollbedingungen (CTR) oder hohen Glukosekonzentrationen (HG) ausgesetzt. (d): Western-Blot-Ergebnisse der Expression des Proteins CBFA1 (n = 9) in HAoSMCs mit und ohne Zusatz von Zinksulfat (ZnSO₄) zum Medium nach 24-stündiger Behandlung als Kontrollgruppe (CTR) oder mit hohen Glukosekonzentrationen (HG). (e): Osteopontin (OPN)-Spiegel (n = 10) im Medium von HAoSMCs mit und ohne Zusatz von Zinksulfat (ZnSO₄) zum Medium unter Kontrollbedingungen oder nach 1-wöchiger Behandlung mit hohen Glukosekonzentrationen (HG). (f): ALP-Aktivität (n = 5) in HAoSMCs mit und ohne Zusatz von Zinksulfat (ZnSO₄) zum Medium, die eine Woche lang unter Kontrollbedingungen (CTR) oder hohen Glukosespiegeln (HG) behandelt wurden. ** (p < 0,01), *** (p < 0,001) steht für einen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe, † (p < 0,05), †† (p < 0,01), ††† (p < 0,001) zeigt einen signifikanten Unterschied gegenüber der HG-Gruppe an.

Theoretisch könnte das im Zinksulfat enthaltene Sulfat eine direkte hemmende Rolle bei der Verkalkung spielen. Daher wurde untersucht, ob durch die Verwendung von Zinkchlorid (ZnCl₂) entsprechende Ergebnisse erzielt werden können. Abbildung 3 a und b zeigen, dass die Behandlung mit ZnCl₂ tatsächlich eine ähnliche hemmende Wirkung wie die mit ZnSO₄ auf die mRNA-Expression der osteogenen Marker CBFA1 und ALPL hatte (13). Abbildung 3c deutet darauf hin, dass der Kalziumgehalt in HAoSMCs, die mit ZnCl₂ behandelt wurden, gesunken ist, was die anti-kalzifizierenden Eigenschaften von Zink in

Zellen, die hohen Glukosekonzentrationen ausgesetzt sind, weiter bestätigt (13). Diese Ergebnisse deuten an, dass eine Zinksupplementierung die vermehrte Kalzifizierung in Gefäßmuskelzellen unter hyperglykämischen Bedingungen vermindern könnte, wahrscheinlich vermittelt durch die Hemmung der osteo-/chondrogenen Signalübertragung und Umprogrammierung der Zellen (13).

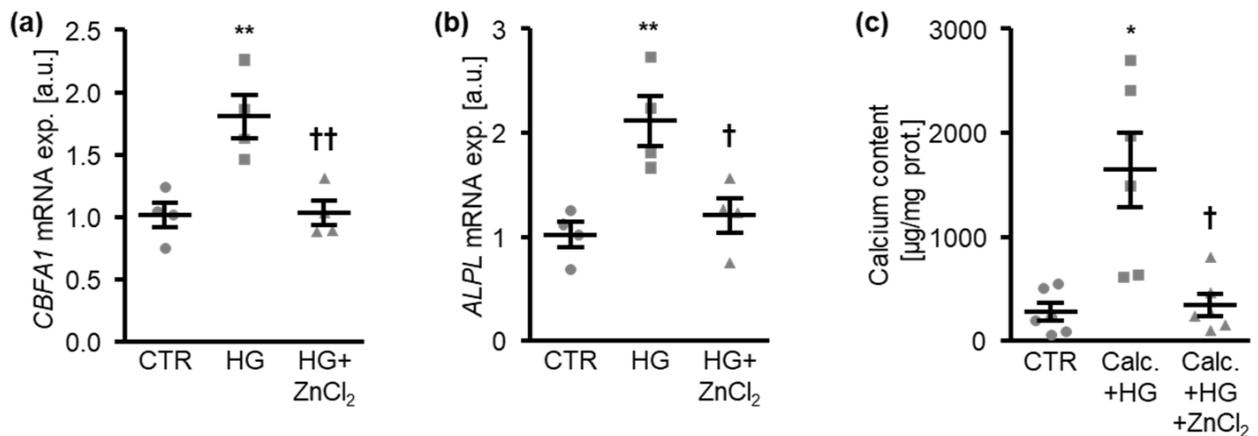


Abbildung 3 (13): Zinkchlorid hemmt die Expression osteogener Marker und die Kalzifizierung von HAoSMCs, welche durch hohe Glukosespiegel induziert werden. (a,b): mRNA-Expression von CBFA1 und ALPL (n = 4) in HAoSMCs mit und ohne Zusatz von Zinkchlorid (ZnCl₂) zum Medium, die 24 Stunden lang dem Kontrollmedium (CTR) oder hohen Glukosespiegeln (HG) ausgesetzt waren. (c): Kalzium-Gehalt (n = 6) in HAoSMCs mit und ohne Zusatz von Zinkchlorid (ZnCl₂) zum Medium, die 11 Tage lang dem Kontrollmedium oder dem Kalzifizierungsmedium (Calc.) mit hohen Glukosekonzentrationen (HG) ausgesetzt waren. * (p < 0,05), ** (p < 0,01) steht für einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe; † (p < 0,05), †† (p < 0,01) bedeutet einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Gruppe, welche hohen Glukosekonzentrationen ausgesetzt war oder pro-kalzifizierendem Medium und hohen Glukosekonzentrationen.

NF-κB wurde bereits als wichtiger Signalweg der Gefäßverkalkung beschrieben, und kann durch Zink gehemmt werden. Daher untersuchten wir die zugrundeliegenden Mechanismen und die Rolle der NF-κB-Signalübertragung bei Zinkbehandlung unter hohen Glukosekonzentrationen. In Abbildung 4a wird gezeigt, dass in HAoSMCs, die hohen Glukosekonzentrationen ausgesetzt waren, Indikation für erhöhte NF-κB-abhängige Transkriptionsaktivität gefunden wurde. Durch eine Behandlung mit Zink konnte dieser verstärkende Effekt auf die NF-κB Aktivität supprimiert werden (13). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass das TNFα-induced protein 3 (TNFAIP3), ein Inhibitor des NF-κB-

Signalwegs, unter hyperglykämischen Bedingungen erhöht war und durch die Zugabe von ZnSO₄ signifikant hochreguliert wurde (Abbildung 4b) (13). Folglich beeinflusste Zink die Aktivierung des NF-κB-Signalwegs, wahrscheinlich zumindest teilweise via TNFAIP3 in HAoSMCs unter hyperglykämischen Bedingungen (13).

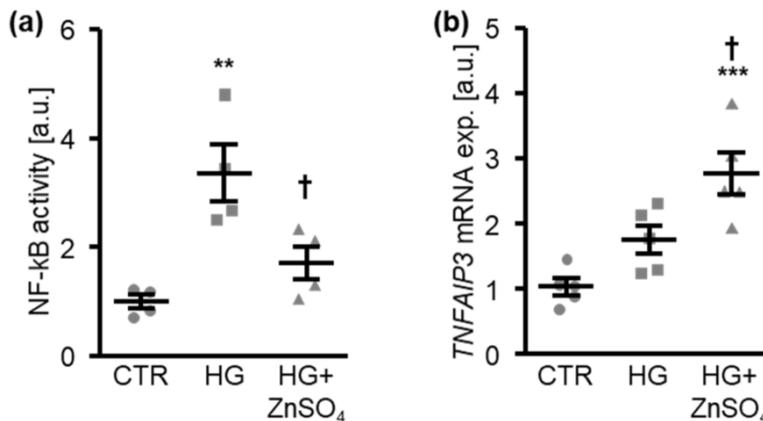


Abbildung 4 (13): Zinksulfat unterdrückt die NF-κB-Aktivierung, die durch hohe Glukosekonzentration in HAoSMCs gefördert wird. (a): NF-κB-abhängige Transkriptionsaktivität (n = 4) in HAoSMCs mit und ohne Zusatz von Zinksulfat (ZnSO₄) zum Medium, die 30 Minuten lang mit Kontrollmedium (CTR) oder hohen Glukosekonzentrationen (HG) behandelt wurden. (b): mRNA-Expression von TNFAIP3 (n = 5) in HAoSMCs mit und ohne Zusatz von Zinksulfat (ZnSO₄) zum Medium, die 24 Stunden lang Kontrollbedingungen (CTR) oder hohen Glukosekonzentrationen (HG) ausgesetzt waren. ** (p < 0,01), *** (p < 0,001) steht für einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe, † (p < 0,05) steht für einen signifikanten Unterschied zur Hyperglykämie-Gruppe.

TNFAIP3 wurde bereits mit den hemmenden Effekten von Zink auf NF-κB assoziiert (11, 61). In den folgenden Experimenten wurde daher weiter untersucht, wie TNFAIP3 an dem Mechanismus beteiligt ist, durch den Zink protektiv wirkt auf die durch hohe Glukosekonzentrationen induzierten osteogenen Signale und die Kalzifizierung der HAoSMC (13). Dafür wurde die endogene Expression von TNFAIP3 mit Hilfe von small interfering RNA (siRNA) unterdrückt (Abbildung 5a). In HAoSMCs führte allein die Reduktion von TNFAIP3 zu einem signifikanten Anstieg der NF-κB-abhängigen Transkriptionsaktivität (Abbildung 5b) (13). Die Behandlung mit ZnSO₄ verringerte die NF-κB-abhängige Transkriptionsaktivität nur in der negativen Kontrollgruppe der siRNA-transfizierten HAoSMCs, nicht aber in der Gruppe mit ausgeschaltetem TNFAIP3 (Abbildung 5b). Die Reduktion von TNFAIP3 erhöhte tendenziell die mRNA-Expression von CBFA1 und ALPL

in HAoSMCs unter Kontrollbedingungen (Abbildung 5c,d). Diese Tendenz war aber statistisch nicht signifikant ($p = 0,064$ und $p = 0,066$) (13). In Abbildung 5 c und d wird gezeigt, dass TNFAIP3-Silencing die hemmenden Effekte von ZnSO₄ auf die mRNA-Expression osteogener Marker unter hohen Glukosebedingungen signifikant unterdrückt (13).

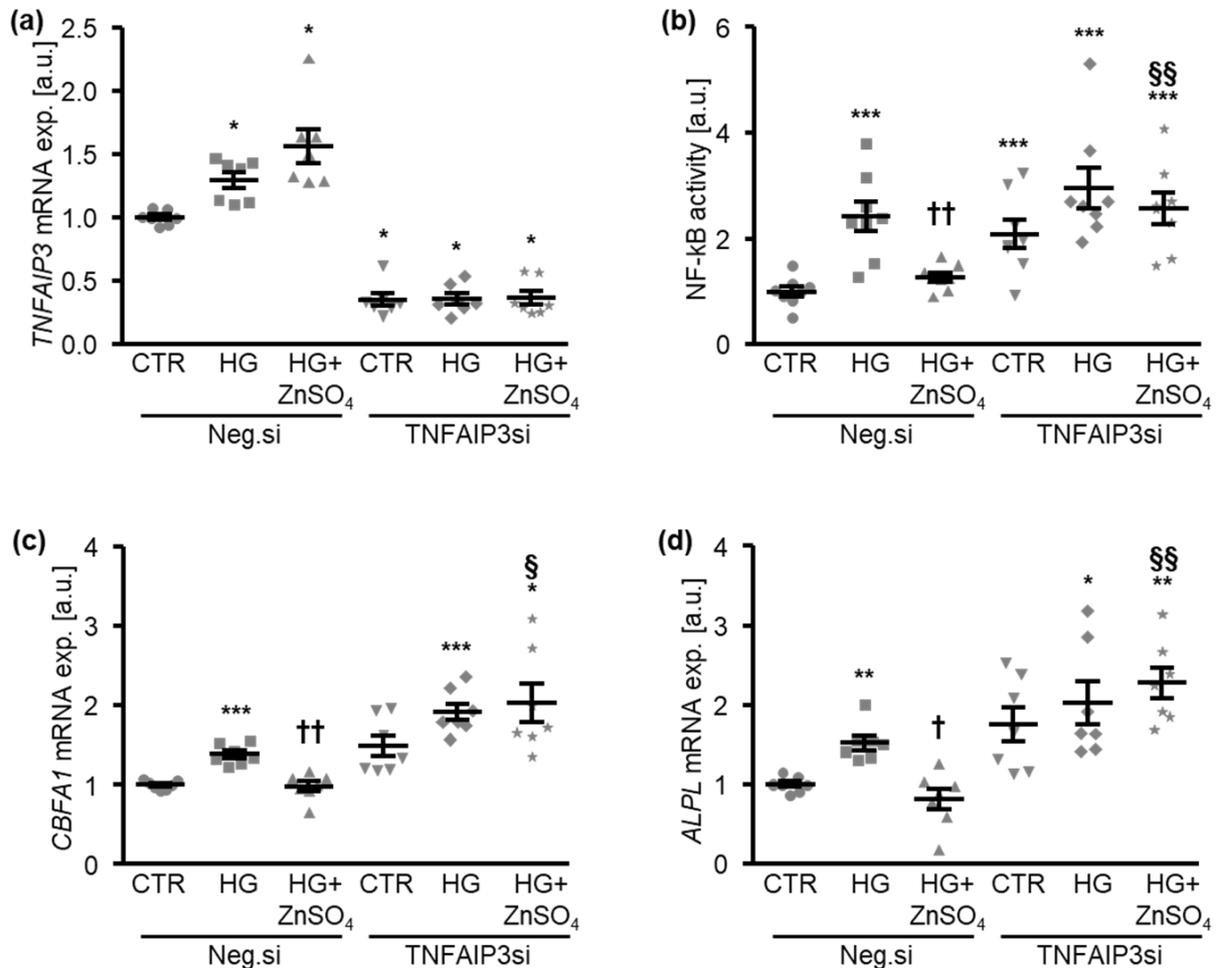


Abbildung 5 (13): Silencing von TNFAIP3 verhindert die protektiven Effekte von Zinksulfat auf die durch hohe Glukosekonzentrationen induzierte NF-kB-Aktivierung und die Expression osteogener Marker in HAoSMCs. (a): mRNA-Expression von TNFAIP3 ($n = 7$) in HAoSMCs mit und ohne Zusatz von Zinksulfat (ZnSO₄) zum Medium, die mit negativer Kontroll-siRNA (Neg.si) oder TNFAIP3-siRNA (TNFAIP3si) transfiziert wurden und 24 Stunden lang mit Kontrollmedium (CTR) oder hohen Glukosekonzentrationen (HG) behandelt wurden. * ($p < 0,05$) steht für einen signifikanten Unterschied zur Negativkontrollgruppe mit Kontrollmedium und ohne Zugabe von ZnSO₄. (b): NF-kB-abhängige Transkriptionsaktivität ($n = 8$) in HAoSMCs mit und ohne Zusatz von Zinksulfat (ZnSO₄) zum Medium, die mit negativer Kontroll-siRNA (Neg.si) oder TNFAIP3-siRNA (TNFAIP3si) transfiziert wurden und 30 Minuten lang einem Kontrollmedium (CTR) oder einem Medium mit hoher Glukosekonzentration (HG) ausgesetzt wurden. (c,d): mRNA-Expression von

CBFA1 und ALPL ($n = 7$) in HAoSMCs mit und ohne Zusatz von Zinksulfat (ZnSO_4) zum Medium, die mit negativer Kontroll-siRNA (Neg.si) oder TNFAIP3-siRNA (TNFAIP3si) transfiziert wurden und 24 Stunden lang einem Kontrollmedium (CTR) oder einem Medium mit hoher Glukosekonzentration (HG) exponiert waren. * ($p < 0,05$) ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) steht für einen signifikanten Unterschied gegenüber der Neg.si CTR Gruppe, † ($p < 0,05$, †† ($p < 0,01$) steht für einen signifikanten Unterschied zwischen der Neg.si und HG Gruppe gegenüber der Neg.si und HG-Gruppe mit ZnSO_4 -Behandlung, § ($p < 0,05$), §§ ($p < 0,01$) steht für einen signifikanten Unterschied zwischen der Neg.si und TNFAIP3si transfizierten Gruppe, die beide mit HG und ZnSO_4 behandelt wurden.

Um die Bedeutung von TNFAIP3 bei Kalzifizierung unter glukosereichen Bedingungen zu untersuchen, wurden weitere Versuche durchgeführt. Dafür wurden Silencing-Versuche von TNFAIP3 im Kalzifizierungsmodell vorgenommen. Es wurde wieder Kalzifizierung von HAoSMCs direkt über den Kalziumgehalt der Zellen analysiert, wobei als Ergebnis ein deutlich geringerer protektiver Effekt der Zinksupplementierung auftrat, wenn TNFAIP3 reduziert war (Abbildung 6) (13).

