

Aus dem Uniklinikum des Saarlandes
Klinik für Innere Medizin IV
Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten
Homburg
Klinikdirektor: Prof. Dr. med. D. Fliser

**Bedeutung epigenetischer Mechanismen für die beschleunigte
Differenzierung intermediärer Monozyten bei chronisch nierenkranken
Menschen**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2014

vorgelegt von
Jenny Sarah Schneider
geb. am 08.07.1990 in Kaiserslautern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
Zusammenfassung	7
Abstract (Zusammenfassung in englischer Sprache)	9
1 Einleitung	10
1.1 Die chronische Nierenerkrankung	10
1.2 Bedeutung von Monozyten bei kardiovaskulären Erkrankungen (CVD).....	11
1.3 Monozytensubpopulationen.....	12
1.4 C1 Metabolismus und Epigenetik.....	13
1.5 Zielsetzung der Arbeit	16
2 Material	17
2.1 Geräte.....	17
2.2 Antikörper.....	17
2.3 Chemikalien.....	17
2.4 Kits.....	18
2.5 Gebrauchsfertige Puffer, Lösungen und Medien.....	18
2.6 Puffer, Lösungen und Medien	19
2.7 Verbrauchsmaterialien.....	20
2.8 Software.....	21
3 Methoden.....	22
3.1 Durchflusszytometrie.....	22
3.1.1 Bestimmung von Monozytensubpopulationen im Vollblut	24
3.1.2 Bestimmung der Oberflächenexpression auf Monozytensubpopulationen.....	24
3.2 Zellisolation	25
3.2.1 Isolation von PBMCs	25
3.2.2 Isolation von CD34+ hämatopoetischen Stammzellen	26
3.2.3 Zellzahlbestimmung	27
3.3 Zellkultur	27
3.3.1 Expansion von CD34+ Stammzellen	27
3.3.2 Differenzierung von CD34+ Stammzellen zu Monozytensubpopulationen	28
3.3.3 Vollblutstimulation.....	29
3.4 Funktionelle Charakterisierung von Monozytensubpopulationen.....	29

3.4.1	Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies in Monozytensubpopulationen	29
3.4.2	Messung der Phagozytoserate in Monozytensubpopulationen	30
3.5	Molekulargenetische Methoden	31
3.5.1	DNA-Isolation aus Monozyten	31
3.5.2	Quantifizierung der DNA-Konzentration.....	31
3.5.3	DNA-Methylierungsanalyse.....	31
3.6	Auswertung und Statistik.....	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Urämie induziert die Differenzierung der CD14++CD16+ Monozyten	33
4.1.1	Charakteristika der eingeschlossenen Probanden.....	33
4.1.2	Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen zu Monozyten	34
4.2	Epigenetische Regulation der Monozytendifferenzierung unter urämischen Bedingungen.....	37
4.2.1	Genomweite DNA-Methylierungsanalyse der unterschiedlich differenzierten Monozyten.....	37
4.2.2	Charakterisierung differentiell methylierter Gene	43
4.3	Einfluss von C1 Metaboliten auf Monozytensubpopulationen	49
4.3.1	Einfluss von C1 Metaboliten auf differenzierte Monozyten	49
4.3.2	Einfluss des C1 Metabolismus auf die Differenzierung von Monozytensubpopulationen	53
5	Diskussion	57
5.1	Monozytensubpopulationen bei chronischer Nierenerkrankung und Atherosklerose	57
5.2	Bedeutung des C1 Metabolismus bei chronischer Nierenerkrankung und Atherosklerose.....	59
5.3	Einfluss von Homocystein auf das Immunsystem.....	61
5.4	SAH als kardiovaskulärer Risikofaktor	63
5.5	Bedeutung von SAH für das Immunsystem	64
5.6	Bedeutung epigenetischer Regulationsmechanismen bei Atherosklerose und chronischer Nierenerkrankung	65
5.7	Ausblick.....	68
6	Literaturverzeichnis.....	69
7	Danksagung	81
8	Posterpräsentationen.....	82
9	Lebenslauf	83

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym („Angiotensin Converting Enzyme“)
Adox	Adenosin-2',3'-dialdehyd
ANOVA	Varianzanalyse („analysis of variance“)
ApoE	Apolipoprotein E
BSA	Bovines Serum Albumin
C1 Stoffwechsel	Ein-Kohlenstoff-Stoffwechsel
Cbs	Cystathionin- β -Synthase
CCR5	„chemokine (C-C motif) receptor 5“
CD	„Cluster of differentiation“
CKD	chronische Nierenerkrankung („chronic kidney disease“)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankung („cardiovascular disease“)
CX ₃ CR1	„chemokine (C-X3-C motif) receptor 1“
DNA	Desoxyribonukleinsäure („Deoxyribonucleic acid“)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Durchflusszytometrie („fluorescence-activated cell sorting“)
FC	„Fold change“
FCS	Fetales Kälberserum („fetal bovine serum“)
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	„Forward Scatter“
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
H ₂ DFFDA	5-(6)-Carboxy-2',7'-dihydro-fluorescein-Diacetat

Hcy	Homocystein
HSA	Humanes Serum Albumin
IL	Interleukin
IMM	Inflammation
INF	Infektion
IUIS	„International Union of Immunological Societies“
KDOQI	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
Ldlr	„low density lipoprotein receptor“
LPS	Lipopolysaccharid
Ly6C	„lymphocyte antigen 6C“
MACS	„Magnetic Activated Cell Sorting“
MFI	Mediane Fluoreszenzintensität
PBMCs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes („peripheral blood mononuclear cells“)
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute („revolutions per minute“)
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SSC	„Side Scatter“
TLR2	Toll-like-Rezeptor 2
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Vit B ₁₂	Vitamin B12 (Cobalamin)
Vit B ₆	Vitamin B6 (Pyridoxalphosphat)

Zusammenfassung

Chronisch nierenkranke Menschen weisen im Vergleich zur nierengesunden Allgemeinbevölkerung ein immens erhöhtes kardiovaskuläres Risiko auf, welches vor allem auf die beschleunigte Entstehung atherosklerotischer Gefäßerkrankungen zurückgeführt werden kann. Monozyten sind zentrale Mediatoren der Atherogenese. Basierend auf einer unterschiedlichen Expression von CD14 und CD16 lassen sich durchflusszytometrisch drei Monozytensubpopulationen unterscheiden: klassische CD14⁺⁺CD16⁻, intermediäre CD14⁺⁺CD16⁺ und nichtklassische CD14⁺CD16⁺⁺ Monozyten. Die intermediären Monozyten konnten in zahlreichen experimentellen und klinischen Studien als besonders proatherogene Zellen mit hohem proinflammatorischen Potenzial charakterisiert werden. Im Verlauf der chronischen Nierenerkrankung kommt es zu einer Zunahme der intermediären Monozyten, deren Zellzahlen in prospektiven Studien als unabhängige Prädiktoren für kardiovaskuläre Ereignisse charakterisiert werden konnten. Die Mechanismen, die zu einer Zellzunahme der intermediären Monozyten bei chronisch nierenkranken Menschen führen, sind jedoch bis heute nicht bekannt.

Die Urämie geht mit der Akkumulation zahlreicher Substanzen einher, die immunmodulierend wirken können. In diesem Kontext hat die Veränderung des C1 Metabolismus eine zentrale Bedeutung für die Immundysregulation chronisch nierenkranker Menschen. Bisherige Studien fokussierten hierbei zumeist auf die Bedeutung der Hyperhomocysteinämie, deren pathophysiologische Relevanz mittlerweile jedoch fraglich erscheint. Die Veränderungen des C1 Metabolismus bei chronisch nierenerkrankten Menschen beinhalten neben einer Homocysteinämie ebenfalls deutlich erhöhte Spiegel von S-Adenosylhomocystein, welches aufgrund seiner inhibitorischen Wirkung auf DNA-Methyltransferasen direkt mit der epigenetischen Genregulation verknüpft ist.

Diese Dissertationsschrift untersucht die Hypothese, inwieweit es im Rahmen der chronischen Nierenerkrankung aufgrund einer Akkumulation von S-Adenosylhomocystein zu einer Dysregulation der DNA-Methylierung von sich differenzierenden Monozyten kommt, welche in einer beschleunigten Bildung intermediärer Monozyten mündet.

Die Stimulation hämatopoetischer Stammzellen mit urämischem Serum induzierte eine vermehrte Entstehung intermediärer Monozyten. Diese waren in ihren funktionellen Charakteristika verändert und wiesen zudem eine genomweite DNA-Hypomethylierung auf. Dabei konnten zahlreiche differentiell methylierte Gene identifiziert werden, welche für Transkriptionsfaktoren codieren. Die genauere Untersuchung der Urämietoxine identifizierte

S-Adenosylhomocystein als zentralen Mediator der Verschiebung klassischer zu intermediären Monozyten bei chronisch nierenkranken Menschen. Zukünftige Studien müssen untersuchen, ob ein Eingriff in epigenetische Regulationsmechanismen die chronische Inflammation von Patienten mit chronischer Nierenerkrankung zu beeinflussen vermag.

Abstract (Zusammenfassung in englischer Sprache)

Compared to subjects with intact renal function, CKD (chronic kidney disease) patients display a tremendously elevated cardiovascular risk, which is mainly due to accelerated atherosclerosis. Monocytes are central mediators of atherogenesis; based on their differential expression of CD14 and CD16, monocytes can be flow-cytometrically differentiated into three subsets: classical CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes, intermediate CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes and nonclassical CD14⁺CD16⁺⁺ monocytes. In many experimental and clinical studies intermediate monocytes were characterized as proatherogenic and proinflammatory cells. Progression of CKD is associated with an increase of intermediate monocyte counts; moreover, cell counts of intermediate monocytes were characterized as independent predictors of cardiovascular events in prospective clinical studies. The underlying pathophysiological mechanisms which lead to the increased counts of intermediate monocytes in CKD are unknown.

In uremia accumulation of numerous toxins may induce immune modulation. In this context, modulation of the C1 metabolism may centrally contribute to the immune dysregulation in CKD patients. Previous studies mainly focused on hyperhomocysteinemia, the pathophysiological role of which is nowadays considered as questionable. Besides hyperhomocysteinemia, modulation of C1 metabolism in CKD comprises strongly elevated plasma levels of S-adenosylhomocysteine, which itself is a potent inhibitor of DNA-methyltransferases and thus directly implicated in epigenetic gene regulation.

The present thesis tested the hypothesis that CKD induces – *via* accumulation of S-adenosylhomocysteine – a dysregulation of DNA-methylation in monocyte progenitors, which results in an enhanced generation of intermediate monocytes.

Stimulation of hematopoietic stem cells with uremic serum induced enhanced generation of intermediate monocytes. These cells displayed altered functional characteristics and genome-wide DNA-hypomethylation. The gene-specific DNA-methylation analysis identified numerous differentially methylated genes, which are coding for transcription factors. Characterization of uremic toxins identified S-adenosylhomocysteine as a central mediator for the shift of classical towards intermediate monocytes in CKD. Future experimental studies should aim to explore in how far modulation of epigenetic regulation may reduce chronic inflammation in patients with CKD.

1 Einleitung

1.1 Die chronische Nierenerkrankung

Die chronische Nierenerkrankung („chronic kidney disease“; CKD) beschreibt ein multifaktorielles Krankheitsbild mit stetig zunehmender Bedeutung in der internistischen Patientenversorgung. Die weltweite Prävalenz der CKD in der erwachsenen Allgemeinbevölkerung beträgt 10 - 16% (51) und es zeigt sich - vor allem in den westlichen Industriestaaten - in den letzten Jahrzehnten eine Zunahme der Krankheitshäufigkeit (41).

Die CKD ist definiert als das Vorliegen einer strukturellen oder funktionellen renalen Veränderung und / oder Verminderung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) der Niere auf unter 60 ml/min/1,73 m² über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten.

Basierend auf der GFR wird seit 2002 die CKD nach KDOQI (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) in fünf Stadien eingeteilt; 2013 erfolgte durch die KDIGO eine Revision mit Definition von sechs Kategorien der glomerulären Filtrationsrate (GFR Kategorien; Tabelle 1).

Tabelle 1. Kategorien der glomerulären Filtrationsrate bei chronischer Nierenerkrankung nach KDIGO

GFR Kategorie	Beschreibung	GFR (ml/min/1,73 m ²)
G 1	Nierenschaden mit normaler oder erhöhter GFR	≥ 90
G 2	GFR leicht erniedrigt	60-89
G 3a	GFR leicht bis moderat erniedrigt	45-59
G 3b	GFR moderat bis stark erniedrigt	30-44
G 4	GFR stark erniedrigt	15-29
G 5	Nierenversagen	< 15

Chronisch nierenkranke Menschen weisen eine überdurchschnittliche hohe kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität auf, die sich in einer deutlich reduzierten Lebenserwartung dieser Patienten widerspiegelt (28). Schon mit einer leicht bis moderat erniedrigten GFR von 45-59 ml/min/1,73 m² steigt das Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis um 43% im Vergleich zu dem Risiko eines Menschen mit einer GFR > 60 ml/min/1,73 m² (31). Die pathophysiologische Grundlage für die hohe kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität ist die

massiv beschleunigte atherosklerotische Gefäßerkrankung chronisch nierenkranker Menschen (79).

Die erhöhte Ereignisrate chronisch nierenkranker Patienten lässt sich nicht alleine mit den in der Framingham Heart Study (48) identifizierten „klassischen“ Risikofaktoren erklären (85). Im Einklang hiermit konnten klassische Therapiestrategien wie die Senkung des Cholesterins mittels Statinen (4, 24, 100) oder die Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (104) keine befriedigende Reduktion der kardiovaskulären Ereignisse erreichen. Vielmehr weisen diese Patienten eine überdurchschnittlich hohe Prävalenz an sogenannten „nichtklassischen“ Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) auf (Tabelle 2). Diese gewinnen als Erklärungsansätze für die hohe kardiovaskuläre Sterblichkeit und beschleunigte Atherosklerose chronisch nierenkranker Menschen zunehmend an Bedeutung (77).

Tabelle 2. Klassische und nichtklassische Risikofaktoren für kardiovaskuläre Ereignisse

Klassische Risikofaktoren	Nichtklassische Risikofaktoren
Alter	Albuminurie
Geschlecht	Hyperhomocysteinämie
Hypertension	Anämie
Hypercholesterinämie	Hyperphosphatämie
Diabetes mellitus	Hypervolämie
Rauchen	oxidativer Stress
physische Inaktivität	Inflammation
familiäre Disposition	

1.2 Bedeutung von Monozyten bei kardiovaskulären Erkrankungen (CVD)

Monozyten, zentrale Zellen des unspezifischen Immunsystems, nehmen eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der Atherosklerose ein. Aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks differenzieren sich Monozyten über myeloische Vorläuferzellen und bilden im peripheren Blut des erwachsenen Menschen einen Anteil von 4-8% aller Leukozyten (96). Durch eine Aktivierung des Endothels, die mit einer Expression spezifischer Adhäsionsmoleküle einhergeht, werden Monozyten aus dem peripheren Blut in die Gefäßwand rekrutiert. Es folgt eine Differenzierung zu gewebständigen Makrophagen,

welche, nach einer rezeptorvermittelten Aufnahme von Lipiden, die für die Atherosklerose typischen Schaumzellen ausbilden. Dieser inflammatorische Prozess induziert die Rekrutierung weiterer Immunzellen, sowie die Einwanderung glatter Muskelzellen in die Intima der Gefäßwand. Ein komplizierter atherosklerotischer Plaque entsteht, wenn sich ein nekrotischer Kern, umgeben von glatten Muskelzellen und einer fibrösen Kappe, ausbildet. Eine Ruptur dieser fibrösen Kappe und die damit einhergehende Präsentation prothrombotischen Materials und die Ausbildung eines Thrombus kann letztendlich zu einem Gefäßverschluss führen und je nach Ausmaß und Lokalisation ein kardiovaskuläres Ereignis zur Folge haben (33, 76).

1.3 Monozytensubpopulationen

Schon 1989 konnten Passlick *et al.* Monozyten als eine heterogene Population beschreiben und die Gesamtpopulation der Monozyten in zwei Subpopulationen einteilen: die CD14⁺⁺CD16⁻ und die CD16⁻positiven Monozyten (68). Kriterien für diese Einteilung war die unterschiedliche Expression des Lipopolysaccharid-Co-Rezeptors CD14 sowie des Fc γ -Rezeptors CD16 auf ihrer Zelloberfläche. Monozyten mit einer starken CD14 Expression und einer fehlenden CD16 Expression wurden als CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten definiert, während Monozyten, die zusätzlich CD16 auf ihrer Oberfläche exprimieren, als CD16-positive Monozyten beschrieben wurden.

Diesen CD16⁻positiven Monozyten wurde ein proinflammatorisches Potential zugeschrieben, da sie einerseits verstärkt proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-12 bilden, andererseits vermindert das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 sezernieren (5, 27, 91). Bei zahlreichen inflammatorischen Erkrankungen - wie auch bei der chronischen Nierenerkrankung - sind CD16-positive Monozyten in erhöhter Zellzahl im zirkulierenden Blut nachzuweisen (zusammengefasst in (37, 73, 107)). Durch nähere Charakterisierung der Monozytensubpopulationen gelang es in den folgenden Jahren die CD16⁻positiven Monozyten weiter in zwei unterschiedliche Subpopulationen zu differenzieren: die CD14⁺⁺CD16⁺ und die CD14⁺CD16⁺⁺ Monozyten.

