

**Diplomarbeit**

# **Die Pathogenese der arteriellen Mediaverkalkung**

eingereicht von

**Nicole Smaczny**

Geb.Dat.: 20.09.1980

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor(in) der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Abteilung für Angiologie / Univ. Klinik für Innere**

**Medizin**

unter der Anleitung von

**Ass.-Prof. PD Dr. Philipp Eller &**

**Ass.-Prof. PD Dr. Kathrin Eller**

Ort, Datum: Graz, 10.07.2013

(Nicole Smaczny)

## *Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, am 10.07.2013*

*(Nicole Smaczny)*

## **Vorwort**

Die vorliegende Diplomarbeit wurde von Oktober 2011 bis Juni 2013 erstellt. Ich habe mich für eine Wissenschaftliche Arbeit entschieden, da ich das Arbeiten im Labor bereits aus meiner Ausbildung zur Medizinisch-technischen-Laboratoriums-Assistentin kannte. Als ich mich damals für das Thema entschieden habe und meine Betreuer und das Laborteam kennengelernt habe, hätte ich nie damit gerechnet, welche positive Entwicklung diese Diplomarbeit auf mein Studium und meine weitere medizinische Laufbahn haben würde.

Aller Anfang ist schwer. An das tierexperimentelle Arbeiten musste ich mich zunächst gewöhnen und auch einige Rückschläge musste ich einstecken. Doch dies hat mich nur darin bekräftigt zielstrebig zu werden und spornte mich noch mehr in meiner Arbeit an. Es hat richtig Spaß gemacht mit dem gesamten Team zu arbeiten und ich habe mich dort gut aufgehoben gefühlt.

Doch das Größte für mich ist, dass unsere Arbeit zum Schluss im American Journal of Pathology publiziert wurde. Vielen Dank Euch allen.

## Danksagungen

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Betreuer, Herrn Ass.Prof.PD.Dr.Philipp Eller bedanken. Er hat mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden und geduldig auf meine Fertigstellung der Diplomarbeit gewartet. Dies gilt auch für meine Zweitbetreuerin Ass.Prof. PD Dr. Kathrin Eller.

Ausserdem möchte ich mich bei Dr. med. univ. Alexander Kirsch für jede tatkräftige Unterstützung seinerseits und all meine Fragen, die er mir beantwortet hat bedanken und der BMA des Labors, Viktoria Riegelbauer, die die ersten Färbungen mit mir durchgegangen ist und mir auch so immer unter die Arme gegriffen hat. Danke, dass ihr mich so herzlich ins Team aufgenommen habt.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Maria und Peter Smaczny, die mich die gesamte Zeit meines Studiums unterstützt haben, nicht nur finanziell, immer für mich da waren und ein offenes Ohr für mich hatten. Ihr habt immer an mich geglaubt, auch in schweren Zeiten. Das werde ich Euch nie vergessen.

Für Euch ist diese Arbeit gewidmet, als kleiner Dank.

Bedanken möchte ich mich zu guter Letzt bei meinem Partner und allen anderen Familienmitgliedern, die mich mein Studium über liebevoll unterstützt haben, mich immer wieder motiviert haben, mich nie aufgegeben haben und mir die Daumen gedrückt haben.

Vielen herzlichen Dank!

## Zusammenfassung

Die Prävalenz von Weichteilverkalkungen und im speziellen der arteriellen Mediaverkalkung ist bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz deutlich höher als bei gesunden Kontrollen und korreliert stark mit der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität in diesem Patientenkollektiv. Die arterielle Mediaverkalkung führt nicht nur zu einer gesteigerter Wandsteifigkeit und einer erhöhter Pulswellengeschwindigkeit, sondern auch zu einer linksventrikulären Hypertrophie, einer verminderten koronaren Perfusion und letztlich zur Herzinsuffizienz. In der Pathogenese der Weichteilverkalkung bei Patienten mit Niereninsuffizienz spielen der gestörte Phosphathaushalt und die durch die ektope Verkalkung getriggerte Entzündungsreaktion eine wesentliche Rolle. Ziel dieser Diplomarbeit war es, den Einfluss der Hochphosphatdiät auf die ektope Verkalkung von Herz, Nieren und Gefäßen im Tiermodell näher zu beschreiben und die enge Wechselwirkung dieser Weichteilverkalkung mit der begleitenden Entzündungsreaktion zu untersuchen. Für unsere Experimente benutzten wir DBA/2 Mäuse, die unter Hochphosphatdiät ein kardiorenales Syndrom mit einer akuten Phosphatnephropathie und einer dystrophen Herzverkalkung entwickeln. Wir konnten in diesem Tiermodell der DBA/2 Mäuse zeigen, dass insbesondere den regulatorischen T Zellen eine zentrale Rolle bei der Modulation der ektopen Verkalkung zukommt und dass diese antiinflammatorische Subpopulation der T Zellen das Ausmaß der Nephrokalzinose und damit auch die Gesamtmortalität beeinflusst. Eine systemische Treg Depletion ging in unserem Tiermodell mit einer deutlich gesteigerten Kristallablagerung in der Niere und einer Erhöhung der FGF23 Konzentration im Serum einher. Die lokale Entzündungsreaktion bei Weichteilverkalkung ist damit kein einfaches Begleitphänomen, sondern moduliert aktiv den pathologischen Prozess der Weichteilverkalkung. Es bedarf allerdings noch weiterer experimenteller Untersuchungen, um den genauen Pathomechanismus der Weichteilverkalkung und insbesondere auch jenen der arteriellen Mediaverkalkung zu klären und ihn frühzeitig zu unterbinden.

## **Abstract**

Background: Nephrocalcinosis is characterized by aberrant deposition of calcium in the kidneys and is seen in phosphate nephropathy, primary hyperparathyroidism, and distal renal tubular acidosis. To further evaluate the specific pathophysiological role of T cells in ectopic calcification, we used DBA/2 mice that are prone to develop nephrocalcinosis and dystrophic cardiac calcinosis.

Methods: Female DBA/2 mice were depleted of T cells (n=10) or regulatory T cells (Tregs) (n=15) using either an anti-CD3 or an anti-CD25 monoclonal antibody, and were compared to isotype-treated controls (n=9; n=15), respectively. After this immunomodulation, the DBA/2 mice were set on a high-phosphate diet for 9 days and the degree of calcification was assessed by micro-computed tomography. Successful depletion was confirmed by flow cytometry of splenocytes.

Results: In DBA/2 mice, high-phosphate diet induced a phenotype of nephrocalcinosis and dystrophic cardiac calcinosis. T-cell depletion significantly increased renal calcification in micro-computed tomography ( $p=0.022$ ). Concordantly, Treg depletion significantly deteriorated acute phosphate nephropathy ( $p=0.039$ ) and was associated with a significantly increased mortality rate ( $p=0.004$ ). Immunomodulation had no impact on the amount of cardiac calcification. Semi-quantitative histopathological evaluations with Alizarin Red stainings independently confirmed the respective radiological measurements.

Conclusion: In summary, our data suggest a pivotal role of T cells, particularly Tregs, in the progression of nephrocalcinosis, and emphasize the fact that inflammation deteriorates the outcome in acute phosphate nephropathy.

## Glossar und Abkürzungen

ABC Komplex	= Avidin-Biotin-Complex
ABCC6	= ATP-binding cassette Transporter C6
AEC	= 3-amino-9-Ethylcarbazol
ATP	= Adenosintriphosphat
Ca	= Kalzium
DBA/2	= Diluted brown non-agouti
FGF23	= Fibroblasten Faktor 23
Foxp3	= forkhead box protein P3
GATA3	= GATA-binding Protein 3
HPD	= Hochphosphatdiät
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	= Wasserstoffperoxid
Lcn2	= Lipocalin 2
Mg	= Magnesium
mRNA	= messenger RNA
MSX2	= Homebox Protein MSX-2
NO	= Stickstoffmonoxid
P	= Phosphat
PBS	= Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	= Paraformaldehyd
PiT-1	= Phosphattransporter
PPi	= anorganisches Phosphat
Pth	= Parathormon
Runx2	= Run-related Transkriptionsfaktor
SCD	= Standarddiät
SEM	= Standardfehler des Mittelwertes
TGF $\beta$	= Transformierender Wachstumsfaktor beta
TH	= T-Helferzelle
Tregs	= regulatorisch T-Zellen

## Abbildungsverzeichnis

Bild 1A: FACS Ansaugdüse (BD Biosciences)	10
Bild 1B: FACS Optische Wegkonstellation (BD Biosciences)	11
Bild 1C: FACS Computerauswertung	11
Bild 2: Mikro Computertomograph für Kleintiere	12
Bild 3A: Von Kossa Färbung der Niere	14
Bild 3B: PAS Färbung der Niere	15
Bild 3C: Alizarin Rot Färbung der Aorta	16
Bild 4: Immunhistologische Färbung Niere	18
Bild 5: Computerunterstützte Auswertung der immunhistochemischen Schnitte	19
Bild 6A: Nephrocalcinose in DBA/2 Mäusen unter Hochphosphatdiät (HPD) und Standarddiät (SCD) - von Kossa Färbung	20
Bild 6B: Nephrokalzinose in DBA/2 Mäusen unter Hochphosphatdiät (HPD) und Standarddiät (SCD) -Alizarin Rot Färbung	20
Bild 6C: Nephrokalzinose in DBA/2 Mäusen unter Hochphosphatdiät (HPD) und Standarddiät (SCD) - PAS Färbung	21
Bild 6D: Nephrokalzinose in DBA/2 Mäusen Infiltration mit CD68 positiven Makrophagen	21
Bild 6E: Nephrokalzinose in DBA/2 Mäusen Infiltration mit CD4 positiven Zellen	21
Bild 7A: 3D Rekonstruktion einer $\mu$ -CT Auswertung von einer DBA/2 Maus mit Nephrokalzinose unter Hochphosphatdiät	22
Bild 7B: Parasagittaler Schnitt einer $\mu$ -CT Auswertung von einer DBA/2 Maus mit Nephrokalzinose unter Hochphosphatdiät	22
Bild 8A: Überprüfung der T-Zell Depletion mittels Durchflusszytometrie	23
Bild 8B: Absolute und relative Menge der Nephrokalzinose in Abhängigkeit von der T-Zell Depletion	24
Bild 8C: Nephrokalzinose in Abhängigkeit von der T-Zell Depletion in der Alizarin Rot Färbung	24
Bild 9A: Überprüfung der CD25 Depletion anhand Durchflusszytometrie	25

Bild 9B: Absolute und relative Menge der Nephrokalzinose in Abhängigkeit von der Treg Depletion	26
Bild 9C: Nephrokalzinose in Abhängigkeit von der Treg Depletion in der Alizarin Rot Färbung	26
Bild 9D: mRNA Expression in der Niere in Abhängigkeit von der Treg Depletion	27
Bild 9E: FGF23 Konzentration im Serum in Abhängigkeit von der Treg Depletion	27
Bild 9F: Bestimmung neutrophile Gelatinase assoziierte Lipocalin2 (LCN2)/ Kreatinin Quotient im Harn der CD25 depletierten DBA/2 Mäuse	29
Bild 10A: Überlebenskurve von T-Zell depletierten, Treg depletierten und Isotyp Kontrollen DBA/2 Mäusen unter Hochphosphatdiät	30
Bild 10B: Dystrophe Herzverkalkung unter Hochphosphatdiät in der Alizarin Rot	31
Bild 10C: Dystrophe Herzverkalkung unter Hochphosphatdiät in der PAS Färbung	31
Bild 10D: Telemetrische EKG Aufzeichnung in DBA/2 Mäusen unter Hochphosphatdiät	32
Bild 10E: Absolute und relative Menge der dystrophen Herzverkalkung in Abhängigkeit von der T Zell Depletion	33
Bild 10F: Absolute und relative Menge der dystrophen Herzverkalkung in Abhängigkeit von der Treg Depletion	33
Bild 11A: Massenspektrometrische Messung der Gewebskonzentration von Kalzium, Phosphor und Magnesium in der abdominalen Aorta von DBA/2 Mäusen unter Hochphosphatdiät, Standarddiät und alten Kontrollen	34
Bild 11B: Mediaverkalkung der abdominalen Aorta in der Alizarin Rot Färbung	34

## Tabellen

Tabelle 1 Biochemische Serumparameter der DBA/2 Mäuse auf Hochphosphatdiät

28

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Hintergrund	1
1.2	Risikofaktoren für Atherosklerose	1
1.3	Pathophysiologie der Gefäßverkalkung	2
1.4	Chronische Niereninsuffizienz als Risikofaktor für Gefäßverkalkung	4
1.5	Phosphathaushalt in der Niereninsuffizienz	6
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>8</b>
2.1	Studiendesign	8
2.2	Intraperitoneale Injektion von depletierenden Antikörpern	8
2.3	Probengewinnung	9
2.4	Durchflusszytometrie	10
2.5	Elektrophysiologie	11
2.6	Mikro-Computertomographie	12
2.7	Fixierung	13
2.8	Paraffineinbettung	13
2.9	Histopathologische Evaluation	14
2.10	Immunhistochemische Färbungen	17
2.11	Auswertung der Immunhistochemischen Färbungen	19
2.12	Statistische Analysen	19
<b>3</b>	<b>Ergebnisse – Resultate</b>	<b>20</b>
3.1	Einfluss von Hochphosphatdiät auf die Nierenverkalkung	20
3.2	CD3 Depletion verschlechtert Nierenverkalkung	23
3.3	Tregs schützen vor Nierenverkalkung	25
3.4	Einfluss von Hochphosphatdiät auf die Herzverkalkung	29
3.5	Einfluss von Hochphosphatdiät auf Mediaverkalkung	32

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>37</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Hintergrund**

Vaskuläre Kalzifikationen fanden sich schon bei Autopsien ägyptischer Mumien. (1) Johann Georg Mönckeberg beschrieb als erster die Mediasklerose, wo in der Tunica media der Arterienwände Calciumablagerungen gefunden wurden. (2) Anfangs wurde die vaskuläre Kalzifikation von Virchow als ein passiver degenerativer Alterungsprozess angesehen, der keiner spezifischen Therapie zugänglich ist. In den letzten zwei Jahrzehnten haben mehrere wissenschaftliche Arbeiten eindeutig gezeigt, dass die Mediaverkalkung ein streng regulierter Prozess ist, der viele Gemeinsamkeiten mit der Knochenmineralisation teilt. (3-9) Mediaverkalkungen finden sich insbesondere bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung und Diabetes mellitus. (10-16) Das Ausmaß dieser Gefäßverkalkungen korreliert signifikant mit der Morbidität und Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen (17-19) und führt zu einer herabgesetzten Dehnbarkeit der Aorta, einem erniedrigten Herzindex, einer Verschlechterung der Koronarperfusion und einer subendokardialen Ischämie. (20-23) Daher ist das genauere Verständnis der Pathogenese der ektopen Verkalkung und insbesondere der Mediaverkalkung wichtig, um neuartige pharmakologische Angriffspunkte für kardiovaskuläre Erkrankungen identifizieren, charakterisieren und nützen zu können.

## **1.2 Risikofaktoren für Atherosklerose**

In der allgemeinen Bevölkerung sind Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Adipositas, Rauchen, fortgeschrittenes Alter und das männliche Geschlecht als Risikofaktoren für die Atherosklerose bekannt. (24) Hierbei beginnt die Erkrankung in der Regel mit der Bildung von subendothelialen Plaques in der Tunica intima, der innersten Schicht der Arterienwand. Bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz kommt es ähnlich wie bei der diabetischen Mediasklerose Typ Mönckeberg zu einer Verkalkung der Tunica media. (25, 26) Diese Mediaverkalkung reduziert die arterielle Compliance, führt zu einer linksventrikulären Hypertrophie und zur Linksherzinsuffizienz.