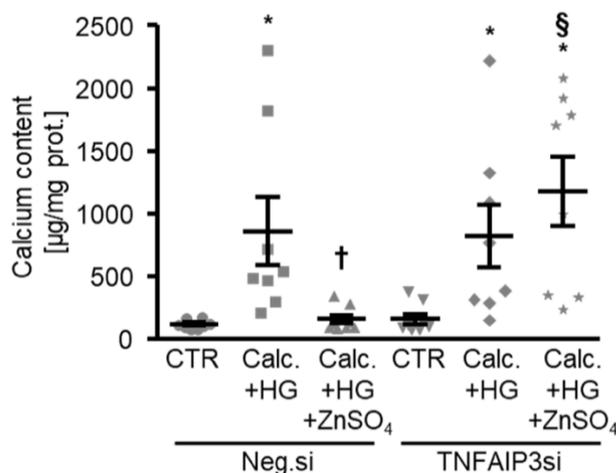
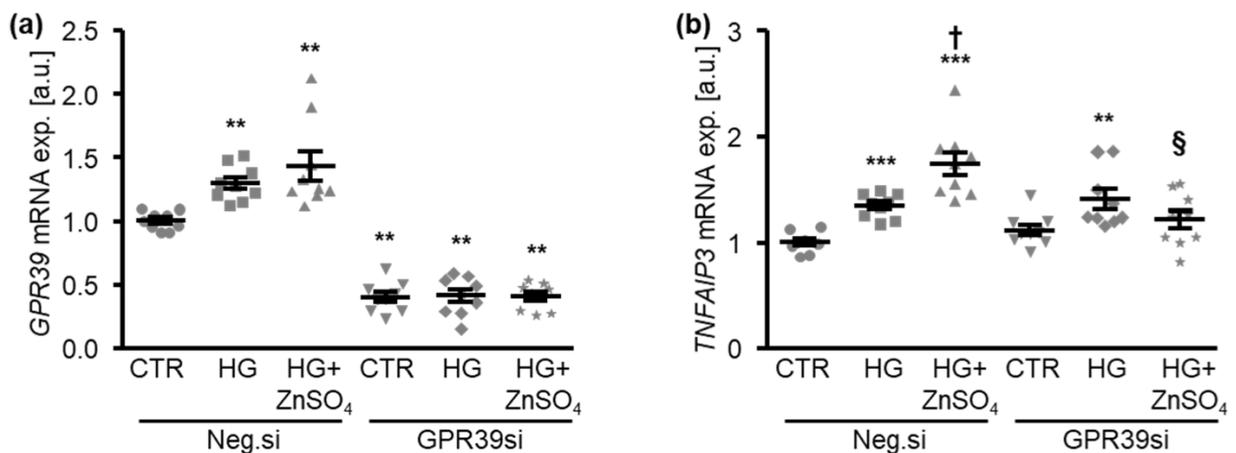


Abbildung 6 (13): Das Silencing von TNFAIP3 verringert die protektive Wirkung von Zinksulfat auf die Kalzifizierung der HAoSMCs unter hohen Glukosekonzentrationen. Kalziumgehalt ($n = 8$, $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein) in HAoSMCs mit und ohne Zusatz von Zinksulfat (ZnSO_4) zum Medium, die entweder mit negativer Kontroll-siRNA (Neg.si) oder TNFAIP3-siRNA (TNFAIP3si) transfiziert wurden und 11 Tage lang mit Kontrollmedium (CTR) oder Kalzifizierungsmedium (Calc.) und hohen Glukosekonzentrationen (HG) behandelt wurden. * ($p < 0,05$) steht für einen signifikanten Unterschied gegenüber der Neg.si CTR-Gruppe, † ($p < 0,05$) steht für einen signifikanten Unterschied zwischen der Neg.si+Calc.+HG-Gruppe und der Neg.si+Calc.+HG+ZnSO₄-Gruppe, § ($p < 0,05$)

steht für einen signifikanten Unterschied zwischen den Calc.+HG+ZnSO₄-Gruppen jeweils mit und ohne TNFAIP3 siRNA Behandlung.

In die Effekte von Zink auf TNFAIP3-Expression wurde bereits der Rezeptor GPR39 impliziert. Daher wurde unter glukosereichen Bedingungen und Zinkbehandlung die mögliche Rolle des zinkempfindlichen Rezeptors G protein coupled receptor 39 (GPR39) exploriert. Die Expression von GPR39 wurde durch RNA-Silencing gehemmt (Abbildung 7a) (13). Interessanterweise erhöhten hohe Glukosespiegel die mRNA-Expression von GPR39 in der mit negativer Kontroll-siRNA behandelten Gruppe, ein Effekt, der durch die Abwesenheit oder Anwesenheit von ZnSO₄ nicht signifikant verändert wurde (Abbildung 7a) (13). Wie in Abbildung 7b-d dargestellt, verringerte die Ausschaltung von GPR39 die Hochregulierung von TNFAIP3 nach Zinksulfat Behandlung. Ebenso wurde der protektive Effekt der Zinksulfat Behandlung auf die Hemmung der osteogenen Marker CBFA1 und ALPL unter GPR39 silencing gehemmt (13). Die GPR39-Transfektion hatte keinen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Expression von TNFAIP3, CBFA1 oder ALPL unter normalen bedingungen (13). Insgesamt scheint daher die schützende Wirkung von Zink auf die durch Hyperglykämie induzierte Expression osteogener Marker zumindest teilweise durch die GPR39-abhängige Hochregulierung von TNFAIP3 vermittelt (13).



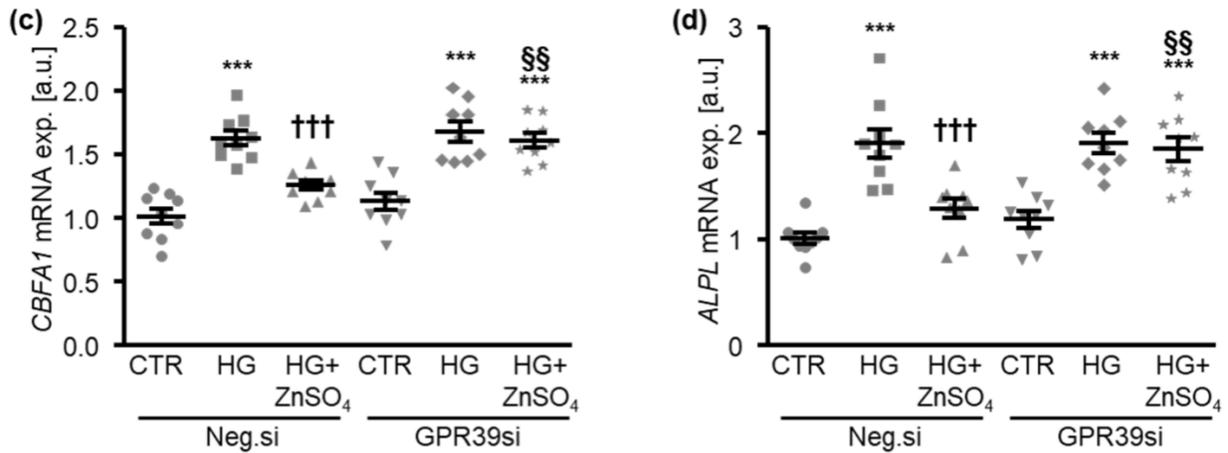


Abbildung 7 (13): Das Silencing von GPR39 schwächt die schützende Wirkung von Zink auf die durch hohe Glukose induzierte Expression von osteogenen Markern in HAoSMCs ab. (a): GPR39-mRNA-Expression ($n = 9$) in HAoSMCs mit und ohne Zusatz von Zinksulfat (ZnSO_4) zum Medium, die mit negativer Kontroll-siRNA (Neg.si) oder GPR39-siRNA (GPR39si) transfiziert wurden und 24 Stunden lang mit Kontroll- (CTR) oder hohen Glukosekonzentrationen (HG) behandelt wurden. ** ($p < 0,01$) steht für einen signifikanten Unterschied gegenüber der Neg.si-CTR-Gruppe. (b-d): mRNA-Expression von TNFAIP3, CBFA1 und ALPL ($n = 9$) in HAoSMCs mit und ohne Zusatz von Zinksulfat (ZnSO_4) zum Medium, die entweder mit Negativkontroll-siRNA (Neg.si) oder GPR39-siRNA (pPR39si) transfiziert wurden und 24 Stunden lang Kontrollmedium (CTR) oder hohen Glukosekonzentrationen (HG) ausgesetzt wurden. ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) steht für einen signifikanten Unterschied gegenüber der Neg.si-transfizierten CTR-Behandlungsgruppe, † ($p < 0,05$), ††† ($p < 0,001$) steht für einen signifikanten Unterschied zwischen der Neg.si transfizierten und HG-Gruppe gegenüber der Neg.si transfizierten und HG+ZNSO₄-Gruppe, § ($p < 0,05$), §§ ($p < 0,01$) steht für einen signifikanten Unterschied zwischen den HG+ZnSO₄-Gruppen, jeweils mit und ohne GPR39-siRNA Behandlung.

4. Diskussion

4.1 Ziel des Projekts

Ziel dieses Projekts war die Untersuchung möglicher protektiver Effekte von Zinksupplementierung auf die Kalzifizierung von glatten Gefäßmuskelzellen unter hohen Glukosebedingungen und welche Mechanismen dem zugrunde liegen. Die Gefäßverkalkung ist ein aktiver Prozess der Zellneuprogrammierung, und diese Studie untersuchte die Regulierung und einige der beteiligten fördernden und hemmenden Faktoren bei dieser Fragestellung.

4.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die gezeigten Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die durch hohe Glukosekonzentrationen verstärkte Gefäßmuskelzell-Kalzifizierung durch eine Zinksupplementierung verringert wird. Dies wurde durch direkte Untersuchungen des Kalziumgehalts in den Zellen und Fluoreszenzfärbung nachgewiesen. Weitere Hinweise darauf, dass eine Zinksupplementierung die durch hohe Glukose induzierte Kalzifizierung abschwächt, ergaben sich aus der Analyse der mRNA-Expression, der Proteinexpression und der Enzymaktivität von osteogenen Markern. Die Expression der osteogenen Marker CBFA1, SOX9 und ALPL unter glukosereichen Bedingungen wurde nach der Behandlung mit Zink reduziert. Dies sind typische Marker von verstärkten Verkalkungsprozessen in Gefäßmuskelzellen (1). Darüber hinaus konnte Zinkchlorid gleichartige protektive Effekte vermitteln: Nach der Behandlung mit Zinkchlorid wiesen die VSMCs ebenfalls eine deutlich geringere Expression von osteogenen Markern und einen niedrigeren Gesamtkalziumgehalt auf, was gegen einen relevanten Einfluss von Sulfat spricht. Bei den Effekten von Glukose auf pro-kalzifizierende Signalwege spielt der Transkriptionsfaktor NF- κ B wahrscheinlich eine wichtige Rolle (17). Die Aktivierung von NF- κ B durch hohe Glukosekonzentrationen wurde durch eine Zinksupplementierung unterdrückt, während der endogene NF- κ B Inhibitor TNFAIP3 hochreguliert wurde. Um zu überprüfen, ob Zink den NF- κ B Signalweg und damit den Kalzifizierungsprozess durch TNFAIP3 hemmt, wurden Silencing Versuche von TNFAIP3 durchgeführt, um Zellen vergleichen zu können, die mit hohen Glukosekonzentrationen und Zink behandelt wurden, jeweils mit oder ohne Ausschaltung von TNFAIP3. Dabei zeigte sich, dass die Präsenz von TNFAIP3 für die pro-

tektiven Effekte von Zink benötigt war. Mit TNFAIP3-silencing wurde die durch hohe Glukose induzierte Kalzifizierung und NF-kB-Hinunterregulierung durch Zink nicht unterdrückt. Schließlich, um festzustellen, ob der zinkempfindliche Rezeptor GPR39 am Anfang dieser Signalkaskade steht, wurde Silencing von GPR39 durchgeführt, wodurch wiederum die protektiven Auswirkungen von Zink abgeschwächt wurden.

4.3 Auswirkungen

Zusammenfassend wurde ein protektiver Effekt von Zink auf Verkalkungssignalwege unter glukosereichen Bedingungen festgestellt. Mechanistisch ist dieser Effekt zumindest teilweise über GPR39-abhängige Hochregulierung von TNFAIP3 vermittelt, die dann NF-kB daran hindert, die Kalzifizierung von glatten Gefäßmuskelzellen zu fördern. Dieser Zusammenhang ist im Folgenden schematisch dargestellt:

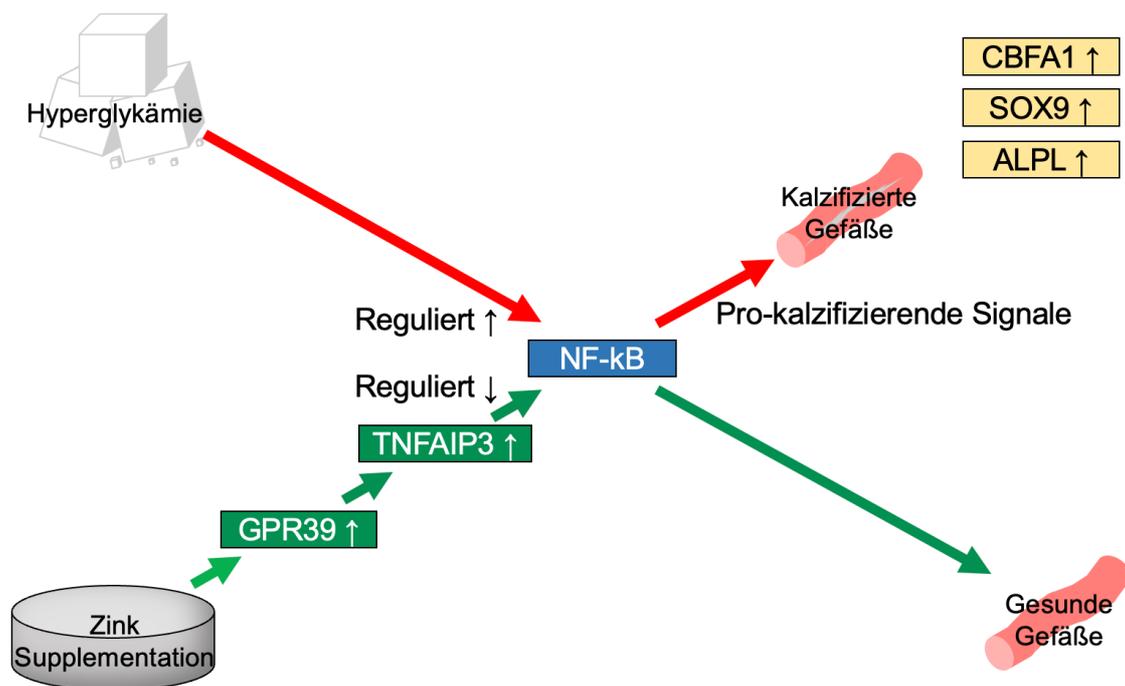


Abbildung 8 (13): Schematische Darstellung der in dieser Studie explorierten Signalwege, welche in den Prozess der Gefäßkalzifizierung involviert sind. Bei Hyperglykämie kann NF-kB vermehrt aktiviert werden, was durch den roten Pfeil dargestellt ist und was zu pro-kalzifizierenden Signalen und einem Umbau der glatten Gefäßmuskelzellen führt, wodurch die pro-kalzifizierenden Transkriptionsfaktoren CBFA1 und SOX9 sowie das pro-kalzifizierende Enzym ALPL vermehrt exprimiert werden. Zink kann dem gegenüber protektiv entgegenwirken über die Hemmung

des Transkriptionsfaktors NF- κ B, was mit grünen Pfeilen dargestellt ist. Diese antiinflammatorischen Effekte können über TNFAIP3 vermittelt werden, welches von GPR39 aktiviert wird, was wiederum unter anderem abhängig von der Zink-Konzentration stimuliert wird.

4.4 Bisheriger Wissensstand

4.4.1 Hyperglykämie

Die Zahl der an Diabetes mellitus erkrankten Menschen steigt stetig und damit nehmen auch die mikro- und makrovaskulären Folgeerkrankungen und die durch hohe Glukosekonzentrationen verursachten Effekte zu: Weltweit ist Diabetes mellitus die siebthäufigste Todesursache (62) und stellt auch eine wachsende Herausforderung für das Gesundheitssystem dar. Laut der International Diabetes Federation hatten im Jahr 2019 9,3 % der Weltbevölkerung zwischen 20 und 97 Jahren Diabetes mellitus und prospektiv werden es 2045 10,9% sein (63). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, kommt es bei Diabetes mellitus zu Gefäßverkalkungen und diese sind ein Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen und Tod (64). Aufgrund dieser Zusammenhänge wurde in dieser Studie die Hyperglykämie bei Gefäßverkalkung näher betrachtet. In anderen Studien, in welchen die Hyperphosphatämie im Vordergrund stand, der Hauptrisikofaktor für Gefäßverkalkungen, wurde der protektive Effekt von Zink bereits nachgewiesen (11).

Interessanterweise wurde in klinischen Studien diskutiert, dass es zwar eine ausgeprägte Assoziation zwischen Hyperphosphatämie und Gefäßverkalkung gibt bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung ohne Diabetes, aber dass Hyperphosphatämie eventuell nicht dieselbe Relevanz hat bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung und Diabetes mellitus (65). Gefäßverkalkung entwickelt sich bei Patienten mit Diabetes mellitus bevor eine Dialysepflichtigkeit und damit eine Hyperphosphatämie besteht (39).

Wie genau Hyperglykämie die Gefäßverkalkung beeinflusst ist nicht abschließend geklärt. Oxidativer Stress und Inflammation sind treibende Kräfte in dem multifaktoriellen Prozess der Gefäßverkalkung. Über die Expression von osteo- und chondrogenen Markern kommt es zum Umbau der glatten Gefäßmuskelzellen (66). Die Serum und Glukokortikoid-induzierbare Kinase 1 (SGK1) wurde als ein wichtiger Faktor identifiziert, welcher zu Gefäßverkalkung führt und das sowohl ausgelöst durch Hyperglykämie als auch durch Hyperphosphatämie (56). Hypoxie könnte ein weiterer Prozess sein, durch den

Hyperglykämie zu Gefäßverkalkung führt, über Osteopontin Erhöhung und Zellproliferation (27). Diskutiert wurde auch der Einfluss von oxidiertem LDL, welcher in Studien zu einer Erhöhung der alkalischen Phosphatase Aktivität und zur Formation von kalzifizierten Arealen führte (29, 67). Ein weiterer Aspekt sind die mit Diabetes mellitus einhergehenden anderen Veränderungen wie Hyperinsulinämie aufgrund von Insulinresistenz, welche selber pro-kalzifizierend wirkt (68).