Basierend auf diesen Beobachtungen wurde 2010 von der IUIS (Nomenclature Committee of the international Union of Immunological Societies) eine offizielle Nomenklatur für Monozyten veröffentlicht (115), welche

- klassische (CD14⁺⁺CD16⁻) Monozyten,
- intermediäre (CD14⁺⁺CD16⁺) Monozyten und
- nichtklassische (CD14⁺CD16⁺⁺) Monozyten

differenziert. Die Gesamtpopulation der intermediären und nichtklassischen Monozyten wird als CD16-positive Monozytensubpopulation bezeichnet. Innerhalb der CD16-positiven Monozyten wird vor allem den intermediären Monozyten eine besondere proinflammatorische Rolle zugeschrieben. Neben der verstärkten Expression von proatherogenen und proinflammatorischen Rezeptoren (CCR5, TLR2, ACE) (1, 93, 94) bildet diese Monozytensubpopulation selektiv reaktive Sauerstoffspezies (105) sowie TNF α und IL1 β nach LPS Stimulation (14). In Einklang mit diesen proinflammatorischen Eigenschaften wurden die intermediären Monozyten in epidemiologischen Untersuchungen als unabhängige Prädiktoren für kardiovaskuläre Ereignisse bei Dialysepatienten (36), bei chronisch nierenkranken, nicht-dialysepflichtigen Patienten (72) sowie bei kardiovaskulären Risikopatienten (75) beschrieben.

Die zugrundeliegenden Mechanismen für die bei der chronischen Nierenerkrankung beobachtete Zunahme der intermediären Monozytensubpopulation sind bislang weitgehend ungeklärt. Ein Ansatz bietet die mit Abnahme der Nierenfunktion auftretende Immundysfunktion. Im Verlauf der chronischen Nierenerkrankung kommt es zu einer Retention und Akkumulation zahlreicher harnpflichtiger Substanzen, die als Urämietoxine bezeichnet werden, sofern sie schädigende Effekte auf den Patienten ausüben. Insbesondere können Urämietoxine immunmodulierend wirken und hierbei bei chronisch nierenkranken Menschen einerseits immundepressive Effekte ausüben, welche sich in einer erhöhten Infektanfälligkeit widerspiegeln, andererseits aber auch immunstimulierende Wirkungen besitzen, welche Inflamationsprozesse induzieren können und so etwa die Entstehung und Progression atherosklerotischer Gefäßerkrankungen begünstigen (49).

Aufgrund solcher ausgeprägten immunmodulierenden Wirkungen von Urämietoxinen kann postuliert werden, dass Urämietoxine auch für die vermehrte Bildung intermediärer Monozyten verantwortlich sind.

1.4 C1 Metabolismus und Epigenetik

In diesem Zusammenhang wird Homocystein, eine schwefelhaltige Aminosäure und zentraler Metabolit des C1 Stoffwechsels, als Immunmodulator diskutiert (112, 113). Chronisch nierenkranke Menschen weisen in der Regel eine hohe Prävalenz einer milden bis moderaten Hyperhomocysteinämie (31-100 $\mu\text{mol/l}$) auf (90). Erhöhte Plasma-Homocysteinspiegel sind mit dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen sowohl bei chronisch nierenkranken als

auch bei nierengesunden Menschen assoziiert (13, 38, 61, 89), ohne dass ihre kausale Bedeutung in der Pathogenese hinreichend verstanden wird.

Eine zentrale Bedeutung einer Hyperhomocysteinämie für die Monozytenbiologie konnte in tierexperimentellen Arbeiten erkannt werden (112, 113). So konnten Zhang *et al.* sowohl an ApoE^{-/-} als auch Ldlr^{-/-} Mäusen zeigen, dass eine genetisch und diätinduzierte Hyperhomocysteinämie eine vermehrte Rekrutierung von Monozyten aus dem Knochenmark sowie eine systemische Inflammation mit vermehrter Zytokinausschüttung induziert. Die Hyperhomocysteinämie beschleunigte sowohl die Differenzierung von Ly6C^{hi} und Ly6C^{mid} Monozyten, den murinen Gegenstücken der klassischen und intermediären Monozyten, als auch deren Akkumulation in atherosklerotischen Plaques (112, 113). Eine Senkung von Homocystein mittels Substitution von Vitamin B₁₂, B₆ und Folsäure reduzierte die Bildung proinflammatorischer Monozyten und atherosklerotischer Plaques in diesem Tiermodell.

Als Metabolit des C1 Stoffwechsels hat Homocystein einen direkten Einfluss auf die DNA-Methylierung, einer zentralen epigenetischen Komponente. So wird Homocystein im C1 Metabolismus zu S-Adenosylmethionin (SAM), dem universellen Methylgruppendonor, remethyliert. SAM steht zahlreichen Methylierungsreaktionen, darunter der DNA-Methylierung, zur Verfügung. Nach erfolgter Methylierungsreaktion wird aus SAM das S-Adenosylhomocystein (SAH), ein potenter Inhibitor von Methyltransferasen und folglich auch der DNA-Methylierung. Die DNA-Methylierung ihrerseits reguliert die Genexpression, ohne dabei die genetische Information zu modifizieren. Als dynamischer Prozess ist sie abhängig von exogenen Faktoren wie Ernährung, Umwelt und Lebensstil. Hierbei stellt das Kohlenstoffatom C5 von Cytosin den Ort der Methylierung dar. Die Methylierung findet hauptsächlich in Bereichen der DNA statt, die reich an Cytosin-Guanin Dinukleotiden, sogenannten CpG-Inseln, sind und die sich häufig in Regulationsbereichen von Genen befinden. Die Methylierung der DNA geht dabei mit einer verminderten Transkriptionsrate einher, während ein unmethylierter Status eine verstärkte Transkription zur Folge hat (108). Bei chronisch nierenkranken Menschen ist aufgrund des derangierten C1 Metabolismus, der sowohl eine Erhöhung von Homocystein als auch der SAH-Spiegel im Plasma umfasst, die epigenetische Genregulation gestört. Diese Fehlregulation wurde in rezenten Arbeiten als mögliche Ursache für die erhöhte Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse bei chronisch nierenkranken Menschen diskutiert (106).

Auch in anderen Bereichen der Inneren Medizin konnte eine kausale Bedeutung einer Dysregulation der DNA-Methylierung für kardiovaskuläre Erkrankungen aufgezeigt werden. So weisen Patienten mit Atherosklerose eine veränderte globale DNA-Methylierung auf, die

auch in peripheren Blutzellen nachzuweisen ist (3, 11, 82). Prospektive epidemiologische Untersuchungen identifizierten sowohl eine gestörte DNA-Methylierung (86) als auch erhöhte SAH-Spiegel (103) als unabhängige Prädiktoren für kardiovaskuläre Ereignisse.

Die Bedeutung epigenetischer Mechanismen konnte in den letzten Jahren auch bei der Regulation des Immunsystems erkannt werden (64, 67). Die im Rahmen einer chronischen Nierenerkrankung auftretende epigenetische Fehlregulation könnte somit auch die Funktion und Differenzierung von Monozyten beeinflussen und so ein Bindeglied zwischen Immundysfunktion und beschleunigter Atherosklerose chronisch nierenkranker Menschen darstellen. Die Demaskierung der zugrundeliegenden Pathomechanismen, welche eine vermehrte Differenzierung intermediärer Monozyten bei CKD bedingen, könnte langfristig neue Optionen zur immunmodulatorischen Therapie aufzeigen, um das hohe kardiovaskuläre Risiko chronisch nierenkranker Menschen zu senken.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Vor dem aufgeführten wissenschaftlichen Hintergrund soll in der vorliegenden Promotionsarbeit die Bedeutung einer epigenetischen Dysregulation bei chronischer Nierenerkrankung für die Differenzierung humaner Monozytensubpopulationen untersucht werden. Dazu soll der Einfluss der Urämie auf die DNA-Methylierung in sich differenzierenden Monozyten *in vitro* analysiert werden. Mittels genomweiter DNA Methylierungsanalysen sollen dabei diejenigen Gene identifiziert werden, die in sich differenzierenden Monozyten unter urämischen Bedingungen differentiell methyliert werden. Die Bedeutung differentieller Methylierung für funktionelle Eigenschaften der unter Urämiebedingungen differenzierten Monozyten soll ebenfalls untersucht werden. In einem zweiten Versuchsaufbau soll der Fokus auf SAH als zentralem Modulator der DNA-Methylierung gelegt werden. Dabei soll untersucht werden, ob SAH spezifisch die Differenzierung intermediärer Monozyten induzieren kann. Zudem soll der Einfluss von SAH auf die funktionellen Eigenschaften und Oberflächenrezeptoren von Monozytensubpopulationen erforscht werden.

2 Material

2.1 Geräte

Geräte	Bezugsquelle
Durchflusszytometer BD FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
OctoMACS Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
QuadroMACS Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Qubit Fluorometer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pH-Meter HI211	Hanna instruments, Kehl am Rhein, Deutschland

2.2 Antikörper

Antikörper	Klon	Konjugat	Bezugsquelle
Anti-CD14	MφP9	PerCP	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Anti-CD16	3G8	PeCy7	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Anti-CD86	HA5.2B7	PE	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Anti-CD195 (CCR5)	2D7/CCR5	APC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Anti-CX ₃ CR1	2A9-1	FITC	Biozol, Eching, Deutschland
Anti-CD34	581	APC	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Anti-CD45	2D1	PE	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland

2.3 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Adenosin -2', 3'-Dialdehyd (Adox)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
5-(6)-Carboxy-2',7'-dihydro-fluorescein-Diacetat (H ₂ DFFDA)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Cytometer Setup & Tracking Beads	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
100% Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fluoresbrite Yellow Green (YG) Carboxylate Microspheres (0,75 µm)	Polysciences Inc., Eppelheim, Deutschland
Homocystein (Hcy)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Humanes Serum Albumin (HSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
LSM 1077 Lymphocyte Separation Medium	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Serva, Heidelberg, Deutschland
95% Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Rainbow Calibration Particles (6,0-6,4 µm)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
S-Adenosylhomocystein	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2.4 Kits

Kits	Bezugsquelle
CD34 Microbead Kit, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD14 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Dneasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Qubit® dsDNA BR Assay Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.5 Gebrauchsfertige Puffer, Lösungen und Medien

Puffer/Lösung/Medium	Bezugsquelle
Aqua dest.	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Dulbecco´s PBS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland

FACS Lysing Solution	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS-Clean	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS-Flow	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS-Rinse	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Hematopoetic Progenitor Cell Expansion Medium DXF	Promo Cell, Heidelberg, Deutschland
Hematopoetic Progenitor Medium mit Cytokine Mix E (TPO, SCF, flt3-Ligand, IL-3)	Promo Cell, Heidelberg, Deutschland
LSM 1077 Lymphocyte Separation Medium	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
RPMI 1640 Flüssigmedium	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

2.6 Puffer, Lösungen und Medien

Puffer/Lösung/Medium	Substanz	Menge
10% EDTA	EDTA	10 g
	Aqua dest.	ad 100 ml
3% Essigsäure	100% Essigsäure	3 ml
	Aqua dest.	97 ml
FACS-Puffer	PBS	500 ml
	FCS hitzeinaktiviert	25 ml
	BSA (pH7)	2,5 g
	10% NaN ₃	3,5 ml
	10% EDTA	1 ml
Krebs Ringer PBS	Glucose (wasserfrei)	20,4 mg
	PBS (mit Ca und Mg)	20 ml
Lysepuffer	Lysing Solution	50 ml
	Aqua dest.	450 ml

MACS-Puffer	PBS/ 5 mM EDTA	48,75 ml
	20% HSA	1,25 ml
4% PFA	PFA	8 g
	PBS	200 ml
1% PFA	4% PFA	25 ml
	PBS	75 ml
PBS/ 5 mM EDTA	PBS	500 ml
	EDTA (500 mM)	5 ml

2.7 Verbrauchsmaterialien

Material	Bezugsquelle
s-Monovette® Blutentnahmesystem, Citrat	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht, Deutschland
s-Monovette® Blutentnahmesystem, Serum	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht, Deutschland
s-Monovette® Blutentnahmesystem, EDTA	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht, Deutschland
FACS-Röhre, 75 x 12 mm	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhre 15 ml, 120 x 17 mm	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhre 50 ml, 114 x 28	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht, Deutschland
Safty-Multifly®-Set	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht, Deutschland
C-Chip Neubauer improved Zählkammer	Biochrom, Berlin, Deutschland
Cellstar® Multiwell Zellkultur Platte, 12 Well	Greiner bio-one, Frickenhausen Deutschland
Thermo Scientific Nunclon™ MultiWell, Zellkulturplatte, 6 Well	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
BD Falcon Polypropylen Round-Bottom Tube 12 x 75 mm	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

2.8 Software

Software	Bezugsquelle
BD FACSDiva™ Software	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Genetic Association Database	http://geneticassociationdb.nih.gov/
GraphPad Prism4	GraphPad, San Diego, California, USA
Microsoft Office 2013	Microsoft, Redmond, USA
String 9.05	http://string-db.org/

3 Methoden

3.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen, intrazellulären Proteinen, Peptiden und DNA von Zellen. Grundlage hierfür ist die Detektion optischer Signale, die entstehen, wenn einzelne Zellen eine ausgesandte Laserstrahlung passieren. Die Emission optischer Signale ist zunächst abhängig von der Gestalt und Größe der einzelnen passierenden Zellen. Zur Messung werden Zellen in Suspension durch Überdruck in eine Kapillare geleitet, woraufhin sie einzeln in eine Durchflusszelle gelangen. Die Passage einzelner Zellen führt zu einer Streuung des ausgesandten Lichts, welches durch unterschiedliche Detektoren registriert wird. Unterschieden werden kann dabei das entstehende Vorwärts- (FSC, „Forward Scatter“) und Seitwärtsstreulicht (SSC, „Sideward Scatter“). Das Vorwärtsstreulicht beschreibt die Beugung des Lichts im flachen Winkel und verändert sich entsprechend dem Volumen der passierenden Zelle. Das Seitwärtsstreulicht, welches der Brechung des Lichts im rechten Winkel entspricht, lässt auf die Granularität der Zelle und die Struktur ihres Zellkernes zurückschließen. Um Oberflächenproteine einzelner Zellen genauer differenzieren zu können, werden diese mit Antikörpern markiert, welche ihrerseits an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Werden diese durch die Laserstrahlung angeregt, lässt sich je nach Menge der gebundenen Antikörper ein unterschiedlich starkes Fluoreszenzsignal ableiten, wodurch die Expressionsstärke des entsprechenden Proteins quantifiziert werden kann.

Die registrierten optischen Signale können im Laufe der Messung in einem Punktdiagramm (Dot Plot) oder einem Histogramm visualisiert werden, welches erlaubt, Zellen mit ähnlichen Eigenschaften zu einer Zellpopulation zusammenzufassen (zu „gaten“) und nachfolgend subpopulationsspezifische Auswertungen durchzuführen.

Die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten Monozyten wurden primär in einem SSC/CD86 Dot Plot dargestellt (siehe Abbildung 1). Die Expression von CD86 auf der Zelloberfläche dieser Zellpopulation bietet die Möglichkeit eine Abgrenzung („Gating“) von Monozyten zu anderen Zellpopulationen wie Lymphozyten und Granulozyten vorzunehmen. Anschließend werden diese CD86 positiven Zellen selektiv in einem FSC/SSC Dot Plot dargestellt, in welchem eine weitere Eingrenzung der präsumptiven Monozyten aufgrund ihrer charakteristischen Streulichteigenschaften erfolgt. Innerhalb dieser vordefinierten Monozyten lassen sich durch Markierung der Oberflächenrezeptoren CD14 und CD16 mittels Antikörper

die drei Subpopulationen definieren (siehe Abbildung 1): CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten, CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten und CD14⁺CD16⁺⁺ Monozyten.