### **1.3 Pathophysiologie der Gefäßverkalkung**

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von klinischen und wissenschaftlichen Studien durchgeführt, welche den komplexen Prozess der Gefäßverkalkung durchleuchten. Der Prozess der vaskulären Kalzifikation besteht aus mehreren Schritten. Glatte Gefäßmuskelzellen verändern ihren Phänotyp und bilden Osteoblasten ähnliche Zellen. Ihnen fehlt der charakteristische histopathologische Marker glatter Muskelzellen. Sie entwickeln dabei osteoblastische Funktionen und exprimieren alkalische Phosphatase, Osteocalcin und Osteopontin. Diese osteoblastische Transdifferenzierung kann dann zur Mineralisation der extrazellulären Matrix führen. Der pathologische Prozess der Weichteilverkalkung teilt somit viele Gemeinsamkeiten mit der physiologischen Mineralisierung während der Skelettentwicklung. Membrangebundene Matrixvesikel bilden einen Kern mit Calciumhydroxylapatit Ablagerungen, die Kalzium und anorganisches Phosphat enthalten (27, 28) und den Ausgangspunkt der Verkalkung darstellen. Dies geschieht über ein streng kontrolliertes Gleichgewicht von Inhibitoren und Induktoren der Verkalkung, welche durch Stoffwechselveränderungen, (8, 29-31) Entzündungsreaktionen, (32, 33) und Medikamente (34-38) beeinflusst werden. Die Matrixvesikel enthalten Inhibitoren der Gefäßverkalkung wie das Fetuin-A und das Matrix GLA Protein. (39, 40) In Zusammenarbeit mit lokalen Mediatoren wie dem inorganischen Pyrophosphat (PPi) schützen diese Moleküle die Arterien vor der Ablagerung und dem Wachstum von Mineralien. (41-43) In Abwesenheit dieser physiologischen Inhibitoren der Verkalkung wird unter Stress durch zusätzliche endogene oder exogene Noxen eine Transdifferenzierung der glatten Muskelzellen und in weiterer Folge eine Gefäßverkalkung. (44-46)

Osteoblasten und Chondrozyten sind verantwortlich für die Knochen- und Knorpelbildung und die Verkalkung innerhalb des Skeletts. Populationen normaler glatter Gefäßmuskelzellen enthalten Zellen, die in einer verkalkten Umgebung phänotypisch einen Wandel zu Osteozyten, Osteoblasten und Chondrozyten durchlaufen. (9, 47-49) Im Zuge dieser Transdifferenzierung der glatten Gefäßmuskelzellen ändert sich auch deren Expressionsmuster. So werden unter anderem die Transkriptionsfaktoren Msx2 (50) und Runx2 (49) und die Kollagentypen I, II, IX und XI hoch reguliert (51). Der Phosphat Transporter PiT-1 ist der vorherrschende Natriumabhängige Phosphat-Co-Transporter in glatten Gefäßmuskelzellen. Phosphat erhöht die PiT-1 Expression, die zu einem erhöhten

intrazellulären Phosphatgehalt führt. Dies induziert wiederum eine Runx2 Expression und die osteogene Transdifferenzierung der glatten Gefäßmuskelzellen. (52)

Ein weiteres Schlüsselenzym für die Verkalkung ist die gewebeunspezifische alkalische Phosphatase, die durch die Hydrolyse des Kalzifikationshemmer PPi die Verkalkung in den glatten Gefäßmuskelzellen fördert. (53, 54) Umgekehrt hemmen das Ankylose Protein und die Ekto-Nukleotid Pyrophosphatase/Phosphodiesterase-1 Gefäßverkalkung durch die Förderung des extrazellulären PPi Gehalts in den glatten Gefäßmuskelzellen. (48, 53) PPi hemmt das Wachstum der Calciumphosphat-Kristalle und hilft bei der Verhinderung der chondroosären Differenzierung und Verkalkung. (48, 55) Arterienverkalkung wird zudem durch die Osteopontin Expression der glatten Gefäßmuskelzellen gehemmt. Osteopontin ist ein Inhibitor der Calciumhydroxylapatit Kristallbildung und fördert die Resorption der Präzipitate. (45) Osteoprotegerin, der endogene Inhibitor Matrix Gla Protein und das zirkulierende Fetuin-A blockieren ebenso die Kalzifikation der glatten Gefäßmuskelzellen. (45, 56-58)

#### **1.4 Chronische Niereninsuffizienz als Risikofaktor für Gefäßverkalkung**

Chronische Nierenerkrankung ist ein eigenständiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen. (59) Ein forciertes Verlaufs der Arteriosklerose und eine erhöhte Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse sind bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz in zahlreichen klinischen Studien dokumentiert worden (59-61). Eine Assoziation zwischen einer geringeren glomerulären Filtrationsrate und dem kardiovaskulär bedingten Tod ist ab einer Erniedrigung der glomerulären Filtrationsrate auf  $<60-80 \text{ ml/min/1,73m}^2$  nachweisbar (62). Kardiovaskuläre Erkrankungen treten somit bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung weitaus häufiger auf als in der Normalbevölkerung. Zum Beispiel beträgt die Prävalenz einer koronaren Herzerkrankung bei Dialysepatienten ca. 40%. Die kardiovaskuläre Mortalität wurde auf ca. 9% pro Jahr geschätzt und ist bei Dialysepatienten 10-20-mal häufiger als in der Normalbevölkerung. (61) Die vaskuläre Kalzifikation bei der chronischen Nierenerkrankung betrifft sowohl die Tunica media wie auch die Tunica intima und ist ein prognostischer Marker für die Gesamtsterblichkeit von Dialysepatienten. (4,

26) In den Arterien führt vor allem die Mediaverkalkung zu einer erhöhten Wandsteifigkeit der Gefäße, einer herabgesetzten Nachgiebigkeit der Gefäßwand, einer gesteigerten Pulswellengeschwindigkeit und einem erhöhten systolischen Blutdruck. Langfristig führen diese Veränderungen mechanischer und hämodynamischer Eigenschaften der Arterien zu Linksherzhypertrophie, verminderter koronarer Durchblutung und Herzinsuffizienz. (26)

Die Inzidenz und Behandlungskosten chronischer Nierenerkrankung und die daraus entstehenden kardiovaskulären Komplikationen nehmen zu, da die Bevölkerung in Westeuropa immer älter wird und die Inzidenz von Diabetes mellitus Typ 2 weiterhin ansteigt. Damit ist die chronische Nierenerkrankung ein immer größer werdendes soziales Gesundheitsproblem geworden. Die Zahl der dialysepflichtigen Patienten ist in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich angestiegen und wird sich in den nächsten 10 Jahren nochmals verdoppeln. (63)

In Österreich leiden ca. 400.000 Menschen an einer chronischen Niereninsuffizienz. 2010 gab es in Österreich in etwa 4.300 Patienten, die auf die Dialyse angewiesen waren. Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die Haupttodesursache von Patienten mit einer terminalen chronischen Niereninsuffizienz. (64) Das kardiovaskuläre Mortalitätsrisiko ist bei diesen Patienten 10-100mal höher als bei der gesunden Bevölkerung. (65)

Schon 1936 zeigte Robert Platt, dass eine eingeschränkte Nierenfunktion sowohl mit einem erhöhten glomerulären Druck als auch mit dem Verlust von Nephronen einhergeht. Ein erhöhter glomerulärer Druck steigert die Filtrationsmengen, die von jedem einzelnen Nephron produziert wird. Dadurch kann die Niere die eingeschränkte Nierenfunktion für eine bestimmte Zeitspanne kompensieren. Letztlich bleiben nur wenige Nephronen übrig, die unter einem möglichst hohen Druck Harn filtrieren, wobei auch der systemische arterielle Blutdruck ansteigt (Platt). (66) Alfred Chanutin und Eugene Ferris bewiesen in tierexperimentellen Modellen bereits 1932, dass erhöhter glomerulärer Druck zu einer abnormalen glomerulären Durchlässigkeit und damit zu einer Proteinurie führte. Damals wurde bereits die Bedeutung der Proteinurie als Marker für die das Ausmaß der Nierenschädigung erkannt. (67) In Dextran Clearance Studien wurde nachgewiesen, dass ein erhöhter intraglomerulärer kapillärer zu einem direkten glomerulären Schaden führte. (68) Dadurch ist die Filtration der Plasmaproteine beeinträchtigt. (69) Die mechanische Beanspruchung steigert auch die

Angiotensin II Produktion und die Expression von Angiotensin Typ I Rezeptoren in den Podozyten. (70) Demnach scheint eine beeinträchtigte glomeruläre Filtrationsrate Gewebeschaden auszulösen und aufrechtzuerhalten, so dass letztlich unabhängig vom glomerulären Druck eine Niereninsuffizienz durch erhöhten filtrierte Proteingehalt entsteht. (71) Die Podozyten, die einer erhöhten Proteinbelastung ausgesetzt sind, setzen Transforming Growth Factor, TGF- $\beta$ , frei, das zu einer Differenzierung der Mesangialzellen in Myofibroblasten führt. (72) Die Proteinbelastung der Tubuli induziert in Tubuluszellen die Produktion von Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und vasoaktiven Molekülen, welche zu einer abnormalen interstitiellen Ansammlung von Entzündungszellen, einer Ablagerung von Kollagenen, Fibronectin und anderen Komponenten in der extrazellulären Matrix führen und schließlich eine Fibrose bedingen. (73, 74)

## **1.5 Phosphathaushalt in der Niereninsuffizienz**

Als ein wichtiger Promotor der vaskulären Kalzifikation in der chronischen Niereninsuffizienz hat sich Phosphat herauskristallisiert. Phosphat wird primär über die Niere ausgeschieden. Daher kommt es bei der terminalen Niereninsuffizienz automatisch zu einer Überladung des Körpers mit Phosphat. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass ein erhöhtes Phosphat im Serum einen großen Einfluss auf die Morbidität und die kardiovaskuläre Mortalität bei Dialysepatienten hat. (75, 76) Raggi et al. zeigte, dass Phosphatserumspiegel deutlich im Zusammenhang mit der Anwesenheit von Koronargefäßverkalkung stehen. (77) Es gibt somit eine enge Assoziation von Phosphatserumspiegel mit dem Mortalitätsrisiko von Dialysepatienten. Patienten mit einem hohen Phosphatserumspiegel haben eine höhere Mortalität als Patienten mit niedrigen Spiegeln (Block). (78) Ein erhöhter Phosphatwert im Serum ist ein wichtiger Risikofaktor für die vaskuläre Kalzifizierung und kardiovaskuläre Mortalität bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen. (79)

Für den Phosphathaushalt ist die renale Ausscheidung essentiell. Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23 (FGF23) steuert die Ausscheidung des Phosphats über die Niere. (80, 81) FGF23 wird von Osteozyten im Knochen produziert (80) und von hohen Phosphatkonzentrationen im Serum und von hohen

Calcitriolwerten induziert. FGF23 wiederum unterdrückt die renale 1-alpha-Hydroxylase und somit die renale Synthese von Calcitriol. Im proximalen Tubulus interagiert FGF23 mit dem Cofaktor Klotho. Klotho ist ein membrangebundenes beta-Glucuronidaseenzym und ein unverzichtbarer Bestandteil bei der FGF Rezeptor Signalübertragung in der Niere. (82)

Vaskuläre Kalzifikation ist nicht nur das Resultat passiver Präzipitation von Kalzium und Phosphat in der Gefäßwand. Neuere Studien dokumentieren, dass vor allem hohe Phosphatwerte die Transdifferenzierung von glatten Muskelzellen in Osteoblasten ähnliche Zellen auslösen. Dieser Prozess wird auch als osteogenetische Transdifferenzierung bezeichnet. (83) Bei Anwesenheit hoher Phosphatwerte wird das Phosphat über die Natrium-Phosphat-Transporter in die Zellen transportiert. Dieser Prozess ist der Startschuss für das Programm der Transdifferenzierung. Dabei übernehmen die glatten Muskelzellen teilweise das Expressionsprofil eines Osteoblasten. Ein weiterer wichtiger Auslöser für das zelluläre Programm der Transdifferenzierung ist eine Entzündungsreaktion. (82)

Selbst ein vorübergehender Anstieg der Serumphosphat Konzentration, z.B. eine postprandiale Hyperphosphatämie, kann eine endotheliale Dysfunktion fördern. In einer Studie von Shuto et al. wurde gezeigt, dass endotheliale Zellen von Rinderaorten, die einer hohen Phosphatkonzentration ausgesetzt wurden, mehr reaktive Sauerstoffpartikel und weniger NO produzierten. Eine derartige Dysfunktion wurde auch durch einen erhöhten Zustrom von Phosphat über Natriumabhängige Transporter ausgelöst. (84)

Ähnliche Daten wurden auch in einer Doppelblind-Crossover-Studie im Menschen erhoben. Eine Mahlzeit mit 1200 mg Phosphat verursacht nach 2 Stunden eine signifikant größere Abnahme der Fluss-vermittelten Dilatation als eine Mahlzeit mit 400mg Phosphat. Eine derartige postprandiale Dysfunktion endothelialer Zellen könnte zu einer Phosphat-induzierten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität beitragen.

Um den Einfluss einer phosphatreichen Kost auf die ektope Verkalkung von Herz, Niere und Gefäße näher zu untersuchen, verwendeten wir den Inzuchtstamm der DBA/2 Maus. Die DBA/2 Mäuse haben eine Mutation im *Abcc6* Gen, sind daher anfällig für Weichteilverkalkungen und ideal dafür geeignet, um die Auswirkungen der phosphatreichen Diät und der Immunmodulation auf ektope Verkalkungen im Tiermodell zu untersuchen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Studiendesign**

Alle Experimente in dieser Diplomarbeit wurden übereinstimmend mit den Vorschriften des österreichischen Tierschutzgesetzes ausgeführt und vom Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung genehmigt. Wir benutzten 8 Wochen alte, weibliche DBA/2 Mäuse für unsere Experimente. Sie wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) geliefert und in einer Antikörper- und Virusfreien Umgebung im Tierstall der Medizinischen Universität Graz untergebracht.

In der ersten Experimentreihe wurde die ein Gruppe der Mäuse mit 10µg eines CD3-depletierenden Antikörpers (Muromonab, Biolegends, San Diego, CA, USA) an fünf aufeinander folgenden Tagen behandelt, während die Vergleichsgruppe jeweils intraperitoneale Injektionen eines Isotyp-Kontroll-Antikörpers (LEAF™ Purified Armenian Hamster IgG Isotype Ctrl, Biolegends, San Diego, CA, USA) erhielt. In der zweiten Experimentreihe erhielt die eine Gruppe von DBA/2 Mäusen einmalig 200 µg anti-CD25 Antikörper (BD Bioscience, San Diego, CA, USA), während der Vergleichsgruppe ein entsprechender Isotyp Antikörper intraperitoneal injiziert wurde. Nach dieser Vorbehandlung wurden alle Mäuse für 9 Tage auf eine phosphatreiche Diät (Altromin, Lage, Deutschland) gesetzt. Das phosphatreiche Futter beinhaltete 20,46g Phosphat pro Kilogramm. Zusätzlich bekamen die Mäuse Wasser ad libitum. Nach 9 Tagen wurden die Tiere anästhesiert und mittels zervikaler Dislokation getötet. Die Organe wurden sofort entnommen und unmittelbar weiter aufgearbeitet.

### **2.2 Intraperitoneale Injektion von depletierenden Antikörper**

Die Ausgangskonzentration des CD3 depletierenden Antikörpers (Muromonab, Biolegends, San Diego, CA, USA) betrug 1,0 mg/ml. Die DBA/2 Mäuse bekamen an fünf aufeinander folgenden Tagen jeweils 10µg in 100ml intraperitoneal injiziert. Dafür wurden pro Tag und Maus jeweils 10µl Antikörper in 90µl physiologischer Kochsalz-Lösung unter sterilen Bedingungen unter einem Abzug verdünnt. So erhielt man eine Verdünnung von 1:10. Der Isotyp-Kontroll-Antikörper (LEAF™ Purified Armenian Hamster IgG Isotype Ctrl, Biolegends, San Diego, CA, USA) hatte ebenfalls eine Ausgangskonzentration von 1,0 mg/ml.

Daher wurde die gleiche Vorverdünnung (1:10) für den Isotyp-Kontroll-Antikörper angefertigt. Die Depletion der regulatorischen T-Zellen mit einem monoklonalen anti-CD25 Antikörper (BD Bioscience, San Diego, CA, USA) erfolgte in analoger Weise. Dabei war eine einmalige intraperitoneale Injektion von 200 µg ausreichend. Die Kontrollgruppe erhielt die entsprechende Menge des Isotyp-Antikörpers.