4.4.2 Zink

Zink ist nach Eisen das zweithäufigste Spurenelement im menschlichen Körper. Jeder Mensch hat circa 1,4 – 2,3 g in den verschiedenen Geweben zu unterschiedlichen Anteilen verteilt (69). Zink ist ein fester Bestandteil von circa 10% der menschlichen Proteine und damit Teil der Regulation aller zellulären Prozesse durch Enzyme und Transkriptionsfaktoren (70).

Es wurden die Auswirkungen von Zink untersucht, weil dies als relevanter Faktor in Zusammenhang mit Gefäßkalzifizierung zunehmend besprochen wird (11). Es wurde bereits diskutiert, dass eine Zinksupplementierung mit einem geringeren Risiko für Gefäßverkalkung in chronischer Niereninsuffizienz vergesellschaftet sein könnte (11, 71, 72). In experimentellen Studien wurde schon 2013 gezeigt, dass die Lebensdauer von glatten Gefäßmuskelzellen von der Zinkkonzentration abhängt (73). Der Zusammenhang basiert nicht nur auf experimentellem Kontext, sondern auch auf Studien, in denen untersucht wurde, wie das Risiko der Arterienverkalkung in der Allgemeinbevölkerung mit der Zinkzufuhr in der Nahrung zusammenhängt (13, 71). Andere Studien haben gezeigt, dass Zink im Blut speziell bei Patienten mit Diabetes Mellitus mit der Verkalkungsneigung korreliert (46).

4.4.3 Inflammation, NF- κ B und Gefäßverkalkungen

Entzündliche Prozesse hängen eng mit der Gefäßverkalkung zusammen (74). Aktivierung von pro-inflammatorischen Signalwegen durch inflammatorische Mediatoren verstärken die Verkalkung von Gefäßmuskelzellen (6). Dies konnten wir auch bereits in früheren Versuchen nachweisen (58). Wir konnten beispielsweise zeigen, dass das pro-inflammatorische Plasmaprotein „C-reactive protein“ direkt pro-kalzifizierende intrazelluläre Signalmechanismen aktiviert, die eine osteo-/chondrogene Transdifferenzierung in

VSMCs fördern (58). Dies geschah zumindest teilweise durch die Induktion von oxidativem Stress über das Fc fragment of IgG type IIa (FCGR2A) Rezeptor (58). Dies unterstützt, dass Gefäßverkalkung ein komplexer Prozess ist, der durch inflammatorische Faktoren gefördert wird.

Dabei spielt der Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells eine wichtige Rolle (75). Dieser ist ein ubiquitär vorkommender Proteinkomplex. Er ist ein wichtiger Regulator für die Entwicklung des Immunsystems, Immunreaktion, Entzündung und Krebs. NF- κ B ist verantwortlich für DNA-Transkription, induziert die Zytokinproduktion und vermittelt das Zellüberleben (76). Die Verbindung zwischen der hemmenden Wirkung von Zink auf die NF- κ B-Aktivierung wurde bereits als eine der wichtigen entzündungshemmenden Eigenschaften von Zink nachgewiesen (69). Studien haben gezeigt, dass ein Zinkdefizit in einem Zustand von akuter Inflammation zu einer erhöhten NF- κ B Aktivierung führt (69). In Studien sind mehrere unterschiedliche inhibierende Wirkweisen von Zink auf NF- κ B beschrieben, eine der wichtigsten ist jedoch die Zink-abhängige Induzierung von TNFAIP3, welches einer der wichtigsten Inhibitoren von NF- κ B ist (69).

Es hat sich gezeigt, dass Zink die Regulierung der Osteoblastogenese und Osteoklastogenese zumindest teilweise über NF- κ B beeinflusst (13, 77). Darüber hinaus wird die NF- κ B-Aktivierung als ein wichtiger Faktor angesehen, der zu Gefäßpathologien bei Diabetes mellitus beiträgt (13, 17). So konnte gezeigt werden, dass die osteoinduktive Signalübertragung, gefördert durch hohe Glukosekonzentrationen, durch die Aktivierung von NF- κ B mittels SGK1 reguliert wird (17). Somit war der Zusammenhang zwischen durch Hyperglykämie induzierten prokalzifizierenden Veränderungen und der Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs bereits hergestellt.

Die vorliegende Studie baute auf diesen zuvor etablierten Konzepten auf und zeigte, dass Zink die durch hohe Glukosekonzentrationen geförderte NF- κ B-Aktivierung und VSMC-Kalzifizierung reduziert.

4.4.4 GPR39

Es war bereits bekannt, dass die zelluläre Wirkung von Zink zumindest teilweise durch den G-Protein-gekoppelten Rezeptor 39 vermittelt wird, der durch die extrazelluläre Zinkkonzentration reguliert wird (78). Beispielsweise wurde gezeigt, dass ein Zink-Defizit über die Regulation von GPR39 mit depressiven Symptomen zusammenhängt (79). GPR39

ist außerdem für entzündungshemmende Eigenschaften bekannt (13, 80, 81). So wird beispielsweise die Anheftung von Monozyten an Endothelzellen, was ein wichtiger Faktor bei der Entstehung von Atherosklerose ist, zumindest teilweise durch GPR39 gehemmt (82). GPR39 vermittelt anti-inflammatorische Effekte zumindest teilweise durch Regulation von TNFAIP3 (83). Aufgrund dieser bereits etablierten Konzepte vermuteten wir, dass GPR39 in den zugrunde liegenden Mechanismus der antikalzifizierenden Wirkung von Zink auf VSMCs unter hohen Glukosekonzentrationen involviert ist. Die hemmende Wirkung auf Gefäßkalzifizierung durch Zink und GPR39 bei phosphatreichen Bedingungen wurde experimentell bereits nachgewiesen (11). Auch in Bezug auf Aortenklappenkalzifikation konnte gezeigt werden, dass Zink über GPR 39 protektiv der Verkalkung entgegenwirken könnte (84).

Andererseits ist Zink auch an der Aufrechterhaltung der Knochenhomöostase beteiligt (85). Zink spielt eine wichtige Rolle für das Wachstum, die Entwicklung und den Erhalt der Knochen, und zwar zumindest teilweise via GPR39, welches die Enzyme in Osteoblasten sowie die Prozessierung und Ablagerung von Kollagen reguliert (86). Andere Studien haben gezeigt, dass der GPR39-Agonismus sogar ein therapeutisches Ziel für die Vorbeugung von Osteoarthritis sein könnte (87). Somit ist Zink ein wichtiger Vermittler der Knochen-Gefäß-Achse mit unterschiedlichen Funktionen in den jeweiligen Geweben.

4.4.5 TNFAIP3

TNFAIP3, auch A20 genannt, ist ein Zinkfingerprotein mit der Fähigkeit, die NF- κ B-Aktivität und die TNF-vermittelte Apoptose zu hemmen (88). TNFAIP wirkt antiinflammatorisch über die Hemmung von NF- κ B, wie in experimentellen Studien gezeigt wurde, in denen TNFAIP3 knock-out Mäuse an Multiorgan-Inflammation verstarben (89). In einer Studie mit Mäusen, die TNFAIP3-haploinsuffiziente Gefäß-Allotransplantate erhielten, wurde gezeigt, dass es zu einer verstärkten Transplantat-Arteriosklerose kam (13, 90). TNFAIP3 wird durch NF- κ B-Stimulatoren hochreguliert, was möglicherweise die Beobachtung einer erhöhten TNFAIP3-Expression in VSMCs erklären könnte, die hohen Glukosespiegeln ausgesetzt wurden (91). TNFAIP3-Expression wird durch Zink hochreguliert (69) und die vorliegende Studie zeigt, dass Zink TNFAIP3 benötigt, um die NF- κ B-Aktivierung unter hohen Glukosekonzentrationen zu beeinflussen (13). Vielfach wurde bereits gezeigt, dass Zink durch die TNFAIP-3-abhängige NF- κ B-Hemmung verschiedene andere entzündungshemmende Wirkungen hat, wie die Verringerung entzündlicher

Zytokine (92) oder zum Beispiel die Wachstumsunterdrückung von intrakraniellen Aneurysmen, deren Pathogenese stark mit chronischen Entzündungen in Verbindung gebracht wird (93). Dass auch TNFAIP3 in die Knochen-Gefäß Achse involviert ist, zeigte sich in Studien an Mäusen, in denen eine Überexpression von TNFAIP3 zu geringer ausgeprägter Osteoarthritis führte (94).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass nachgewiesen wurde, dass TNFAIP3 in den peripheren mononukleären Blutzellen von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 reduziert ist, was darauf schließen lässt, dass es bei der Pathogenese der Krankheit eine wichtige Rolle spielt und sogar therapeutisch relevant sein könnte (95). Aufgrund all dieser früheren Beobachtungen vermuteten wir, dass TNFAIP3 eine wichtige Rolle spielen könnte bei der Wirkung von Zink auf Gefäßverkalkung unter hohen Glukosekonzentrationen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass TNFAIP3 tatsächlich eine entscheidende Rolle bei dem zugrunde liegenden Mechanismus spielt.

4.5 Stärken und Schwächen

Die vorliegenden Ergebnisse wurden ausschließlich durch in-vitro-Experimente erzielt, was ihre Übertragbarkeit einschränkt. Außerdem verwendeten wir sehr hohe Glukosekonzentrationen im Medium der VSMCs. Daher wäre es schwierig, unsere Ergebnisse direkt auf Patienten mit Diabetes Mellitus zu übertragen. Auch wenn ein konsistenter Signalweg gefunden wurde, schließt dies andere Faktoren und Mechanismen nicht aus, die daran beteiligt sein könnten, wie Zink die durch hohe Glukosekonzentrationen geförderte Gefäßkalzifizierung verbessert. Abbildung 7a ist ein Beispiel dafür: Wir konnten feststellen, dass GPR39 schon allein durch hohe Glukose hochreguliert wird. Es ist möglich, dass viele weitere Interaktionen involviert sind, welche bislang unbekannt sind.

In dieser Studie wurde ein Kalzifizierungs-Medium, welches Phosphat enthielt, verwendet, um eine Verkalkung der Zellen zu ermöglichen. Dies stellt ebenfalls eine Limitation dar, da in experimentellen Studien diskutiert wurde, dass eine durch Hyperphosphatämie verursachte Gefäßverkalkung durch Hyperglykämie in vivo nicht beeinflusst wurde (96). Allerdings wurden auch synergistische Effekte von Diabetes Mellitus und chronischer Niereninsuffizienz auf Gefäßverkalkung gezeigt (97). Das Durchführen der Experimente ohne Kalzifizierungsmedium war in der vorliegenden Studie nicht möglich, jedoch können primär durch das Kalzifizierungsmedium erzeugte Effekte nicht ausgeschlossen werden.

Eine Stärke der vorliegenden Studie ist, dass wir den Kalzifizierungsprozess auf verschiedene Weise untersucht haben, um unsere Ergebnisse zu validieren. Es wurden osteo-/chondrogene Marker auf der Ebene der mRNA-Expression und der Proteinexpression untersucht, sowie der Gesamtkalziumgehalt gemessen. Ebenso wurden Assays zur Quantifizierung von Enzymaktivität und von Protein verwendet. Darüber hinaus wurden die Auswirkungen von Zink nicht nur mit Zinksulfat, sondern auch mit Zinkchlorid untersucht, um vergleichbare Effekte zu reproduzieren.

Obwohl die Interpretation der Ergebnisse durch zahlreiche Limitationen eingeschränkt ist, unterstützen diese eine mögliche wichtige Rolle von Zink bei diabetischer Gefäßverkalkung.

4.6 Bedeutung und zukünftige Auswirkungen

Da es sich bei der Gefäßverkalkung um eine häufige Pathologie handelt und diese mit einem drei- bis vierfach höheren Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse und Mortalität einhergeht, ist eine Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen wichtig (98). Die Gefäßverkalkung findet bei Patienten mit Diabetes mellitus beschleunigt statt (99). Bei Diabetes mellitus spielt die Gefäßverkalkung eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die die häufigste Todesursache bei Patienten mit Diabetes mellitus sind (24). Somit könnte die antikalzifizierende und entzündungshemmende Wirkung von Zink bei Diabetes Mellitus von großer Bedeutung sein (13). Dies gilt umso mehr, da Patienten mit Diabetes Mellitus Typ 1 und 2 an Zinkmangel leiden könnten (100).

Klinische Studien haben bereits gezeigt, dass eine Zinksupplementierung bei Personen mit Prädiabetes einen positiven Einfluss auf die glykämischen und Lipidparameter haben könnte (13, 101). Andere Studien haben ergeben, dass eine Zinksupplementierung bei Patienten mit Diabetes mellitus eine positive Wirkung auf den Blutzucker- und LDL-Cholesterinspiegel hat (102). Außerdem stellten sie eine signifikante Senkung des systolischen und diastolischen Blutdrucks fest (102).

Neben einer positiven Auswirkung auf den Blutzuckerspiegel könnte eine Zinksupplementierung auch durch entzündungshemmende Eigenschaften positive Auswirkungen haben, da Entzündung ein Schlüsselfaktor bei der Kalzifizierung von Gefäßen sind (103). Bei fettleibigen Mäusen linderte eine Zinksupplementierung eine Herzhypertrophie und

ein Zinkdefizit verstärkte eine Herzhypertrophie über die Vermittlung von p38 MAPK-abhängigen kardialen Entzündungswegen (104). Eine andere Studie ergab, dass eine Zinksupplementierung das Fortschreiten einer diabetischen Nephropathie bei Mäusen verhindert (13, 105).

In einer Metaanalyse wurde festgestellt, dass eine niedrig dosierte, langanhaltende Zinksupplementierung den Risikofaktoren für Diabetes mellitus und Herz-Kreislauf-Erkrankungen entgegenwirken kann (13, 106). Da 17,3 % der Weltbevölkerung eine unzureichende Zinkzufuhr haben (107), untersuchte die Meta Analyse auch die Biofortifikation, was den gezielten Einsatz konventioneller Pflanzenzüchtung bei Grundnahrungsmitteln impliziert, und kam zu dem Ergebnis, dass diese einen relevanten Einfluss auf den Lipidstoffwechsel, das Redox-Gleichgewicht, die DNA-Reparatur und Entzündung haben und sich letztendlich positiv auf Risikofaktoren für Diabetes mellitus und Herz-Kreislauf-Erkrankungen auswirken könnte (106).

Im Hinblick auf künftige Auswirkungen ist es wichtig zu erwähnen, dass GPR39 in Studien untersucht wurde, die ergaben, dass das Ausschalten von GPR39 bei Mäusen zu einem Defekt der Insulinsekretion führte, wenn die Mäuse gefüttert wurden und eine Insulinresistenz entwickelten (108). GPR39 hat somit neben dem in der vorliegenden Studie explorierten Einfluss auf antikalzifizierende und antiinflammatorische Mechanismen bei Hyperglykämie auch einen Einfluss auf die Insulinsekretion unter hyperglykämischen Bedingungen, worauf bei Schlussfolgerungen geachtet werden muss.

Eine weitere interessante Fragestellung, welche über den Mechanismus der Verlangsamung oder Inhibierung hinausgeht ist eine mögliche Reversibilität der Gefäßkalzifizierung (5). In einer Studie an Ratten konnte eine durch Langzeit Therapie mit Warfarin und Vitamin-K verursachte Gefäßverkalkung im Verlauf verbessert werden durch eine Behandlung mit Endothelin-1-Rezeptor-Antagonisten (109). Der hinter dem Modell liegende Mechanismus ist, dass das Matrix G1a Protein von Vitamin K abhängig ist um der Kalzifizierung in der extrazellulären Matrix entgegenzuwirken (110).

Betreffend der Gefäßverkalkung im Rahmen einer Hyperglykämie hat eine Studie an VSMCs von Ratten ergeben, dass durch die Behandlung mit dem GLP-1-Antagonisten Liraglutid eine durch Hyperglykämie induzierte Kalzifizierung von glatten Gefäßmuskeln abgeschwächt werden kann (111). Es wurde beobachtet, dass die osteogenen Marker CBFA1 und Osteopontin durch die Behandlung reduziert werden konnten und

smooth muscle alpha actin durch die Behandlung erhöht werden konnte (111). Die ALP Aktivität war nach Liraglutid Behandlung reduziert (111). In der Studie wurde die Hemmung des PI3K/ERK Signalwegs als Wirkmechanismus von Liraglutid auf die durch Hyperglykämie induzierte Gefäßverkalkung besprochen (111). In einer anderen Studie wurde investigated, dass ein durch advanced glycation end products (AGEs) verursachte Phänotypveränderung von glatten Gefäßmuskelzellen aus einem Rattenmodell durch Liraglutid inhibiert werden konnte, was an nicht mehr vermindertem alpha-smooth muscle actin sichtbar war nach Liraglutid-Therapie (112). Unter anderem lag dem zugrunde eine Inhibierung durch Liraglutid des durch advanced glycation end products hochregulierten NF-kB Signalwegs (112). Sitagliptin, ein anderes orales Antidiabetikum, was über die Hemmung der Dipeptidyl-Peptidase den Abbau von GLP-1 hemmt, wurde ebenfalls in Studien untersucht und es wurde gefunden, dass die Gefäßkalzifizierung in diabetischen Mausmodellen durch Sitagliptin ebenfalls reduziert wird, was sich beispielsweise an geringerer Calcium Ablagerung in glatten Gefäßmuskelzellen im Mausmodell zeigte (113). Zusammengefasst bietet die Supplementierung mit Zink zahlreiche potenzielle Vorteile aufgrund seiner entzündungshemmenden, antioxidativen und antikalzifizierenden Eigenschaften, und es wurden bereits zahlreiche Studien durchgeführt zu verschiedenen Anwendungsmöglichkeiten.