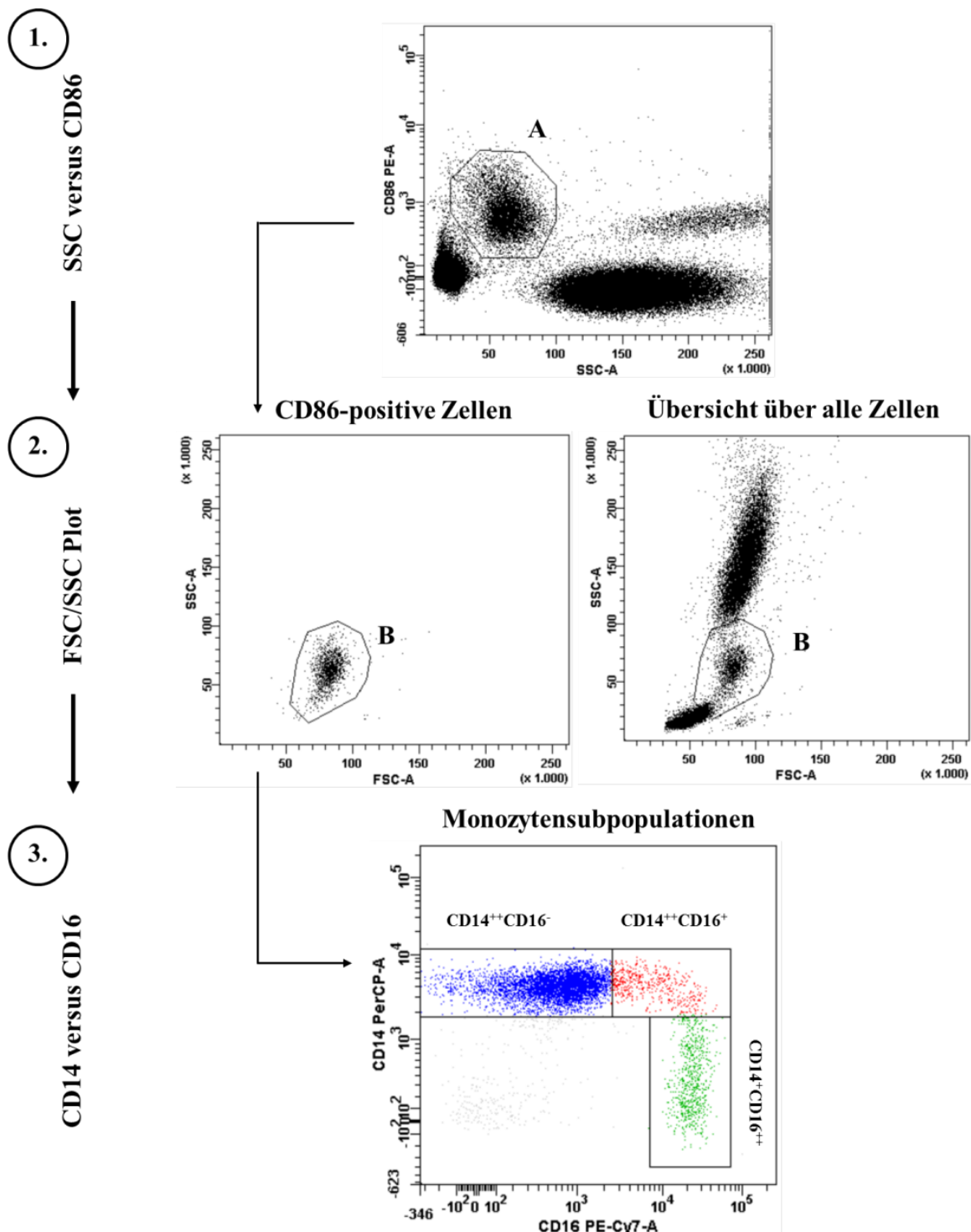


Abbildung 1. Gatingstrategie humaner Monozytensubpopulationen. Im ersten Schritt (1.) werden Monozyten anhand ihrer CD86 Expression und ihres spezifischen SSC (Seitwärtsstreulicht; „sideward scatter“-) Signals in einem SSC/CD86 Dot-Plot von anderen Leukozytenpopulationen abgegrenzt (Gate A). Im zweiten Schritt (2.) werden die CD86-positiven Zellen (aus Gate A) in einem Dot-Plot entsprechend ihrem FSC/SSC Signal dargestellt und Monozyten anhand ihrer charakteristischen Streulichteigenschaften in einem weiteren Gate (B) charakterisiert. Die Schnittmenge von Gate A und B wird in einem dritten Dot-Plot dargestellt (Schritt 3), welche erlaubt, Monozyten anhand ihrer Oberflächenexpression von CD14 und CD16 in ihre drei Subpopulationen einzuteilen. Abbildung modifiziert nach (107).

3.1.1 Bestimmung von Monozytensubpopulationen im Vollblut

Zur durchflusszytometrischen Darstellung der Monozytensubpopulationen wurde eine Färbung der Oberflächenrezeptoren CD86, CD14 und CD16 folgendermaßen vorgenommen: In ein FACS-Röhrchen wurde 100 µl EDTA-Vollblut pipettiert und 2 ml FACS-Puffer hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde gemischt und bei 1300 rpm für 7 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde folgender Antikörper-Ansatz hinzupipettiert:

Anti-CD86-PE	5 µl
Anti-CD14-PerCP	4 µl
Anti-CD16-PeCy	0,5 µl
FACS-Puffer	60,5 µl

Der Ansatz wurde im Anschluss gemischt und bei 4 °C für 30 min im Dunkeln inkubiert, um die Bindung der zugegebenen Antikörper zu erlauben. Eine Lyse der Erythrozyten erfolgte anschließend durch Zugabe von 2 ml Lysepuffer, welcher 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubierte. Nach einer Zentrifugation zur Entfernung des Lysepuffers für 7 min bei 1300 rpm folgte ein erneuter Waschschrift mit 2 ml FACS-Puffer. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 200 µl Paraformaldehyd (PFA) (1%) resuspendiert und die Monozytensubpopulationen durchflusszytometrisch dargestellt.

3.1.2 Bestimmung der Oberflächenexpression auf Monozytensubpopulationen

Um die Oberflächenexpression von CCR5 und CX₃CR1 auf den Monozytensubpopulationen zu charakterisieren, wurde die Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) durchflusszytometrisch bestimmt. Zu diesem Zweck wurde zusätzlich zu dem in 3.1.1 beschriebenen Antikörperansatz zur Monozytenfärbung folgende Antikörper pipettiert:

Anti-CCR5-APC	20 µl
Anti-CX ₃ CR1-FITC	10 µl

Im Anschluss wurden die Schritte entsprechend der Beschreibung in 3.1.1 durchgeführt. Zur Erfassung der Hintergrundfluoreszenz wurde ein zusätzlicher Ansatz ohne die Zugabe der Antikörper anti-CCR5 und anti-CX₃CR1 gemessen.

3.2 Zellisolation

3.2.1 Isolation von PBMCs

Zur Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) wurde 54 ml EDTA antikoagulierendes Vollblut auf vier Falcons (50 ml) verteilt und mit 21,5 ml PBS/EDTA auf 35 ml aufgefüllt. Das Blut/PBS-Gemisch wurde anschließend auf vier Falcons mit je 13 ml LSM 1077 (Lymphocyte Separation Medium) aufpipettiert, sodass sich zwei Phasen bildeten. Diese wurden danach bei 1400 rpm und 20 °C für 35 min ohne Bremse zentrifugiert, wobei sich vier Phasen ergaben (siehe Abbildung 2). Die oberste Schicht bestand aus Blutplasma und PBS, an welche sich eine weißliche Interphase aus PBMCs anschloss. Nach unten waren die mononukleären Zellen durch eine Schicht des Trennmediums (Ficoll) von dem Sediment am Boden des Falcons getrennt, welches aus Erythrozyten, Granulozyten und Debris bestand.

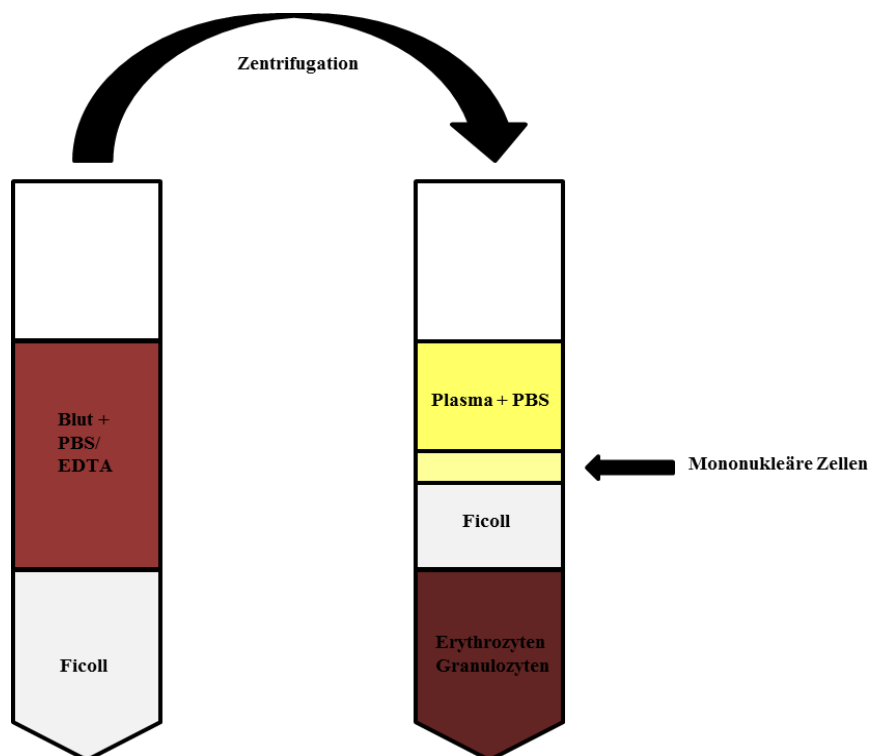


Abbildung 2. Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll zur Isolation von PBMCs. 35 ml Vollblut-PBS-Gemisch wurde auf 13 ml Lymphozytenseparationsmedium (Ficoll) aufpipettiert und zentrifugiert. Es ergeben sich vier Schichten: am Boden des Falcons ein Sediment aus Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen, welches durch eine Schicht Separationsmedium (Ficoll) von den mononukleären Zellen getrennt war. Obenauf sammelten sich Plasma und Phosphatpuffer.

Nach Absaugen des Überstandes wurden die PBMCs aus den vier Falcons in zwei neue Falcons vereinigt und jeweils mit PBS/ 5 mM EDTA auf 50 ml aufgefüllt. Im Anschluss an eine Zentrifugation für 10 min bei 1200 rpm und dem Verwerfen des Überstandes wurden die beiden Zellpellets in PBS/ 5mM EDTA resuspendiert. Die beiden Zellsuspensionen wurden in

einem 15 ml Falcon zusammengeführt und bis auf 15 ml mit PBS/ 5 mM EDTA aufgefüllt. Nach Abnahme von 10 µl zur Zellzahlbestimmung (siehe Abschnitt 3.2.3) wurde die Zellsuspension bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Zellpellet in PBS/ 5 mM EDTA resuspendiert.

3.2.2 Isolation von CD34+ hämatopoetischen Stammzellen

CD34+ hämatopoetische Stammzellen wurden aus vorher isolierten PBMCs (siehe Abschnitt 3.2.1) aufgereinigt. Dazu wurde eine der Zellzahl angepasste Menge an MACS Puffer, CD34 MicroBeads und FcR Blocking Reagent zur Zellsuspension hinzugegeben:

Pro 10⁸ Zellen: 300 µl MACS Puffer
 100 µl Fc Blocking Reagent
 100 µl CD34 MicroBeads

Diese wurden für die 30-minütige Inkubationszeit, in welcher die MicroBeads an die CD34+ Stammzellen binden konnten, bei 4 °C und Dunkelheit inkubiert. Durch mehrmaliges leichtes Mischen der Suspension innerhalb der Inkubationszeit wurde dieser Prozess unterstützt. Unspezifische Bindungen der MicroBeads wurden durch das zugegebene FcR Blocking Reagent unterbunden. Im Folgenden wurden der Zellsuspension 10 ml MACS Puffer zugegeben und bei 1200 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die nun als Pellet konzentrierten Zellen wurden in 500 µl MACS Puffer aufgenommen. Es folgte eine magnetische Isolation: Hierzu wurde im ersten Schritt auf den QuadroMACS Magneten eine entsprechende LS Säule eingespannt und diese mit 3ml MACS Puffer äquilibriert. Die 500 µl Zellsuspension wurde auf die Säule pipettiert und anschließend dreimal mit 3 ml MACS Puffer gewaschen, wobei die markierten CD34+ Stammzellen in der Säule verblieben. Diese wurde nun vom Magneten abgenommen und auf ein 15 ml Falcon aufgesetzt. Nach dem Aufpipettieren von 5 ml MACS Puffer wurden die CD34+ Zellen unter Druck heraus gespült. Die CD34+ Zellen wurden bei 1200 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet erneut in 500 µl MACS Puffer resuspendiert. Zur Erhöhung der Reinheit an CD34+ Zellen wurde im nächsten Schritt das Vorgehen mit dem OctoMACS Magneten und der entsprechenden MS Säule wiederholt. Die Säule wurde mit 500 µl MACS Puffer äquilibriert und nach dem Durchlaufen der 500 µl Zellsuspension dreimal mit 500 µl MACS Puffer gespült. Nach Umsetzen der Säule auf ein 15 ml Falcon wurde 1 ml MACS Puffer auf die Säule gegeben und die CD34+ Stammzellen unter Druck heraus gespült.

Zur Reinheitskontrolle wurde eine durchflusszytometrische Messung durchgeführt, wozu 40 µl Zellsuspension zu folgendem Antikörperansatz hinzupipettiert wurde:

Anti-CD45 PE	20 µl
Anti-CD34 APC	20 µl
FACS-Puffer	30 µl

Der Ansatz wurde für 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach der Zugabe von 2 ml FACS-Puffer und Zentrifugation (7 min bei 1200 rpm) wurde nach Abnahme des Überstandes und Resuspension in 200 µl PFA (1%) die Frequenz der CD34+ Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

3.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte am Mikroskop mit einer Neubauer-Zählkammer (C-Chip). In diese wurde eine Mischung aus 10 µl Zellsuspension und 90 µl Essigsäure (3%) pipettiert. Bei der Betrachtung unter dem Mikroskop ergab sich ein Bild aus vier großen Quadraten zu je 16 Feldern. Zur Ermittlung der Zellzahl/ml wurde die durchschnittliche Zellzahl in den vier großen Quadraten mit dem Faktor 100.000 multipliziert.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Expansion von CD34+ Stammzellen

Um die Zellzahl CD34+ hämatopoetischer Stammzellen zu erhöhen, wurden diese vor einer weiteren Differenzierung zu Monozyten zunächst expandiert. Nach Zentrifugation (10 min, 1200 rpm, 4 °C) der Suspension und Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 5 ml Hematopoetic Progenitor Cell Expansion Medium DXF resuspendiert. Diese Suspension wurde zusammen mit 50 µl Wachstumsfaktoren (TPO, SCF, flt3-Ligand, IL-3) in eine 6-Well-Platte überführt. Es folgte die Kultivierung im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ für 14 Tage. An Tag 8 der Expansionsphase erfolgte ein Mediumwechsel.

Für die Experimente zur Bedeutung von Urämie für die Differenzierung von Monozyten wurde das Hematopoetic Progenitor Cell Expansion Medium DXF mit 10%igem urämischem Serum bzw. 10%igen Kontrollserum supplementiert. Zur Gewinnung des urämischen Serums wurde jeweils fünf Hämodialysepatienten und fünf alters- und geschlechtsgleichen Kontrollprobanden (Charakteristika der Probanden siehe 4.1.1) eine 9 ml Serum-Monovette

abgenommen, bei 4000 rpm für 5 min zentrifugiert und das Serum bis zur Verwendung in Aliquots zu je 500 µl bei – 80 °C gelagert.

3.3.2 Differenzierung von CD34+ Stammzellen zu Monozytensubpopulationen

Die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen zu Monozyten wurde durch den Wechsel in das Hematopoetic Progenitor Medium an Tag 14 initiiert und mittels Durchflusszytometrie verfolgt. Hierzu wurde nach vorsichtigem Mischen 100 µl Zellsuspension zu folgendem Antikörperansatz pipettiert:

Anti-CD86	5 µl
Anti-CD14-PerCP	4 µl
Anti-CD16-PeCy7	0,5 µl
FACS-Puffer	60,5 µl

Die Inkubation erfolgte bei Dunkelheit und 4 °C für 15 min. Der Ansatz wurde nach Zugabe von 2 ml FACS-Puffer für 7 min bei 1200 rpm zentrifugiert und das Pellet anschließend in 200 µl PFA (1%) aufgenommen. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Charakterisierung.

Für die Experimente zur Bedeutung von Urämie für die Differenzierung von Monozyten wurde das Hematopoetic Progenitor Medium mit 10%igem urämischem Serum bzw. 10%igem Kontrollserum supplementiert. Die durchflusszytometrische Charakterisierung erfolgte am letzten Tag der Differenzierung (Tag 8). Für die genomweite DNA-Methylierungsanalyse wurden zusätzlich am letzten Tag der Differenzierung intermediäre Monozyten mittels CD14 Microbeads und einer MS Säule aufgetrennt.

Für die Experimente zur Bedeutung einzelner Metabolite und Mediatoren des C1 Stoffwechsels (Homocystein, S-Adenosylhomocystein, Adenosin-2',3'-dialdehyd) wurden diese jeweils in bestimmten Konzentrationen (Homocystein: 30 µM; 100 µM; 500 µM, S-Adenosylhomocystein: 0,5 µM, 1 µM, 10 µM, Adenosin-2',3'-dialdehyd: 10 µM; 50 µM, S-Adenosylhomocystein + Adenosin-2',3'-dialdehyd: 0,5 µM + 50 µM; 1 µM + 50 µM) zu dem Hematopoetic Progenitor Medium zugegeben. Die durchflusszytometrische Charakterisierung der Monozytensubpopulationen erfolgte täglich. Zusätzlich wurde am letzten Tag der Differenzierung die Oberflächenexpression von CCR5 und CX₃CR1 erfasst, sowie eine funktionelle Charakterisierung (siehe 3.4) durchgeführt.

3.3.3 Vollblutstimulation

Die Vollblutstimulation erfolgte in Polypropylen-Röhrchen, in welche 150 µl Vollblut, die entsprechenden Stimulanzen (Homocystein, S-Adenosylhomocystein, Adenosin-2,3-dialdehyd) sowie RPMI-Medium pipettiert wurden. Das Gesamtvolumen betrug 450 µl. Die Stimulation erfolgte im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ für 5 bzw. 16 Stunden. Nachfolgend erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Monozytensubpopulationen (5 und 16 stündige Inkubation), sowie der Oberflächenrezeptoren CCR5 und CX₃CR1 (5 stündige Inkubation) (siehe 3.1.1 und 3.1.2). Ebenso wurde eine funktionelle Charakterisierung (siehe 3.4) der Ansätze durchgeführt.