## **2.3 Probengewinnung**

Alle Tiere wurden mit einem Ketamin Xylazin Gemisch, das in die Bauchhöhle gespritzt wurde, anästhesiert, bevor sie durch einen Genickbruch getötet wurden. Der retrobulbäre Venenplexus wurde mit einer Kapillare punktiert, um Blut für die biochemischen Analysen von Elektrolyten, Harnstoff, Parathormon und FGF23 zu gewinnen. Das Blut wurde anfangs in einem mit EDTA gefüllten Vacutainer (Sarstedt GmbH, Wiener Neudorf, Österreich) aufbewahrt, anschließend bei 3000 rpm für 10 min abzentrifugiert und letztlich das Serum vorsichtig abpipettiert und bei -20°C aufbewahrt.

Nach Öffnen der Bauchhöhle wurde zuerst die linke Niere entfernt, in einen Behälter mit Formalin eingelegt und anschließend der Untersuchung im µ-CT zugeführt. Die rechte Niere wurde entfernt und halbiert. Eine Hälfte wurde in O.C.T. Compound Tissue-Tek® (Sakura Fintek Europe B.V., Zoeterwonde, Niederlande) gelegt und dann in einem Methylbutanbad in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um daraus später Gefrierschnitte anzufertigen. Die andere Hälfte der Niere wurde in ein Einbett-Kassette (Simport, Beloeil, Qc, Kanada) in Formalin eingelegt und anschließend in Paraffin eingebettet. Diese Paraffinblöcke wurden dann am Rotationsmikrotom geschnitten. Dann wurde die Milz entfernt und eine Einzelzellsuspension hergestellt, um in der Durchflusszytometrie den Effekt der Zelldepletion zu überprüfen. Anschließend wurde das Herz entnommen. Es wurde in Formalin eingelegt und zunächst im µ-CT untersucht. Danach wurde das Herz geteilt. Eine Hälfte wurde in O.C.T. Compound Tissue-Tek® (Sakura Fintek Europe B.V., Zoeterwonde, Niederlande) gelegt und dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die andere Hälfte des Herzens wurde in eine Einbettkassette (Simport, Beloeil, Qc, Kanada) in Formalin eingelegt und anschließend in Paraffin eingebettet. Als letztes wurde die Aorta entfernt und

ebenfalls wie Niere und Herz für Gefrier- und Paraffinschnitte in die entsprechenden Behältnisse gelegt.

## 2.4 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie überprüften wir die Wirkung der T-Zell- und Treg-Depletion. Dafür mussten wir zuvor aus den einzelnen Milzen jeweils eine Einzelzellsuspension anfertigen und diese auf CD4 und CD25 (BD, Biosciences, San Diego, CA, USA) färben. Anschließend wurden die Einzelzellsuspensionen am FACS Calibur gemessen. Die Durchflusszytometrie am FACS Calibur (BD Biosciences) basiert darauf, dass die mit fluoreszierenden Antikörpern gefärbte Zellen über eine Düse gepresst werden. Am Ausgang der Düse ist ein Laserstrahl positioniert, dessen Licht durch die Zellsuspension in verschiedene Richtungen gestreut und durch fluoreszierende Antikörper zu einem Fluoreszenzlicht angeregt werden.

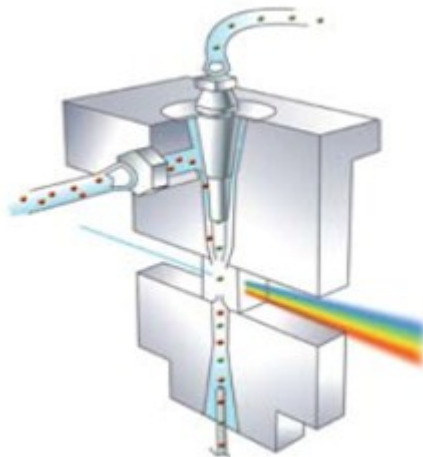


Abb. 1A FACS Ansaugdüse BD Biosciences

Das gestreute Licht wird in einem relativ engen Winkel erfasst und mit einem Sensor als sogenanntes Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) gemessen, welches ein Maß für die Zellgröße ist. Das Licht, das hinter der Düse aufgefangen wurde, ist das sogenannte Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidewards Scatter), das ein Maß für die Zellgranulation ist. Außerdem werden die Lichtspektren gemessen, indem das Licht durch spezifische Filter nach Wellenlängen aufgetrennt wird. Damit können Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern von Zellen ohne gebundene Antikörper unterschieden werden.



## 2.6 Mikro-Computertomographie

Wir quantifizierten das Ausmaß der ektopten Verkalkung von Herz und Nieren ex vivo im Inveon  $\mu$ -CT (Siemens, München, Deutschland). Von den einzelnen Organen wurde eine schichtweise Reihe von Röntgen-Absorptionsmessungen gemacht, die dann in weiterer Folge zu einem 3D-Bild rekonstruiert wurden. Durch die Messung der Hounsfield Einheiten für die einzelnen Pixel Bildpunkte konnten wir das absolute und relative Ausmaß der ektopten Verkalkung der einzelnen Organe exakt bestimmen.



Abb.2 Micro Computertomograph für Kleintiere

## **2.7 Fixierung**

Ziel der Fixierung ist es, dass das Gewebe möglichst gut erhalten bleibt. Daher wurden die Organe direkt nach der Entnahme in 4% Formalin (Donauchem GmbH, Wien, Österreich) eingelegt. Formalin dringt relativ gut ins Gewebe ein, vernetzt die Proteine untereinander, verhindert so die Fäulnis des Gewebes und macht es dauerhaft haltbar. Dabei werden Methylenbrücken gebildet. Danach kann das Gewebe eingebettet werden, um sehr dünne und gleichmäßige Schnitte für weitere Färbungen herzustellen.

## **2.8 Paraffineinbettung**

Da das Paraffin nicht wasserlöslich ist, musste das Gewebe vorbehandelt werden. Dafür muss dem Gewebe das Wasser entzogen werden. Das geschieht, indem man die Organe mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%iges Ethanol-80%-96%-100% (EMSURE, Merck, Darmstadt, Deutschland)) behandelt. Anschließend muss der Alkohol entfernt werden, damit das Paraffin ins Gewebe gelangen kann. Dafür braucht man ein Intermedium, z. B. Xylol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Das Xylol verdrängt den Alkohol aus dem Gewebe und wird anschließend durch 56°C heißes Paraffin ersetzt. Diese Schritte laufen automatisch in einem Histokinet Einbettautomat ab. Nun können die mit Paraffin durchtränkten Gewebsstücke in Gießschälchen gelegt und mit Paraffin überdeckt werden, damit schöne Paraffinblöcke zum Schneiden entstehen. Zum Abschluss wird die Einbettkassette mit der entsprechenden Fallnummer auf den noch flüssigen Paraffinblock aufgelegt, da diese den Boden des Paraffinblockes bildet. Wenn das Paraffin erkaltet ist, kann das Gießschälchen entfernt werden und der Block geschnitten werden. Es wurden 4µm dünne Schnitte für die PAS-Reaktion und die Alizarin Rot Färbung angefertigt.

## 2.9 Histopathologische Evaluation

Für die verschiedenen Färbungen am Gefrierschnitt wurden Gewebeproben in Einbett Gussformen mit O.C.T. Compound Tissue-Tek® (Sakura Fintek Europe B.V., Zoeterwonde, Niederlande) eingelegt und dann in einem Methylbutanbad in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Davon wurden 4µm dicke Schnitte am Kryomikrotom angefertigt, auf Objektträgern (C. Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) befestigt, 30-60 min getrocknet und dann weiterverarbeitet. Zwei Schnitte wurden pro Objektträger angefertigt.

### Von Kossa

Um die ektope Verkalkung in den Organen darzustellen, wurde die von Kossa Färbung durchgeführt. Zuerst wurden die Gewebsschnitt am Objektträger für 8 Minuten mit 4%PFA in PBS (Donauchem GmbH, Wien, Österreich) fixiert und danach 10 Minuten in PBS-Puffer und anschließend nochmal 10 Minuten in Aqua dest. gewaschen. Nach diesem Waschvorgang wurden die Schnitte mit 1% Silbernitrat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) unter einer UV-Lichtquelle für ca. 45 Minuten inkubiert. Hierbei wird das Calcium gegen Silberionen ausgetauscht und zu metallischem Silber reduziert. Dieser Vorgang wurde nach 45 Minuten mikroskopisch kontrolliert. Wenn der gewünschte Grad der Anfärbung erreicht war, wurden die Schnitte in Aqua dest. für 5 Minuten gespült. Im nächsten Schritt wurde mit 5% Natriumthiosulfat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) 2 Minuten lang inkubiert und anschließend wieder mit Aqua dest. 5 Minuten gespült. Danach erfolgt die Gegenfärbung mit gefiltertem Kernechtrot für 2 Minuten. Abschließend wurde noch einmal mit Aqua dest. 5 Minuten gespült und mit Aquatex® (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt. Als Ergebnis sollten die Calciumablagerungen schwarz erscheinen, die Zellkerne rot und das Zytoplasma rosa

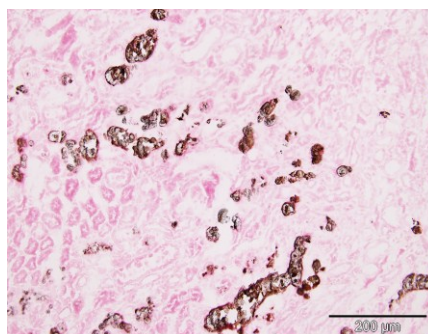


Abb. 3A Von Kossa Färbung der Niere

## PAS-Reaktion

Durch die PAS-Reaktion (Perjodsäure-Schiff-Reaktion) werden Kohlenhydratgruppen nachgewiesen. Die PAS-Färbung eignet sich gut, um eine Übersicht über die histologischen Strukturen in den Organen zu bekommen bzw. um den Unterschied zwischen gesunden und kranken Organen darzustellen.

Für diese Färbung mussten die Schnitte zunächst entparaffiniert werden. Dies geschieht in umgekehrter Reihenfolge zur Einbettung. Dazu wurden die Schnitte zunächst für 2 x 5 Minuten in Xylol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) getaucht. Anschließend kam die absteigende Alkoholreihe (100%iges Ethanol-96%-70% (EMSURE, Merck, Darmstadt, Deutschland) für jeweils 3 Minuten und ein kurzes Abspülen in Aqua dest. Dann wurden die Schnitte für 5 Minuten in Perjodsäure (EMSURE, Merck, Darmstadt, Deutschland) gelegt. Dadurch werden unsubstituierte Glykole zu Aldehyden oxidiert. Die Schnitte wurden 3 Minuten lang mit Leitungswasser gewässert und anschließend in Aqua dest. gespült, bevor das Schiff'sche Reagenz (EMSURE, Merck, Darmstadt, Deutschland) für 15 Minuten dazukam. Das Reagenz reagiert mit den Aldehyden, die durch die Perjodsäure entstanden sind und setzt den Farbstoff Fuchsin frei. Daraufhin wurden die Schnitte mit Aqua dest. gespült und mit gefiltertem Gill's Nr. 3 Hämatoxilin (SIGMA Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) gegengefärbt, noch einmal mit fließendem Leitungswasser gewässert und mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%iges Ethanol-80%-96%-100% (EMSURE, Merck, Darmstadt, Deutschland) für jeweils 3 Minuten und 10 Minuten in Xylol (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) dehydriert.

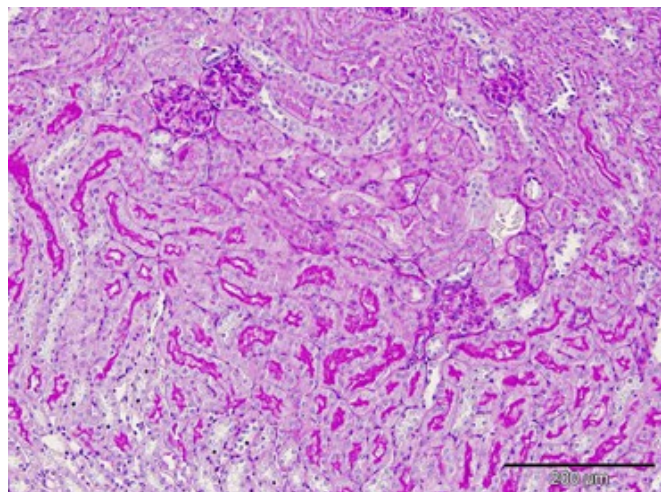


Abb. 3B PAS Färbung der Niere

## Alizarinrot

Auf den Paraffinschnitten wurde die ektope Weichteilverkalkung mit der Alizarinrotfärbung nachgewiesen. Dafür mussten auch hier erst einmal die Paraffinschnitte entparaffiniert werden, indem sie für 10 Minuten in Xylol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) getaucht und mit einer anschließenden absteigenden Alkoholreihe (100%iges Ethanol-96%-70% (EMSURE, Merck, Darmstadt, Deutschland)) für jeweils 3 Minuten und ein kurzes Abspülen in Aqua dest. gewaschen wurden. Dann wurden die Schnitte für ca. 5 Minuten in der Alizarin Rot Lösung (2g Alizarin Red S (SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) in 100ml Aqua dest. auflösen und einen pH zwischen 4,1 und 4,3 mit Ammonium Hydroxid einstellen) gefärbt. In diesem Schritt formt das Alizarin Rot Chelatverbindungen mit den zweiwertigen Calciumionen. Nach 2 Minuten wurde der Grad der Anfärbung auf dem Schnitt mikroskopisch kontrolliert. Anschließend wurden die Schnitte dehydriert, indem sie jeweils 20-mal nacheinander in Aceton (EMSURE, Merck, Darmstadt, Deutschland), dann in ein Aceton-Xylol Gemisch (1:1) und zum Abschluss in Xylol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) getaucht wurden. Nach dem Xylol wurden die Schnitte mit Roti®-Histokitt II (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt. Die Verkalkung stellt sich hier orange-rot dar.

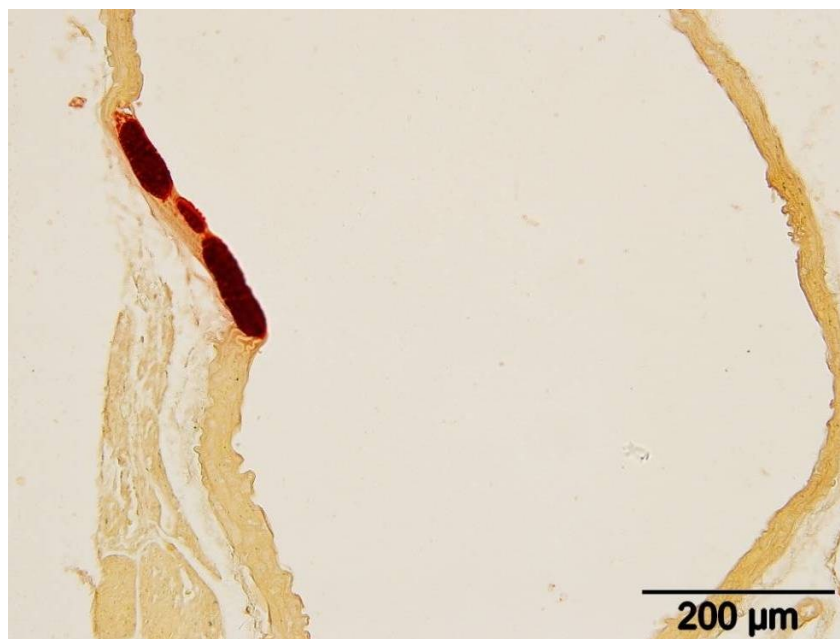


Abb.3C Alizarin Rot Färbung der Aorta

## 2.10 Immunhistochemische Färbung

Um die Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen in Herz und Niere zu untersuchen, wurde eine CD4 bzw. CD68 immunohistochemische Färbung dieser Organe angefertigt.