5. Schlussfolgerung

Zinksupplementierung verbessert die durch hohe Glukosekonzentrationen verstärkte Verkalkung von glatten Gefäßmuskelzellen. Die osteo-/chondrogene Transdifferenzierung von glatten Gefäßmuskelzellen und die Expression osteogener Marker, die durch hohe Glukosekonzentrationen gefördert wird, wird durch eine Behandlung mit Zink abgeschwächt. Dies steht in Zusammenhang mit einer verringerten Glukose-induzierten NF-kB-Aktivierung nach Zinksupplementation, welche unter anderem durch Hochregulierung des NF-kB-Inhibitors TNFAIP3 gesteuert wird. Die TNFAIP3-Expression nach Zinkbehandlung wird zumindest teilweise durch GPR39 vermittelt. Es sind weitere Studien erforderlich, um diese Erkenntnisse zu bestätigen, andere beitragende Faktoren aufzudecken und schließlich diese Erkenntnisse möglicherweise in einen klinischen Kontext zu übertragen.

Literaturverzeichnis

1. Voelkl J, Lang F, Eckardt KU, Amann K, Kuro OM, Pasch A, Pieske B, Alesutan I. Signaling pathways involved in vascular smooth muscle cell calcification during hyperphosphatemia. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(11):2077-91.
2. Chen NX, Duan D, O'Neill KD, Moe SM. High glucose increases the expression of Cbfa1 and BMP-2 and enhances the calcification of vascular smooth muscle cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(12):3435-42.
3. Lee SJ, Lee IK, Jeon JH. Vascular Calcification-New Insights Into Its Mechanism. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8).
4. Lanzer P, Boehm M, Sorribas V, Thiriet M, Janzen J, Zeller T, St Hilaire C, Shanahan C. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *Eur Heart J.* 2014;35(23):1515-25.
5. Giachelli CM. Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(12):2959-64.
6. Lanzer P, Hannan FM, Lanzer JD, Janzen J, Raggi P, Furniss D, Schuchardt M, Thakker R, Fok P, Saez-Rodriguez J, Millan A, Sato Y, Ferraresi R, Virmani R, St Hilaire C. Medial Arterial Calcification: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol.* 2021;78(11):1145-65.
7. Kramann R, Goettsch C, Wongboonsin J, Iwata H, Schneider RK, Kuppe C, Kaesler N, Chang-Panesso M, Machado FG, Gratwohl S, Madhurima K, Hutcheson JD, Jain S, Aikawa E, Humphreys BD. Adventitial MSC-like Cells Are Progenitors of Vascular Smooth Muscle Cells and Drive Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Cell Stem Cell.* 2016;19(5):628-42.
8. Mönckeberg JG. Über die reine Mediaverkalkung der Extremitätenarterien und ihr Verhalten zur Arteriosklerose. *Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin.* 1903;171(1):141-67.
9. Fadini GP, Pauletto P, Avogaro A, Rattazzi M. The good and the bad in the link between insulin resistance and vascular calcification. *Atherosclerosis.* 2007;193(2):241-4.
10. Boström KI. Where do we stand on vascular calcification? *Vascul Pharmacol.* 2016;84:8-14.
11. Voelkl J, Tuffaha R, Luong TTD, Zickler D, Masyout J, Feger M, Verheyen N, Blaschke F, Kuro-O M, Tomaschitz A, Pilz S, Pasch A, Eckardt K, Scherberich JE, Lang F, Pieske B, Alesutan I. Zinc Inhibits Phosphate-Induced Vascular Calcification through TNFAIP3-Mediated Suppression of NF- κ B. *J Am Soc Nephrol.* 2018;29(6):1636-48.
12. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res.* 2001;89(12):1147-54.
13. Henze LA, Estepa M, Pieske B, Lang F, Eckardt KU, Alesutan I, Voelkl J. Zinc Ameliorates the Osteogenic Effects of High Glucose in Vascular Smooth Muscle Cells. *Cells.* 2021;10(11).
14. Tintut Y, Honda HM, Demer LL. Biomolecules Orchestrating Cardiovascular Calcification. *Biomolecules.* 2021;11(10).
15. Haarhaus M, Cianciolo G, Barbuto S, La Manna G, Gasperoni L, Tripepi G, Plebani M, Fusaro M, Magnusson P. Alkaline Phosphatase: An Old Friend as Treatment Target for Cardiovascular and Mineral Bone Disorders in Chronic Kidney Disease. *Nutrients.* 2022;14(10).
16. Voelkl J, Egli-Spichtig D, Alesutan I, Wagner CA. Inflammation: a putative link between phosphate metabolism and cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond).* 2021;135(1):201-27.
17. Poetsch F, Henze LA, Estepa M, Moser B, Pieske B, Lang F, Eckardt K, Alesutan I, Voelkl J. Role of SGK1 in the Osteogenic Transdifferentiation and Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells Promoted by Hyperglycemic Conditions. *Int J Mol Sci.* 2020;21(19).
18. La Sala L, Prattichizzo F, Ceriello A. The link between diabetes and atherosclerosis. *Eur J Prev Cardiol.* 2019;26(2_suppl):15-24.
19. Lin X, Li S, Wang YJ, Wang Y, Zhong JY, He JY, Cui XJ, Zhan JK, Liu YS. Exosomal Notch3 from high glucose-stimulated endothelial cells regulates vascular smooth muscle cells calcification/aging. *Life Sci.* 2019;232:116582.

20. Zhao G, Xu MJ, Zhao MM, Dai XY, Kong W, Wilson GM, Guan Y, Wang CY, Wang X. Activation of nuclear factor-kappa B accelerates vascular calcification by inhibiting ankylosis protein homolog expression. *Kidney Int.* 2012;82(1):34-44.
21. Giridharan S, Srinivasan M. Mechanisms of NF- κ B p65 and strategies for therapeutic manipulation. *J Inflamm Res.* 2018;11:407-19.
22. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2012;35 Suppl 1(Suppl 1):S64-71.
23. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, Stein C, Basit A, Chan JC, Mbanya JC, Pavkov ME, Ramachandaran A, Wild SH, James S, Herman WH, Zhang P, Bommer C, Kuo S, Boyko EJ, Magliano DJ. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2022;183:109119.
24. Forde H, Davenport C, Harper E, Cummins P, Smith D. The role of OPG/RANKL in the pathogenesis of diabetic cardiovascular disease. *Cardiovasc Endocrinol Metab.* 2018;7(2):28-33.
25. Chen NX, Moe SM. Arterial calcification in diabetes. *Curr Diab Rep.* 2003;3(1):28-32.
26. Takemoto M, Yokote K, Yamazaki M, Ridall AL, Butler WT, Matsumoto T, Tamura K, Saito Y, Mori S. Enhanced expression of osteopontin by high glucose. Involvement of osteopontin in diabetic macroangiopathy. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;902:357-63.
27. Sodhi CP, Phadke SA, Batlle D, Sahai A. Hypoxia stimulates osteopontin expression and proliferation of cultured vascular smooth muscle cells: potentiation by high glucose. *Diabetes.* 2001;50(6):1482-90.
28. Santilli SM, Fiegel VD, Knighton DR. Alloxan diabetes alters the rabbit transarterial wall oxygen gradient. *J Vasc Surg.* 1993;18(2):227-33.
29. Navas-Madroñal M, Castelblanco E, Camacho M, Consegal M, Ramirez-Morros A, Sarrias MR, Perez P, Alonso N, Galan M, Mauricio D. Role of the Scavenger Receptor CD36 in Accelerated Diabetic Atherosclerosis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(19).
30. Bessueille L, Fakhry M, Hamade E, Badran B, Magne D. Glucose stimulates chondrocyte differentiation of vascular smooth muscle cells and calcification: A possible role for IL-1 β . *FEBS Lett.* 2015;589(19 Pt B):2797-804.
31. Wang Y, Shan J, Yang W, Zheng H, Xue S. High mobility group box 1 (HMGB1) mediates high-glucose-induced calcification in vascular smooth muscle cells of saphenous veins. *Inflammation.* 2013;36(6):1592-604.
32. Zhu Q, Guo R, Liu C, Fu D, Liu F, Hu J, Jiang H. Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis Contributing to High Glucose-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Calcification. *J Vasc Res.* 2015;52(5):291-8.
33. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation.* 2006;114(6):597-605.
34. Koike S, Yano S, Tanaka S, Sheikh AM, Nagai A, Sugimoto T. Advanced Glycation End-Products Induce Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells: A Mechanism for Vascular Calcification. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9).
35. London GM, Guérin AP, Marchais SJ, Métivier F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18(9):1731-40.
36. Stabley JN, Towler DA. Arterial Calcification in Diabetes Mellitus: Preclinical Models and Translational Implications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37(2):205-17.
37. Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation.* 2008;117(22):2938-48.
38. Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Rönnemaa T, Laakso M. Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16(8):978-83.
39. Merjanian R, Budoff M, Adler S, Berman N, Mehrotra R. Coronary artery, aortic wall, and valvular calcification in nondialyzed individuals with type 2 diabetes and renal disease. *Kidney Int.* 2003;64(1):263-71.

40. Prasad AS. Zinc: an antioxidant and anti-inflammatory agent: role of zinc in degenerative disorders of aging. *J Trace Elem Med Biol.* 2014;28(4):364-71.
41. Prasad AS, Miale A, Jr., Farid Z, Sandstead HH, Schulert AR. Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism, and hypogonadism. *J Lab Clin Med.* 1963;61:537-49.
42. Saper RB, Rash R. Zinc: an essential micronutrient. *Am Fam Physician.* 2009;79(9):768-72.
43. de Carvalho GB, Brandão-Lima PN, Maia CS, Barbosa KB, Pires LV. Zinc's role in the glycemic control of patients with type 2 diabetes: a systematic review. *Biometals.* 2017;30(2):151-62.
44. Fukunaka A, Fujitani Y. Role of Zinc Homeostasis in the Pathogenesis of Diabetes and Obesity. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2).
45. Soinio M, Marniemi J, Laakso M, Pyörälä K, Lehto S, Rönnemaa T. Serum zinc level and coronary heart disease events in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2007;30(3):523-8.
46. Nakatani S, Mori K, Sonoda M, Nishide K, Uedono H, Tsuda A, Emoto M, Shoji T. Association between Serum Zinc and Calcification Propensity (T(50)) in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and In Vitro Effect of Exogenous Zinc on T(50). *Biomedicines.* 2020;8(9).
47. Nagy A, Pethő D, Gáll T, Zavaczki E, Nyitrai M, Posta J, Zarjou A, Agarwal A, Balla G, Balla J. Zinc Inhibits HIF-Prolyl Hydroxylase Inhibitor-Aggravated VSMC Calcification Induced by High Phosphate. *Front Physiol.* 2019;10:1584.
48. Kar M, Khan NA, Panwar A, Bais SS, Basak S, Goel R, Sopory S, Medigeshi GR. Zinc Chelation Specifically Inhibits Early Stages of Dengue Virus Replication by Activation of NF-κB and Induction of Antiviral Response in Epithelial Cells. *Front Immunol.* 2019;10:2347.
49. Hongxia L, Yuxiao T, Zhilei S, Yan S, Yicui Q, Jiamin S, Xin X, Jianxin Y, Fengfeng M, Hui S. Zinc inhibited LPS-induced inflammatory responses by upregulating A20 expression in microglia BV2 cells. *J Affect Disord.* 2019;249:136-42.
50. Prasad AS. Zinc is an Antioxidant and Anti-Inflammatory Agent: Its Role in Human Health. *Front Nutr.* 2014;1:14.
51. Oyagbemi AA, Ajibade TO, Aboua YG, Gbadamosi IT, Adedapo ADA, Aro AO, Adejumobi OA, Thamahane-Katengua E, Omobowale TO, Falayi OO, Oyagbemi TO, Ogunpolu BS, Hassan FO, Ogunmiluyi IO, Ola-Davies OE, Saba AB, Adedapo AA, Nkadimeng SM, McGaw LJ, Kayoka-Kabongo PN, Oguntibeju OO, Yakubu MA. Potential health benefits of zinc supplementation for the management of COVID-19 pandemic. *J Food Biochem.* 2021;45(2):e13604.
52. Begum F, Me HM, Christov M. The Role of Zinc in Cardiovascular Disease. *Cardiol Rev.* 2022;30(2):100-8.
53. Nakatani S, Mori K, Shoji T, Emoto M. Association of Zinc Deficiency with Development of CVD Events in Patients with CKD. *Nutrients.* 2021;13(5).
54. Alesutan I, Voelkl J, Feger M, Kratschmar DV, Castor T, Mia S, Sacherer M, Viereck R, Borst O, Leibrock C, Gawaz M, Kuro-O M, Pilz S, Tomaschitz A, Odermatt A, Pieske B, Wagner CA, Lang F. Involvement Of Vascular Aldosterone Synthase In Phosphate-Induced Osteogenic Transformation Of Vascular Smooth Muscle Cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):2059.
55. Alesutan I, Luong TTD, Schelski N, Masyout J, Hille S, Schneider MP, Graham D, Zickler D, Verheyen N, Estepa M, Pasch A, Maerz W, Tomaschitz A, Pilz S, Frey N, Lang F, Delles C, Mueller OJ, Pieske B, Eckardt KU, Scherberich J, Voelkl J. Circulating uromodulin inhibits vascular calcification by interfering with pro-inflammatory cytokine signalling. *Cardiovasc Res.* 2021;117(3):930-41.
56. Voelkl J, Luong TT, Tuffaha R, Musculus K, Auer T, Lian X, Daniel C, Zickler D, Boehme B, Sacherer M, Metzler B, Kuhl D, Gollasch M, Amann K, Mueller DN, Pieske B, Lang F, Alesutan I. SGK1 induces vascular smooth muscle cell calcification through NF-κB signaling. *J Clin Invest.* 2018;128(7):3024-40.
57. Wang X, Seed B. A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(24):e154.
58. Henze LA, Luong TTD, Boehme B, Masyout J, Schneider MP, Brachs S, Lang F, Pieske B, Pasch A, Eckardt KU, Voelkl J, Alesutan I. Impact of C-reactive protein on osteo-/chondrogenic transdifferentiation and calcification of vascular smooth muscle cells. *Aging (Albany NY).* 2019;11(15):5445-62.

59. O'Rourke C, Shelton G, Hutcheson JD, Burke MF, Martyn T, Thayer TE, Shakartzi HR, Buswell MD, Tainsh RE, Yu B, Bagchi A, Rhee DK, Wu C, Derwall M, Buys ES, Yu PB, Bloch KD, Aikawa E, Bloch DB, Malhotra Rajeev. Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells and Imaging of Aortic Calcification and Inflammation. *J Vis Exp.* 2016(111).
60. Moser B, Poetsch F, Estepa M, Luong TTD, Pieske B, Lang F, Alesutan I, Voelkl J. Increased β -adrenergic stimulation augments vascular smooth muscle cell calcification via PKA/CREB signalling. *Pflugers Arch.* 2021;473(12):1899-910.
61. Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, Wu P, Wiesmann C, Baker R, Boone DL, Ma A, Koonin EV, Dixit VM. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF- κ B signalling. *Nature.* 2004;430(7000):694-9.
62. Glovaci D, Fan W, Wong ND. Epidemiology of Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. *Curr Cardiol Rep.* 2019;21(4):21.
63. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, Colagiuri S, Guariguata L, Motala AA, Ogurtsova K, Shaw JE, Bright D, Williams R, IDF Diabetes Atlas Committee. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019;157:107843.
64. Yao H, Sun Z, Zang G, Zhang L, Hou L, Shao C, Wang Z. Epidemiological Research Advances in Vascular Calcification in Diabetes. *J Diabetes Res.* 2021;2021:4461311.
65. Ishimura E, Okuno S, Taniwaki H, Kizu A, Tsuchida T, Shioi A, Shoji T, Tabata T, Inaba M, Nishizawa Y. Different risk factors for vascular calcification in end-stage renal disease between diabetics and nondiabetics: the respective importance of glycemic and phosphate control. *Kidney Blood Press Res.* 2008;31(1):10-5.
66. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Mönckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation.* 1999;100(21):2168-76.
67. Parhami F, Morrow AD, Balucan J, Leitinger N, Watson AD, Tintut Y, Berliner JA, Demer LL. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(4):680-7.
68. Olesen P, Nguyen K, Wogensen L, Ledet T, Rasmussen LM. Calcification of human vascular smooth muscle cells: associations with osteoprotegerin expression and acceleration by high-dose insulin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(2):H1058-64.
69. Jarosz M, Olbert M, Wyszogrodzka G, Młyniec K, Librowski T. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF- κ B signaling. *Inflammopharmacology.* 2017;25(1):11-24.
70. Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res.* 2006;5(1):196-201.
71. Chen W, Eisenberg R, Mowrey WB, Wylie-Rosett J, Abramowitz MK, Bushinsky DA, Melamed ML. Association between dietary zinc intake and abdominal aortic calcification in US adults. *Nephrol Dial Transplant.* 2020;35(7):1171-8.
72. Little PJ, Bhattacharya R, Moreyra AE, Korichneva IL. Zinc and cardiovascular disease. *Nutrition.* 2010;26(11-12):1050-7.
73. Shin MY, Kwun IS. Phosphate-induced rat vascular smooth muscle cell calcification and the implication of zinc deficiency in a7r5 cell viability. *Prev Nutr Food Sci.* 2013;18(2):92-7.
74. Moe SM, Chen NX. Inflammation and vascular calcification. *Blood Purif.* 2005;23(1):64-71.
75. He X, Wang Z, Wei L, Cheng X, Chen L, Gao F, Jiang H. Indoxyl sulfate promotes osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells by miR-155-5p-dependent downregulation of matrix Gla protein via ROS/NF- κ B signaling. *Exp Cell Res.* 2020;397(1):112301.
76. Gilmore TD. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene.* 2006;25(51):6680-4.
77. Yamaguchi M, Weitzmann MN. Zinc stimulates osteoblastogenesis and suppresses osteoclastogenesis by antagonizing NF- κ B activation. *Mol Cell Biochem.* 2011;355(1-2):179-86.