3.4 Funktionelle Charakterisierung von Monozytensubpopulationen

3.4.1 Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies in Monozytensubpopulationen

Intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies (ROS) lassen sich mittels Durchflusszytometrie erfassen. Zu diesem Zweck nutzt man 5-(6)-Carboxy-2',7'-dihydro-fluorescein-Diacetat (H₂DFFDA) als Reagenz, welches intrazellulär durch Esterasen gespalten wird und so seine Membrangängigkeit verliert. Durch freie Radikale wird H₂DFFDA im Zellinnern zu der fluoreszierenden Form DCF oxidiert. Aus der durchflusszytometrischen Quantifizierung der Fluoreszenz kann man auf die ROS-Spiegel zurückschließen.

Die Bestimmung von reaktiven Sauerstoffspezies in den Monozytensubpopulationen erfolgte sowohl nach Stimulation mit Metaboliten und Mediatoren des C1 Stoffwechsels von bereits differenzierten Monozyten, als auch nach Stimulation von sich differenzierenden Monozyten aus hämatopoetischen Stammzellen.

Zur Untersuchung von ROS in bereits differenzierten Monozyten wurden zunächst PBMCs aus Vollblut isoliert (siehe 3.2.1), 150 µl Zellsuspension (1 x 10⁶ Zellen in RPMI Medium) in Polypropylen-Röhrchen (Gesamtvolumen 450 µl, gemäß 3.3.3) aufgenommen und mit den entsprechenden Stimulanzen (Homocystein, S-Adenosylhomocystein, Adenosin-2',3'-dialdehyd) für 3 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert (gemäß 3.3.3). Nach Zugabe von 2 ml PBS/ 5 mM EDTA wurde der Ansatz 10 min zentrifugiert (1200 rpm, 20 °C). Anschließend wurde der Überstand abgenommen und 2,5 ml PBS/EDTA sowie 40 µl H₂DFFDA (Endkonzentration 10 nM) zu dem Zellpellet pipettiert. Der Ansatz wurde gemischt und es folgte eine 10 minütige Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂. Die anschließende

durchflusszytometrische Bestimmung der Monozytensubpopulationen erfolgte nach 3.1.1, jedoch mit folgendem verändertem Antikörper-Ansatz:

Anti-CD86 PE	4 µl
Anti-CD14 PerCP	3 µl
Anti-CD16 PeCy7	0,25 µl
FACS-Puffer	62,75 µl

Die ROS Bildung in den Monozytensubpopulationen wurde durchflusszytometrisch als MFI des Indikatorreagenzes quantifiziert.

Die Bestimmung von reaktiven Sauerstoffspezies in sich differenzierenden Monozyten erfolgte an Tag 8 der Differenzierung und analog zu der Bestimmung von ROS bei bereits differenzierten Monozyten, jedoch mit unverändertem (nach 3.1.1) Antikörper-Ansatz.

3.4.2 Messung der Phagozytoserate in Monozytensubpopulationen

Um die Phagozytoserate der Monozytensubpopulationen zu erfassen, wurden Fluoresbrite Yellow Green (YG) Carboxylate Microspheres, fluoreszierende Latexpartikel, eingesetzt. Diese wurden in einem ersten Schritt zunächst opsonisiert. Dazu wurden 1 µl Latexpartikel (Endkonzentration 1×10^8 Partikel/ml) mit 500 µl humanem Serum (aus drei humanen Seren gemischt) und 500 µl Krebs-Ringer PBS vermischt und unter Schütteln für 30 min im 37 °C warmen Wasserbad inkubiert.

Zur Bestimmung der Phagozytoserate in bereits differenzierten Monozyten wurden 150 µl Citratblut mit 50 µl der opsonierten Latexpartikel vermischt und 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgten die Färbung der Monozytensubpopulationen nach 3.1.1 und die durchflusszytometrische Analyse. Dazu wurde die Anzahl der FTIC positiven Zellen der jeweiligen Monozytensubpopulation bestimmt.

Zur Bestimmung der Phagozytoserate in sich differenzierenden Monozyten wurden 90 µl Zellsuspension von Tag 8 der Differenzierung mit 10 µl der opsonierten Latexpartikel vermischt und 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Färbung erfolgte gemäß 3.4.1 und die Auswertung wie oben beschrieben.

3.5 Molekulargenetische Methoden

3.5.1 DNA-Isolation aus Monozyten

Mittels des DNeasy Blood & Tissue Kits erfolgte die DNA-Isolation aus intermediären Monozyten, welche aus hämatopoetischen Stammzellen differenziert wurden (siehe 3.3.2). Hierzu wurden die Monozyten zunächst bei 1300 rpm für 7 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert und nach Zugabe von 20 µl Proteinase K und 4 µl RNase A gemischt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 200 µl AL Puffer hinzupipettiert und nach erneutem Mischen bei 56 °C für 10 min inkubiert. Es wurden 200 µl Ethanol hinzugegeben und gemischt. Dieser Ansatz wurde auf die DNeasy Mini spin Säule pipettiert und bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert. Es folgte ein Waschschriff mit 500 µl AW1 Puffer (8000 rpm, 1 min). Dieser Waschschriff wurde mit dem AW2 Puffer (500 µl) wiederholt (14000 rpm, 3 min). Die Säule wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 200 µl AE Puffer direkt auf die Membran pipettiert. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 1 min. Zur Elution folgte eine Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 min. Um die DNA-Ausbeute zu erhöhen, erfolgte ein erneuter Elutionsschriff mit 200 µl AE Puffer.

3.5.2 Quantifizierung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Qubit Fluorometer und dem Qubit® dsDNA BR Assay Kit. Dazu wurde 1 µl des „Qubit® dsDNA BR reagent“ zu 199 µl „Qubit® dsDNA BR buffer“ pipettiert. Anschließend wurden davon 198 µl mit 2 µl der isolierten DNA vermischt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte im Anschluss mit Hilfe des Qubit Fluorometer.

3.5.3 DNA-Methylierungsanalyse

Die genomweite DNA-Methylierungsanalyse wurde durch GenXPro GmbH (Frankfurt am Main) durchgeführt. Die isolierte DNA wurde mit der methylierungssensitiven Restriktionsendonuklease HpaII verdaut. An die entstandenen Restriktionsschnittstellen wurde ein Adapter ligiert, der eine Hybridisierung und Sequenzierung auf der Illumina Hiseq2000 Plattform ermöglicht (P-5 Adapter). Die entstandenen Produkte wurden mittels Ultraschall geschert. An die entstandenen DNA-Fragment-Enden wurde der zweite, zur

Sequenzierung auf der Illumina HiSeq2000 Plattform notwendige Adapter ligiert (p-7 Adapter). Die Konstrukte wurden mittels PCR und Primern für die P7 und P7 Adapter amplifiziert. Die entstehenden Produkte, bestehend aus „p5 – *HpaII*-Schnittstelle – DNA – zufällige Bruchstelle – p7“ wurden auf der Illumina HiSeq2000-Plattform sequenziert. Sequenzen mit der *HpaII*-typischen Erkennungssequenz (CGG) wurden mittels Novoalign (<http://www.novocraft.com/main/index.php>) von qualitativ minderwertigen Sequenzinformationen bereinigt und zum Humanen Genom (Version 19 des UCSC Genome Browser; <http://hgdownload.cse.ucsc.edu/downloads.html#human>) zugeordnet. Die *HpaII*-Schnittstellen und ihre flankierenden Bereiche (=HpaII-tags) wurden ausgezählt. Die HpaII-tags wurden zu CpG Inseln und dem ENCODE “ChIP-Seq track” der UCSC Datenbank zugeordnet, um *HpaII*-Schnittstellen in Transkriptionsfaktor-Bindestellen zu identifizieren.

3.6 Auswertung und Statistik

Die statistische Auswertung der genomweiten DNA-Methylierungsanalyse erfolgte durch GenXPro analog zu Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (106).

Die Analyse aller anderen experimentellen Ergebnisse erfolgte mittels Graphpad Prism 4 (La Jolla, USA). Für den statistischen Vergleich von zwei Gruppen wurde der Student's t-Test angewendet. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit nachfolgendem Dunnett-Test zur anschließenden Post-hoc-Analyse eingesetzt. Als Signifikanzniveau wurde dabei ein $p < 0,05$ definiert.

4 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung von Urämie auf die epigenetischen Regulationsmechanismen der Monozytendifferenzierung zu untersuchen. Dabei sollte die Hypothese überprüft werden, inwieweit die Urämie zu einer epigenetischen Dysregulation in sich differenzierenden Monozyten führt und so die Entwicklung intermediärer Monozyten fördert.

4.1 Urämie induziert die Differenzierung der CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten

4.1.1 Charakteristika der eingeschlossenen Probanden

Um zu untersuchen, inwieweit die Urämie die Entwicklung von CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten induziert, wurden fünf nierengesunde Kontrollprobanden und fünf alters- und geschlechtsgleiche Dialysepatienten in die Studie eingeschlossen. Die Kontrollprobanden ($66,6 \pm 4,3$ Jahre) wurden aus der Hochdruckambulanz der Klinik für Innere Medizin IV des Universitätsklinikums des Saarlandes rekrutiert. Sie hatten eine normale Nierenfunktion (eGFR: $77,1 \pm 10,3$ ml/min/1,73 m²) und keine Albuminurie am Untersuchungstag. Klinisch stabile Dialysepatienten ($64,2 \pm 2,8$ Jahre), welche sich dreimal wöchentlich einer Dialysebehandlung in der Klinik für Innere Medizin IV unterzogen, wurden nach dem langen interdialytischen Intervall rekrutiert. Von jedem Probanden wurde Serum gewonnen, um nachfolgend die Differenzierung von Monozyten unter Kontrollbedingungen bzw. urämischen Bedingungen zu untersuchen.

Die durchflusszytometrische Analyse der Monozytensubpopulationen in beiden Gruppen ergab im Einklang mit der Literatur (36), dass Dialysepatienten im Vergleich zu den Kontrollprobanden mehr CD16-positive Monozyten aufweisen (siehe Abbildung 3). Dabei waren sowohl die CD14⁺⁺CD16⁺ ($p < 0,05$) als auch die CD14⁺CD16⁺⁺ Monozyten ($p < 0,01$) bei Dialysepatienten in ihrer Zellzahl erhöht.

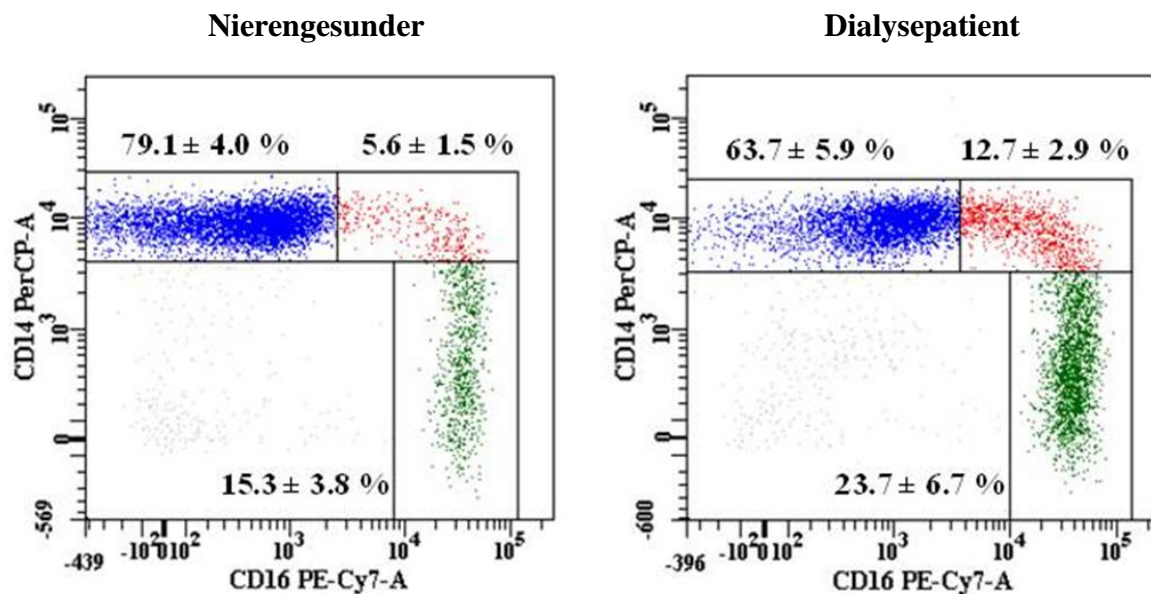


Abbildung 3. Monozytensubpopulationen von Kontrollprobanden und Dialysepatienten. Die Bestimmung erfolgte durchflusszytometrisch anhand der Expression der Oberflächenmarker CD14 und CD16. Monozyten wurden eingeteilt in klassische CD14⁺⁺CD16⁻ (blau), intermediäre CD14⁺⁺CD16⁺ (rot) und nichtklassische CD14⁺CD16⁺⁺ (grün) Monozyten. Dargestellt sind repräsentative Beispiele von Monozytensubpopulationen eines Kontrollprobanden und eines Dialysepatienten. Die Prozentwerte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung der jeweiligen Monozytensubpopulationen der fünf Kontrollprobanden bzw. fünf Dialysepatienten dar.

4.1.2 Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen zu Monozyten

Zur Untersuchung, inwieweit die Urämie auch *in vitro* die Differenzierung von CD16-positiven Monozyten induziert, wurden zunächst hämatopoetische Stammzellen von fünf weiteren gesunden Spendern isoliert und unter Zugabe von Serum der gesunden Kontrollprobanden bzw. der Dialysepatienten expandiert. Nach der zweiwöchigen Expansion wurden die Stammzellen anschließend unter Kontroll- bzw. urämischen Bedingungen zu Monozyten differenziert. Der schematische Versuchsablauf ist in Abbildung 4 dargestellt. Dabei zeigte sich, dass unter Urämie auch *in vitro* mehr CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten gebildet wurden ($p < 0,05$; siehe Abbildung 5).

Zur weiteren Charakterisierung der unter urämischen Bedingungen differenzierten CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten wurden diese anschließend funktionell analysiert. Dabei zeigte sich, dass urämische Monozyten verstärkt reaktive Sauerstoffspezies bilden ($p < 0,05$) und eine erhöhte Phagozytoseleistung ($p < 0,05$) aufweisen (siehe Abbildung 6).

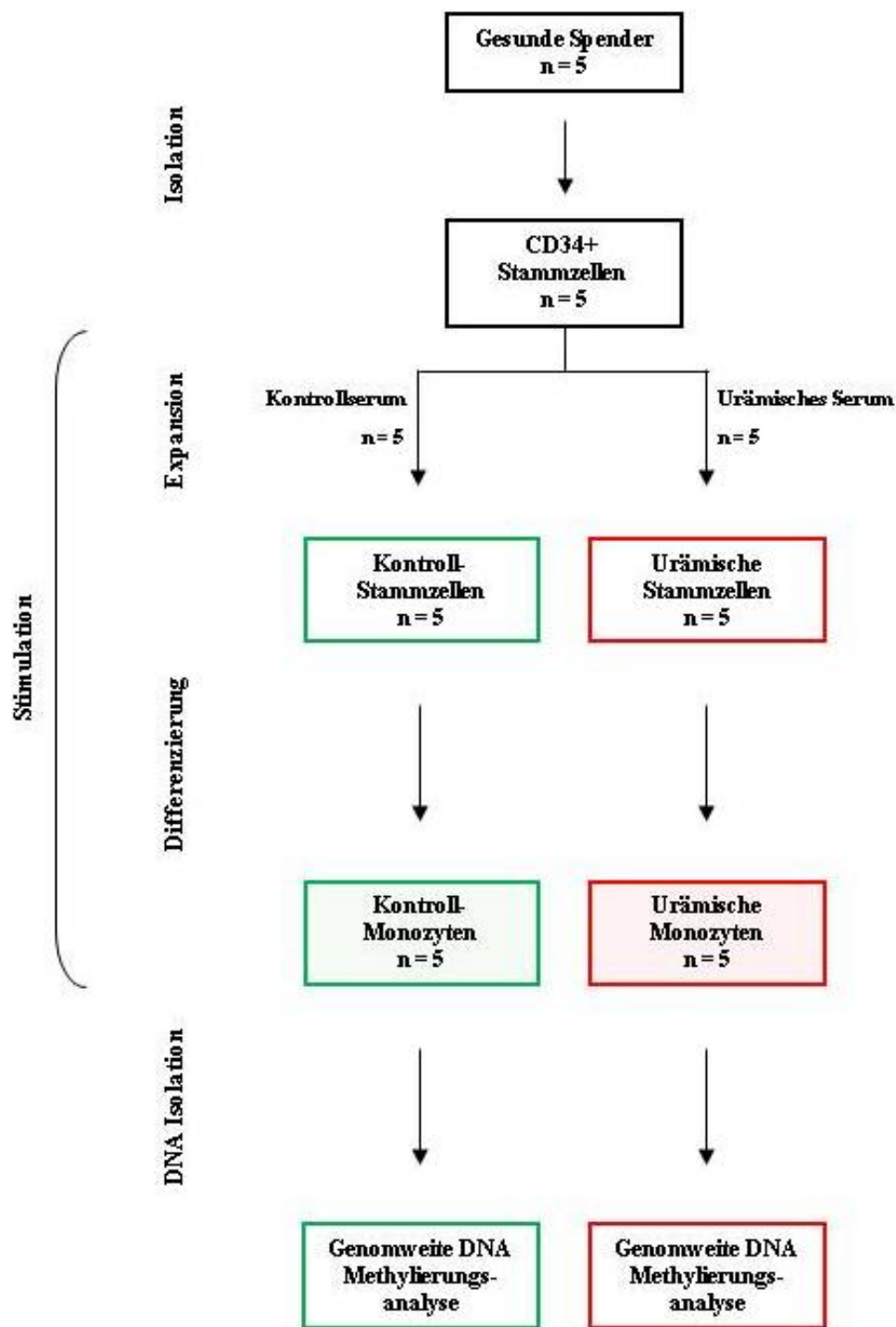


Abbildung 4. Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. Hämatopoetische Stammzellen (CD34+ Stammzellen) von nierengesunden Kontrollprobanden wurden mittels magnetischer Isolation aufgereinigt und unter Zugabe von Serum, welches von Kontrollprobanden bzw. Dialysepatienten gewonnen wurde, expandiert und anschließend, erneut unter Zugabe von Kontroll- bzw. urämischem Serum, zu Monozyten differenziert. Anschließend wurden Monozyten mittels CD14 Microbeads isoliert und eine genomweite DNA-Methylierungsanalyse durchgeführt.