Für diese Färbungen wurden die Schnitte zunächst 8 min lang in Aceton (EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) fixiert. Die Schnitte mussten danach an der Luft für ca. 1min trocknen und wurden dann mit einem Fettstift umrandet. Dann wurden die Objektträger 20min in einer Lösung geblockt, die zu 70% aus PBS-Puffer, zu 20% aus fetalem Kalbserum und zu 10% aus Hitze inaktiviertem Ziegen Serum bestand. Nach dem Waschvorgang mit PBS-Puffer wurde mit Avidin und Biotin (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) geblockt, indem die Schnitte zuerst für 15 Minuten mit Avidin inkubiert, dann 2 Minuten mit PBS-Puffer gewaschen, mit Biotin für 15 Minuten inkubiert und schließlich wieder mit PBS-Puffer für 2 Minuten gewaschen wurden. Es wurde zusätzlich mit einer 2% Gelatine-Waschlösung (0,8g Gelatine in 100ml Aqua dest. auflösen und kochen und 300 ml PBS dazugeben) ebenfalls für 2 Minuten gewaschen. Dann wurde der Primärantikörper, ein Anti-MausCD4 Antikörper (AbD Serotec, Oxford, Großbritannien) bzw. ein Ratten Anti-MausCD68 Antikörper mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml (Abcam, Cambridge, Großbritannien) aufgetragen und für 60 Minuten inkubiert. Parallel wurde als Negativkontrolle Schnitte mit IgG2 Isotypkontrollen in identer Konzentration mitgeführt. Anschließend wurden die Schnitte 12 Minuten mit PBS-Puffer gewaschen und mit einem Biotin-konjugierten Sekundärantikörper (AffiPure Donkey Anti Rat IgG, Jackson ImmunoResearch, Inc., West Grove, PA, USA) für 45 Minuten inkubiert. Danach wurde wieder 12 Minuten in PBS-Puffer gewaschen. Für den nächsten Färbeschritt wurde ein ABC-Komplex (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) vorbereitet, für den 10µl Lösung A und 10µl Lösung B in 1000µl PBS pipettiert wurden. Beim ABC-Komplex wird die starke Bindung zwischen Avidin und Biotin ausgenutzt. Avidin besitzt vier Bindungsstellen für das Biotin, von denen aber nur zwei besetzt werden können. Avidin und Biotin bilden zusammen große dreidimensionale Komplexe, die wiederum über die freien Bindungsstellen des Avidin nun an die Biotin-Gruppen des Sekundärantikörpers binden können. So können pro Primärantikörper viele Enzymmoleküle pro Schnitt gebunden werden. Die Objektträger wurden 45 Minuten im ABC-Komplex inkubiert. Anschließend

wurden die Schnitte wieder 12 Minuten in PBS-Puffer und danach für 3 Minuten in 0,1M Acetat-Puffer (300 ml Na-Acetat 0,2M und 100 ml Essigsäurelösung in 400 ml Aqua dest) gewaschen. Auch für den nächsten Schritt wurde wieder eine Lösung hergestellt, ein sogenanntes Chromogen aus 4 ml AEC (3-amino-9-Ethylcarbazol (SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)) Stocklösung (6Tabletten AEC in 30 ml n-dimethylformamid (EMPLURA®, Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland)), 80 ml 0,1M Acetat-Puffer und 50 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (EMSURE®, Merck KGmbH, Darmstadt, Deutschland). In dieser Lösung wurden die Schnitte 6-8 Minuten inkubiert und nach 4 Minuten mikroskopisch auf den Färbegrad kontrolliert. Danach wurden die Schnitte 3 Minuten in Aqua dest. gewaschen und mit gefiltertem Gill`s Nr. 3 Hämatoxilin (SIGMA Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) gegengefärbt. Zum Schluss kamen noch zwei Waschvorgänge, erst 3x in Leitungswasser spülen, 2x in Aqua dest. und dann erfolgte mit Aquatex® (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) die Eindeckung. Mikroskopisch sollten die CD4 bzw. CD68 positiven Zellen eine Braunfärbung aufweisen, das umliegende Gewebe ist blau angefärbt.

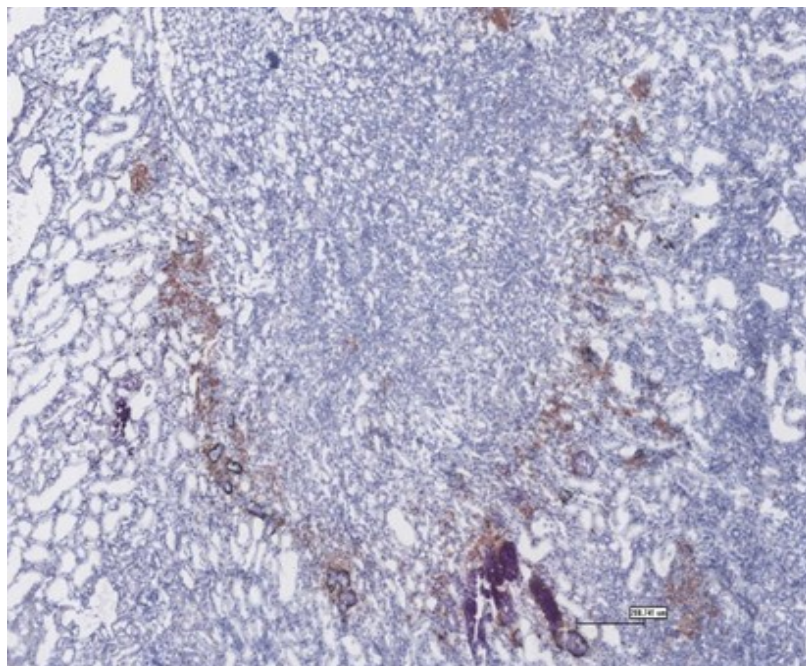


Abb.4 Immunhistochemische Färbung der Niere

## 2.11 Auswertung der Immunhistochemischen Färbung

Nach dem Färbevorgang wurden die Schnitte unmittelbar für eine genauere Beurteilung im Aperio Scan Scope eingescannt. Dazu wurden jeweils fünf Objektträger in der entsprechenden Halterung befestigt und ins Scan Scope geschoben. Vor dem Scanvorgang erfolgte jeweils ein Weißabgleich. Der Scanlauf selbst ist automatisiert und erfolgt mit einem 20er Objektiv in Linien von oben nach unten über den gesamten Gewebeschnitt und schreibt die Färbung in Pixel um. Die Dateien der eingescannten Färbungen ermöglichen eine computerunterstützte prozentuelle Auswertung der angefärbten Areale. Zudem hat diese Art der Datenaufbewahrung den Vorteil, dass die Färbungen nicht wie bei herkömmliche Schnitten mit der Zeit ausbleichen.

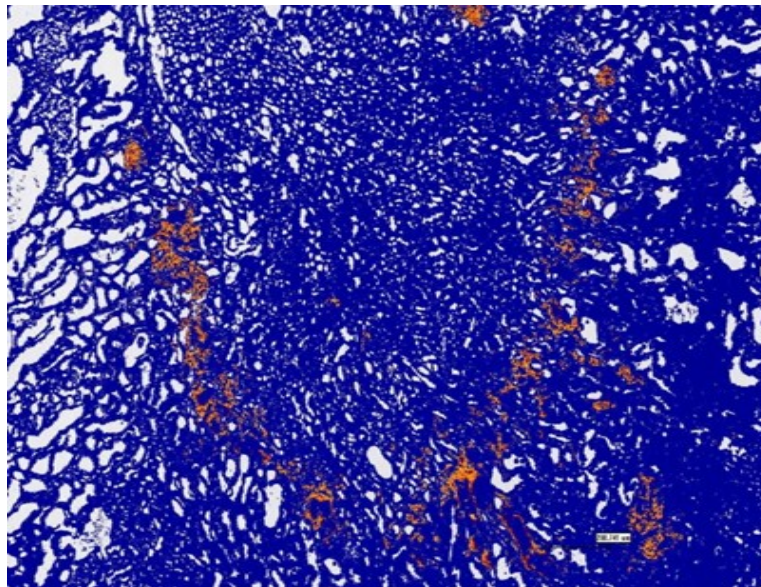


Abb.5 Computerunterstützte Auswertung der immunhistochemischen Färbung

## 2.12 Statistische Analysen

Alle Ergebnisse in diesen Experimentreihen wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test und dem Lilliefors-Test überprüft. Beide Gruppen wurden anhand des Mann-Whitney U-Tests oder dem t-Test verglichen. Ein zweiseitiger Test mit  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Alle statistischen Analysen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS 15.0 für Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) durchgeführt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Einfluss von Hochphosphatdiät auf die Nierenverkalkung

Als erstes untersuchten wir den Einfluss einer phosphatreichen Kost auf die Verkalkung der Niere. Eine Hochphosphatdiät induziert in 8 Wochen alten DBA/2 Mäusen innerhalb von 9 Tagen eine auffallende Nierenverkalkung (Bild 6). Die histopathologischen Evaluationen der Niere mittels von Kossa Färbung (Bild 6A), Alizarin Rot (Bild 6B) und PAS Färbung (Bild 6C) zeigen eine radiale Anordnung der ektopen Nierenverkalkungen, die der renalen tubulären Architektur folgt und am stärksten in der der Nierenrinde ausgeprägt ist.

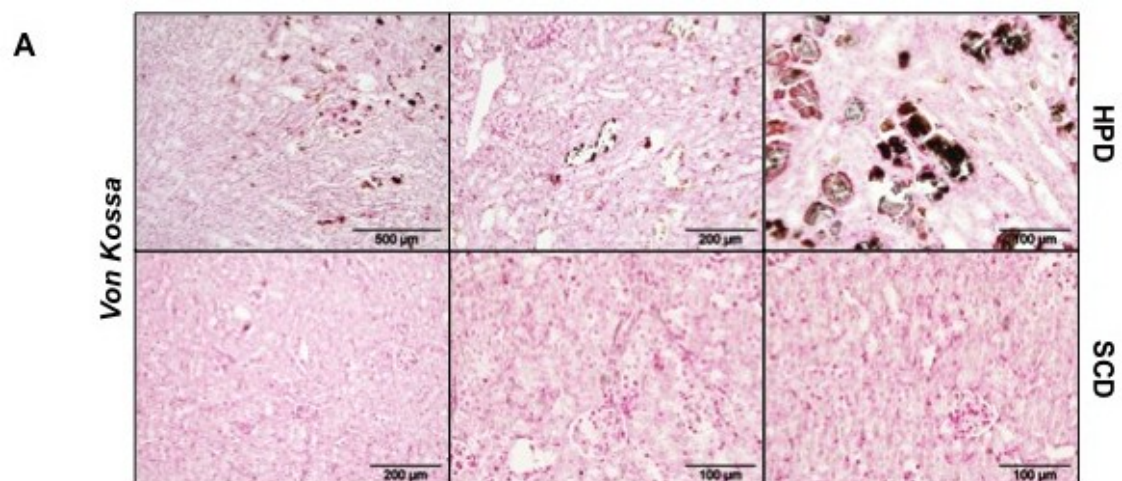


Abb.6A Nephrokalzinose in DBA/2 Mäusen unter Hochphosphatdiät (HPD) und Standarddiät Kontrolle (SCD) – von Kossa Färbung



Abb.6B Nephrokalzinose in DBA/2 Mäusen unter Hochphosphatdiät – Alizarin Rot Färbung

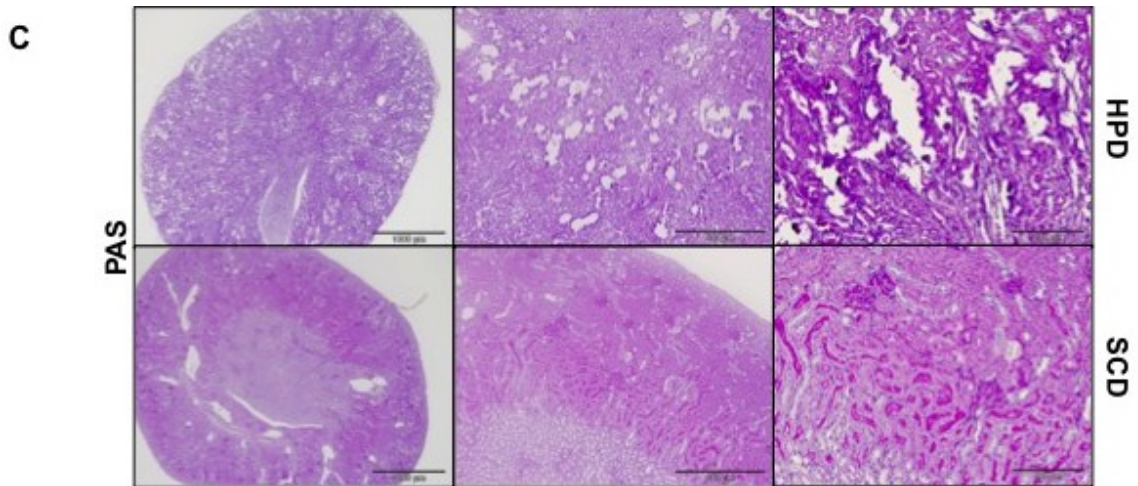


Abb.6C Nephrokalzinose in DBA/2 Mäusen unter Hochphosphatdiät (HPD) und Standarddiät Kontrolle (SCD)– PAS Färbung

Die immunhistologischen Färbungen für CD68 positive Makrophagen und CD4 positive T Zellen zeigten eine erhebliche Infiltrationen beider Zelltypen ins Nierenparenchym (Bild 6D und 6E).

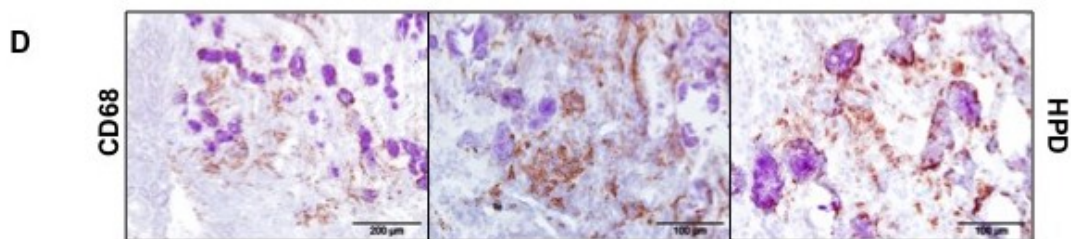


Abb.6D Nephrokalzinose DBA/2 Mäuse – Infiltration mit CD68 positiven Makrophagen

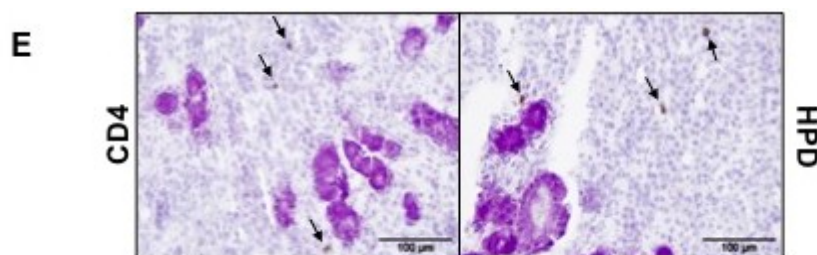


Abb.6E Nephrokalzinose DBA/2 Mäuse – Infiltration mit CD4 positiven Zellen

Die im Mikro-Computertomographen erzeugten Röntgenbilder der explantierten Niere bestätigen unabhängig die Lokalisation und das Ausmaß der Nierenverkalkung, die einer akuten Phosphatnephropathie entspricht (Bild 7A und 7B).