78. Hershinkel M. The Zinc Sensing Receptor, ZnR/GPR39, in Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2).
79. Mlyniec K. Interaction between Zinc, GPR39, BDNF and Neuropeptides in Depression. *Curr Neuropharmacol.* 2021;19(11):2012-9.
80. Laitakari A, Liu L, Frimurer TM, Holst B. The Zinc-Sensing Receptor GPR39 in Physiology and as a Pharmacological Target. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8).
81. Muneoka S, Goto M, Kadoshima-Yamaoka K, Kamei R, Terakawa M, Tomimori Y. G protein-coupled receptor 39 plays an anti-inflammatory role by enhancing IL-10 production from macrophages under inflammatory conditions. *Eur J Pharmacol.* 2018;834:240-5.
82. Xu Y, Wang M, Xie Y, Jiang Y, Liu M, Yu S, Wang B, Liu Q. Activation of GPR39 with the agonist TC-G 1008 ameliorates ox-LDL-induced attachment of monocytes to endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 2019;858:172451.
83. Chen L, Fang Z, Wang X, Sun X, Ge X, Cheng C, Hu H. G protein-coupled receptor 39 activation alleviates oxidized low-density lipoprotein-induced macrophage inflammatory response, lipid accumulation and apoptosis by inducing A20 expression. *Bioengineered.* 2021;12(1):4070-80.
84. Chen Z, Gordillo-Martinez F, Jiang L, He P, Hong W, Wei X, Staines KA, Macrae VE, Zhang C, Yu D, Fu X, Zhu D. Zinc ameliorates human aortic valve calcification through GPR39 mediated ERK1/2 signalling pathway. *Cardiovasc Res.* 2021;117(3):820-35.
85. O'Connor JP, Kanjilal D, Teitelbaum M, Lin SS, Cottrell JA. Zinc as a Therapeutic Agent in Bone Regeneration. *Materials (Basel).* 2020;13(10).
86. Jovanovic M, Schmidt FN, Guterman-Ram G, Khayyeri H, Hiram-Bab S, Orenbuch A, Katchkovsky S, Aflalo A, Isaksson H, Busse B, Jaehn K, Levaot N. Perturbed bone composition and integrity with disorganized osteoblast function in zinc receptor/Gpr39-deficient mice. *Faseb j.* 2018;32(5):2507-18.
87. Shan W, Qi J, Li C, Nie X. Agonism of GPR39 displays protective effects against advanced glycation end-product (AGE)-induced degradation of extracellular matrix in human SW1353 cells. *Arch Biochem Biophys.* 2019;677:108164.
88. Lee EG, Boone DL, Chai S, Libby SL, Chien M, Lodolce JP, Ma A. Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science.* 2000;289(5488):2350-4.
89. Ma A, Malynn BA. A20: linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(11):774-85.
90. Moll HP, Lee A, Peterson CR, Revuelta Cervantes J, Wojcik BM, Parulkar A, Mele A, LoGerfo PJ, Siracuse JJ, Csizmadia E, da Silva CG, Ferran C. A20 Haploinsufficiency Aggravates Transplant Arteriosclerosis in Mouse Vascular Allografts: Implications for Clinical Transplantation. *Transplantation.* 2016;100(11):e106-e16.
91. Verstrepen L, Verhelst K, van Loo G, Carpentier I, Ley SC, Beyaert R. Expression, biological activities and mechanisms of action of A20 (TNFAIP3). *Biochem Pharmacol.* 2010;80(12):2009-20.
92. Prasad AS, Bao B, Beck FW, Sarkar FH. Zinc-suppressed inflammatory cytokines by induction of A20-mediated inhibition of nuclear factor- κ B. *Nutrition.* 2011;27(7-8):816-23.
93. Hayashi K, Kataoka H, Minami M, Ikedo T, Miyata T, Shimizu K, Nagata M, Yang T, Yamamoto Y, Yokode M, Miyamoto S. Association of zinc administration with growth suppression of intracranial aneurysms via induction of A20. *J Neurosurg.* 2020;134(3):992-8.
94. Cui SB, Wang TX, Liu ZW, Yan JY, Zhang K. Zinc finger protein A20 regulates the development and progression of osteoarthritis by affecting the activity of NF- κ B p65. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2021;43(6):713-23.
95. Cheng L, Zhang D, Jiang Y, Deng W, Wu Q, Jiang X, Chen B. Decreased A20 mRNA and protein expression in peripheral blood mononuclear cells in patients with type 2 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;106(3):611-6.
96. Yoshida T, Yamashita M, Horimai C, Hayashi M. High glucose concentration does not modulate the formation of arterial medial calcification in experimental uremic rats. *J Vasc Res.* 2013;50(6):512-20.
97. Krishnan P, Moreno PR, Turnbull IC, Purushothaman M, Zafar U, Tarricone A, Singla S, Kini A, Sharma S, Narula J, Badimon JJ, Purushothaman KR. Incremental effects of diabetes mellitus and chronic

kidney disease in medial arterial calcification: Synergistic pathways for peripheral artery disease progression. *Vasc Med*. 2019;24(5):383-94.

98. Rennenberg RJ, Kessels AG, Schurgers LJ, van Engelshoven JM, de Leeuw PW, Kroon AA. Vascular calcifications as a marker of increased cardiovascular risk: a meta-analysis. *Vasc Health Risk Manag*. 2009;5(1):185-97.

99. Shao JS, Cheng SL, Sadhu J, Towler DA. Inflammation and the osteogenic regulation of vascular calcification: a review and perspective. *Hypertension*. 2010;55(3):579-92.

100. Jansen J, Rosenkranz E, Overbeck S, Warmuth S, Mocchegiani E, Giacconi R, Weiskirchen R, Karges W, Rink L. Disturbed zinc homeostasis in diabetic patients by in vitro and in vivo analysis of insulinomimetic activity of zinc. *J Nutr Biochem*. 2012;23(11):1458-66.

101. Jayawardena R, Ranasinghe P, Kodithuwakku W, Dalpatadu C, Attia J. Zinc supplementation in pre-diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Minerva Endocrinol (Torino)*. 2021.

102. Jayawardena R, Ranasinghe P, Galappatthy P, Malkanthi R, Constantine G, Katulanda P. Effects of zinc supplementation on diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Diabetol Metab Syndr*. 2012;4(1):13.

103. Bessueille L, Magne D. Inflammation: a culprit for vascular calcification in atherosclerosis and diabetes. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(13):2475-89.

104. Wang S, Luo M, Zhang Z, Gu J, Chen J, Payne KM, Tan Y, Wang Y, Yin X, Zhang X, Liu GC, Wintergerst K, Liu Q, Zheng Y, Cai L. Zinc deficiency exacerbates while zinc supplement attenuates cardiac hypertrophy in high-fat diet-induced obese mice through modulating p38 MAPK-dependent signaling. *Toxicol Lett*. 2016;258:134-46.

105. Sun W, Wang Y, Miao X, Wang Y, Zhang L, Xin Y, Zheng S, Epstein PN, Fu Y, Cai L. Renal improvement by zinc in diabetic mice is associated with glucose metabolism signaling mediated by metallothionein and Akt, but not Akt2. *Free Radic Biol Med*. 2014;68:22-34.

106. Pompano LM, Boy E. Effects of Dose and Duration of Zinc Interventions on Risk Factors for Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Adv Nutr*. 2021;12(1):141-60.

107. Wessells KR, Brown KH. Estimating the global prevalence of zinc deficiency: results based on zinc availability in national food supplies and the prevalence of stunting. *PLoS One*. 2012;7(11):e50568.

108. Tremblay F, Richard AM, Will S, Syed J, Stedman N, Perreault M, Gimeno RE. Disruption of G protein-coupled receptor 39 impairs insulin secretion in vivo. *Endocrinology*. 2009;150(6):2586-95.

109. Dao HH, Essalihi R, Graillon JF, Larivière R, De Champlain J, Moreau P. Pharmacological prevention and regression of arterial remodeling in a rat model of isolated systolic hypertension. *J Hypertens*. 2002;20(8):1597-606.

110. Essalihi R, Dao HH, Yamaguchi N, Moreau P. A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment. *Am J Hypertens*. 2003;16(2):103-10.

111. Shi LL, Hao M, Jin ZY, Peng GF, Tang YY, Kuang HY. Liraglutide Alleviates Diabetic Atherosclerosis through Regulating Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells. *Dis Markers*. 2022;2022:5013622.

112. Di B, Li HW, Li W, Hua B. Liraglutide inhibited AGEs induced coronary smooth muscle cell phenotypic transition through inhibiting the NF- κ B signal pathway. *Peptides*. 2019;112:125-32.

113. Lin CP, Huang PH, Chen CY, Wu MY, Chen JS, Chen JW, Lin SJ. Sitagliptin attenuates arterial calcification by downregulating oxidative stress-induced receptor for advanced glycation end products in LDLR knockout mice. *Sci Rep*. 2021;11(1):17851.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Laura Alina Henze, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Zink reduziert die osteogenen Effekte von hohen Glukosekonzentrationen

Protective effects of zinc on glucose-induced osteogenic reprogramming of vascular smooth muscle cells

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

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

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Laura Alina Henze hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation:

Henze LA, Estepa M, Pieske B, Lang F, Eckardt KU, Alesutan I, Voelkl J. Zinc Ameliorates the Osteogenic Effects of High Glucose in Vascular Smooth Muscle Cells. *Cells*. 2021;10(11). <https://doi.org/10.3390/cells10113083>

Beitrag im Einzelnen: Die Experimente wurden von Laura Alina Henze, Misael Estepa und Ioana Alesutan durchgeführt, mit technischer Assistenz von Julius Brosch. Laura Alina Henze hatte signifikanten Anteil in den Planungen und Experimenten in folgenden Bereichen: Zellkultur und Behandlungen (Abb. 3-5 und 7), real time quantitative PCR (Abb.3-5 und 7), Western-Blotting (Abb.2d), siRNA-silencing (Abb. 5&7). Es wurde eine geteilte Erstautorschaft mit Misael Estepa, aber führender Rolle von Laura Alina Henze (1. Position) durchgeführt, da Misael Estepa bedeutenden Anteil an der Entwicklung des projektrelevanten Verkalkungsmodells in Zellkultur (Abb.1, Abb. 3c und Abb.6) innehatte. Laura Alina Henze hat an der Überprüfung und Bearbeitung des Manuskripts mitgearbeitet. Laura Alina Henze hat gemeinsam mit allen anderen Autorinnen und Autoren der final publizierten Fassung zugestimmt.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Druckexemplar der Publikation



Article

Zinc Ameliorates the Osteogenic Effects of High Glucose in Vascular Smooth Muscle Cells

Laura A. Henze ^{1,†}, Misael Estepa ^{1,†}, Burkert Pieske ¹, Florian Lang ², Kai-Uwe Eckardt ³, Ioana Alesutan ^{4,*} and Jakob Voelkl ^{3,4,5}

¹ Department of Internal Medicine and Cardiology, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum, 13353 Berlin, Germany; laura.henze@charite.de (L.A.H.); misael.estepa@gmail.com (M.E.); burkert.pieske@charite.de (B.P.)

² Department of Vegetative and Clinical Physiology, Eberhard Karls University Tübingen, 72076 Tübingen, Germany; florian.lang@uni-tuebingen.de

³ Department of Nephrology and Medical Intensive Care, Charité—Universitätsmedizin Berlin, 13353 Berlin, Germany; kai-uwe.eckardt@charite.de (K.-U.E.); jakob.voelkl@jku.at (J.V.)

⁴ Institute for Physiology and Pathophysiology, Johannes Kepler University Linz, 4040 Linz, Austria

⁵ DZHK (German Centre for Cardiovascular Research), Partner Site Berlin, 13347 Berlin, Germany

* Correspondence: ioana.alesutan@jku.at; Tel.: +43-732-2468-8990

† These authors contributed equally.



Citation: Henze, L.A.; Estepa, M.; Pieske, B.; Lang, F.; Eckardt, K.-U.; Alesutan, I.; Voelkl, J. Zinc

Ameliorates the Osteogenic Effects of High Glucose in Vascular Smooth Muscle Cells. *Cells* **2021**, *10*, 3083. <https://doi.org/10.3390/cells10113083>

Academic Editors:

Evangelos Kolettas, Kenneth B. Marcu and Johannes A. Schmid

Received: 8 July 2021

Accepted: 2 November 2021

Published: 9 November 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/>).

Abstract: In diabetic patients, medial vascular calcification is common and associated with increased cardiovascular mortality. Excessive glucose concentrations can activate the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF- κ B) and trigger pro-calcific effects in vascular smooth muscle cells (VSMCs), which may actively augment vascular calcification. Zinc is able to mitigate phosphate-induced VSMC calcification. Reduced serum zinc levels have been reported in diabetes mellitus. Therefore, in this study the effects of zinc supplementation were investigated in primary human aortic VSMCs exposed to excessive glucose concentrations. Zinc treatment was found to abrogate the stimulating effects of high glucose on VSMC calcification. Furthermore, zinc was found to blunt the increased expression of osteogenic and chondrogenic markers in high glucose-treated VSMCs. High glucose exposure was shown to activate NF- κ B in VSMCs, an effect that was blunted by additional zinc treatment. Zinc was further found to increase the expression of TNF α -induced protein 3 (TNFAIP3) in high glucose-treated VSMCs. The silencing of TNFAIP3 was shown to abolish the protective effects of zinc on high glucose-induced NF- κ B-dependent transcriptional activation, osteogenic marker expression, and the calcification of VSMCs. Silencing of the zinc-sensing receptor G protein-coupled receptor 39 (GPR39) was shown to abolish zinc-induced TNFAIP3 expression and the effects of zinc on high glucose-induced osteogenic marker expression. These observations indicate that zinc may be a protective factor during vascular calcification in hyperglycemic conditions.

Keywords: diabetes mellitus; GPR39; high glucose; osteogenic transition; vascular calcification; vascular smooth muscle cells; zinc; NF- κ B

1. Introduction

Vascular calcification is closely associated with a high risk of cardiovascular events and mortality [1,2]. In patients with diabetes mellitus, vascular calcification is accelerated [3–6] and may contribute to the development of cardiovascular diseases [3], which in turn are responsible in large part for the high mortality of these patients [3,7]. Nonetheless, no broadly applicable treatment against the development of vascular calcification is currently available [1,8].

Vascular calcification is an active process [9], involving a transition of vascular smooth muscle cells (VSMCs) into cells with some osteoblast- and chondroblast-like characteristics [9,10]. These VSMCs express increased levels of osteogenic and chondrogenic transcription factors, such as core-binding factor alpha-1 (CBFA1/RUNX2) or SRY-box transcrip-

tion factor 9 (SOX9), as well as enzymes such as tissue-nonspecific alkaline phosphatase (ALPL) [9–11]. These cells contribute to the creation of a pro-calcific environment in the media of the vasculature and actively promote tissue mineralization [9]. Hyperglycemia has been suggested to be a key pathological factor that triggers the expression of osteogenic markers in VSMCs [12–14] and augments vascular calcification [12–15].

The reprogramming of VSMCs is controlled by complex intracellular signaling pathways [9,16,17]. A key mediator of the pro-calcific effects of high glucose in VSMCs is the transcription factor NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) [14,18]. High levels of glucose activate NF- κ B in VSMCs [14,19,20]. Interference with NF- κ B activation can suppress high glucose-induced osteogenic signaling in VSMCs [14]. Zinc may act as an inhibitor of NF- κ B activity in VSMCs [21]. Zinc supplementation can ameliorate VSMC calcification during phosphate exposure [21,22] and valvular interstitial cell calcification [23].

Zinc has been associated with beta cell function and insulin resistance [24] and reduced serum zinc levels are observed in patients with diabetes mellitus [25–29], most likely due to hyperzincuria and intestinal malabsorption [25,26,30]. Zinc deficiency is a risk factor for diabetes [31] and its cardiovascular complications [32]. Moreover, in patients with diabetes mellitus, serum zinc levels inversely associate with serum calcification propensity, indicating an increased risk of calcification [33]. However, the direct impact of zinc on vascular calcification during diabetic conditions is still unclear. Therefore, the current study explored the effects of zinc supplementation on osteogenic/chondrogenic marker expression and the calcification of VSMCs promoted by elevated glucose levels in vitro.