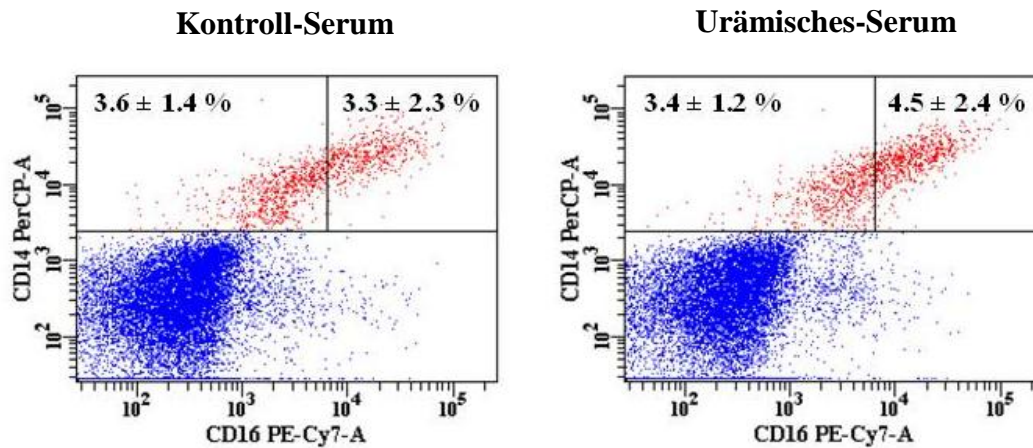


Abbildung 5. Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen zu Monozyten unter Kontroll- und urämischen Bedingungen. Die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen zu CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten wurde durchflusszytometrisch anhand der Oberflächenexpression an Tag 8 der Differenzierungsphase bestimmt. Die Prozentzahlen geben jeweils die Mittelwerte \pm Standardabweichung der fünf unabhängigen Versuchsreihen wieder.

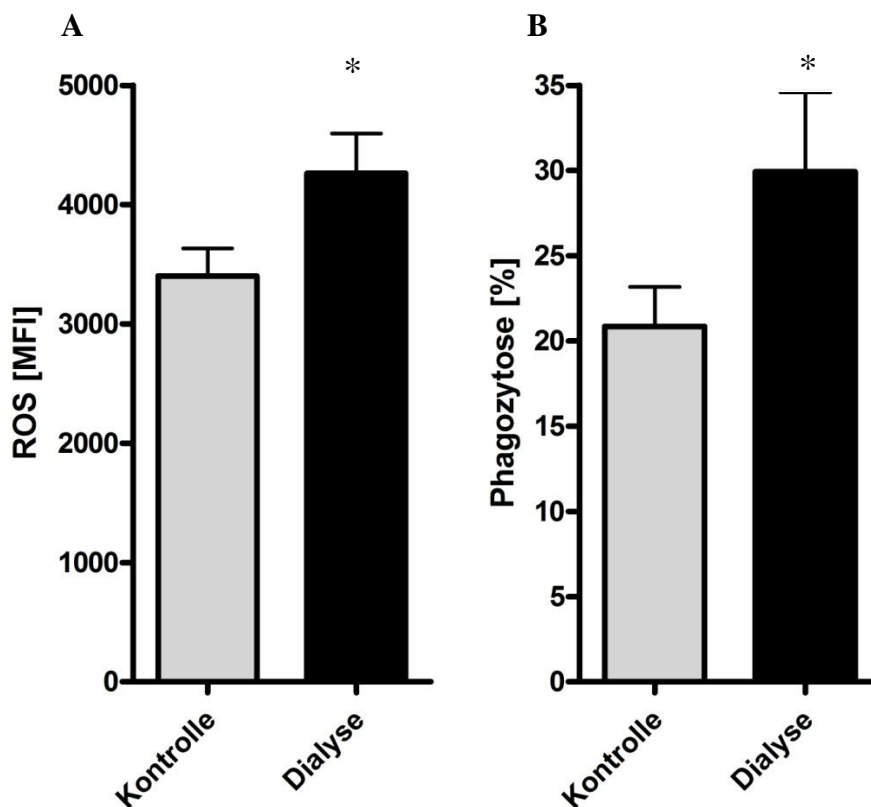


Abbildung 6. (A) Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Kontroll- bzw. urämischen CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten. Am Tag 8 der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten wurde die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten, die unter Kontroll- bzw. urämischen Bedingungen differenziert wurden, mittels des Detektionsreagenzes H₂DFDA durchflusszytometrisch als MFI bestimmt. **(B) Phagozytoseleistung Kontroll- und urämischer CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten.** Am Tag 8 der Differenzierung wurde die Phagozytoseleistung von CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten, die unter Kontroll- bzw. urämischen Bedingungen differenziert wurden, mittels fluoreszenzmarkierten Partikeln (Fluoresbrite Yellow Green Carboxylate Microspheres) durchflusszytometrisch bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Student's t-Tests; * $p < 0,05$.

4.2 Epigenetische Regulation der Monozytendifferenzierung unter urämischen Bedingungen

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, inwieweit die vermehrte Differenzierung intermediärer Monozyten auf epigenetische Fehlregulationen zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck wurde die DNA der unter Kontroll- und urämischen Bedingungen differenzierten Monozyten einer genomweiten Methylierungsanalyse zugeführt.

4.2.1 Genomweite DNA-Methylierungsanalyse der unterschiedlich differenzierten Monozyten

Für die genomweite DNA-Methylierungsanalyse wurden zunächst die unterschiedlich differenzierten Monozyten mittels CD14 Microbeads aufgereinigt und DNA aus diesen Zellen isoliert. Die durchschnittliche DNA Konzentration der Kontroll-Monozyten betrug dabei $11,4 \pm 6,3$ ng/ μ l, die der urämischen Monozyten $12,2 \pm 5,1$ ng/ μ l. Die DNA der Kontroll-Monozyten aus den fünf Versuchsreihen sowie die DNA der urämischen Monozyten aus den fünf Versuchsreihen wurde jeweils gepoolt und eine genomweite Methylierungsanalyse mittels MethSeq durchgeführt.

Aus den gepoolten DNA-Proben wurden zwei unabhängige Datenbanken (eine Datenbank der Kontroll-Monozyten sowie eine Datenbank der urämischen Monozyten) generiert. Nach Ausschluss von Sequenzartefakten betrug die Gesamtzahl der Reads 39.049.993, wovon 18.802.748 Reads den Kontroll-Monozyten und 20.247.245 Reads den urämischen Monozyten zugeordnet wurden. Diese 39.049.993 Reads ergaben 1.155.949 unterschiedliche Sequenzen, wovon 264.189 nur in den Kontroll-Monozyten und 194.556 nur in den urämischen Monozyten identifiziert wurden. Die Zuordnung zum humanen Genom erlaubte, die Verteilung der Sequenzen in verschiedenen DNA-Bereichen zu beschreiben (siehe Abbildung 7).

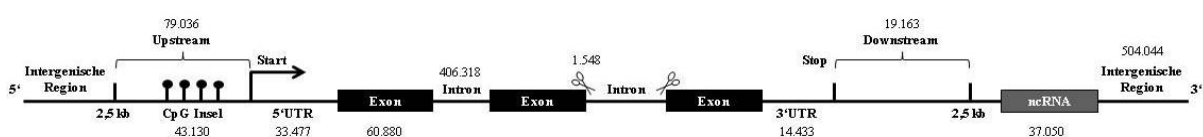


Abbildung 7. Übersicht über die Verteilung der in dieser Studie untersuchten Loci. Die Zahlen unter den DNA-Bereichen geben die Anzahl der analysierten Loci wieder.

Die Methode zur Analyse der genomweiten DNA-Methylierung umfasst verschiedene DNA Bereiche, wobei die weiteren Analysen den upstream Bereich von Genen fokussierten, da dieser Bereich zentral an der Regulation der Genexpression beteiligt ist. Es wurden insgesamt 43130 dieser Genregulationsbereiche analysiert, von welchen 388 zwischen Kontroll-Monozyten und urämischen Monozyten differentiell methyliert waren ($p < 0,001$). Unter den 388 differentiell methylierten Loci waren 303 Loci in urämischen Monozyten hypomethyliert, wohingegen 85 Loci hypermethyliert waren (siehe Abbildung 8).

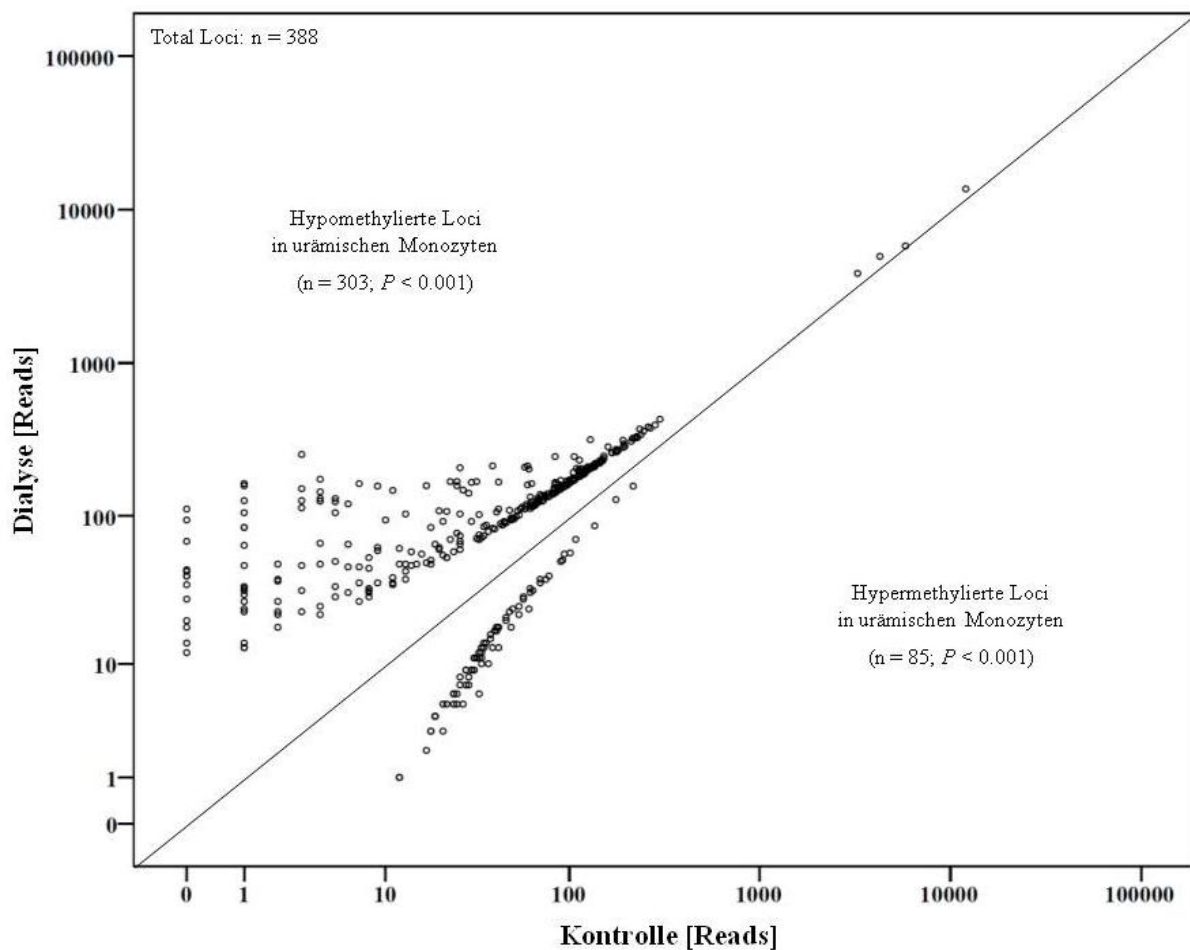


Abbildung 8. Streudiagramm zur Darstellung der differentiellen DNA-Methylierung zwischen Kontroll-Monozyten und urämischen Monozyten. Zur besseren Übersicht sind nur die differentiell methylierten Loci im upstream Bereich von Genen ($p < 0,001$) dargestellt.

In Tabelle 3 wurden diejenigen differentiell methylierten Gene aufgelistet, die sich zwischen den Kontroll-Monozyten und den urämischen Monozyten am stärksten unterschieden haben ($p < 10^{-10}$).

Tabelle 3. Am stärksten differentiell methylierte Gene in urämischen Monozyten

GenSymbol	Gen Name	CpG Insel	Kontrolle [Reads]	Dialyse [Reads]	log2 FC	P	Proteinfunktion
<i>FAM78A</i>	family with sequence similarity 78, member A	Nein	3	253	-6,3	5,9E-59	-
<i>UBTF</i>	upstream binding transcription factor, RNA polymerase I	Ja	4	174	-5,3	3,6E-41	rRNA Transkription; pre-rRNA Prozessierung; Chromatin Remodeling
<i>AXIN2</i>	axin 2	Nein	1	163	-7,2	7,0E-37	Regulation der Beta-Catenin Stabilität im nt-Signalweg
<i>KLHL2</i>	kelch-like family member 2	Ja	7	163	-4,4	1,3E-36	Organisation des Actincytoskeletts
<i>WNK1</i>	WNK lysine deficient protein kinase 1	Nein	3	151	-5,5	4,2E-36	Serine/Threonin- Proteinkinase; Regulation des Elektrolythaushaltes; Signaltransduktion, Zellproliferation
<i>HSD17B12</i>	hydroxysteroid (17-beta)dehydrogenase 12	Ja	1	158	-7,2	6,5E-36	17beta-hydroxysteroid Dehydrogenase
<i>NCMAP</i>	noncompact myelin associated protein	Nein	4	144	-5,1	5,0E-34	Myelin-Bildung
<i>MORC3</i>	MORC Family CW-Type Zinc Finger 3	Ja	26	207	-2,9	8,2E-34	RNA Bindungsaktivität; Lokalisation in Kernmatrix
<i>ST3GAL5</i>	ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase 5	Ja	9	157	-4,0	1,4E-33	Zelldifferenzierung, Proliferation, Signaltransduktion, Integrin-vermittelte Zelladhäsion
<i>SETD8</i>	SET Domain Containing (Lysine Methyltransferase) 8	Nein	4	130	-4,9	1,2E-30	Protein-lysine N-Methyltransferase; Monomethylierung von Lys-20 an Histon H4 (H4K20me1)
<i>SLFN12L</i>	Schlafen Family Member 12-Like	Nein	3	126	-5,3	3,1E-30	-
<i>PRKCE</i>	Protein Kinase C, Epsilon	Ja	5	130	-4,6	5,7E-30	Serine/Threonine-Proteinkinase; Zelladhäsion, Migration, Zellzykluskontrolle, Immunantwort, Apoptose
<i>HHEX</i>	Hematopoietically Expressed Homeobox	Ja	11	147	-3,6	1,4E-29	Transkriptions-Repressor; hämatopoetische Differenzierung

Ergebnisse

<i>C9orf169</i>	chromosome 9 open reading frame 169	Ja	1	126	-6,9	1,5E-29	-
<i>SALL1</i>	Sal-Like 1 (Drosophila)	Ja	4	125	-4,9	1,9E-29	Zinkfinger Transkriptions-Repressor; NuRD Histon-Deacetylase Komplex (HDAC)
<i>ZNF84</i>	Zinc Finger Protein 84	Nein	5	124	-4,5	1,7E-28	Transkriptionsregulation
<i>PEAR1</i>	platelet endothelial aggregation receptor 1	Nein	17	158	-3,1	5,0E-28	Thrombozytenrezeptor; reduziert die Zahl nicht-adhärenter myeloider Vorläuferzellen
<i>BARHL2</i>	BarH-like homeobox 2	Ja	39	213	-2,3	5,6E-28	Regulator neuronalerhelix-loop-helix Gene
<i>GOLGA1</i>	golgin A1	Ja	3	113	-5,1	3,9E-27	Aufrechterhaltung der Golgi-Struktur
<i>LOC100996307</i>	uncharacterized LOC100996307	Nein	6	120	-4,2	9,6E-27	-
<i>INTS8</i>	Integrator Complex Subunit 8	Nein	25	168	-2,6	1,9E-25	Prozessierung von small nuclear RNAs U1 und U2
<i>HIST1H2AK</i>	histone cluster 1, H2ak	Nein	1	105	-6,6	3,4E-25	Komponente des Nukleosoms
<i>C12orf57</i>	chromosome 12 open reading frame 57	Ja	0	111	-7,7	8,0E-25	-
<i>SNRPA1</i>	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A'	Ja	5	105	-4,3	8,5E-24	Assoziiert mitsn-RNP U2
<i>MARCH2</i>	membrane-associated ring finger (C3HC4) 2, E3 ubiquitin protein ligase	Nein	25	158	-2,6	3,3E-23	E3 Ubiquitin-Protein Ligase; vermittelt Ubiquitinierung von TFRCund CD86
<i>P2RX1</i>	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1	Nein	30	166	-2,4	2,3E-22	Liganden abhängiger Ionen-Kanal mit hoher Calcium-Permeabilität
<i>SLC30A9</i>	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 9	Nein	32	168	-2,3	8,4E-22	transkriptionale Aktivierung von Wnt-abhängigen Genen
<i>MMP23A/B</i>	Matrix Metallopeptidase 23A/B	Ja	0	94	-7,4	1,2E-21	Abbau extrazellulärer Matrix