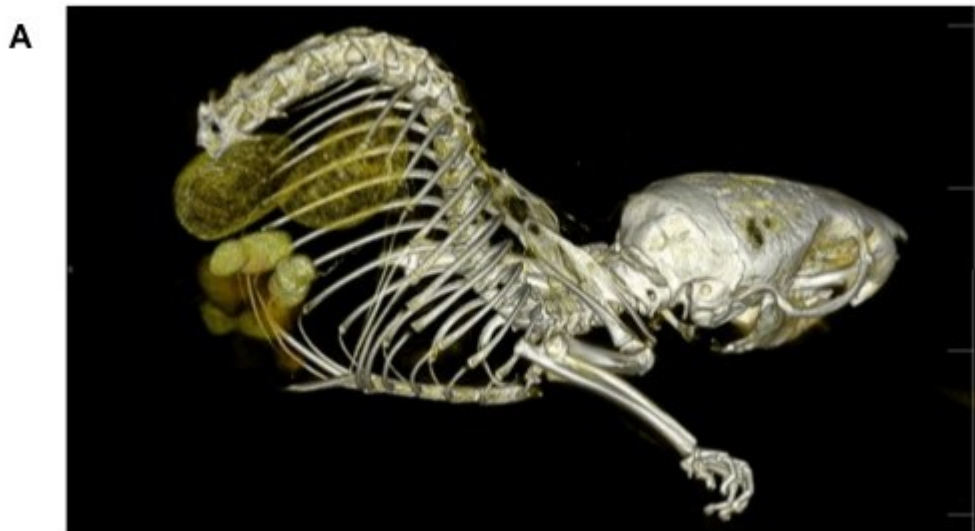


Abb.7A 3D Rekonstruktion einer  $\mu$ -CT-Auswertung von einer DBA/2 Maus mit Nephrokalzinose unter Hochphosphatdiät

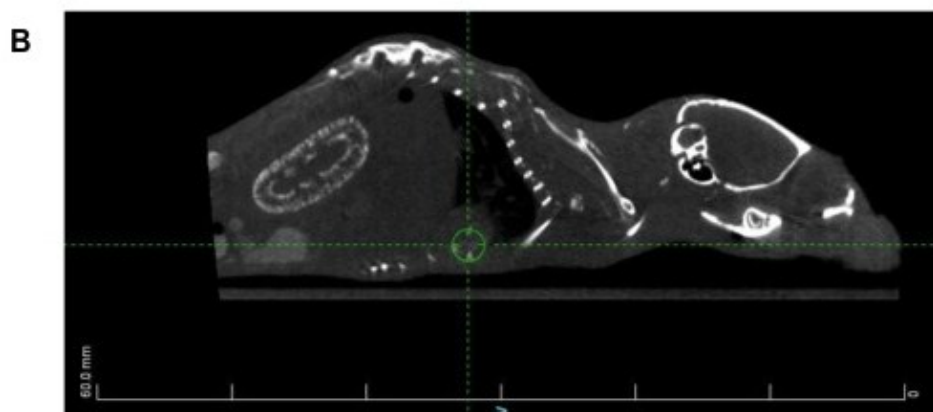


Abb.7B Parasagittaler Schnitt einer  $\mu$ -CT-Auswertung von einer DBA/2 Maus unter Hochphosphatdiät mit Nephrokalzinose

### 3.2 CD3 Depletion verschlechtert Nierenverkalkung

Um die Rolle der Entzündungszellen und insbesondere der T Zellen in der Progression der Nierenverkalkung näher zu untersuchen, behandelten wir 10 weibliche DBA/2 Mäuse mit 10 µg Anti CD3 Antikörper an 5 aufeinander folgenden Tagen. Als Kontrolle erhielten 10 weitere DBA/2 Mäuse in der Vergleichsgruppe einen entsprechenden Isotyp Antikörper. Nach dieser Vorbehandlung erhielten beide Gruppen, die CD3 depletierten Tiere und die Isotyp Kontrollgruppe, eine identische Hochphosphatdiät für 9 Tage. So wurde eine mögliche Auswirkung durch die Zusammensetzung der Diät auf das Ausmaß der Nierenverkalkung ausgeschlossen. Nach 9 Tagen wurden die Mäuse anästhesiert und durch Genickbruch getötet. Die Durchflusszytometrie der unmittelbar angefertigten Einzelzellsuspension der Milz zeigte die Wirksamkeit und den Umfang der T Zell Depletion (Bild 8A).

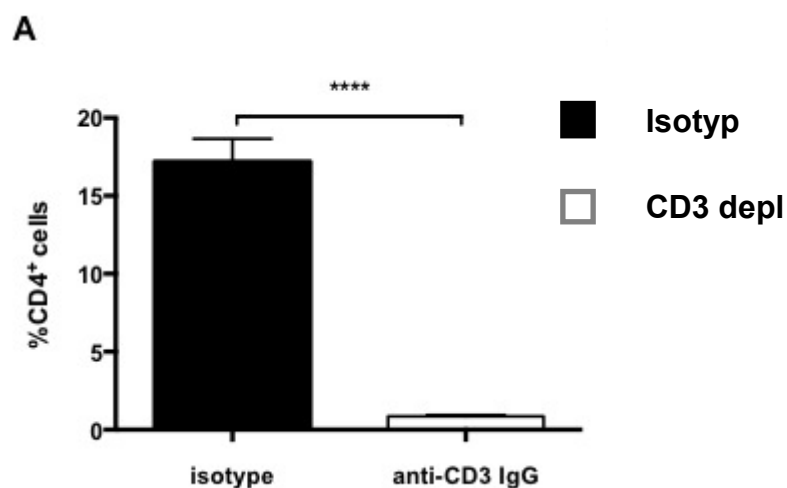


Abb.8A Überprüfung der T-Zell Depletion mittels Durchflusszytometrie; Isotyp vs. CD3 Depletion

Herzen und Nieren wurden entnommen und hinsichtlich einer ektopen Verkalkung radiologisch und histopathologisch evaluiert. Die im Mikro-CT angefertigten Bilder der explantierten Nieren erlaubten uns, den Schweregrad der Nierenverkalkung durch die Messung der absoluten und relativen Menge des röntgendichten Gewebes in den Organen zu quantifizieren (Bild 8B).

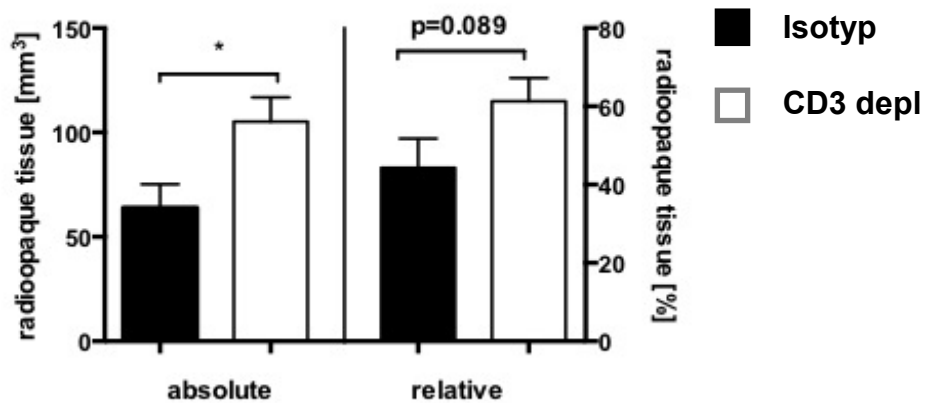
**B**

Abb.8B Absolute und relative Menge der Nephrokalzinose in Abhängigkeit von der T-Zelldepletion im  $\mu$ CT; Isotyp (schwarzer Balken) vs. CD3 Depletion (weißer Balken)

Interessanterweise zeigten die CD3 depletierten DBA/2 Mäusen eine signifikante Verschlechterung der akuten Phosphatnephropathie mit einem deutlich höheren Prozentsatz von röntgendichtem Nierengewebe im Vergleich zur Isotyp Kontrollgruppe ( $44,3\pm 7,5\%$  vs.  $61,3\pm 5,9\%$ ;  $p=0,022$ ; Bild 8B). Semiquantitative histopathologische Evaluationen mit einer Alizarin Rot Färbung bestätigen unabhängig diese radiologischen Messungen (Bild 8C).

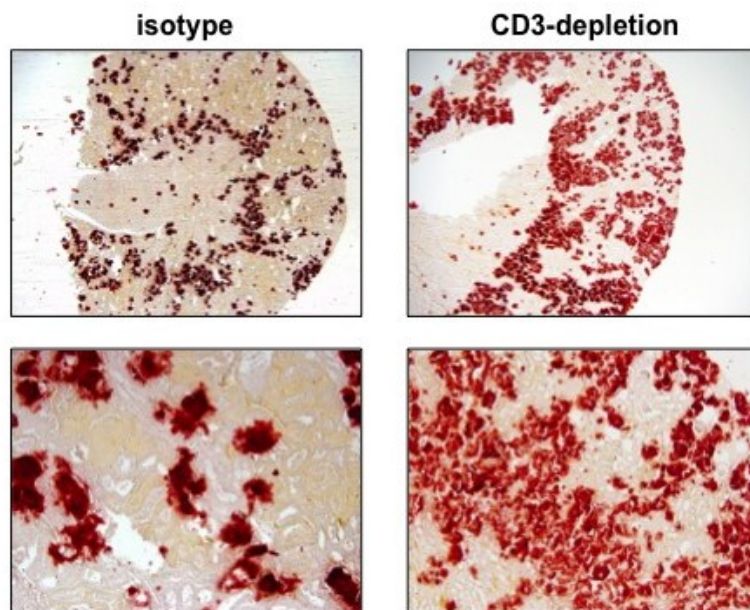
**C**

Abb.8C Nephrokalzinose in Abhängigkeit von der T-Zell Depletion in der Alizarin Rot Färbung

Die chemischen Analysen der verkalkten Nieren mittels Massenspektrometrie zeigten eine signifikant höhere renale Phosphatablagerung in den CD3 depletierten DBA/2 Mäusen als in der Isotyp Kontrollgruppe der DBA/2 Mäuse ( $66,7 \pm 5,9$  vs.  $49,7 \pm 5,4$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  Trockengewicht;  $n=10$  pro Gruppe;  $p=0,048$ ), wohingegen die renale Kalziummenge zwischen den beiden Gruppen statistisch nicht unterschiedlich war ( $105,1 \pm 11,3$  vs.  $73,0 \pm 10,6$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  Trockengewicht;  $p=0,055$ ). Insgesamt resultierte die systemische Depletion der T Zellen in einem erhöhten Schweregrad der akuten Phosphatnephropathie.

### 3.3 Tregs schützen vor Nierenverkalkung

Als nächsten Schritt untersuchten wir, welche T Zell Subpopulationen an der Progression der akuten Phosphatnephropathie beteiligt sein könnte und warfen dabei wegen ihrer antiinflammatorischen Eigenschaften ein besonderes Augenmerk auf die regulatorischen T Zellen (Tregs).

Dazu wurden 15 weibliche DBA/2 Mäuse mit einer intraperitonealen Injektion mit einem Treg depletierten Anti-CD25 Antikörper behandelt. Daneben gab es wieder eine Isotyp Kontrollgruppe mit weiteren 15 DBA/2 Mäusen. Nach dieser Vorbehandlung wurden beide Gruppen wieder für 9 Tage auf eine Hochphosphatdiät gesetzt. Die Mäuse wurden nach 9 Tagen anästhesiert und durch eine zervikale Dislokation getötet. Um die Wirksamkeit und den Umfang der Treg Depletion zu kontrollieren, wurde wiederum eine Durchflusszytometrie mit einer Einzelzellsuspension von Milzzellen durchgeführt (Bild 9A).

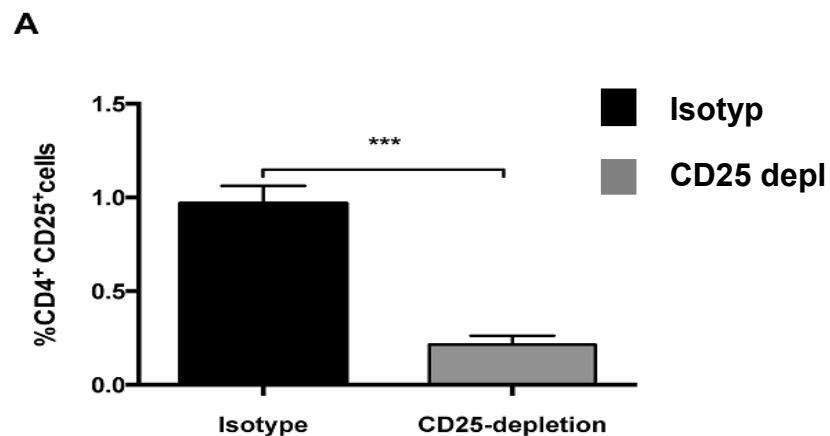


Abb.9A Überprüfung CD25 Depletion anhand Durchflusszytometrie, Isotyp (schwarzer Balken) vs. CD25 Depletion (grauer Balken)

Des Weiteren wurde Nieren- und Herzgewebe auf ektope Verkalkungen evaluiert. Die Depletion der Tregs resultierte in einer höheren prozentuellen Anteil der Nierenverkalkung im Vergleich zur Isotyp Kontrollgruppe ( $47,3 \pm 4,6\%$  vs.  $59,9 \pm 3,2\%$ ;  $n=15$  Mäuse pro Gruppe;  $p=0,039$ ; Bild. 9B).

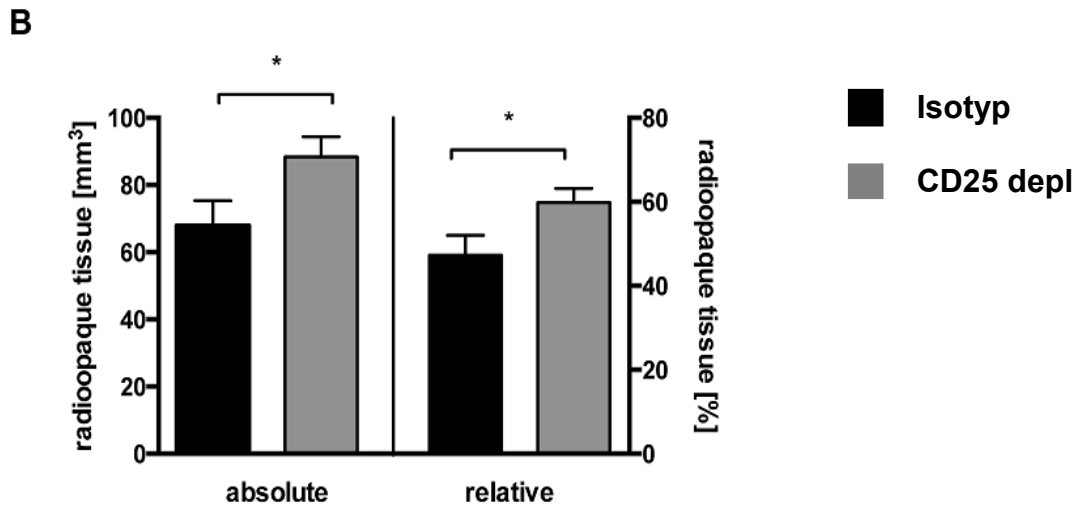


Abb.9B Absolute und relative Menge der Nephrokalzinose in Abhängigkeit von der Treg Depletion; Isotyp (schwarzer Balken) vs. CD25 Depletion (grauer Balken)

Eine semiquantitative Auswertung mit einer Alizarin Rot Färbung bestätigte unabhängig diese radiologische Messungen (Bild

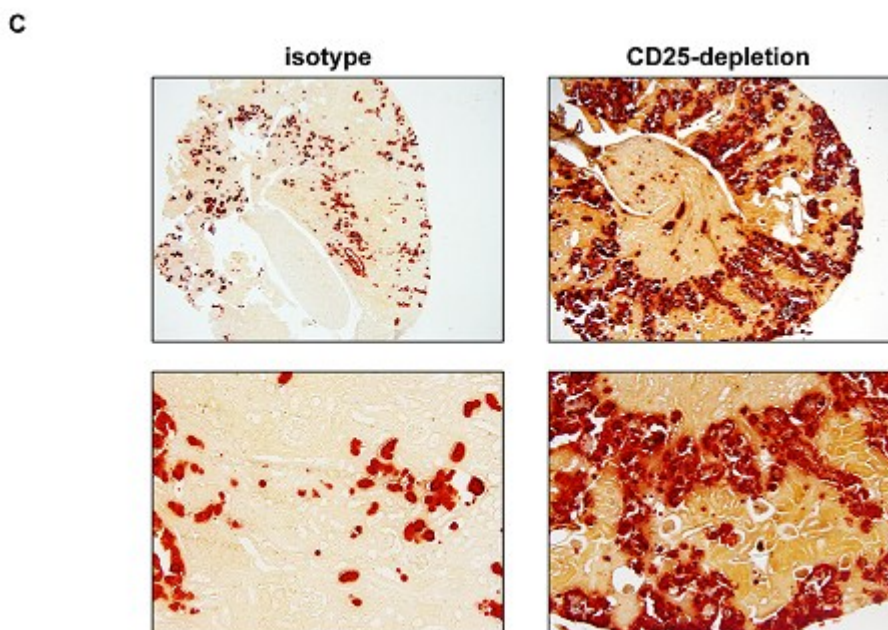


Abb.9C Nephrokalzinose in Abhängigkeit von der Treg Depletion in der Alizarin Rot Färbung

Die chemischen Analysen der verkalkten Nieren mittels Massenspektrometrie zeigten eine signifikant höhere Menge an Phosphat in den CD25 depletierten DBA/2 Mäusen im Vergleich zur Isotyp Kontrollgruppe ( $72,1 \pm 4,6$  vs.  $57,1 \pm 3,7$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  Trockengewicht;  $n=5$  pro Gruppe;  $p=0,045$ ), wohingegen die renale Kalziummenge statistisch zwischen beiden Gruppen nicht unterschiedlich war ( $128,4 \pm 11,4$  vs.  $94,5 \pm 8,8$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  Trockengewicht;  $p=0,060$ ). Die systemische Depletion der Tregs ging einher mit einer signifikant niedrigeren mRNA Expression von *Foxp3* und *Gata3* im Nierengewebe (Bild 9D) und mit einer signifikant höheren FGF23 Konzentration im Serum (Bild 9E).