2. Materials and Methods

2.1. Primary Human Aortic Smooth Muscle Cells (HAoSMCs)

HAoSMCs (Fisher Scientific, Vienna, Austria and Sigma Aldrich, Vienna, Austria) were cultured as previously described [34,35] and used in experiments up to passage 11. HAoSMCs were treated with 50 mM of glucose (Sigma Aldrich, Vienna, Austria) [14], 15 μ M of ZnSO₄ (Sigma Aldrich, Vienna, Austria), and 15 μ M of ZnCl₂ (Sigma Aldrich, Vienna, Austria) [21]. For calcification analysis, HAoSMCs were treated for 11 days with calcification medium supplemented with 10 mM of β -glycerophosphate and 1.5 mM of CaCl₂ (Sigma-Aldrich, Vienna, Austria) [36–38]. Fresh medium with agents was added every two to three days. Where indicated, HAoSMCs were transfected with 10 nM of TNFAIP3 (ID: s14260), GPR39 (ID: s6074) or negative control (ID: 4390843) siRNA using siPORT amine transfection reagent (all from Fisher Scientific, Vienna, Austria) [21].

2.2. RT-PCR

Total RNA was isolated from HAoSMCs using trizol reagent [34,39] and cDNA was synthesized with oligo(dT)_{12–18} primers and SuperScript III Reverse Transcriptase (all from Fisher Scientific, Vienna, Austria). RT-PCR was performed using iQ Sybr Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Vienna, Austria) and the following human primers (Fisher Scientific, Vienna, Austria) [14,21,40]:

CBFA1 fw: GCCTTCCACTCTCAGTAAGAAGA;
 CBFA1 rev: GCCTGGGGTCTGAAAAAGGG;
 SOX9 fw: AGCGAACGCACATCAAGAC;
 SOX9 rev: CTGTAGGCGATCTGTTGGGG;
 ALPL fw: GGGACTGGTACTCAGACAACG;
 ALPL rev: GTAGGCGATGCCTTACAGCC;
 TNFAIP3 fw: TCAACTGGTGTGCGAGAAGTCC;
 TNFAIP3 rev: CAAGTCTGTGCCTGAACGC;
 GPR39 fw: TCTTCGTGATGGGCCTTCTG;
 GPR39 rev: ACCTCCTTCTGCAAGTATCCTTT;
 GAPDH fw: GAGTCAACGGATTTGGTCGT;
 GAPDH rev: GACAAGCTTCCCCTTCTCAG.

A melt curve analysis was performed to confirm the specificity of the PCR products. The relative mRNA expression was determined using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method with GAPDH as the housekeeping gene, normalized to the control group.

2.3. Western Blotting

Proteins were isolated from HAoSMCs using ice-cold Pierce IP lysis buffer containing complete protease and a phosphatase inhibitor cocktail (all from Fisher Scientific, Vienna, Austria). Protein concentration was measured using the Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, Vienna, Austria) [37,38]. Equal amounts of proteins incubated in Roti-Load1 Buffer (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) for 10 min at 100 °C were separated on SDS-PAGE gels and transferred to PVDF membranes. Membranes were incubated with primary rabbit anti-RUNX2 (1:1000, Cell Signaling, Frankfurt am Main, Germany, #8486) or rabbit anti-GAPDH (1:1000, Cell Signaling, Frankfurt am Main, Germany, #2118) antibodies overnight at 4 °C and then with secondary anti-rabbit HRP-conjugated antibody (1:1000, Cell Signaling, Frankfurt am Main, Germany) for 1 h at room temperature, before being stripped in stripping buffer (Fisher Scientific, Vienna, Austria) at room temperature. Bands were detected with the ECL detection reagent (Fisher Scientific, Vienna, Austria) and quantified using the ImageJ software (NIH, Rockville, MD, USA, 1.52n). Data are shown as the ratio of total protein to GAPDH and were normalized to the control group [14,21].

2.4. NF- κ B Activity

NF- κ B-dependent transcriptional activity in HAoSMCs was determined using equal amounts of nuclear proteins, isolated with the NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction kit (Fisher Scientific, Vienna, Austria), and quantified by the Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, Vienna, Austria) [41] and the NF- κ B p65 transcription factor colorimetric assay kit (Abcam, Cambridge, UK) [14]. Data are shown normalized to the control group.

2.5. OPN Levels

OPN levels in conditioned medium from HAoSMCs were determined by using the human OPN DuoSet ELISA kit (R&D Systems, Abingdon, UK, #DY1433) and DuoSet Ancillary Reagent kit 2 (R&D Systems, Abingdon, UK). HAoSMCs were lysed with ice-cold Pierce IP lysis buffer containing a complete protease and phosphatase inhibitors cocktail (all from Fisher Scientific, Vienna, Austria). Data are shown normalized to total protein concentration measured by the Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, Vienna, Austria) and to the control group.

2.6. ALP Activity

ALP enzyme activity was determined in cell lysates using the ALP colorimetric assay kit (Abcam, Cambridge, UK). Data are shown normalized to the total protein concentration measured by the Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, Vienna, Austria) and to the control group [14].

2.7. Calcification Analysis

HAoSMCs were incubated overnight at 37 °C with OsteoSense 680EX (1:250, Perkin Elmer, Traiskirchen, Austria) [42]. Images were acquired with the ChemiDoc MP imaging system (Bio-Rad Laboratories, Vienna, Austria) with excitation/emission (bandpass) wavelengths of 680/715(30) nm [43]. HAoSMCs were decalcified in 0.6 M HCl at 4 °C overnight and the calcium content was quantified with the QuantiChrom Calcium assay kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) [14,21,37]. Proteins were isolated using 0.1 M NaOH/0.1% SDS buffer and quantified by the Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, Vienna, Austria). Data are shown normalized to total protein concentration.

2.8. Statistics

Data are presented as scatter dot plots and arithmetic means \pm SEM and n indicate the number of independent experiments performed. The Shapiro–Wilk test was used for normality analysis. Prior to statistical testing, non-normal datasets were transformed (log, sqrt or reciprocal) to provide normality. Statistical testing was assessed using one-way ANOVA with Tukey’s post hoc test for homoscedastic data or the Games–Howell post hoc test for heteroscedastic data and the Steel–Dwass method for non-normal data [21,37,44]. A p value of <0.05 was considered statistically significant.

3. Results

A first series of experiments was used to investigate the effects of zinc sulfate (ZnSO_4) on the calcification of HAoSMCs during excessive glucose conditions. As shown in Figure 1a, treatment with high level of glucose significantly augmented the calcification of HAoSMCs, which was promoted by exposure to pro-calcific medium containing β -glycerophosphate and calcium as mineralization substrates. Additional treatment with ZnSO_4 significantly suppressed the calcification of HAoSMCs triggered by calcification medium alone and by calcification medium together with high levels of glucose. In accordance, the fluorescence imaging of the calcification revealed that high-glucose conditions aggravated the calcification of HAoSMCs induced by calcification medium, while ZnSO_4 supplementation had strong inhibitory effects during these pro-calcific conditions (Figure 1b).

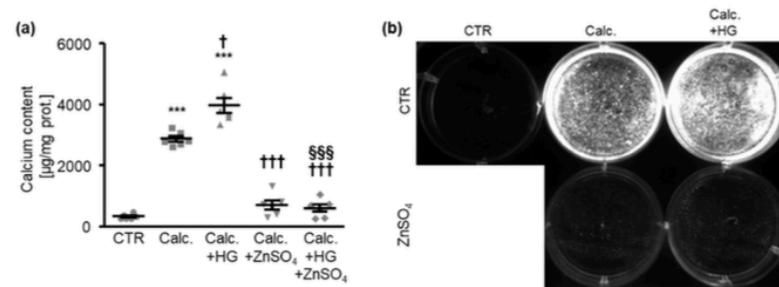


Figure 1. Zinc sulfate inhibits the calcification of HAoSMCs promoted by high levels of glucose. (a). Calcium content ($n = 6$, $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) in HAoSMCs treated for 11 days with control (CTR) or calcification medium (Calc.) without and with high glucose levels (HG) in the absence and presence of ZnSO_4 . *** ($p < 0.001$) significant difference versus control group; † ($p < 0.05$), ††† ($p < 0.001$) significant difference versus Calc.-treated group; §§§ ($p < 0.001$) significant difference between Calc.+HG- and Calc.+HG+ ZnSO_4 -treated groups. (b). Calcification detected by fluorescence imaging in HAoSMCs treated for 11 days with control (CTR) or calcification medium (Calc.) without and with high glucose levels (HG) in the absence and presence of ZnSO_4 . Calcified areas: white pseudocolor.

These effects were paralleled by the inhibition of osteo-/chondrogenic signaling in HAoSMCs, as indicated by osteo-/chondrogenic marker expression and activity. High levels of glucose induced *CBFA1*, *SOX9*, and *ALPL* mRNA expression in HAoSMCs, effects that were significantly suppressed by ZnSO_4 (Figure 2a–c). Moreover, exposure to high levels of glucose significantly increased the CBFA1 protein abundance (Figure 2d), the osteopontin (OPN) levels released in cell culture medium (Figure 2e), as well as the ALP activity (Figure 2f) in HAoSMCs, all effects that were again significantly reduced by ZnSO_4 supplementation.

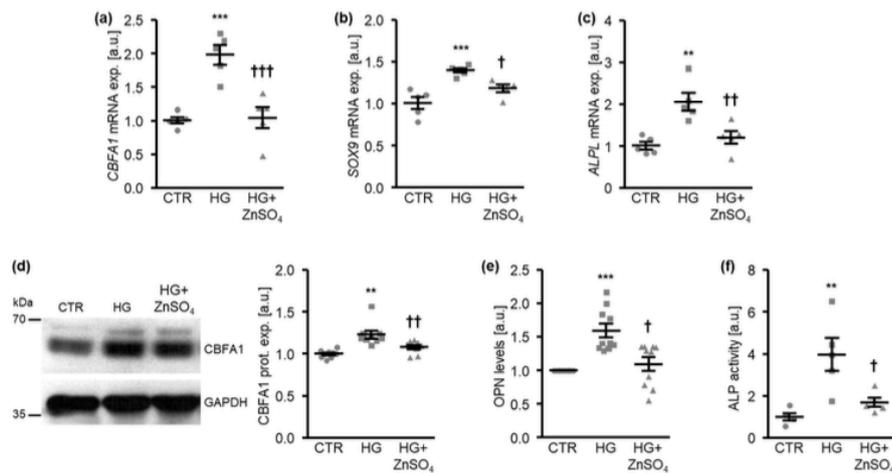


Figure 2. Zinc sulfate suppresses osteo-/chondrogenic marker expression promoted by high glucose levels in HAoSMCs. (a–c). Relative mRNA expression of *CBFA1* (a), *SOX9* (b), and *ALPL* (c) ($n = 5$; arbitrary units, a.u.) in HAoSMCs treated for 24 h with control (CTR) or high glucose levels (HG) in the absence and presence of ZnSO₄. (d). Representative Western blots and normalized CBFA1 protein expression ($n = 9$; a.u.) in HAoSMCs treated for 24 h with control (CTR) or high glucose levels (HG) in the absence and presence of ZnSO₄. (e). Normalized OPN levels ($n = 10$; a.u.) in conditioned medium from HAoSMCs treated for 7 days with control (CTR) or high glucose levels (HG) in the absence and presence of ZnSO₄. (f). Normalized ALP activity ($n = 5$; a.u.) in HAoSMCs treated for 7 days with control (CTR) or high glucose levels (HG) in the absence and presence of ZnSO₄. ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) significant difference versus control group; † ($p < 0.05$), †† ($p < 0.01$), ††† ($p < 0.001$) significant difference versus the HG-treated group.

ZnCl₂ treatment had similar inhibitory effects on the mRNA expression of the osteogenic markers *CBFA1* and *ALPL* (Figure 3a,b) and on the calcification of HAoSMCs (Figure 3c), further confirming the anti-calcific properties of zinc during hyperglycemic conditions. Thus, zinc supplementation inhibited osteo-/chondrogenic reprogramming and the aggravation of calcification of HAoSMCs under high-glucose conditions.

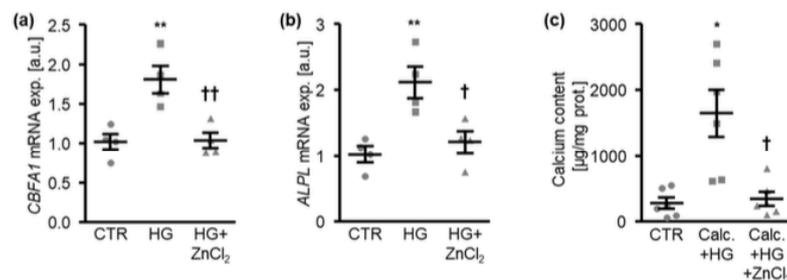


Figure 3. Zinc chloride inhibits osteogenic marker expression and the calcification of HAoSMCs induced by high levels of glucose. (a,b). Relative mRNA expression of *CBFA1* (a) and *ALPL* (b) ($n = 4$; arbitrary units, a.u.) in HAoSMCs treated for 24 h with control (CTR) or high glucose levels (HG) in the absence and presence of ZnCl₂. (c). Calcium content ($n = 6$, $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) in HAoSMCs treated for 11 days with control (CTR) or calcification medium (Calc.) and high glucose levels (HG) in the absence and presence of ZnCl₂. * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) significant difference versus control group; † ($p < 0.05$), †† ($p < 0.01$) significant difference versus the HG-/Calc.+HG-treated group.

To elucidate the underlying mechanisms, the potential interference with NF- κ B signaling was analyzed. In HAoSMCs, high levels of glucose significantly increased the NF- κ B-dependent transcriptional activity, as indicated by the DNA-binding activity of

NF- κ B p65 in nuclear extracts, effects that were significantly suppressed in the presence of ZnSO_4 (Figure 4a). Furthermore, the mRNA expression of TNF α -induced protein 3 (*TNFAIP3*), a suppressor of the NF- κ B pathway, was increased by the high glucose treatment and was further up-regulated by the addition of ZnSO_4 (Figure 4b). Thus, zinc interfered with NF- κ B pathway activation in HAoSMCs under high-glucose conditions.

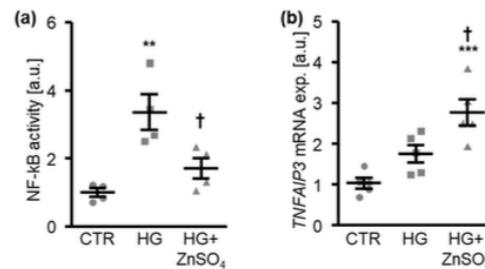


Figure 4. Zinc sulfate suppresses NF- κ B activation induced by high levels of glucose in HAoSMCs. (a). Normalized NF- κ B-dependent transcriptional activity ($n = 4$; arbitrary units, a.u.) in HAoSMCs treated for 30 min with control (CTR) or high glucose levels (HG) in the absence and presence of ZnSO_4 . (b). Relative mRNA expression of *TNFAIP3* ($n = 5$; a.u.) in HAoSMCs treated for 24 h with control (CTR) or high glucose levels (HG) in the absence and presence of ZnSO_4 . ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) significant difference versus control group; † ($p < 0.05$) significant difference versus HG-treated group.

The next experiments investigated the involvement of TNFAIP3 in the protective effects of zinc during high glucose-induced osteogenic signaling and the calcification of HAoSMCs. To this end, the endogenous expression of TNFAIP3 was suppressed by silencing using small interfering RNA (siRNA) (Figure 5a). The silencing of TNFAIP3 alone was sufficient to significantly increase the NF- κ B-dependent transcriptional activity in HAoSMCs (Figure 5b). ZnSO_4 treatment significantly suppressed the high glucose-induced NF- κ B-dependent transcriptional activity in negative control siRNA-transfected HAoSMCs, but not in TNFAIP3-silenced HAoSMCs (Figure 5b). As illustrated in Figure 5c,d, TNFAIP3 knockdown tended to increase the *CBFA1* and *ALPL* mRNA expression in HAoSMCs during control conditions. The difference, however, did not reach statistical significance ($p = 0.064$ and $p = 0.066$, respectively). Moreover, the silencing of TNFAIP3 significantly blunted the inhibitory effects of ZnSO_4 on the high glucose-induced mRNA expression of osteogenic markers in HAoSMCs (Figure 5c,d). Accordingly, the silencing of TNFAIP3 abrogated the protective effects of ZnSO_4 supplementation on the calcification of HAoSMCs under high-glucose conditions (Figure 6).

Additional experiments explored the potential role of the zinc-sensing receptor G protein-coupled receptor 39 (GPR39) in mediating the anti-calcific effects of zinc on HAoSMCs by the inhibition of GPR39 endogenous expression using siRNA (Figure 7a). Surprisingly, high levels of glucose up-regulated the mRNA expression of *GPR39* in negative control siRNA-transfected HAoSMCs, effects that were not significantly modified by additional treatment with ZnSO_4 (Figure 7a). The silencing of GPR39 did not significantly affect the *TNFAIP3*, *CBFA1*, and *ALPL* mRNA expression during control conditions but blunted the up-regulation of *TNFAIP3* and down-regulation of *CBFA1* and *ALPL* mRNA expression in HAoSMCs induced by ZnSO_4 in the presence of high levels of glucose (Figure 7b–d). Taken together, the protective effects of zinc on the high glucose-induced osteogenic expression profile of HAoSMCs were mediated, at least in part, by the GPR39-dependent up-regulation of *TNFAIP3*.