Ergebnisse

<i>TUBGCP6</i>	Tubulin, Gamma Complex Associated Protein 6	Ja	1	84	-6,3	1,1E-20	Keimbildung der Mikrotubuli am Zentrosom
<i>SAMD11</i>	sterile alpha motif domain containing 11	Ja	1	84	-6,3	1,1E-20	-
<i>WNK1</i>	WNK lysine deficient protein kinase 1	Nein	27	148	-2,3	5,6E-20	Serin/Threonin-Proteinkinase; Regulation der Elektrolythomöostase, Signaltransduktion, Proliferation
<i>GPR39</i>	G protein-coupled receptor 39	Ja	60	213	-1,7	2,9E-19	Vermittelt Wirkung von Zn(2 ⁺) über G-Proteine
<i>DAP</i>	Death-Associated Protein	Ja	13	103	-2,9	1,3E-17	Vermittler des programmierten Zelltods, induziert durch Interferon-gamma
<i>PANK4</i>	Pantothenate Kinase 4	Ja	29	141	-2,2	1,5E-17	Biosynthese von Coenzym A (CoA)
<i>GLIPR2</i>	GLI pathogenesis-related 2	Nein	10	94	-3,1	2,1E-17	-
<i>IGFBP3</i>	insulin-like growth factor binding protein 3	Ja	42	167	-1,9	2,8E-17	Insulin-like growth Faktor Binde-Protein; IGF-unabhängige antiproliferative und apoptotische Wirkung
<i>EIF4A3</i>	eukaryotic translation initiation factor 4A3	Nein	84	245	-1,4	3,1E-17	RNA Helikase, Translationsinitiation, Spleißing, Ribosom und Spleißosombildung, Zellwachstum und Teilung
<i>NAA20</i>	N(alpha)-acetyltransferase 20, NatB catalytic subunit	Ja	61	203	-1,6	3,8E-17	Komponente des N-Acetyltransferase Komplexes B; Migration
<i>DAPK1</i>	death-associated protein kinase 1	Ja	0	68	-7,0	1,4E-16	Vermittelt gamma-Interferon induzierten programmierten Zelltod
<i>FRAT2</i>	frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 2	Nein	129	316	-1,2	1,4E-16	GSK-3-Bindeprotein; positive Regulation des Wnt Signalwegs durch beta-Catenin Stabilisierung
<i>CDC42BPB</i>	CDC42 binding protein kinase beta (DMPK-like)	Ja	1	64	-5,9	3,0E-16	Serin/Threonin Proteinkinase; vermittelt Wirkung von CDC42; Zykoskelett-Organisation und Zellmigration
<i>MTAP</i>	methylthioadenosine phosphorylase	Nein	4	66	-3,9	7,1E-15	Polyamin-Stoffwechsel
<i>MKI67</i>	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	Nein	20	108	-2,3	7,5E-15	Zellproliferation

Ergebnisse

<i>WDR74</i>	WD repeat domain 74	Nein	22	107	-2,2	1,1E-13	-
<i>hsa-mir-3194</i>	hsa-mir-3194	Ja	6	65	-3,3	4,0E-13	miRNA
<i>SLC43A2</i>	Solute Carrier Family 43, Member 2	Ja	1	47	-5,4	2,7E-12	Na-, Cl-, und pH-unabhängiger Transport von neutralen Aminosäuren
<i>NCKIPSD</i>	NCK Interacting Protein With SH3 Domain	Ja	2	48	-4,5	6,3E-12	Signaltransduktion, Aktinpolymerisation, Zelladhäsion, Angiogenese
<i>BATF3</i>	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3	Nein	106	245	-1,1	7,0E-12	AP-1 Transkriptionsfaktor; Differenzierung von dendritischen Zellen; Hemmung von IL-2 und MMP-1
<i>IFITM4P</i>	interferon induced transmembrane protein 4 pseudogene	Nein	0	44	-6,4	1,5E-11	-
<i>TLCD2</i>	TLC domain containing 2	Ja	0	43	-6,3	2,5E-11	-
<i>TEKT1</i>	tektin 1	Nein	26	103	-1,9	3,4E-11	Filament-bildendes Protein; assoziiert mit Tubulin
<i>RNF19B</i>	ring finger protein 19B	Ja	3	47	-3,9	6,7E-11	E3 Ubiquitin-Proteinligase; zytolytische Funktion
<i>ERC1</i>	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1	Nein	18	84	-2,1	9,9E-11	Regulatorische Untereinheit des IKK Komplexes; Golgi Transport

FC: Fold change, (log2 Kontrolle / Dialyse Verhältnis); Proteinfunktion: nach Entrez Gene, UniProtKB/Swiss-Prot

4.2.2 Charakterisierung differentiell methylierter Gene

Nachfolgend wurde untersucht, ob die differentiell methylierten Gene in bestimmten biologischen Signalwegen involviert sind. Dazu wurde die bioinformatische Datenbank String 9.05 (<http://string-db.org/>) eingesetzt, die erlaubte, eine Interaktionsanalyse sowie eine Gene Ontology Analyse durchzuführen. In die Interaktionsanalyse sind alle differentiell methylierten Loci des upstream Bereichs eingegangen (siehe Abbildung 9). Dabei wurden insgesamt 135 Interaktionen zwischen den differentiell methylierten Genen identifiziert. Die Gene Ontology Analyse, welche die drei Bereiche *Biologischer Prozess*, *Zelluläre Komponente* und *Molekulare Funktion* beinhaltet, konnte signifikante Unterschiede im Bereich *Molekulare Funktion* aufzeigen, mit den größten Unterschieden im Teilbereich *sequence-specific DNA binding transcription factor activity* ($p = 0,007$; 33 differentiell methylierte Gene).

Rezente Daten zeigten, dass Dialysepatienten sich durch eine Dysregulation von Atherosklerose-relevanten Genen auszeichnen (108). Jetzt wurde untersucht, inwieweit die Urämie auch *in vitro* in sich differenzierenden Monozyten eine Dysregulation Atherosklerose-relevanter Gene induziert. Dazu wurde mit Hilfe der Genetic Association Database (<http://geneticassociationdb.nih.gov/>) die Assoziation der differentiell methylierten Gene mit kardiovaskulären Erkrankungen sowie mit Infektion / Inflammation untersucht. Es wurden 52 Gene identifiziert, die mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert sind, und 54 Gene, welche mit Infektion / Inflammation assoziiert werden konnten (siehe Tabelle 4).

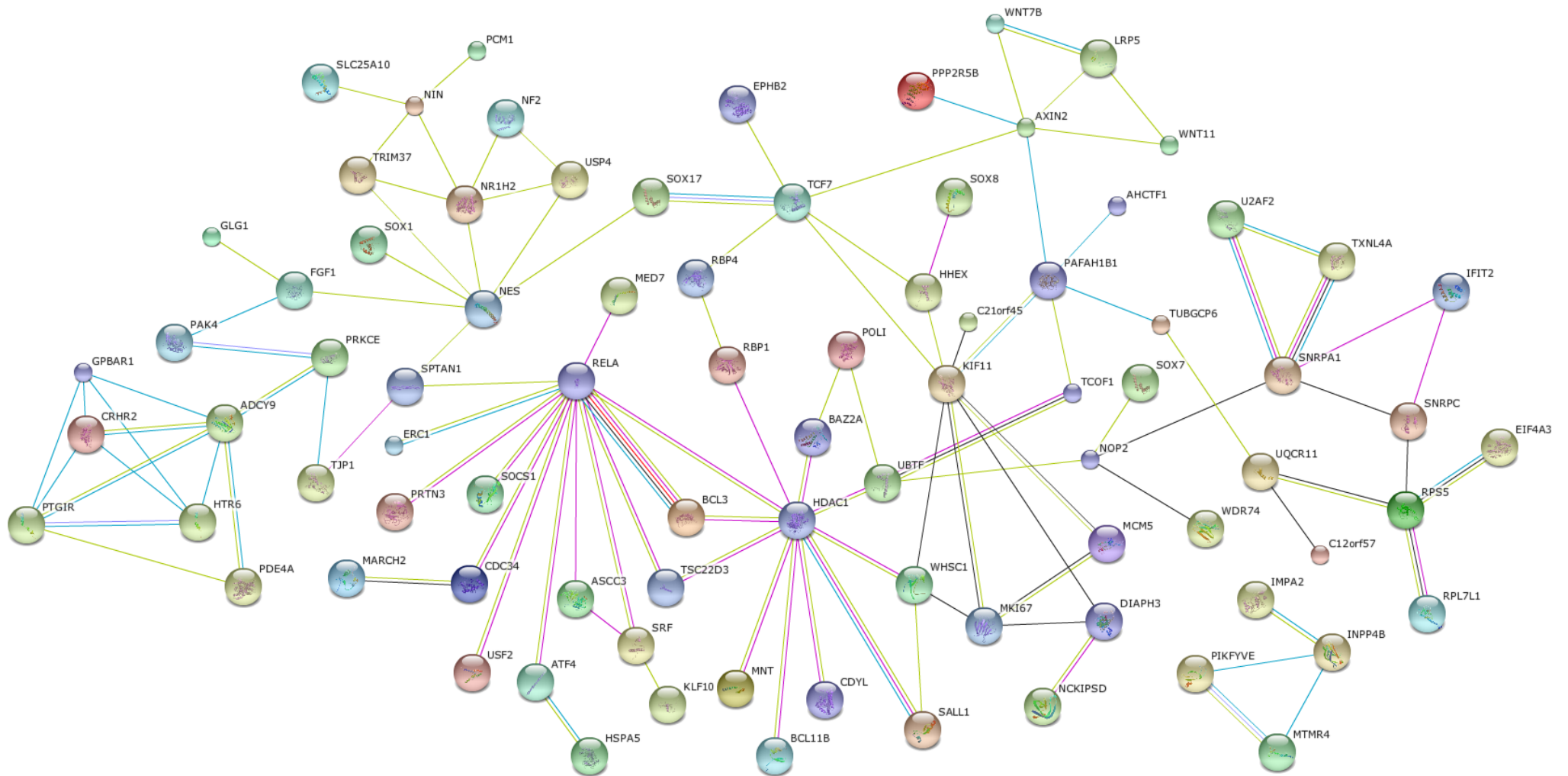


Abbildung 9. Interaktionsanalyse differenziell methylierter Gene. Die Interaktionsanalyse wurde mittels der bioinformatischen Datenbank String 9.05 durchgeführt. Alle differenziell methylierten Loci im upstream Bereich wurden in die Analyse eingeschlossen.

Tabelle 4: Mit kardiovaskulären Erkrankungen (CVD) und Infektion / Inflammation (INF/IMM) assoziierte differentiell methylierte Gene

Gen Symbol	Gen Name	CpG Insel	Kontrolle [Reads]	Dialyse [Reads]	log2 FC	P	CVD	INF / IMM
<i>WNK1</i>	WNK lysine deficient protein kinase 1	Nein	3	151	-5,5	4,2E-36	●	●
<i>HSD17B12</i>	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	Ja	1	158	-7,2	6,5E-36	●	
<i>PRKCE</i>	Protein Kinase C, Epsilon	Ja	5	130	-4,6	5,7E-30	●	●
<i>HHEX</i>	Hematopoietically Expressed Homeobox	Ja	11	147	-3,6	1,4E-29	●	●
<i>TUBGCP6</i>	Tubulin, Gamma Complex Associated Protein 6	Ja	1	84	-6,3	1,1E-20		●
<i>WNK1</i>	WNK lysine deficient protein kinase 1	Nein	27	148	-2,3	5,6E-20	●	●
<i>GPR39</i>	G protein-coupled receptor 39	Ja	60	213	-1,7	2,9E-19	●	
<i>DAP</i>	Death-Associated Protein	Ja	13	103	-2,9	1,3E-17		●
<i>IGFBP3</i>	insulin-like growth factor binding protein 3	Ja	42	167	-1,9	2,8E-17	●	●
<i>DAPK1</i>	death-associated protein kinase 1	Ja	0	68	-7,0	1,4E-16	●	
<i>MTAP</i>	methylthioadenosine phosphorylase	Nein	4	66	-3,9	7,1E-15	●	●
<i>MKI67</i>	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	Nein	20	108	-2,3	7,5E-15	●	●
<i>TEKT1</i>	tektin 1	Nein	26	103	-1,9	3,4E-11		●
<i>PRTN3</i>	proteinase 3	Nein	63	163	-1,3	4,3E-10	●	
<i>PRDM2</i>	PR domain containing 2, with ZNF domain	Ja	0	35	-6,0	1,5E-09	●	
<i>PEX10</i>	peroxisomal biogenesis factor 10	Ja	2	38	-4,1	2,0E-09		●
<i>ALDH5A1</i>	aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1	Ja	160	284	-0,7	2,4E-07		●
<i>CDC34</i>	cell division cycle 34	Ja	2	27	-3,6	1,2E-06		●
<i>MTMR4</i>	myotubularin related protein 4	Nein	109	205	-0,8	1,4E-06		●
<i>CDYL</i>	chromodomain protein, Y-like	Ja	235	371	-0,6	3,3E-06	●	
<i>RAMP3</i>	receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 3	Ja	62	133	-1,0	3,4E-06	●	
<i>BCL3</i>	B-cell CLL/lymphoma 3	Nein	90	171	-0,8	7,7E-06	●	●
<i>PTGIR</i>	prostaglandin I2 (prostacyclin) receptor (IP)	Nein	20	62	-1,5	9,1E-06		●

<i>PTPRM</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, M	Ja	0	18	-5,1	1,7E-05		•
<i>ATP6V0A1</i>	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit a1	Nein	36	87	-1,2	1,9E-05		•
<i>GABRG3</i>	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, gamma 3	Ja	35	85	-1,2	2,2E-05	•	•
<i>NRN1</i>	neuritin 1	Ja	112	196	-0,7	2,9E-05	•	
<i>FGF1</i>	fibroblast growth factor 1 (acidic)	Nein	54	22	1,4	5,4E-05	•	•
<i>BSND</i>	Bartter syndrome, infantile, with sensorineural deafness (Barttin)	Ja	56	114	-0,9	5,7E-05	•	
<i>BCL3</i>	B-cell CLL/lymphoma 3	Nein	63	124	-0,9	6,0E-05	•	•
<i>FRAS1</i>	Fraser syndrome 1	Nein	3	23	-2,8	6,3E-05	•	
<i>HDAC1</i>	histone deacetylase 1	Ja	29	7	2,2	6,5E-05		•
<i>DPYS</i>	dihydropyrimidinase	Nein	39	13	1,7	8,3E-05	•	
<i>ADAMTS5</i>	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 5	Ja	4	25	-2,5	8,4E-05	•	
<i>SOX8</i>	SRY (sex determining region Y)-box 8	Ja	53	108	-0,9	8,7E-05		•
<i>PAFAH1B1</i>	platelet-activating factor acetylhydrolase 1b, regulatory subunit 1 (45kDa)	Ja	136	86	0,8	9,0E-05	•	•
<i>DOT1L</i>	DOT1-like histone H3K79 methyltransferase	Ja	89	158	-0,7	1,2E-04		•
<i>WNT11</i>	wingless-type MMTV integration site family, member 11	Ja	24	5	2,4	1,2E-04	•	
<i>PKP1</i>	plakophilin 1 (ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome)	Ja	217	157	0,6	1,3E-04	•	•
<i>NF2</i>	neurofibromin 2 (merlin)	Ja	167	261	-0,5	1,4E-04	•	•
<i>SOCS1</i>	suppressor of cytokine signaling 1	Ja	100	172	-0,7	1,5E-04		•
<i>ACP5</i>	acid phosphatase 5, tartrate resistant	Nein	31	9	1,9	1,5E-04		•
<i>SFMBT2</i>	Scm-like with four mbt domains 2	Ja	177	273	-0,5	1,6E-04		•
<i>DIAPH3</i>	diaphanous-related formin 3	Ja	29	8	2,0	1,7E-04	•	
<i>PPOX</i>	protoporphyrinogen oxidase	Nein	135	217	-0,6	2,1E-04		•
<i>IMPA2</i>	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2	Ja	21	55	-1,3	2,5E-04	•	
<i>AUTS2</i>	autism susceptibility candidate 2	Ja	30	9	1,8	2,5E-04	•	•
<i>TPK1</i>	thiamin pyrophosphokinase 1	Nein	58	111	-0,8	2,7E-04	•	
<i>CRHR2</i>	corticotropin releasing hormone receptor 2	Nein	54	25	1,2	3,0E-04		•