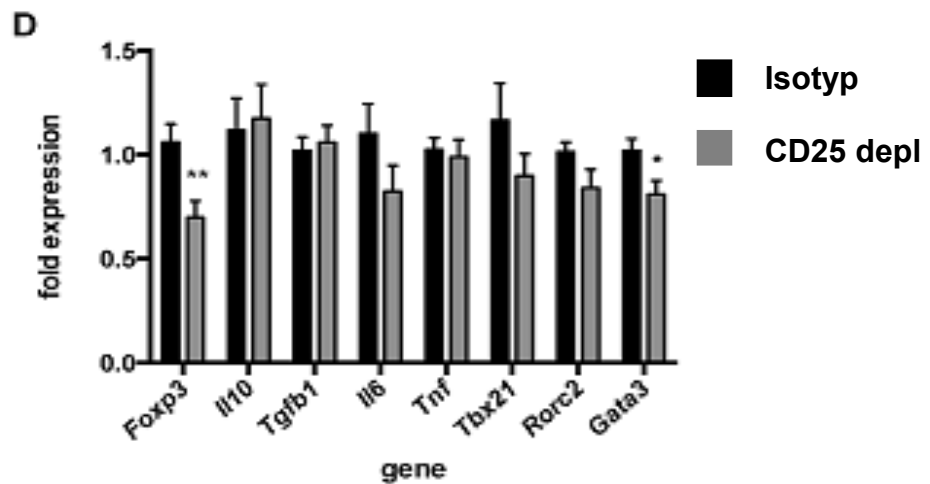


Abb.9D mRNA Expression in der Niere in Abhängigkeit von der Treg Depletion, Isotyp (schwarzer Balken) vs. CD25 Depletion (grauer Balken)

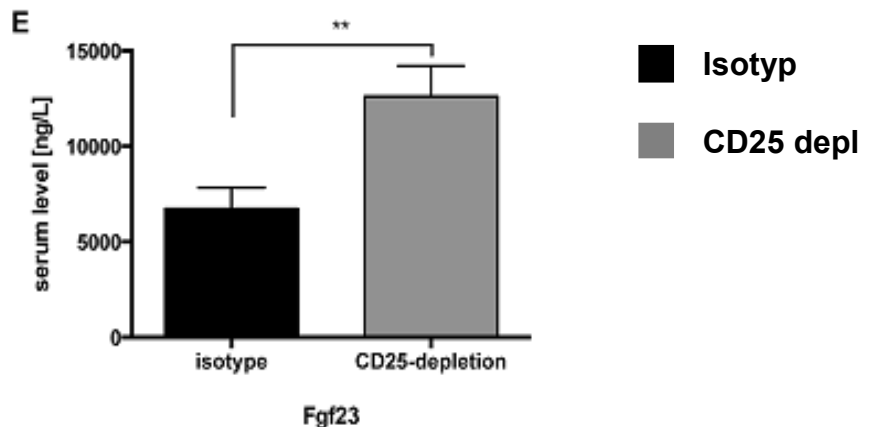


Abb.9E FGF23 Konzentration im Serum in Abhängigkeit von der Treg Depletion, Isotyp (schwarzer Balken) vs. CD25 Depletion (grauer Balken)

Foxp3 ist der Hauptregulator der Entwicklung und Funktion der Tregs, wohingegen Gata3 der Hauptregulator der TH2 Zell Differenzierung ist. Somit bestätigte die niedrige renale mRNA Expression von *Foxp3* in den Treg depletierten Tieren den Effekt und die Dauer der Treg Depletion, während die niedrige *Gata3* Expression in den Treg depletierten Tieren eine Verschiebung von einer TH2- zu einer TH1-lastigen Immunantwort anzeigte. Zudem fanden wir eine signifikante negative Korrelation von *Gata3* Expression mit der Nierenverkalkung in allen untersuchten Versuchstieren unabhängig von der durchgeführten Immunomodulation ( $r=-0,3$ ;  $p=0,037$ ;  $n=49$ ). Es gab keine signifikanten Unterschiede in den Serumparametern wie Harnstoff, Parathormon, Kalzium oder Phosphat zwischen den Treg depletierten DBA/2 Mäusen und der Isotyp Kontrollgruppe (Tabelle 1).

	Control n=9	CD3 depletion N=10		Control n=15	CD25 depletion n=15	
<b>Harnstoff (mg/dL)</b>	190±24	199±14	n.s.	265±31	292±35	n.s.
<b>Calcium (mmol/L)</b>	1,6±0,1	1,5±0,1	n.s.	2,9±0,2	3,3±0,3	n.s.
<b>Phosphor (mmol/L)</b>	5,4±0,5	4,4±0,4	n.s.	6,3±0,6	6,7±0,8	n.s.
<b>Ca x P (mmol<sup>2</sup>/L<sup>2</sup>)</b>	8,1±1,4	5,8±0,9	n.s.	19,5±3,0	25,3±5,0	n.s.
<b>Fgf23 (ng/L)</b>	5141±806	5426±1017	n.s.	6736±1068	12617±1545	0,005
<b>Pth (ng/L)</b>	563±72	1015±275	n.s.	984±225	1059±162	n.s.

Tabelle1: Biochemische Serumparameter der DBA/2 Mäuse auf Hochphosphatdiät

Um die morphologische Auswertung der Nierenverkalkung auch mit funktionellen Messungen der Nierenfunktion bzw. der Nierenschädigung zu hinterlegen, bestimmten wir als nächstes das neutrophile Gelatinase-assoziierte Lipocalin 2 (Lcn2) im Harn. Lcn2 ist ein sensibler Marker der akuten Nierenschädigung. DBA/2 Mäuse waren nach 9 Tagen Hochphosphatdiät anurisch. Aus diesem Grund sammelten wir 3 Tage nach Beginn der Hochphosphatdiät Urin von den Treg depletierten Mäusen und den Isotyp Kontrollen und bestimmten daraus den Lcn2/Kreatinin Quotienten. Interessanterweise fanden wir eine signifikant höhere Lcn2/Kreatinin Quotienten bei den Treg depletierten DBA/2 Mäusen im Vergleich zur Isotyp Kontrollgruppe ( $9,03 \pm 3,05 \mu\text{g}/\text{mg}$  vs.  $1,99 \pm 0,47 \mu\text{g}/\text{mg}$ ;  $p=0,029$ ), was gut zu unserer morphologischen Auswertung der Nierenverkalkung mit micro-CT und histopathologischen Färbungen passte (Bild 9F).

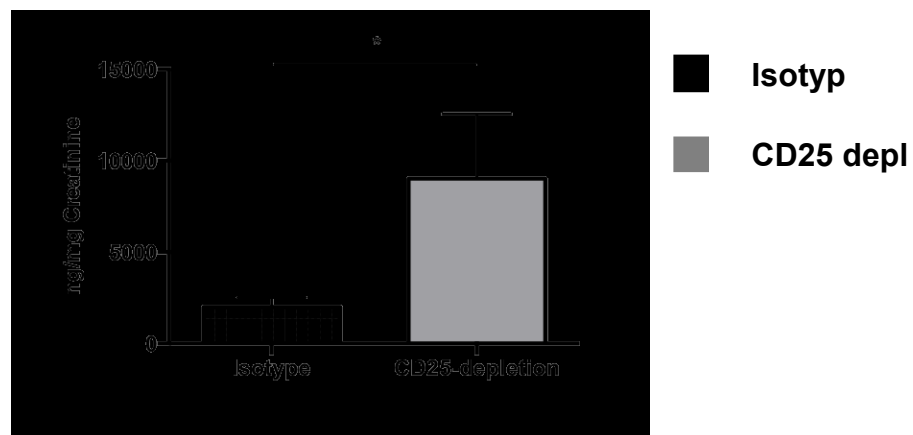


Bild 9F Bestimmung neutrophiles Gelatinase assoziiertes Lipocalin 2(LCN2)/Kreatinin Quotient in Urin der CD25 depletierten DBA/2 Mäuse

### 3.4 Einfluss von Hochphosphatdiät auf Herzverkalkung

Als nächstes untersuchten wir den kardiovaskulären Phänotyp und insbesondere den Einfluss der Immunmodulation auf die Überlebensrate von DBA/2 Mäusen unter phosphatreicher Kost. Dafür depletierten wir erneut selektiv die T Zellen beziehungsweise die Tregs der DBA/2 Mäuse und setzten die Tiere auf eine Hochphosphatdiät. Sowohl die T Zell Depletion als auch die Treg Depletion der DBA/2 Mäuse führte in DBA/2 Mäusen zu einer signifikant erhöhten Mortalitätsrate im Vergleich zu der Isotyp Kontrollgruppe ( $p=0,004$ ; Bild 10A).

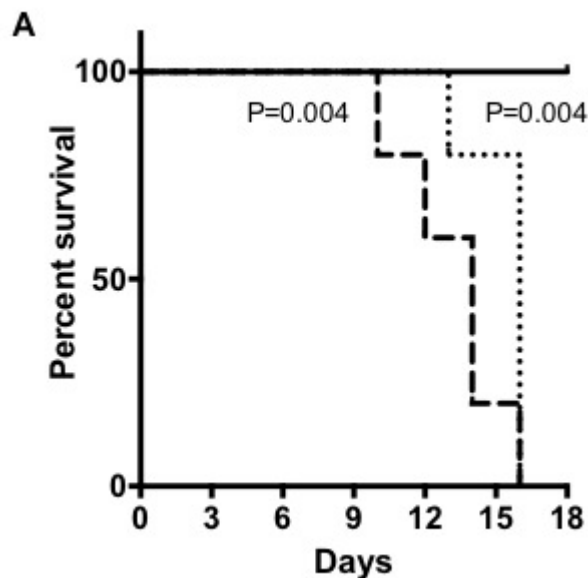


Abb.10A Überlebenskurve von T-Zell depletierten (gestrichelte Linie), Treg depletierten (gepunktete Linie) und Isotyp Kontrollen (durchlaufende Linie) DBA/2 Mäusen unter Hochphosphatdiät

DBA/2 Mäuse entwickelten neben der akuten Phosphatnephropathie auch eine dystrophe Herzverkalkung (Bild 10B und 10C).

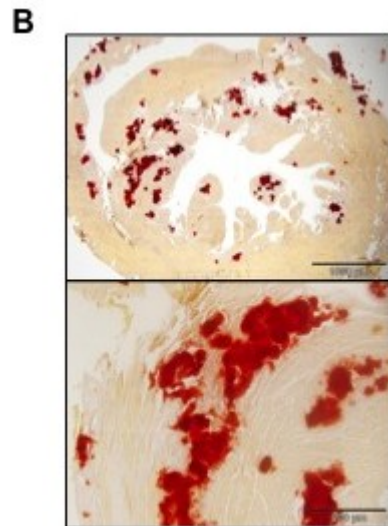


Abb.10B Dystrophe Herzverkalkung unter Hochphosphatdiät in der Alizarin Rot Färbung

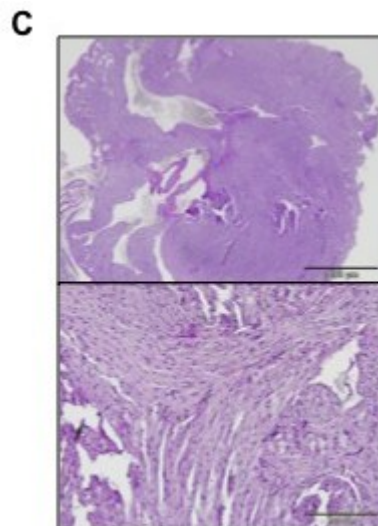


Abb.10C Dystrophe Herzverkalkung unter Hochphosphatdiät in der PAS Färbung

Um den Einfluss dieser Herzverkalkung auf die Erregungsübertragung im Herzen zu untersuchen, führten wir als nächstes eine kontinuierliche telemetrische elektrokardiographische Messung durch. Mit diesen telemetrischen EKG Aufzeichnungen von DBA/2 Mäusen unter Hochphosphatdiät konnten wir zeigen, dass die dystrophe Herzverkalkung mit negativen chronotropen und negativen dromotropen Effekten assoziiert ist (Bild 10D).

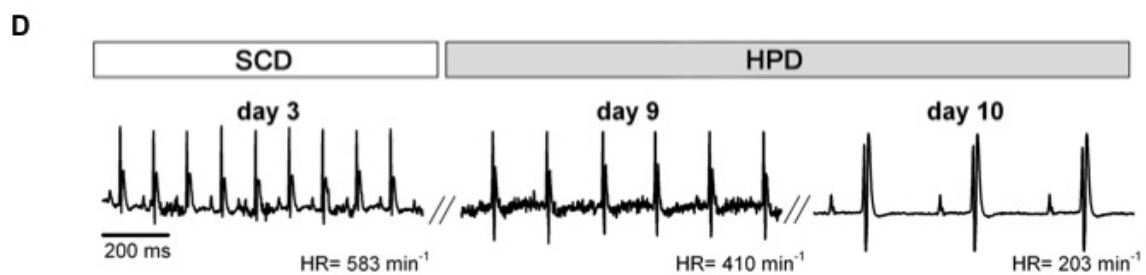


Abb.10D: Telemetrische EKG Aufzeichnung in DBA/2 Mäusen unter Hochphosphatdiät

Die kontinuierlichen EKG Aufzeichnungen zeigten initial einen normalen Sinusrhythmus. Mit zunehmender Dauer der phosphatreichen Kost kam es zu einer sukzessiven Abnahme der Herzfrequenz, einer allmählichen Verlängerung der atrioventrikulären Überleitung und letztendlich höhergradigen atrioventrikulären Blockbildern. Die explantierten Herzen wurden mittels  $\mu$ CT analysiert und der Schweregrad der Herzverkalkung in 3D Rekonstruktionen quantifiziert. Im Unterschied zur Nierenverkalkung wurde die Herzverkalkung in den CD3 depletierten und CD25 depletierten DBA/2 Mäusen nicht signifikant verändert (Bild 10E und 10F).