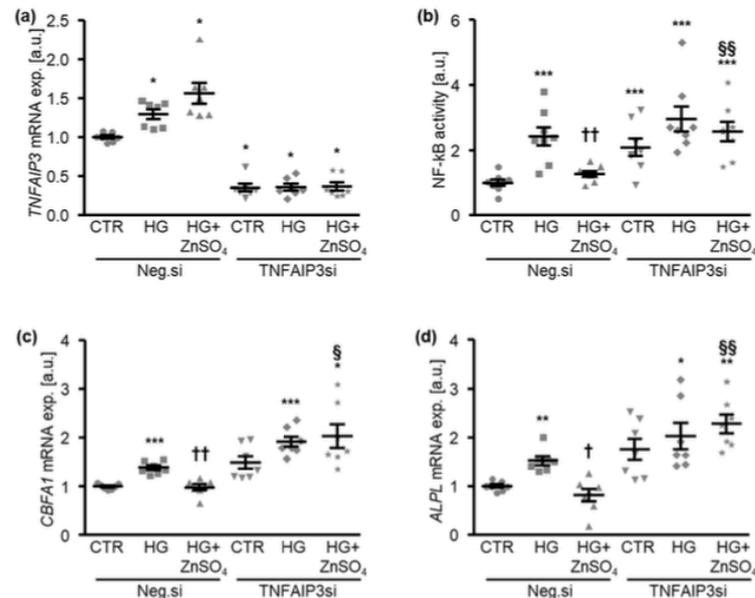


Figure 5. The silencing of TNFAIP3 blocks the effects of zinc sulfate on high glucose-induced NF-kB activation and osteogenic marker expression in HAoSMCs. (a). Relative mRNA expression of *TNFAIP3* ($n = 7$; arbitrary units, a.u.) in HAoSMCs transfected with negative control (Neg.si) or TNFAIP3 (TNFAIP3si) siRNA and treated for 24 h with control (CTR) or high glucose levels (HG) in the absence and presence of $ZnSO_4$. * ($p < 0.05$) significant difference versus Neg.si-transfected CTR-treated group. (b). Normalized NF-kB-dependent transcriptional activity ($n = 8$; a.u.) in HAoSMCs transfected with negative control (Neg.si) or TNFAIP3 (TNFAIP3si) siRNA and treated for 30 min with control (CTR) or high glucose levels (HG) in the absence and presence of $ZnSO_4$. (c,d). Relative mRNA expression of *CBFA1* (c) and *ALPL* (d) ($n = 7$; a.u.) in HAoSMCs transfected with negative control (Neg.si) or TNFAIP3 (TNFAIP3si) siRNA and treated for 24 h with control (CTR) or high glucose levels (HG) in the absence and presence of $ZnSO_4$. * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) significant difference versus the Neg.si-transfected CTR-treated group; † ($p < 0.05$), †† ($p < 0.01$) significant difference between the Neg.si-transfected HG- and HG+ $ZnSO_4$ -treated groups; § ($p < 0.05$), §§ ($p < 0.01$) significant difference between the Neg.si- and TNFAIP3si-transfected HG+ $ZnSO_4$ -treated groups.

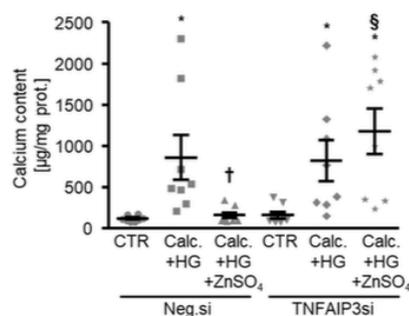


Figure 6. The silencing of TNFAIP3 interferes with the protective effects of zinc sulfate on the calcification of HAoSMCs under high-glucose conditions. Calcium content ($n = 8$, $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) in HAoSMCs transfected with negative control (Neg.si) or TNFAIP3 (TNFAIP3si) siRNA and treated for 11 days with control (CTR) or calcification medium (Calc.) and high glucose levels (HG) in the

absence and presence of ZnSO₄. * ($p < 0.05$) significant difference versus the Neg.si-transfected CTR-treated group; † ($p < 0.05$) significant difference between the Neg.si-transfected Calc.+HG- and Calc.+HG+ZnSO₄-treated groups; § ($p < 0.05$) significant difference between the Neg.si- and TNFAIP3si-transfected Calc.+HG+ZnSO₄-treated groups.

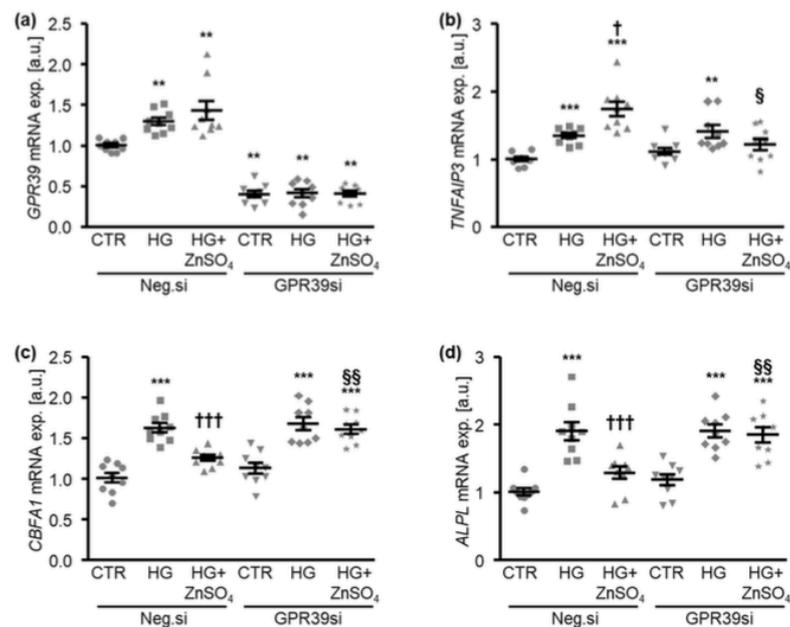


Figure 7. The silencing of GPR39 blunts the protective effects of zinc sulfate on high glucose-induced osteogenic marker expression in HAoSMCs. (a). Relative mRNA expression of *GPR39* ($n = 9$; arbitrary units, a.u.) in HAoSMCs transfected with negative control (Neg.si) or GPR39 (GPR39si) siRNA and treated for 24 h with control (CTR) or high glucose levels (HG) in the absence and presence of ZnSO₄. ** ($p < 0.01$) significant difference versus the Neg.si-transfected CTR-treated group. (b–d). Relative mRNA expression of *TNFAIP3* (b), *CBFA1* (c), and *ALPL* (d) ($n = 9$; a.u.) in HAoSMCs transfected with negative control (Neg.si) or GPR39 (GPR39si) siRNA and treated for 24 h with control (CTR) or high glucose levels (HG) in the absence and presence of ZnSO₄. ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) significant difference versus the Neg.si-transfected CTR-treated group; † ($p < 0.05$), ††† ($p < 0.001$) significant difference between the Neg.si-transfected HG- and HG+ZnSO₄-treated groups; § ($p < 0.05$), §§ ($p < 0.01$) significant difference between the Neg.si- and GPR39si-transfected HG+ZnSO₄-treated groups.

4. Discussion

The present study disclosed the inhibitory effects of zinc supplementation on vascular calcification during excessive glucose concentrations in vitro. Zinc has emerged as a putative protective factor in cardiovascular calcification, and low dietary zinc intake has been linked to calcification in the general population [21,23,45]. In patients with chronic kidney disease, zinc deficiency is associated with the development of cardiovascular disease [46]. The current study extends these findings by showing that zinc deficiency may contribute to vascular calcification during hyperglycemic conditions.

In diabetic patients, at least in skeletal muscle biopsies, an increased activity of NF- κ B can be observed after LPS challenge [47]. NF- κ B activation has been considered to play a critical role in the detrimental effects of diabetic conditions on VSMCs [14,19,20]. The pro-calcific changes in VSMCs after excessive glucose exposure [15] are associated with the activation of the NF- κ B pathway [14]. The current observations indicate that zinc supple-

mentation interferes with the augmenting effects of excessive glucose concentrations on NF- κ B activation, osteogenic marker expression, and calcification in VSMCs. The inhibitory effects on NF- κ B activation have been discussed as a decisive mechanism underlying the anti-inflammatory effects of zinc [48]. The anti-calcific effects of zinc are at least partly mediated by GPR39, a G protein-coupled receptor that is activated by extracellular zinc and widely associated with anti-inflammatory effects [49]. The activation of GPR39 has been associated with reduced monocyte-to-endothelial adhesion [50] and reduced cardiovascular calcification [21,23]. GPR39 agonism further ameliorates the extracellular matrix degradation in chondrocytes induced by advanced glycation end-products [51]. The anti-inflammatory effects of GPR39 activation can be observed in fibroblast-like synoviocytes after TNF α treatment [52]. Interestingly, GPR39 deficiency is associated with impaired bone composition in mice [53] and zinc deficiency reduces bone mineral density in rats [54], which may indicate the role of zinc in the bone-vascular axis [55].

TNFAIP3, also known as A20, acts as an anti-inflammatory signalling protein and may interfere with NF- κ B activation by modulating the ubiquitination or inhibition of the I κ B kinase complex [48,56]. Impaired TNFAIP3 expression increases inflammation and transplant arteriosclerosis in mice [57]. TNFAIP3, in turn, is up-regulated by stimulators of NF- κ B as part of a negative feedback loop [58], which could explain the increased TNFAIP3 expression in VSMCs exposed to high-glucose conditions. Zinc up-regulates the expression of TNFAIP3 [48], and the inhibitory effects of zinc on high glucose-induced NF- κ B activity are dependent on TNFAIP3. A role for TNFAIP3 in zinc-mediated NF- κ B inhibition has also been shown in endothelial [59] and microglial [60] cells. TNFAIP3 expression is reduced in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with type 2 diabetes [61]. Thus, the up-regulation of TNFAIP3 may play a critical role in the protective effects of zinc during hyperglycemic conditions. However, the current observations are limited to *in vitro* experiments with excessive glucose concentrations. Other mechanisms contributing to the protective effects of zinc in this model cannot be ruled out. For example, zinc directly improves serum calcification propensity [33], which could also be reflected in calcification *in vitro*.

The anti-inflammatory and anti-calcific effects of zinc could be relevant to diabetes mellitus, a condition associated with impaired zinc homeostasis [26]. However, the effects of zinc on NF- κ B may be cell-specific [48]. The beneficial effects of zinc supplementation on glycemic control are discussed in [62]. Interestingly, GPR39-deficient mice fed a high-fat/high-sucrose or low-fat/high-sucrose diet showed increased prandial glucose levels [63]. Beyond glycemic control, zinc supplementation may exert beneficial effects on cardiovascular inflammation, a key mechanism promoting vascular calcification [18,64]. In the diabetic db/db mouse, zinc deficiency exacerbates diabetic cardiomyopathy [65]. Similarly, cardiac inflammation in mice fed a high-fat diet is reduced by zinc supplementation [66]. In LDL receptor knockout mice, zinc supplementation exerts positive effects on the serum lipid profile [67]. A favorable effect of zinc supplementation on the lipid profile in humans was suggested in a previous meta-analysis [68]. Zinc supplementation was further found to prevent the full development of diabetic nephropathy in a mouse model [69]. A recent meta-analysis suggests that zinc supplementation may favorably influence risk factors for type 2 diabetes and cardiovascular disease [70]. In diabetic patients with coronary heart disease, the combined supplementation of magnesium and zinc has been associated with favorable effects [71]. Based on these and other beneficial effects, zinc supplementation has been widely discussed as a therapeutic tool in diabetes and other pathologies [72], a concept further supported by the current observations. However, the artificial environment of primary VSMCs in culture warrants caution when translating effects to diabetic patients. Further research *in vivo* is required to confirm the protective effects of zinc on diabetes-related vascular calcification.

In conclusion, zinc supplementation blunts the pro-calcific effects of excessive extracellular glucose concentrations in VSMCs, an effect associated with impaired high glucose-induced NF- κ B activation. The effects of zinc in VSMCs appear to be dependent

on GPR39 and TNFAIP3. Further studies addressing whether zinc supplementation may ultimately translate into better cardiovascular outcomes in diabetes mellitus are warranted.

Author Contributions: Conceptualization, I.A. and J.V.; Funding acquisition, I.A. and J.V.; Investigation, L.A.H., M.E. and I.A.; Writing—original draft, I.A. and J.V.; Writing—review and editing, L.A.H., M.E., B.P., F.L. and K.-U.E. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Deutsche Forschungsgemeinschaft (AL2054/1-1, VO2259/2-1), Berlin Institute of Health (BIH), Else Kröner-Fresenius-Stiftung and DZHK (German Centre for Cardiovascular Research). Open Access Funding by the Johannes Kepler University Linz.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: The authors gratefully acknowledge the technical assistance of J. Brosch.

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.

References

1. Voelkl, J.; Cejka, D.; Alesutan, I. An overview of the mechanisms in vascular calcification during chronic kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2019**, *28*, 289–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. London, G.M.; Guerin, A.P.; Marchais, S.J.; Metivier, F.; Pannier, B.; Adda, H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: Impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol. Dial. Transpl.* **2003**, *18*, 1731–1740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Forde, H.; Davenport, C.; Harper, E.; Cummins, P.; Smith, D. The role of OPG/RANKL in the pathogenesis of diabetic cardiovascular disease. *Cardiovasc. Endocrinol. Metab.* **2018**, *7*, 28–33. [[CrossRef](#)]
4. Stabley, J.N.; Towler, D.A. Arterial Calcification in Diabetes Mellitus: Preclinical Models and Translational Implications. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2017**, *37*, 205–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lehto, S.; Niskanen, L.; Suhonen, M.; Ronnema, T.; Laakso, M. Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1996**, *16*, 978–983. [[CrossRef](#)]
6. Brown, R.B. Diabetes, diabetic complications, and phosphate toxicity: A scoping review. *Curr. Diabetes Rev.* **2020**, *16*, 674–689. [[CrossRef](#)]
7. Grundy, S.M.; Benjamin, I.J.; Burke, G.L.; Chait, A.; Eckel, R.H.; Howard, B.V.; Mitch, W.; Smith, S.C., Jr.; Sowers, J.R. Diabetes and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* **1999**, *100*, 1134–1146. [[CrossRef](#)]
8. Henaut, L.; Chillon, J.M.; Kamel, S.; Massy, Z.A. Updates on the Mechanisms and the Care of Cardiovascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Semin. Nephrol.* **2018**, *38*, 233–250. [[CrossRef](#)]
9. 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](#)]
10. Steitz, S.A.; Speer, M.Y.; Curinga, G.; Yang, H.Y.; Haynes, P.; Aebbersold, R.; Schinke, T.; Karsenty, G.; Giachelli, C.M. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: Upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ. Res.* **2001**, *89*, 1147–1154. [[CrossRef](#)]
11. Lang, F.; Ritz, E.; Voelkl, J.; Alesutan, I. Vascular calcification—is aldosterone a culprit? *Nephrol. Dial. Transpl.* **2013**, *28*, 1080–1084. [[CrossRef](#)]
12. Chen, N.X.; Moe, S.M. Arterial calcification in diabetes. *Curr. Diab. Rep.* **2003**, *3*, 28–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Zhou, Y.B.; Zhou, H.; Li, L.; Kang, Y.; Cao, X.; Wu, Z.Y.; Ding, L.; Sethi, G.; Bian, J.S. Hydrogen Sulfide Prevents Elastin Loss and Attenuates Calcification Induced by High Glucose in Smooth Muscle Cells through Suppression of Stat3/Cathepsin S Signaling Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Poetsch, F.; Henze, L.A.; Estepa, M.; Moser, B.; Pieske, B.; Lang, F.; Eckardt, K.U.; Alesutan, I.; Voelkl, J. Role of SGK1 in the Osteogenic Transdifferentiation and Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells Promoted by Hyperglycemic Conditions. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bessueille, L.; Fakhry, M.; Hamade, E.; Badran, B.; Magne, D. Glucose stimulates chondrocyte differentiation of vascular smooth muscle cells and calcification: A possible role for IL-1beta. *FEBS Lett.* **2015**, *589*, 2797–2804. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Lang, F.; Ritz, E.; Alesutan, I.; Voelkl, J. Impact of aldosterone on osteoinductive signaling and vascular calcification. *Nephron. Physiol.* **2014**, *128*, 40–45. [[CrossRef](#)]