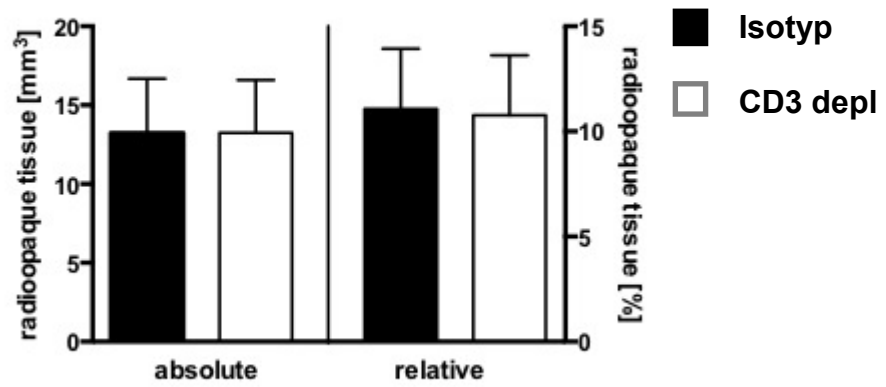
**E**

Abb.10E Absolute und relative Menge der dystrophen Herzverkalkung in Abhängigkeit von der T Zell Depletion, Isotyp (schwarzer Balken) vs. CD3 Depletion (weißer Balken)

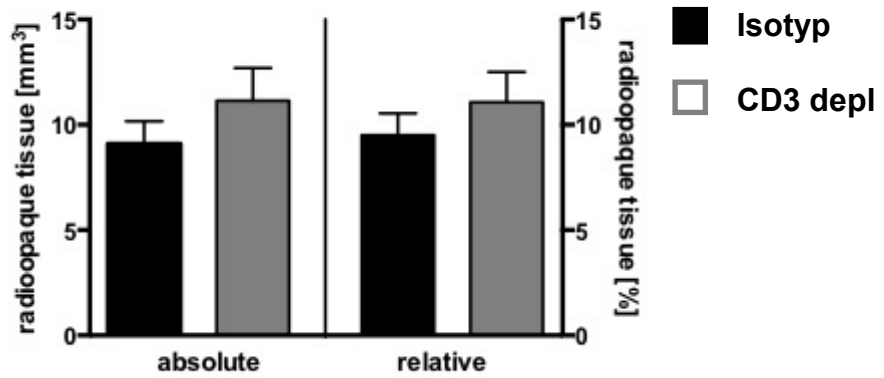
**F**

Abb.10F Absolute und relative Menge der dystrophen Herzverkalkung in Abhängigkeit von der Treg Depletion; Isotyp (schwarzer Balken) vs. CD25 Depletion (grauer Balken)

### 3.6 Einfluss von Hochphosphatdiät auf die Mediaverkalkung

Zu guter letzt untersuchten wir auch den Einfluss von Hochphosphatdiät auf die Mediaverkalkung in unserem Tiermodell. Während DBA/2 Mäuse unter Standarddiät innerhalb unseres Beobachtungszeitraums keine Mediaverkalkung der Aorta entwickelten, fand sich insbesondere in der abdominellen Aorta unter Hochphosphatdiät sowohl in histopathologischen Färbungen wie auch in massenspektrometrischen Analysen ein signifikant höheres Ausmaß der ektopen Verkalkung (Bild 11 A und 11B).

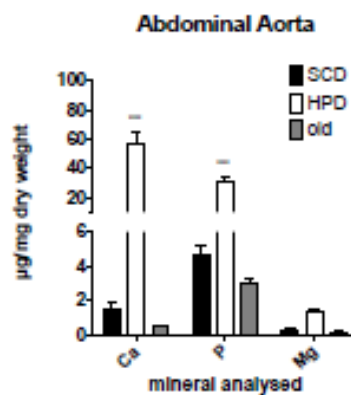


Abb.11A Massenspektrometrische Messung der Gewebskonzentration von Kalzium (Ca), Phosphor (P) und Magnesium (Mg) in der abdominellen Aorta von DBA/2 Mäusen unter Hochphosphatdiät (HPD), Standarddiät (SCD) und alten Kontrollen (old).

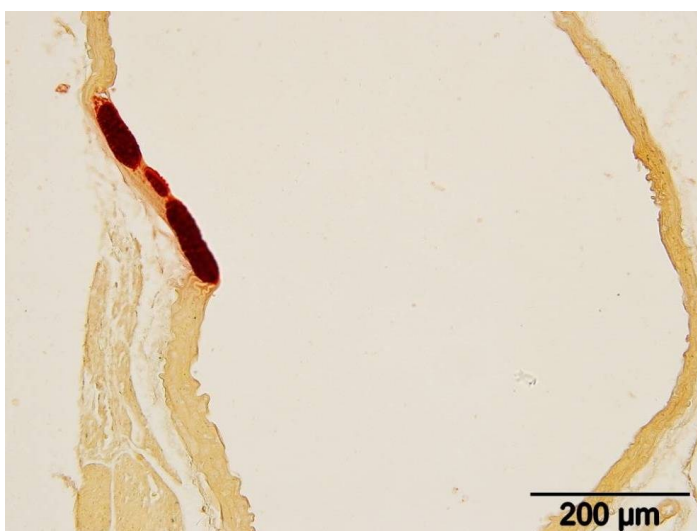


Abb.11B Mediaverkalkung der abdominellen Aorta in der Alizarin Rot Färbung

## Diskussion

Ähnlich wie bei den anderen Kristallopathien wurde die akute Phosphatnephropathie früher als passive Ablagerung durch übersättigte Ionenprodukte angesehen, wo Entzündungen nur ein unwesentliches Begleitphänomen ist. Unsere Daten weisen hingegen darauf hin, dass der Verlauf der akuten Phosphatnephropathie aktiv durch entzündliche Reperaturmechanismen moduliert werden, die zu Gewebeumbau, aberranter Kalziumablagerung und letztendlich zum Verlust von funktionsfähigem Nierenparenchym führen. Die vorliegenden Ergebnisse sind auch konform zu den Daten von Mulay *et al.*, die zeigten, dass akute Oxalatnephropathie therapeutisch durch IL-1 Antagonisten vermindert wird. (85) Somit ist die Nephrokalzinose nicht nur eine passive Präzipitation durch übersättigte Ionenprodukte, sondern ein aktiv modulierter Prozess mit Gewebeumbau, bei dem die Entzündung nicht nur ein Begleitphänomen ist. Aktuell richtet sich die Behandlung der Nephrokalzinose nach der zugrundeliegenden Ursache. Immunmodulation könnte diesen therapeutischen Ansatz einfach ergänzen und die schädliche Nierenentzündung, den Gewebeumbau, den Verlust des funktionsfähigen Nierenparenchyms und die chronische Nierenerkrankung zurückhalten.

Naive CD4 positive T-Zellen können in eine der vielen Phänotypen der verschiedenen T-Helferzellen (TH) differenzieren, wie z.B. zu TH1, TH2 oder zu Tregs. Jeder dieser Zelllinien hat gezeigt, dass sie über verschiedene Transkriptionsmarker reguliert werden, unterschiedliche Zytokine bilden und in den unterschiedlichen pathologischen Prozessen schädliche und protektive Rollen spielen. (86) Bei uns spielen die T-Zellen und besonders die regulatorischen T-Zellen (Tregs) eine zentrale Rolle in der Kontrolle der Entzündungsreaktion in der Niere während der akuten Phosphatnephropathie und damit in der Entstehung der Nephrokalzinose.

In den Treg depletierten Tieren kam es zu einer Verschiebung der TH2 zu TH1 Antwort, die sich in einer signifikanten Abnahme der renalen mRNA Expression des Hauptregulators der TH2 Differenzierung GATA3 widerspiegelt. Darüber hinaus fanden wir eine signifikant umgekehrte Korrelation der GATA3 Transkriptionslevel mit dem Grad der Nierenverkalkung, die weiter unsere Hypothese bestätigt, dass die TH2 Zelllinie eine Rolle beim Schutz vor abnormer Verkalkung spielt. Die Treg Depletion führte nicht nur zu einer erhöhten

Nierenverkalkung, wie uns im Mikro CT per Kalziumwert angezeigt wurde, sondern zu einem erhöhten FGF23 Serumwert. Die erhöhten FGF23 Serumkonzentrationen widerspiegeln höchstwahrscheinlich den Grad der Nierenschädigung in den Treg depletierten Mäusen.

Der beschleunigte Verlauf der akuten Phosphatnephropathie unter der Treg Depletion war mit einer signifikant erhöhten Mortalitätsrate assoziiert. Somit bestätigen die aktuellen Daten frühere Studien, die gezeigt haben, dass erhöhte FGF23 Serumwerte mit einem erhöhten Risiko für eine terminale Niereninsuffizienz und für das Sterben chronisch kranker Nierenpatienten assoziiert ist. (87, 88) Bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung gab es auch einen Zusammenhang von FGF23 mit linksventrikulärer Dysfunktion (89, 90), vaskulärer Dysfunktion (91) und höherer Entzündungsmarker. (92) In unserem Tiermodell ergab die kontinuierliche telemetrische EKG Aufzeichnung der DBA/2 Mäuse, die an Nephrokalzinose und dystropher kardialer Verkalkung erkrankt sind, eine negative Chrono- und Dromotropie, die letztlich zum Herzstillstand und somit zum Tod geführt haben. Allerdings erlaubt der vorliegende Versuchsansatz keine direkten Rückschlüsse, ob der erhöhte FGF23 Serumspiegel diese elektrophysiologischen Effekte direkt vermittelt.

Die unterschiedliche Regulation abnormaler Verkalkung in Herz und Niere erklärt sich nicht aus der vorliegenden Versuchsanordnung und zeigt, dass der komplexe pathologische Prozess der ektopen Verkalkung offensichtlich in unterschiedlichen Organen unterschiedlich reguliert ist (93-95). Somit können die vorliegenden Daten unseres Mausstammes nicht einfach generalisiert und auf andere Mäusestämme übertragen werden.

In der vorliegenden Diplomarbeit konnte somit bestätigt werden, dass der Gewebeumbau in der Nephrokalzinose durch eine Entzündungsreaktion begleitet wird (85, 96) und dass der Grad der ektopen Kalziumablagerung von dieser entzündlichen Reaktion moduliert wird. Darüber hinaus deuten unsere Daten darauf hin, dass die T-Zellen und insbesondere die regulatorischen T-Zellen bei der Progression der Nephrokalzinose eine zentrale Rolle spielen, und unterstreichen die Tatsache, dass die lokale Entzündungsreaktion die ektopye Verkalkung verschlechtert. Auch zeigen unsere präliminären Daten zur arteriellen Mediverkalkung, dass diese ähnlich wie die Nephrokalzinose und die dystrophe Herzverkalkung durch phosphatreiche Diät getriggert wird. Es bedarf weiterer

experimenteller Untersuchungen um zu klären, inwieweit eine Immunmodulation auch die Progression der arteriellen Mediaverkalkung beeinflusst.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Czermack. Beschreibung und mikroskopische Untersuchungen von Mumien. . ECHO-European Cultural Heritage Online. 1879;Band 1:114-56.
2. Mönckeberg JG. Über die reine Mediaverkalkung der Extremitätenarterien und ihr Verhalten zur Arteriosklerose. Virchows Arch path Anat. 1903 1903/01/01;171(1):141-67. German.
3. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. Circulation. 1999 Nov 23;100(21):2168-76. PubMed PMID: 10571976.
4. Moe SM, O'Neill KD, Duan D, Ahmed S, Chen NX, Leapman SB, et al. Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. Kidney international. 2002 Feb;61(2):638-47. PubMed PMID: 11849407.
5. Vattikuti R, Towler DA. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. American journal of physiology Endocrinology and metabolism. 2004 May;286(5):E686-96. PubMed PMID: 15102615.
6. Hruska KA, Mathew S, Saab G. Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. Circulation research. 2005 Jul 22;97(2):105-14. PubMed PMID: 16037577.
7. Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. Circulation. 2008 Jun 3;117(22):2938-48. PubMed PMID: 18519861.
8. Sage AP, Lu J, Tintut Y, Demer LL. Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro. Kidney international. 2011 Feb;79(4):414-22. PubMed PMID: 20944546. Pubmed Central PMCID: 3198856.
9. Zhu D, Mackenzie NC, Millan JL, Farquharson C, MacRae VE. The appearance and modulation of osteocyte marker expression during calcification of vascular smooth muscle cells. PloS one. 2011;6(5):e19595. PubMed PMID: 21611184. Pubmed Central PMCID: 3096630.

10. Fuchs U, Caffier P, Schulz HG, Wieniecki P. Arterial calcification in diabetics. *Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histopathology*. 1985;407(4):431-9. PubMed PMID: 3931343.
11. Sangiorgi G, Rumberger JA, Severson A, Edwards WD, Gregoire J, Fitzpatrick LA, et al. Arterial calcification and not lumen stenosis is highly correlated with atherosclerotic plaque burden in humans: a histologic study of 723 coronary artery segments using nondecalcifying methodology. *Journal of the American College of Cardiology*. 1998 Jan;31(1):126-33. PubMed PMID: 9426030.
12. Allison MA, Criqui MH, Wright CM. Patterns and risk factors for systemic calcified atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004 Feb;24(2):331-6. PubMed PMID: 14656730.
13. Goodman WG, London G, Amann K, Block GA, Giachelli C, Hruska KA, et al. Vascular calcification in chronic kidney disease. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2004 Mar;43(3):572-9. PubMed PMID: 14981617.
14. Reaven PD, Sacks J, Investigators for the V. Coronary artery and abdominal aortic calcification are associated with cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2005 Feb;48(2):379-85. PubMed PMID: 15688207.
15. Shroff RC, Shanahan CM. The vascular biology of calcification. *Seminars in dialysis*. 2007 Mar-Apr;20(2):103-9. PubMed PMID: 17374082.
16. Kestenbaum BR, Adeney KL, de Boer IH, Ix JH, Shlipak MG, Siscovick DS. Incidence and progression of coronary calcification in chronic kidney disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Kidney international*. 2009 Nov;76(9):991-8. PubMed PMID: 19692998. Pubmed Central PMCID: 3039603.
17. Kelly RP, Tunin R, Kass DA. Effect of reduced aortic compliance on cardiac efficiency and contractile function of in situ canine left ventricle. *Circulation research*. 1992 Sep;71(3):490-502. PubMed PMID: 1386792.
18. Watanabe H, Ohtsuka S, Kakihana M, Sugishita Y. Decreased aortic compliance aggravates subendocardial ischaemia in dogs with stenosed coronary artery. *Cardiovascular research*. 1992 Dec;26(12):1212-8. PubMed PMID: 1288867.
19. Ohtsuka S, Kakihana M, Watanabe H, Sugishita Y. Chronically decreased aortic distensibility causes deterioration of coronary perfusion during increased left

- ventricular contraction. *Journal of the American College of Cardiology*. 1994 Nov 1;24(5):1406-14. PubMed PMID: 7930267.
20. Arad Y, Spadaro LA, Goodman K, Newstein D, Guerci AD. Prediction of coronary events with electron beam computed tomography. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000 Oct;36(4):1253-60. PubMed PMID: 11028480.
21. Rosenhek R, Binder T, Porenta G, Lang I, Christ G, Schemper M, et al. Predictors of outcome in severe, asymptomatic aortic stenosis. *The New England journal of medicine*. 2000 Aug 31;343(9):611-7. PubMed PMID: 10965007.
22. Keelan PC, Bielak LF, Ashai K, Jamjoum LS, Denktas AE, Rumberger JA, et al. Long-term prognostic value of coronary calcification detected by electron-beam computed tomography in patients undergoing coronary angiography. *Circulation*. 2001 Jul 24;104(4):412-7. PubMed PMID: 11468202.
23. Wayhs R, Zelinger A, Raggi P. High coronary artery calcium scores pose an extremely elevated risk for hard events. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002 Jan 16;39(2):225-30. PubMed PMID: 11788211.
24. Ford ES, Ajani UA, Croft JB, Critchley JA, Labarthe DR, Kottke TE, et al. Explaining the decrease in U.S. deaths from coronary disease, 1980-2000. *The New England journal of medicine*. 2007 Jun 7;356(23):2388-98. PubMed PMID: 17554120.
25. Amann K. Media calcification and intima calcification are distinct entities in chronic kidney disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2008 Nov;3(6):1599-605. PubMed PMID: 18815240.
26. London GM, Guerin AP, Marchais SJ, Metivier F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2003 Sep;18(9):1731-40. PubMed PMID: 12937218.
27. Anderson HC, Stechschulte DJ, Jr., Collins DE, Jacobs DH, Morris DC, Hsu HH, et al. Matrix vesicle biogenesis in vitro by rachitic and normal rat chondrocytes. *The American journal of pathology*. 1990 Feb;136(2):391-8. PubMed PMID: 2305834. Pubmed Central PMCID: 1877418.
28. Nahar NN, Missana LR, Garimella R, Tague SE, Anderson HC. Matrix vesicles are carriers of bone morphogenetic proteins (BMPs), vascular endothelial

growth factor (VEGF), and noncollagenous matrix proteins. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2008;26(5):514-9. PubMed PMID: 18758911.

29. 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. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2006 Dec;21(12):3435-42. PubMed PMID: 17005530.

30. Kapustin AN, Davies JD, Reynolds JL, McNair R, Jones GT, Sidibe A, et al. Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization. *Circulation research*. 2011 Jun 24;109(1):e1-12. PubMed PMID: 21566214.

31. Sevinc Ok E, Asci G, Kircelli F, Duman S, Dheir H, Sezis Demirci M, et al. Relationship between glucose exposure via peritoneal dialysis solutions and coronary artery calcification in non-diabetic peritoneal dialysis patients. *International urology and nephrology*. 2012 Dec;44(6):1847-53. PubMed PMID: 22350838.

32. Tintut Y, Patel J, Parhami F, Demer LL. Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation*. 2000 Nov 21;102(21):2636-42. PubMed PMID: 11085968.

33. Lencel P, Delplace S, Pilet P, Leterme D, Miellot F, Sourice S, et al. Cell-specific effects of TNF-alpha and IL-1beta on alkaline phosphatase: implication for syndesmophyte formation and vascular calcification. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2011 Oct;91(10):1434-42. PubMed PMID: 21555997.

34. Kirton JP, Wilkinson FL, Canfield AE, Alexander MY. Dexamethasone downregulates calcification-inhibitor molecules and accelerates osteogenic differentiation of vascular pericytes: implications for vascular calcification. *Circulation research*. 2006 May 26;98(10):1264-72. PubMed PMID: 16627786.

35. Helas S, Goettsch C, Schoppet M, Zeitz U, Hempel U, Morawietz H, et al. Inhibition of receptor activator of NF-kappaB ligand by denosumab attenuates vascular calcium deposition in mice. *The American journal of pathology*. 2009 Aug;175(2):473-8. PubMed PMID: 19590040. Pubmed Central PMCID: 2716948.

36. Radcliff K, Tang TB, Lim J, Zhang Z, Abedin M, Demer LL, et al. Insulin-like growth factor-I regulates proliferation and osteoblastic differentiation of calcifying

vascular cells via extracellular signal-regulated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Circulation research*. 2005 Mar 4;96(4):398-400. PubMed PMID: 15692088.

37. Nakahara T, Sato H, Shimizu T, Tanaka T, Matsui H, Kawai-Kowase K, et al. Fibroblast growth factor-2 induces osteogenic differentiation through a Runx2 activation in vascular smooth muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010 Apr 2;394(2):243-8. PubMed PMID: 19903460.

38. Shimizu T, Tanaka T, Iso T, Matsui H, Ooyama Y, Kawai-Kowase K, et al. Notch signaling pathway enhances bone morphogenetic protein 2 (BMP2) responsiveness of Msx2 gene to induce osteogenic differentiation and mineralization of vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*. 2011 May 27;286(21):19138-48. PubMed PMID: 21471203. Pubmed Central PMCID: 3099727.

39. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, et al. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2004 Nov;15(11):2857-67. PubMed PMID: 15504939.

40. Murshed M, Harmey D, Millan JL, McKee MD, Karsenty G. Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes & development*. 2005 May 1;19(9):1093-104. PubMed PMID: 15833911. Pubmed Central PMCID: 1091743.

41. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*. 1997 Mar 6;386(6620):78-81. PubMed PMID: 9052783.

42. Harmey D, Hesse L, Narisawa S, Johnson KA, Terkeltaub R, Millan JL. Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by *akp2*, *enpp1*, and *ank*: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders. *The American journal of pathology*. 2004 Apr;164(4):1199-209. PubMed PMID: 15039209. Pubmed Central PMCID: 1615351.

43. Jahnke-Dechent W, Heiss A, Schafer C, Ketteler M. Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. *Circulation research*. 2011 Jun 10;108(12):1494-509. PubMed PMID: 21659653.

44. Canfield AE, Farrington C, Dziobon MD, Boot-Handford RP, Heagerty AM, Kumar SN, et al. The involvement of matrix glycoproteins in vascular calcification and fibrosis: an immunohistochemical study. *The Journal of pathology*. 2002 Feb;196(2):228-34. PubMed PMID: 11793375.
45. Speer MY, McKee MD, Guldberg RE, Liaw L, Yang HY, Tung E, et al. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 2002 Oct 21;196(8):1047-55. PubMed PMID: 12391016. Pubmed Central PMCID: 2194039.
46. Shroff RC, McNair R, Figg N, Skepper JN, Schurgers L, Gupta A, et al. Dialysis accelerates medial vascular calcification in part by triggering smooth muscle cell apoptosis. *Circulation*. 2008 Oct 21;118(17):1748-57. PubMed PMID: 18838561.
47. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebbersold R, et al. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circulation research*. 2001 Dec 7;89(12):1147-54. PubMed PMID: 11739279.
48. Johnson K, Polewski M, van Etten D, Terkeltaub R. Chondrogenesis mediated by PPI depletion promotes spontaneous aortic calcification in NPP1-/- mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005 Apr;25(4):686-91. PubMed PMID: 15625282.
49. Speer MY, Yang HY, Brabb T, Leaf E, Look A, Lin WL, et al. Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circulation research*. 2009 Mar 27;104(6):733-41. PubMed PMID: 19197075. Pubmed Central PMCID: 2716055.
50. Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus JM, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *The Journal of clinical investigation*. 2005 May;115(5):1210-20. PubMed PMID: 15841209. Pubmed Central PMCID: 1077175.
51. Johnson KA, Polewski M, Terkeltaub RA. Transglutaminase 2 is central to induction of the arterial calcification program by smooth muscle cells. *Circulation research*. 2008 Mar 14;102(5):529-37. PubMed PMID: 18202319. Pubmed Central PMCID: 2652242.

52. Li X, Yang HY, Giachelli CM. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circulation research*. 2006 Apr 14;98(7):905-12. PubMed PMID: 16527991.
53. Narisawa S, Harmey D, Yadav MC, O'Neill WC, Hoylaerts MF, Millan JL. Novel inhibitors of alkaline phosphatase suppress vascular smooth muscle cell calcification. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2007 Nov;22(11):1700-10. PubMed PMID: 17638573.
54. Lomashvili KA, Garg P, Narisawa S, Millan JL, O'Neill WC. Upregulation of alkaline phosphatase and pyrophosphate hydrolysis: potential mechanism for uremic vascular calcification. *Kidney international*. 2008 May;73(9):1024-30. PubMed PMID: 18288101. Pubmed Central PMCID: 3010853.
55. Rutsch F, Ruf N, Vaingankar S, Toliat MR, Suk A, Hohne W, et al. Mutations in ENPP1 are associated with 'idiopathic' infantile arterial calcification. *Nature genetics*. 2003 Aug;34(4):379-81. PubMed PMID: 12881724.
56. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes & development*. 1998 May 1;12(9):1260-8. PubMed PMID: 9573043. Pubmed Central PMCID: 316769.
57. Bennett BJ, Scatena M, Kirk EA, Rattazzi M, Varon RM, Averill M, et al. Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006 Sep;26(9):2117-24. PubMed PMID: 16840715.
58. Matsui I, Hamano T, Mikami S, Fujii N, Takabatake Y, Nagasawa Y, et al. Fully phosphorylated fetuin-A forms a mineral complex in the serum of rats with adenine-induced renal failure. *Kidney international*. 2009 May;75(9):915-28. PubMed PMID: 19190677.
59. Elsayed EF, Tighiouart H, Griffith J, Kurth T, Levey AS, Salem D, et al. Cardiovascular disease and subsequent kidney disease. *Archives of internal medicine*. 2007 Jun 11;167(11):1130-6. PubMed PMID: 17563020.
60. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culeton B, Hamm LL, et al. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and

Epidemiology and Prevention. Hypertension. 2003 Nov;42(5):1050-65. PubMed PMID: 14604997.

61. Foley RN, Parfrey PS. Cardiovascular disease and mortality in ESRD. *Journal of nephrology*. 1998 Sep-Oct;11(5):239-45. PubMed PMID: 9831236.

62. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *The New England journal of medicine*. 2004 Sep 23;351(13):1296-305. PubMed PMID: 15385656.

63. Xue JL, Ma JZ, Louis TA, Collins AJ. Forecast of the number of patients with end-stage renal disease in the United States to the year 2010. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2001 Dec;12(12):2753-8. PubMed PMID: 11729245.

64. Bloembergen WE. Cardiac disease in chronic uremia: epidemiology. *Advances in renal replacement therapy*. 1997 Jul;4(3):185-93. PubMed PMID: 9239424.

65. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1998 Nov;32(5 Suppl 3):S112-9. PubMed PMID: 9820470.

66. Platt R. The Renal Function in Disease. *British medical journal*. 1936 May 16;1(3932):987-90. PubMed PMID: 20779875. Pubmed Central PMCID: 2458749.

67. Chanutin A LS. EXperimental renal insufficiency produced by partial nephrectomy. *Archives of internal medicine*. 1939;64(4):756-66.

68. Ibrahim HN, Rosenberg ME, Hostetter TH. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of renal disease: a critical review. *Seminars in nephrology*. 1997 Sep;17(5):431-40. PubMed PMID: 9316211.

69. Gagliardini E, Conti S, Benigni A, Remuzzi G, Remuzzi A. Imaging of the porous ultrastructure of the glomerular epithelial filtration slit. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010 Dec;21(12):2081-9. PubMed PMID: 21030599. Pubmed Central PMCID: 3014021.

70. Durvasula RV, Petermann AT, Hiromura K, Blonski M, Pippin J, Mundel P, et al. Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain. *Kidney international*. 2004 Jan;65(1):30-9. PubMed PMID: 14675034.

71. Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *The New England journal of medicine*. 1998 Nov 12;339(20):1448-56. PubMed PMID: 9811921.
72. Abbate M, Zoja C, Morigi M, Rottoli D, Angioletti S, Tomasoni S, et al. Transforming growth factor-beta1 is up-regulated by podocytes in response to excess intraglomerular passage of proteins: a central pathway in progressive glomerulosclerosis. *The American journal of pathology*. 2002 Dec;161(6):2179-93. PubMed PMID: 12466133. Pubmed Central PMCID: 1850904.
73. Zeisberg M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010 Nov;21(11):1819-34. PubMed PMID: 20864689.
74. Johnson DW, Saunders HJ, Baxter RC, Field MJ, Pollock CA. Paracrine stimulation of human renal fibroblasts by proximal tubule cells. *Kidney international*. 1998 Sep;54(3):747-57. PubMed PMID: 9734599.
75. Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK. Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1998 Apr;31(4):607-17. PubMed PMID: 9531176.
76. Kestenbaum B, Sampson JN, Rudser KD, Patterson DJ, Seliger SL, Young B, et al. Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2005 Feb;16(2):520-8. PubMed PMID: 15615819.
77. Raggi P. Detection and quantification of cardiovascular calcifications with electron beam tomography to estimate risk in hemodialysis patients. *Clinical nephrology*. 2000 Oct;54(4):325-33. PubMed PMID: 11076109.
78. Block GA, Port FK. Re-evaluation of risks associated with hyperphosphatemia and hyperparathyroidism in dialysis patients: recommendations for a change in management. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2000 Jun;35(6):1226-37. PubMed PMID: 10845841.
79. Jono S, Shioi A, Ikari Y, Nishizawa Y. Vascular calcification in chronic kidney disease. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2006;24(2):176-81. PubMed PMID: 16502129.

80. Berndt T, Kumar R. Novel mechanisms in the regulation of phosphorus homeostasis. *Physiology*. 2009 Feb;24:17-25. PubMed PMID: 19196648.
81. Prie D, Urena Torres P, Friedlander G. Latest findings in phosphate homeostasis. *Kidney international*. 2009 May;75(9):882-9. PubMed PMID: 19190675.
82. Ketteler M, Wolf M, Hahn K, Ritz E. Phosphate: a novel cardiovascular risk factor. *European heart journal*. 2012 Oct 7. PubMed PMID: 23045267.
83. Shroff RC, Donald AE, Hiorns MP, Watson A, Feather S, Milford D, et al. Mineral metabolism and vascular damage in children on dialysis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007 Nov;18(11):2996-3003. PubMed PMID: 17942964.
84. Shuto E, Taketani Y, Tanaka R, Harada N, Isshiki M, Sato M, et al. Dietary phosphorus acutely impairs endothelial function. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2009 Jul;20(7):1504-12. PubMed PMID: 19406976. Pubmed Central PMCID: 2709683.
85. Mulay SR, Kulkarni OP, Rupanagudi KV, Migliorini A, Darisipudi MN, Vilaysane A, et al. Calcium oxalate crystals induce renal inflammation by NLRP3-mediated IL-1beta secretion. *The Journal of clinical investigation*. 2013 Jan 2;123(1):236-46. PubMed PMID: 23221343. Pubmed Central PMCID: 3533282.
86. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annual review of immunology*. 2010;28:445-89. PubMed PMID: 20192806. Pubmed Central PMCID: 3502616.
87. Gutierrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, et al. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *The New England journal of medicine*. 2008 Aug 7;359(6):584-92. PubMed PMID: 18687639. Pubmed Central PMCID: 2890264.
88. Isakova T, Xie H, Yang W, Xie D, Anderson AH, Scialla J, et al. Fibroblast growth factor 23 and risks of mortality and end-stage renal disease in patients with chronic kidney disease. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2011 Jun 15;305(23):2432-9. PubMed PMID: 21673295. Pubmed Central PMCID: 3124770.
89. Faul C, Amaral AP, Oskouei B, Hu MC, Sloan A, Isakova T, et al. FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *The Journal of clinical investigation*. 2011

Nov;121(11):4393-408. PubMed PMID: 21985788. Pubmed Central PMCID: 3204831.

90. Gutierrez OM, Januzzi JL, Isakova T, Laliberte K, Smith K, Collerone G, et al. Fibroblast growth factor 23 and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease. *Circulation*. 2009 May 19;119(19):2545-52. PubMed PMID: 19414634. Pubmed Central PMCID: 2740903.

91. Yilmaz MI, Sonmez A, Saglam M, Yaman H, Kilic S, Demirkaya E, et al. FGF-23 and vascular dysfunction in patients with stage 3 and 4 chronic kidney disease. *Kidney international*. 2010 Oct;78(7):679-85. PubMed PMID: 20613714.

92. Munoz Mendoza J, Isakova T, Ricardo AC, Xie H, Navaneethan SD, Anderson AH, et al. Fibroblast growth factor 23 and Inflammation in CKD. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2012 Jul;7(7):1155-62. PubMed PMID: 22554719. Pubmed Central PMCID: 3386678.

93. Berndt A, Li Q, Potter CS, Liang Y, Silva KA, Kennedy V, et al. A single-nucleotide polymorphism in the *Abcc6* gene associates with connective tissue mineralization in mice similar to targeted models for pseudoxanthoma elasticum. *The Journal of investigative dermatology*. 2013 Mar;133(3):833-6. PubMed PMID: 23014343.

94. Le Corre Y, Le Saux O, Froeliger F, Libouban H, Kauffenstein G, Willoteaux S, et al. Quantification of the calcification phenotype of *Abcc6*-deficient mice with microcomputed tomography. *The American journal of pathology*. 2012 Jun;180(6):2208-13. PubMed PMID: 22469843.

95. Mungrue IN, Zhao P, Yao Y, Meng H, Rau C, Havel JV, et al. *Abcc6* deficiency causes increased infarct size and apoptosis in a mouse cardiac ischemia-reperfusion model. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011 Dec;31(12):2806-12. PubMed PMID: 21979437. Pubmed Central PMCID: 3227394.

96. Eller K, Kirsch A, Wolf AM, Sopper S, Tagwerker A, Stanzl U, et al. Potential role of regulatory T cells in reversing obesity-linked insulin resistance and diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2011 Nov;60(11):2954-62. PubMed PMID: 21911743. Pubmed Central PMCID: 3198056.