17. Lang, F.; Leibrock, C.; Pelzl, L.; Gawaz, M.; Pieske, B.; Alesutan, I.; Voelkl, J. Therapeutic Interference With Vascular Calcification—Lessons From Klotho-Hypomorphic Mice and Beyond. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 207. [\[CrossRef\]](#)
18. Voelkl, J.; Egli-Spichtig, D.; Alesutan, I.; Wagner, C.A. Inflammation: A putative link between phosphate metabolism and cardiovascular disease. *Clin. Sci.* **2021**, *135*, 201–227. [\[CrossRef\]](#)
19. Wang, Y.; Shan, J.; Yang, W.; Zheng, H.; Xue, S. High mobility group box 1 (HMGB1) mediates high-glucose-induced calcification in vascular smooth muscle cells of saphenous veins. *Inflammation* **2013**, *36*, 1592–1604. [\[CrossRef\]](#)
20. Jeong, I.K.; Oh, D.H.; Park, S.J.; Kang, J.H.; Kim, S.; Lee, M.S.; Kim, M.J.; Hwang, Y.C.; Ahn, K.J.; Chung, H.Y.; et al. Inhibition of NF-kappaB prevents high glucose-induced proliferation and plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Exp. Mol. Med.* **2011**, *43*, 684–692. [\[CrossRef\]](#)
21. Voelkl, J.; Tuffaha, R.; Luong, T.T.D.; Zickler, D.; Masyout, J.; Feger, M.; Verheyen, N.; Blaschke, F.; Kuro, O.M.; Tomaschitz, A.; et al. Zinc Inhibits Phosphate-Induced Vascular Calcification through TNFAIP3-Mediated Suppression of NF-kappaB. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2018**, *29*, 1636–1648. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Nagy, A.; Petho, D.; Gall, T.; Zavaczki, E.; Nyitrai, M.; Posta, J.; Zarjou, A.; Agarwal, A.; Balla, G.; Balla, J. Zinc Inhibits HIF-Prolyl Hydroxylase Inhibitor-Aggravated VSMC Calcification Induced by High Phosphate. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 1584. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Chen, Z.; Gordillo-Martinez, F.; Jiang, L.; He, P.; Hong, W.; Wei, X.; Staines, K.A.; Macrae, V.E.; Zhang, C.; Yu, D.; et al. Zinc ameliorates human aortic valve calcification through GPR39 mediated ERK1/2 signaling pathway. *Cardiovasc. Res.* **2021**, *117*, 820–835. [\[CrossRef\]](#)
24. Islam, M.R.; Arslan, I.; Attia, J.; McEvoy, M.; McElduff, P.; Basher, A.; Rahman, W.; Peel, R.; Akhter, A.; Akter, S.; et al. Is serum zinc level associated with prediabetes and diabetes?: A cross-sectional study from Bangladesh. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61776. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. de Carvalho, G.B.; Brandao-Lima, P.N.; Maia, C.S.; Barbosa, K.B.; Pires, L.V. Zinc's role in the glycemic control of patients with type 2 diabetes: A systematic review. *Biometals* **2017**, *30*, 151–162. [\[CrossRef\]](#)
26. Jansen, J.; Rosenkranz, E.; Overbeck, S.; Warmuth, S.; Mocchegiani, E.; Giacconi, R.; Weiskirchen, R.; Karges, W.; Rink, L. Disturbed zinc homeostasis in diabetic patients by in vitro and in vivo analysis of insulinomimetic activity of zinc. *J. Nutr. Biochem.* **2012**, *23*, 1458–1466. [\[CrossRef\]](#)
27. Garg, V.K.; Gupta, R.; Goyal, R.K. Hypozincemia in diabetes mellitus. *J. Assoc. Physicians India* **1994**, *42*, 720–721.
28. Eva, H.; Akter, Q.S.; Alam, M.K. Relationship of Serum Glycemic Status with Serum Zinc Level in Type 2 Diabetes Mellitus. *Mymensingh Med. J.* **2020**, *29*, 357–360.
29. Fernandez-Cao, J.C.; Warthon-Medina, M.; Hall Moran, V.; Arija, V.; Doepking, C.; Lowe, N.M. Dietary zinc intake and whole blood zinc concentration in subjects with type 2 diabetes versus healthy subjects: A systematic review, meta-analysis and meta-regression. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2018**, *49*, 241–251. [\[CrossRef\]](#)
30. Jurowski, K.; Szewczyk, B.; Nowak, G.; Piekoszewski, W. Biological consequences of zinc deficiency in the pathomechanisms of selected diseases. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2014**, *19*, 1069–1079. [\[CrossRef\]](#)
31. Fukunaka, A.; Fujitani, Y. Role of Zinc Homeostasis in the Pathogenesis of Diabetes and Obesity. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 476. [\[CrossRef\]](#)
32. Soinio, M.; Marniemi, J.; Laakso, M.; Pyorala, K.; Lehto, S.; Ronnema, T. Serum zinc level and coronary heart disease events in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **2007**, *30*, 523–528. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Nakatani, S.; Mori, K.; Sonoda, M.; Nishide, K.; Uedono, H.; Tsuda, A.; Emoto, M.; Shoji, T. Association between Serum Zinc and Calcification Propensity (T50) in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and In Vitro Effect of Exogenous Zinc on T50. *Biomedicines* **2020**, *8*, 337. [\[CrossRef\]](#)
34. Alesutan, I.; Luong, T.T.D.; Schelski, N.; Masyout, J.; Hille, S.; Schneider, M.P.; Graham, D.; Zickler, D.; Verheyen, N.; Estepa, M.; et al. Circulating uromodulin inhibits vascular calcification by interfering with pro-inflammatory cytokine signaling. *Cardiovasc. Res.* **2021**, *117*, 930–941. [\[CrossRef\]](#)
35. Voelkl, J.; Alesutan, I.; Leibrock, C.B.; Quintanilla-Martinez, L.; Kuhn, V.; Feger, M.; Mia, S.; Ahmed, M.S.; Rosenblatt, K.P.; Kuro, O.M.; et al. Spironolactone ameliorates PIT1-dependent vascular osteoinduction in klotho-hypomorphic mice. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 812–822. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Villa-Belosta, R.; Millan, A.; Sorribas, V. Role of calcium-phosphate deposition in vascular smooth muscle cell calcification. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2011**, *300*, C210–C220. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Voelkl, J.; Luong, T.T.D.; Tuffaha, R.; Musculus, K.; Auer, T.; Lian, X.; Daniel, C.; Zickler, D.; Boehme, B.; Sacherer, M.; et al. SGK1 induces vascular smooth muscle cell calcification through NF-kappaB signaling. *J. Clin. Investig.* **2018**, *128*, 3024–3040. [\[CrossRef\]](#)
38. Henze, L.A.; Luong, T.T.D.; Boehme, B.; Masyout, J.; Schneider, M.P.; Brachs, S.; Lang, F.; Pieske, B.; Pasch, A.; Eckardt, K.U.; et al. Impact of C-reactive protein on osteo-/chondrogenic transdifferentiation and calcification of vascular smooth muscle cells. *Aging* **2019**, *11*, 5445–5462. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Alesutan, I.; Moritz, F.; Haider, T.; Shouxuan, S.; Gollmann-Tepekoylu, C.; Holfeld, J.; Pieske, B.; Lang, F.; Eckardt, K.U.; Heinzmann, S.S.; et al. Impact of beta-glycerophosphate on the bioenergetic profile of vascular smooth muscle cells. *J. Mol. Med.* **2020**, *98*, 985–997. [\[CrossRef\]](#)
40. Wang, X.; Seed, B. A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, e154. [\[CrossRef\]](#)

41. Alesutan, I.; Voelkl, J.; Feger, M.; Kratschmar, D.V.; Castor, T.; Mia, S.; Sacherer, M.; Viereck, R.; Borst, O.; Leibrock, C.; et al. Involvement Of Vascular Aldosterone Synthase In Phosphate-Induced Osteogenic Transformation Of Vascular Smooth Muscle Cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 2059. [[CrossRef](#)]
42. O'Rourke, C.; Shelton, G.; Hutcheson, J.D.; Burke, M.F.; Martyn, T.; Thayer, T.E.; Shakartzi, H.R.; Buswell, M.D.; Tainsh, R.E.; Yu, B.; et al. Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells and Imaging of Aortic Calcification and Inflammation. *J. Vis. Exp.* **2016**, *111*, 54017. [[CrossRef](#)]
43. Moser, B.; Poetsch, F.; Estepa, M.; Luong, T.T.D.; Pieske, B.; Lang, F.; Alesutan, I.; Voelkl, J. Increased beta-adrenergic stimulation augments vascular smooth muscle cell calcification via PKA/CREB signalling. *Pflug. Arch.* **2021**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Alesutan, I.; Feger, M.; Tuffaha, R.; Castor, T.; Musculus, K.; Buehling, S.S.; Heine, C.L.; Kuro, O.M.; Pieske, B.; Schmidt, K.; et al. Augmentation of phosphate-induced osteo-/chondrogenic transformation of vascular smooth muscle cells by homoarginine. *Cardiovasc. Res.* **2016**, *110*, 408–418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Chen, W.; Eisenberg, R.; Mowrey, W.B.; Wylie-Rosett, J.; Abramowitz, M.K.; Bushinsky, D.A.; Melamed, M.L. Association between dietary zinc intake and abdominal aortic calcification in US adults. *Nephrol. Dial. Transpl.* **2020**, *35*, 1171–1178. [[CrossRef](#)]
46. Nakatani, S.; Mori, K.; Shoji, T.; Emoto, M. Association of Zinc Deficiency with Development of CVD Events in Patients with CKD. *Nutrients* **2021**, *13*, 1680. [[CrossRef](#)]
47. Andreasen, A.S.; Kelly, M.; Berg, R.M.; Moller, K.; Pedersen, B.K. Type 2 diabetes is associated with altered NF-kappaB DNA binding activity, JNK phosphorylation, and AMPK phosphorylation in skeletal muscle after LPS. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e23999. [[CrossRef](#)]
48. Jarosz, M.; Olbert, M.; Wyszogrodzka, G.; Mlyniec, K.; Librowski, T. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF-kappaB signaling. *Inflammopharmacology* **2017**, *25*, 11–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Laitakari, A.; Liu, L.; Frimurer, T.M.; Holst, B. The Zinc-Sensing Receptor GPR39 in Physiology and as a Pharmacological Target. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3872. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Xu, Y.; Wang, M.; Xie, Y.; Jiang, Y.; Liu, M.; Yu, S.; Wang, B.; Liu, Q. Activation of GPR39 with the agonist TC-G 1008 ameliorates ox-LDL-induced attachment of monocytes to endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* **2019**, *858*, 172451. [[CrossRef](#)]
51. Shan, W.; Qi, J.; Li, C.; Nie, X. Agonism of GPR39 displays protective effects against advanced glycation end-product (AGE)-induced degradation of extracellular matrix in human SW1353 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **2019**, *677*, 108164. [[CrossRef](#)]
52. Jing, W.; Sun, W.; Zhang, N.; Zhao, C.; Yan, X. The protective effects of the GPR39 agonist TC-G 1008 against TNF-alpha-induced inflammation in human fibroblast-like synoviocytes (FLSs). *Eur. J. Pharmacol.* **2019**, *865*, 172663. [[CrossRef](#)]
53. Jovanovic, M.; Schmidt, F.N.; Guterman-Ram, G.; Khayyeri, H.; Hiram-Bab, S.; Orenbuch, A.; Katchkovsky, S.; Aflalo, A.; Isaksson, H.; Busse, B.; et al. Perturbed bone composition and integrity with disorganized osteoblast function in zinc receptor/Gpr39-deficient mice. *FASEB J.* **2018**, *32*, 2507–2518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Ryz, N.R.; Weiler, H.A.; Taylor, C.G. Zinc deficiency reduces bone mineral density in the spine of young adult rats: A pilot study. *Ann. Nutr. Metab.* **2009**, *54*, 218–226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Wasilewski, G.B.; Vervloet, M.G.; Schurgers, L.J. The Bone-Vasculature Axis: Calcium Supplementation and the Role of Vitamin K. *Front. Cardiovasc. Med.* **2019**, *6*, 6. [[CrossRef](#)]
56. Skaug, B.; Chen, J.; Du, F.; He, J.; Ma, A.; Chen, Z.J. Direct, noncatalytic mechanism of IKK inhibition by A20. *Mol. Cell* **2011**, *44*, 559–571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Moll, H.P.; Lee, A.; Peterson, C.R.; Revuelta Cervantes, J.; Wojcik, B.M.; Parulkar, A.; Mele, A.; LoGerfo, P.J.; Siracuse, J.J.; Csizmadia, E.; et al. A20 Haploinsufficiency Aggravates Transplant Arteriosclerosis in Mouse Vascular Allografts: Implications for Clinical Transplantation. *Transplantation* **2016**, *100*, e106–e116. [[CrossRef](#)]
58. Verstrepen, L.; Verhelst, K.; van Loo, G.; Carpentier, I.; Ley, S.C.; Beyaert, R. Expression, biological activities and mechanisms of action of A20 (TNFAIP3). *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *80*, 2009–2020. [[CrossRef](#)]
59. Prasad, A.S.; Bao, B.; Beck, F.W.; Sarkar, F.H. Zinc-suppressed inflammatory cytokines by induction of A20-mediated inhibition of nuclear factor-kappaB. *Nutrition* **2011**, *27*, 816–823. [[CrossRef](#)]
60. Hongxia, L.; Yuxiao, T.; Zhilei, S.; Yan, S.; Yicui, Q.; Jiamin, S.; Xin, X.; Jianxin, Y.; Fengfeng, M.; Hui, S. Zinc inhibited LPS-induced inflammatory responses by upregulating A20 expression in microglia BV2 cells. *J. Affect. Disord.* **2019**, *249*, 136–142. [[CrossRef](#)]
61. Cheng, L.; Zhang, D.; Jiang, Y.; Deng, W.; Wu, Q.; Jiang, X.; Chen, B. Decreased A20 mRNA and protein expression in peripheral blood mononuclear cells in patients with type 2 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2014**, *106*, 611–616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Capdor, J.; Foster, M.; Petocz, P.; Samman, S. Zinc and glycemic control: A meta-analysis of randomised placebo controlled supplementation trials in humans. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2013**, *27*, 137–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Tremblay, F.; Richard, A.M.; Will, S.; Syed, J.; Stedman, N.; Perreault, M.; Gimeno, R.E. Disruption of G protein-coupled receptor 39 impairs insulin secretion in vivo. *Endocrinology* **2009**, *150*, 2586–2595. [[CrossRef](#)]
64. Bessueille, L.; Magne, D. Inflammation: A culprit for vascular calcification in atherosclerosis and diabetes. *Cell Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 2475–2489. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Wang, S.; Wang, B.; Wang, Y.; Tong, Q.; Liu, Q.; Sun, J.; Zheng, Y.; Cai, L. Zinc Prevents the Development of Diabetic Cardiomyopathy in db/db Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 580. [[CrossRef](#)]

66. Wang, S.; Luo, M.; Zhang, Z.; Gu, J.; Chen, J.; Payne, K.M.; Tan, Y.; Wang, Y.; Yin, X.; Zhang, X.; et al. Zinc deficiency exacerbates while zinc supplement attenuates cardiac hypertrophy in high-fat diet-induced obese mice through modulating p38 MAPK-dependent signaling. *Toxicol. Lett.* **2016**, *258*, 134–146. [[CrossRef](#)]
67. Reiterer, G.; MacDonald, R.; Browning, J.D.; Morrow, J.; Matveev, S.V.; Daugherty, A.; Smart, E.; Toborek, M.; Hennig, B. Zinc deficiency increases plasma lipids and atherosclerotic markers in LDL-receptor-deficient mice. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 2114–2118. [[CrossRef](#)]
68. Ranasinghe, P.; Wathurapatha, W.S.; Ishara, M.H.; Jayawardana, R.; Galappathay, P.; Katulanda, P.; Constantine, G.R. Effects of Zinc supplementation on serum lipids: A systematic review and meta-analysis. *Nutr. Metab.* **2015**, *12*, 26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Sun, W.; Wang, Y.; Miao, X.; Wang, Y.; Zhang, L.; Xin, Y.; Zheng, S.; Epstein, P.N.; Fu, Y.; Cai, L. Renal improvement by zinc in diabetic mice is associated with glucose metabolism signaling mediated by metallothionein and Akt, but not Akt2. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *68*, 22–34. [[CrossRef](#)]
70. Pompano, L.M.; Boy, E. Effects of Dose and Duration of Zinc Interventions on Risk Factors for Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Adv. Nutr.* **2021**, *12*, 141–160. [[CrossRef](#)]
71. Hamedifard, Z.; Farrokhian, A.; Reiner, Z.; Bahmani, F.; Asemi, Z.; Ghotbi, M.; Taghizadeh, M. The effects of combined magnesium and zinc supplementation on metabolic status in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease. *Lipids Health Dis.* **2020**, *19*, 112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Prasad, A.S. Zinc: An antioxidant and anti-inflammatory agent: Role of zinc in degenerative disorders of aging. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2014**, *28*, 364–371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

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

Komplette Publikationsliste

1. Alesutan I, **Henze LA**, Boehme B, Luong TTD, Zickler D, Pieske B, Eckardt KU, Pasch A, Voelkl J. Periostin Augments Vascular Smooth Muscle Cell Calcification via β -Catenin Signaling. *Biomolecules*. 2022 Aug 21;12(8):1157.

IF 6,064

2. **Henze LA***, Estepa M*, Pieske B, Lang F, Eckardt KU, Alesutan I, et al. Zinc Ameliorates the Osteogenic Effects of High Glucose in Vascular Smooth Muscle Cells. *Cells*. 2021;10(11).

IF 7,666

3. Poetsch F, **Henze LA**, Estepa M, Moser B, Pieske B, Lang F, et al. Role of SGK1 in the Osteogenic Transdifferentiation and Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells Promoted by Hyperglycemic Conditions. *Int J Mol Sci*. 2020;21(19).

IF 5,924

4. **Henze LA**, Luong TTD, Boehme B, Masyout J, Schneider MP, Brachs S, et al. Impact of C-reactive protein on osteo-/chondrogenic transdifferentiation and calcification of vascular smooth muscle cells. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(15):5445-62.

IF 4,831

5. Boehme B, Schelski N, Makridakis M, **Henze L**, Vlahou A, Lang F, et al. Role of Cytosolic Serine Hydroxymethyl Transferase 1 (SHMT1) in Phosphate-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Calcification. *Kidney Blood Press Res*. 2018;43(4):1212-21.

IF 2,123

Danksagung

Ich danke dem Betreuer meiner Doktorarbeit, Prof. Jakob Völkl und der Zweitbetreuerin meiner Doktorarbeit, PD Dr. Ioana Alesutan. Ich danke den Mitgliedern der Forschungsgruppe und allen, die an der Forschungsarbeit beteiligt waren. Ich danke meiner Familie, Svenja Henze, Michael Henze und Niklas Henze.