<i>ADCY9</i>	adenylate cyclase 9	Nein	69	126	-0,8	3,1E-04	●	●
<i>ACVR1</i>	activin A receptor, type I	Nein	8	31	-1,8	3,3E-04	●	
<i>PON3</i>	paraoxonase 3	Ja	24	6	2,1	3,5E-04	●	●
<i>SMOC2</i>	SPARC related modular calcium binding 2	Ja	18	3	2,7	3,5E-04	●	●
<i>SMYD2</i>	SET and MYND domain containing 2	Nein	94	56	0,9	3,6E-04		●
<i>LRP5</i>	low density lipoprotein receptor-related protein 5	Nein	4	22	-2,4	4,1E-04	●	●
<i>USP4</i>	ubiquitin specific peptidase 4 (proto-oncogene)	Nein	1	14	-3,7	4,5E-04		●
<i>ADAM23</i>	ADAM metallopeptidase domain 23	Nein	32	11	1,6	4,7E-04		●
<i>SOX11</i>	SRY (sex determining region Y)-box 11	Nein	45	90	-0,9	4,8E-04	●	●
<i>NR1H2</i>	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2	Ja	38	15	1,4	5,2E-04	●	
<i>DYRK1A</i>	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A	Nein	86	147	-0,7	5,3E-04		●
<i>ADAMTS7</i>	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 7	Ja	89	151	-0,7	5,4E-04	●	
<i>TPK1</i>	thiamin pyrophosphokinase 1	Ja	101	167	-0,6	5,5E-04	●	
<i>TCF7</i>	transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)	Nein	90	152	-0,6	5,8E-04	●	●
<i>RNF39</i>	ring finger protein 39	Nein	42	18	1,3	6,3E-04		●
<i>SAA1</i>	serum amyloid A1	Nein	36	14	1,5	6,4E-04	●	●
<i>RELA</i>	v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A	Nein	28	9	1,7	6,6E-04		●
<i>POLI</i>	polymerase (DNA directed) iota	Nein	35	74	-1,0	6,6E-04		●
<i>CORO2B</i>	coronin, actin binding protein, 2B	Ja	137	213	-0,5	6,8E-04	●	
<i>PAX5</i>	paired box 5	Ja	46	90	-0,9	7,0E-04	●	●
<i>FBN2</i>	fibrillin 2	Ja	105	171	-0,6	7,1E-04	●	●
<i>SLC25A10</i>	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; dicarboxylate transporter), member 10	Ja	44	87	-0,9	7,2E-04		●
<i>KIAA1199</i>	KIAA1199	Ja	229	329	-0,4	7,3E-04	●	
<i>SPTAN1</i>	spectrin, alpha, non-erythrocytic 1	Ja	66	118	-0,7	7,5E-04		●
<i>ITPR3</i>	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 3	Ja	12	1	3,7	7,5E-04		●

<i>PDE4A</i>	phosphodiesterase 4A, cAMP-specific	Ja	26	8	1,8	7,7E-04	●	
<i>SOX17</i>	SRY (sex determining region Y)-box 17	Ja	34	13	1,5	7,8E-04	●	
<i>ITPKA</i>	inositol-trisphosphate 3-kinase A	Nein	62	33	1,0	8,0E-04		●
<i>SPRY4</i>	sprouty homolog 4 (Drosophila)	Ja	117	186	-0,6	8,2E-04	●	
<i>MAPK6</i>	mitogen-activated protein kinase 6	Ja	41	18	1,3	9,4E-04	●	
<i>INPP4B</i>	inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II, 105kDa	Ja	196	286	-0,4	9,4E-04	●	
<i>B4GALT1</i>	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 1	Ja	51	96	-0,8	9,5E-04	●	●

FC: Fold change (log2[Kontrolle/Dialyse Verhältnis]); CVD: kardiovaskuläre Erkrankungen; INF / IMM: Infektion / Inflammation

4.3 Einfluss von C1 Metaboliten auf Monozytensubpopulationen

4.3.1 Einfluss von C1 Metaboliten auf differenzierte Monozyten

Die Identifikation derer Urämietoxine, welche für die beschleunigte Differenzierung von CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten bei chronisch nierenkranken Patienten verantwortlich sein könnten, war Gegenstand der nächsten Fragestellung. Da die chronische Nierenerkrankung mit einem gestörten C1 Metabolismus einhergeht und dessen Metabolite zentral auf die epigenetische Genregulation Einfluss nehmen, wurde nachfolgend untersucht, ob diese auch die Monozytenbiologie verändern. Dazu wurde die Wirkung von Homocystein (Hcy) und S-Adenosylhomocystein (SAH) auf die Monozytensubpopulationen untersucht. Da durch die Zugabe von Hcy auch die intrazelluläre SAH Konzentration ansteigt (83), wurde neben der Stimulation von Monozyten mit Hcy und SAH eine zusätzliche Stimulation mit Adenosin-2',3'-dialdehyd (Adox) durchgeführt. Adox stellt einen Inhibitor der SAH Hydrolase dar, welcher selektiv die intrazelluläre SAH Konzentration erhöht (21, 83) und somit erlaubt, den Einfluss von SAH unabhängig vom Hcy zu untersuchen.

Hierzu wurde zunächst Vollblut gesunder Spender *in vitro* für fünf Stunden stimuliert. Der Effekt auf die Monozytensubpopulationen wurde anschließend durchflusszytometrisch untersucht (siehe Abbildung 10)

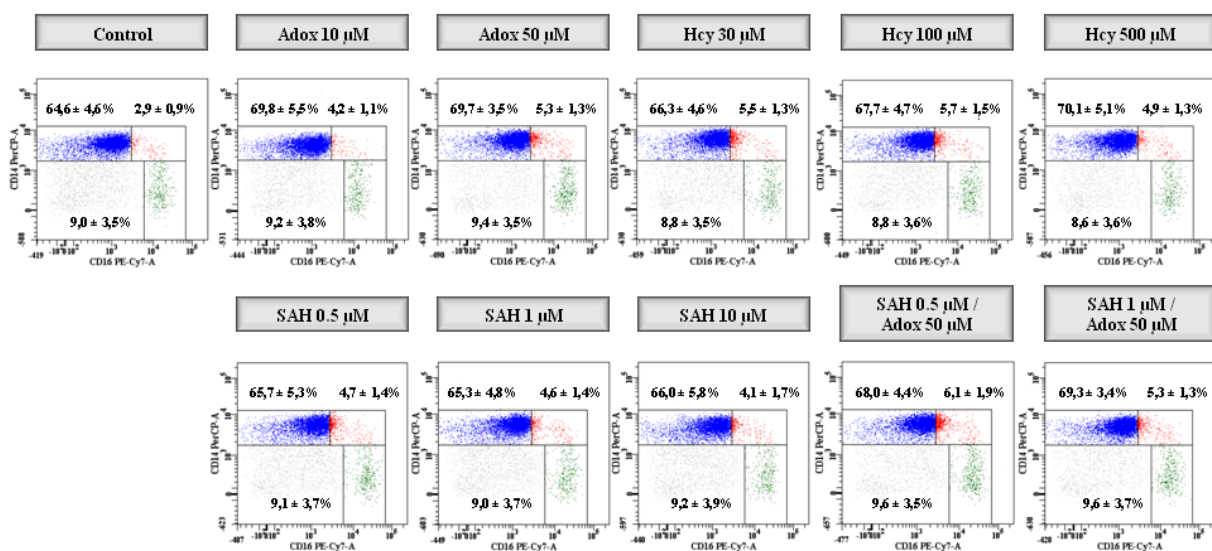


Abbildung 10. Verteilung der Monozytensubpopulationen nach fünfständiger Stimulation mit Hcy, SAH und Adox. Repräsentatives Beispiel aus sechs unabhängigen Versuchen. Die Prozentzahlen geben die Mittelwerte ± Standardabweichung wieder.

Die fünfstündige Stimulation von Monozyten mit Hcy (30 μM : $p < 0,01$; 100 μM : $p < 0,01$; 500 μM : $p < 0,05$) induzierte eine Verschiebung der $\text{CD14}^{++}\text{CD16}^-$ Monozyten in Richtung der $\text{CD14}^{++}\text{CD16}^+$ Monozytensubpopulation. Die Stimulation mit SAH erhöhte ebenso die Zellzahl der $\text{CD14}^{++}\text{CD16}^+$ Monozyten, jedoch erreichte nur der Ansatz mit der 0,5 μM SAH Konzentration die Signifikanzgrenze.

Unter einer selektiven Erhöhung von SAH mittels Adox (unabhängig von Hcy) zeigte sich ebenso eine Verschiebung der $\text{CD14}^{++}\text{CD16}^-$ Monozyten in Richtung der $\text{CD14}^{++}\text{CD16}^+$ Monozytensubpopulation, die bei einer Konzentration von 50 μM signifikant war ($p < 0,01$). Den größten Einfluss auf die Verschiebung der Monozytensubpopulationen hatte eine kombinierte Stimulation der Monozyten mit 0,5 μM SAH und 50 μM Adox ($p < 0,01$). $\text{CD14}^+\text{CD16}^{++}$ Monozyten blieben von den Stimulationen unbeeinflusst.

Um zu untersuchen, ob zeitabhängige Effekte auftreten, wurde im nächsten Schritt die Stimulationszeit auf 16 Stunden erhöht. Der Einfluss dieser verlängerten Stimulationszeit auf die Monozytensubpopulationen ist in Abbildung 11 dargestellt.

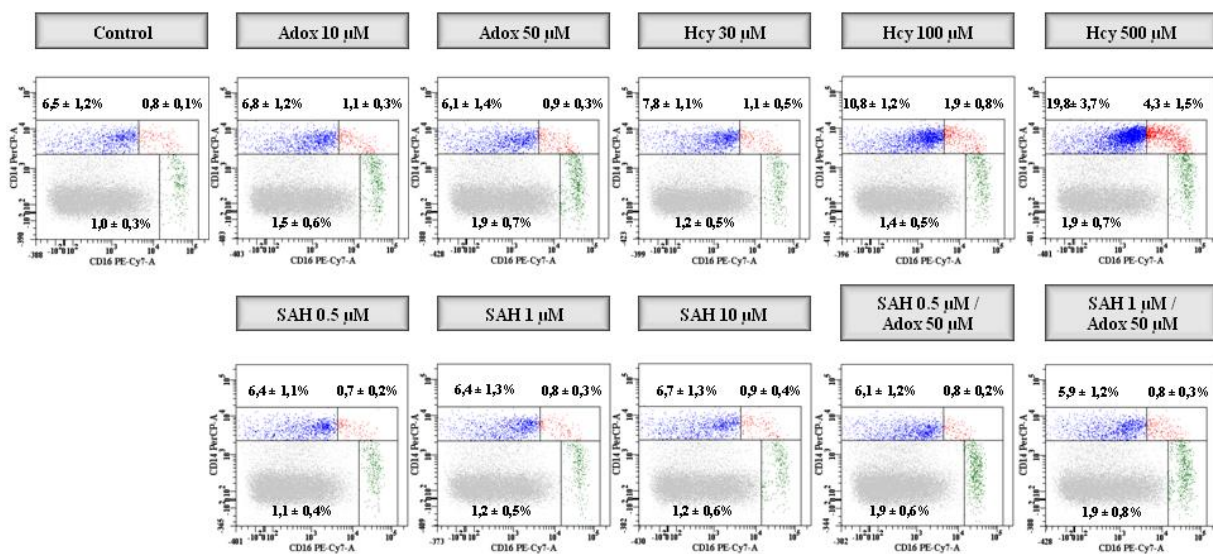


Abbildung 11. Verteilung der Monozytensubpopulationen nach 16-stündiger Stimulation mit Hcy, SAH und Adox. Repräsentatives Beispiel aus sieben unabhängigen Versuchen. Die Prozentzahlen geben die Mittelwerte \pm Standardabweichung wieder.

Die Vollblutstimulation mit Hcy über 16 Stunden bewirkte eine konzentrationsabhängige Zunahme der $\text{CD14}^{++}\text{CD16}^+$ Monozyten. Die Zunahme unter 500 μM Hcy war dabei signifikant ($p < 0,01$). Die Zellzahlen der $\text{CD14}^{++}\text{CD16}^+$ Monozyten nach einer SAH und Adox Stimulation unterschieden sich nicht signifikant zur Kontrolle. Jedoch führte die 16-stündige Stimulation mit Adox konzentrationsabhängig zu einem signifikanten Anstieg der $\text{CD14}^+\text{CD16}^{++}$ Monozyten (50 μM : $p < 0,05$). Gleichmaßen führte eine Stimulation von

Hcy (500 μM : $p < 0,05$) sowie die kombinierte Stimulation mit SAH und Adox (0,5 μM SAH + 50 μM Adox: $p < 0,05$; 1 μM SAH + 50 μM Adox: $p < 0,05$) zu einem Anstieg der CD14⁺CD16⁺⁺ Monozyten.

Zur weiteren Charakterisierung der Monozytensubpopulationen unter Einfluss der C1 Metabolite wurde nach der fünfstündigen Stimulation eine Expressionsanalyse der proatherogenen Rezeptoren CCR5 und CX₃CR1 (siehe Abbildung 12) sowie eine funktionelle Analyse hinsichtlich der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und der Phagozytoseleistung durchgeführt (siehe Abbildung 13).

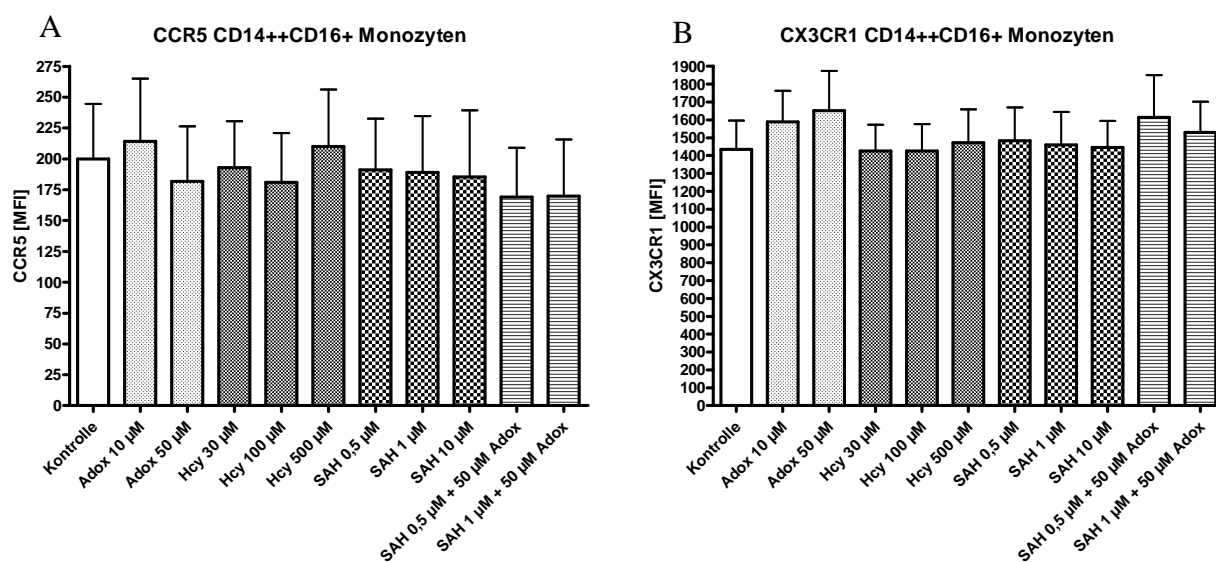


Abbildung 12. Expressionsstärke proatherogener Rezeptoren auf CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten nach fünfstündiger Stimulation mit Hcy, SAH und Adox. Die Expression von CCR5 (A) und CX₃CR1 (B) wurde durchflusszytometrisch als MFI in den CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten quantifiziert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung aus sechs unabhängigen Versuchen. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA mit nachfolgendem Dunnett's post-hoc Test.

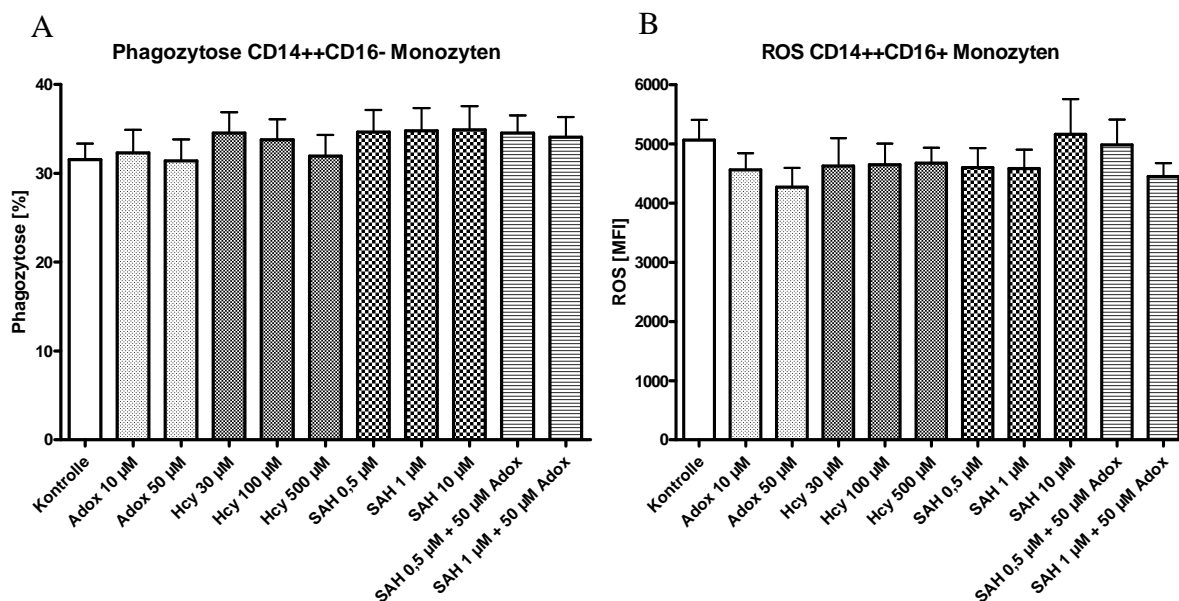


Abbildung 13. Funktionelle Charakterisierung von Monozytensubpopulationen nach fünfstündiger Stimulation mit Hcy, SAH und Adox. Die Phagozytoserate (A) von CD14++CD16- Monozyten wurde durchflusszytometrisch mittels fluoreszenzmarkierten Partikeln (Fluoresbrite Yellow Green Carboxylate Microspheres) bestimmt. Die Messung von reaktiven Sauerstoffspezies (B) erfolgte mittels des Detektionsreagenzes H₂DFDA durchflusszytometrisch als MFI. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA mit nachfolgendem Dunnett's post-hoc Test.

Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen in der Expression der proatherogenen Rezeptoren CCR5 und CX₃CR1 auf den CD14++CD16+ Monozyten nach fünfstündiger Stimulation mit Hcy, SAH und Adox. Ebenso war die Phagozytoseleistung und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nach fünfstündiger Stimulation mit Hcy, SAH und Adox nicht signifikant verändert.

4.3.2 Einfluss des C1 Metabolismus auf die Differenzierung von Monozytensubpopulationen

Abschließend sollte untersucht werden, ob die Modulation des C1 Metabolismus auch den Differenzierungsprozess von Monozyten aus hämatopoetischen Stammzellen beeinflusst.

Hierzu wurden, wie in Abbildung 14 schematisch dargestellt, hämatopoetische Stammzellen isoliert, expandiert und anschließend unter Stimulation mit Hcy (30 μ M, 100 μ M, 500 μ M), SAH (0,5 μ M, 1 μ M, 10 μ M), Adox (10 μ M; 50 μ M) und der Kombination von SAH und Adox (0,5 μ M + 50 μ M; 1 μ M + 50 μ M) zu Monozyten differenziert. Der Verlauf der Differenzierung von CD14⁺⁺CD16⁻ und CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten wurde täglich mittels Durchflusszytometrie erfasst (siehe Abbildung 15).

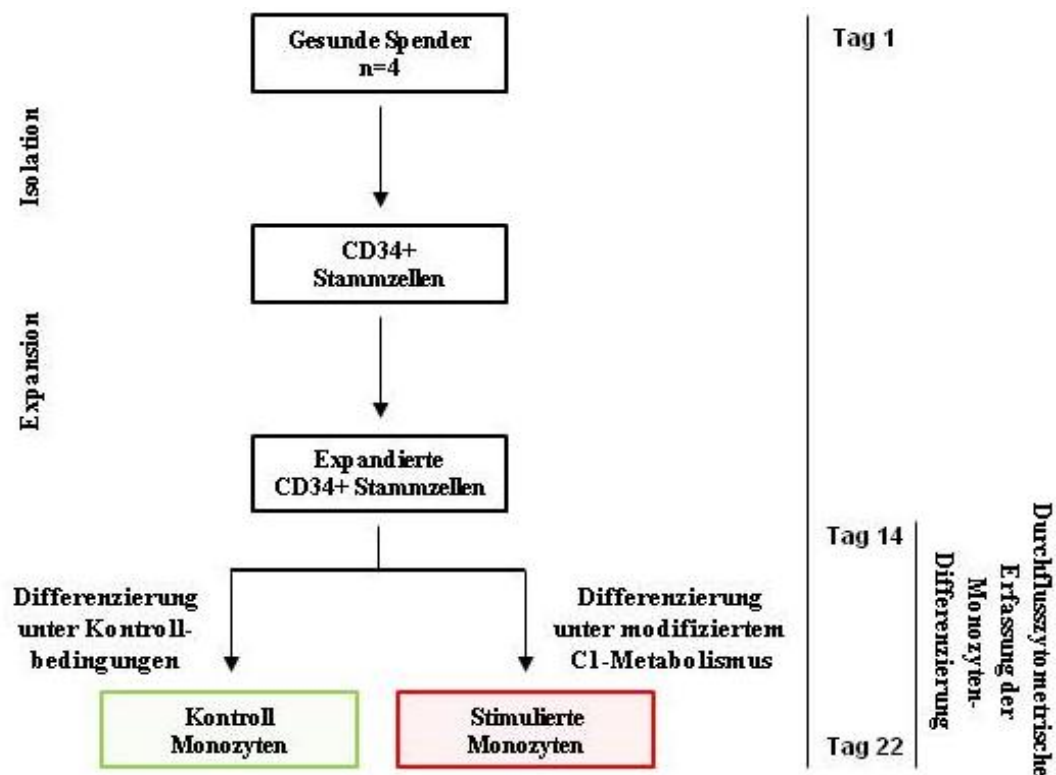


Abbildung 14. Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. Hämatopoetische Stammzellen (CD34+ Stammzellen) wurden mittels magnetischer Isolation aufgereinigt und expandiert. Anschließend wurden die CD34+ Stammzellen unter Kontrollbedingungen und unter Stimulation mit Hcy, SAH oder Adox zu Monozyten differenziert. Die Differenzierung zu Monozyten wurde täglich durchflusszytometrisch erfasst.

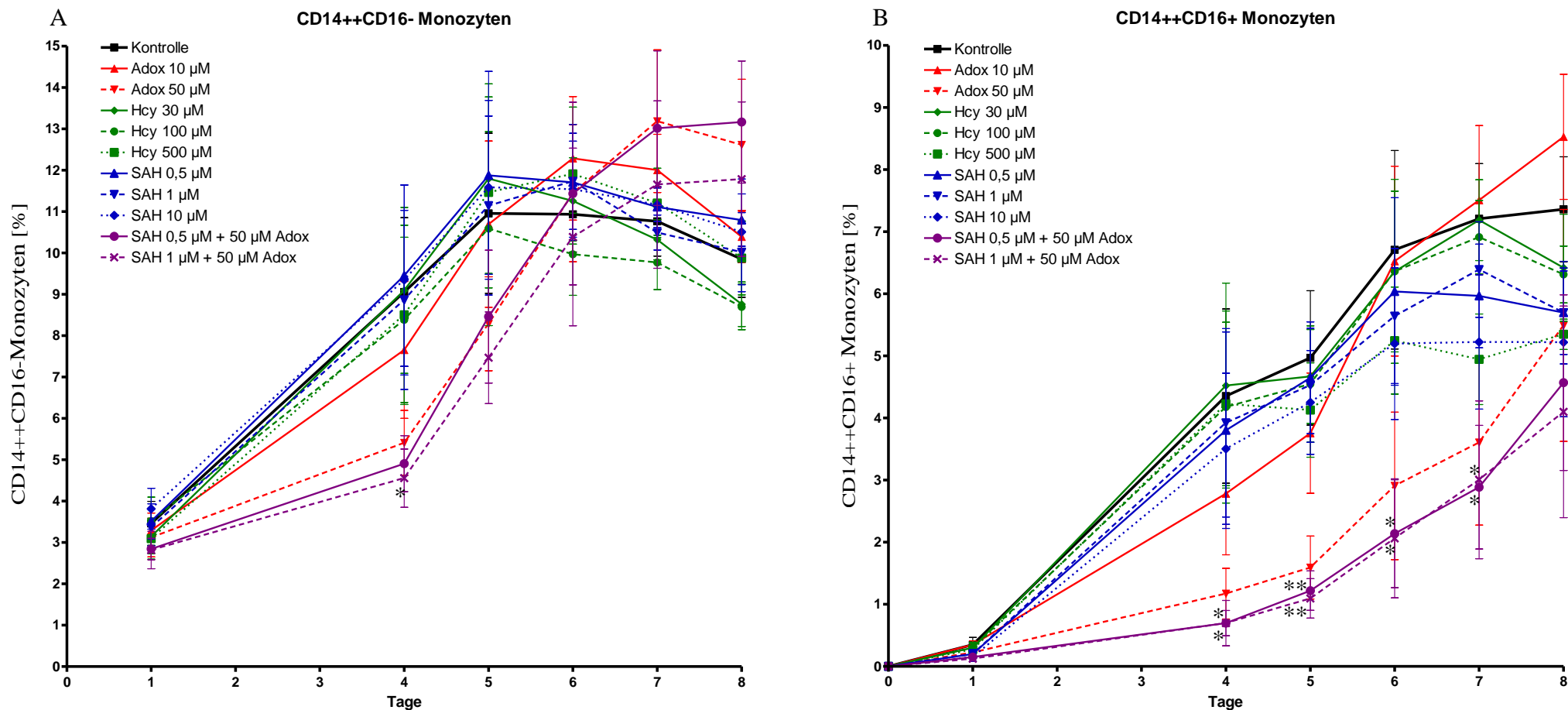


Abbildung 15. Einfluss von Hcy, SAH und Adox auf den Differenzierungsprozess von Monozytensubpopulationen. Hämatopoetische Stammzellen wurden expandiert und unter Stimulation mit Hcy (grün), SAH (blau), Adox (rot) bzw. Kombination von SAH und Adox (lila) über acht Tage zu Monozyten differenziert. Der Differenzierungsprozess von CD14++CD16- (**A**) und CD14++CD16+ Monozyten (**B**) wurde täglich mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler aus 4 unabhängigen Versuchen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA und nachfolgendem Dunnett's post-hoc Test. *p < 0,05; **p < 0,01.

Die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen zu CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten (A) war unter Stimulation mit Adox bzw. kombinierter Stimulation von SAH und Adox zunächst verlangsamt (bis Tag 5), erreichte jedoch an Tag 8 einen höheren Wert als die Kontrolldifferenzierung. Diese Unterschiede waren nicht statistisch signifikant (mit Ausnahme der kombinierten Stimulation von SAH [1 µM] und Adox [50 µM], $p < 0,05$). Die Differenzierung von CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten unter Stimulation von Hcy bzw. SAH ohne Kombination mit Adox zeigten keine Unterschiede zur Kontrolldifferenzierung.

In Einklang mit der Differenzierung von CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten war auch die Differenzierung der CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten (B) unter Stimulation mit Adox bzw. kombinierter Stimulation von SAH und Adox zu Beginn verlangsamt, erreichte jedoch im Beobachtungszeitraum, mit Ausnahme der Stimulation Adox 10 µM, nicht das Niveau der Kontrolldifferenzierung. Die verlangsamte Differenzierung unter der kombinierten Stimulation von SAH und Adox erreichte bei Tag 4 - 7 die vordefinierte statistische Signifikanzgrenze. Die Differenzierung unter Stimulation von Hcy bzw. SAH ohne Kombination mit Adox zeigte auch bei CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten keine Unterschiede im Vergleich zu der Kontrolldifferenzierung.

An Tag 8 der Differenzierungsphase wurde zusätzlich die Oberflächenexpression von CCR5 und CX₃CR1 auf den Monozytensubpopulationen untersucht (Abbildung 16) sowie eine funktionelle Analyse der ROS Produktion und Phagozytoserate der Monozytensubpopulationen durchgeführt (Abbildung 17). Es zeigte sich, dass weder die Oberflächenexpression noch die untersuchten funktionellen Charakteristika der Monozytensubpopulationen durch die Stimulation mit den Metaboliten und Mediatoren des C1 Stoffwechsels signifikant verändert wurden.

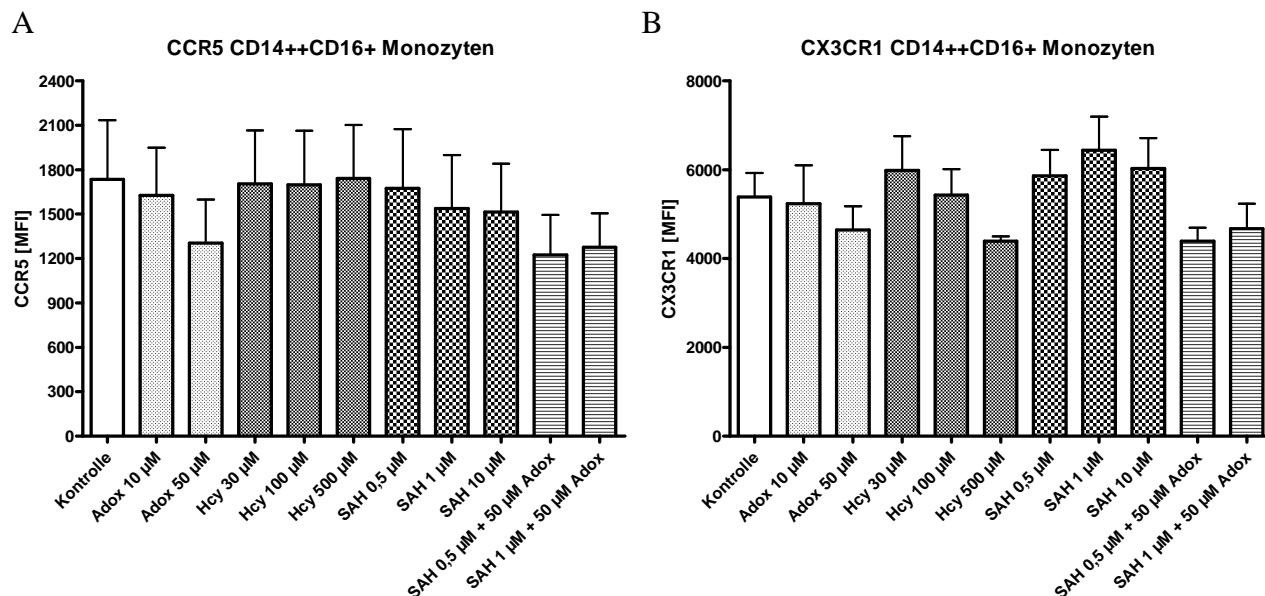


Abbildung 16. Oberflächenexpression von CCR5 und CX₃CR1 auf differenzierten CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten. CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten wurden aus hämatopoetischen Stammzellen unter Einfluss einer Modulation des C1 Metabolismus differenziert. An Tag 8 der Differenzierung wurde die Expression von CCR5 (A) und CX₃CR1 (B) durchflusszytometrisch als MFI in den CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten quantifiziert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung aus 4 unabhängigen Versuchen. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA mit nachfolgendem Dunnett's post-hoc Test.

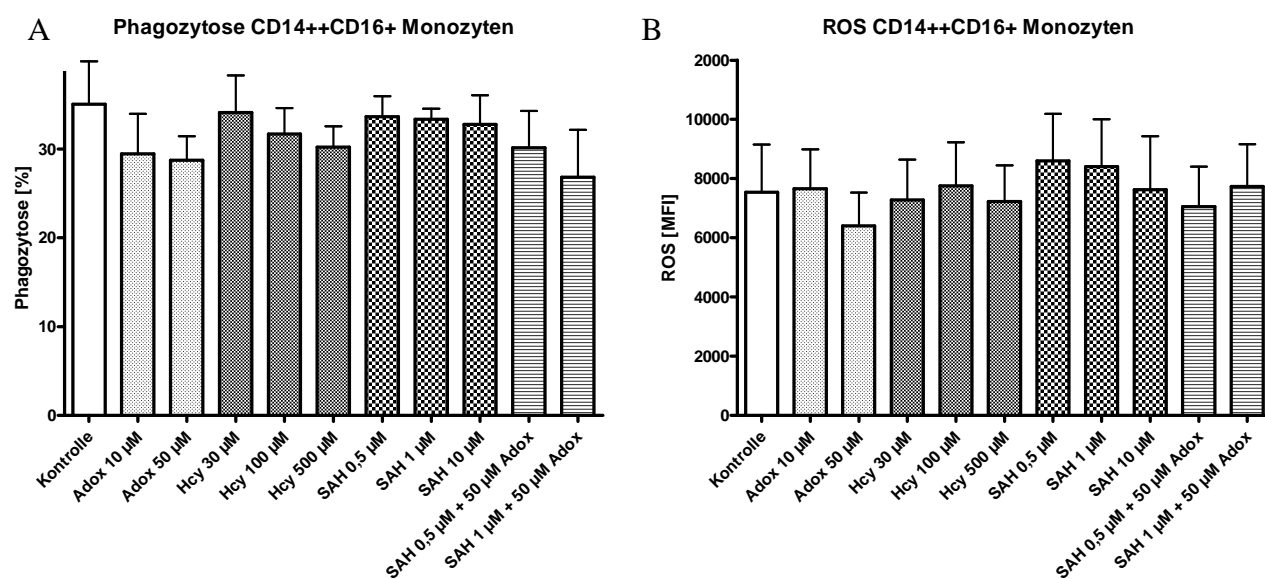


Abbildung 17. Funktionelle Charakterisierung von differenzierten CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten. CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten wurden aus hämatopoetischen Stammzellen unter Einfluss einer Modulation des C1 Metabolismus differenziert. An Tag 8 der Differenzierung wurde die Phagozytose-Rate (A) von CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten durchflusszytometrisch mittels fluoreszenzmarkierten Partikeln (Fluoresbrite Yellow Green Carboxylate Microspheres) bestimmt. Die Messung von reaktiven Sauerstoffspezies (B) erfolgte mittels des Detektionsreagenzes H₂DFFDA in differenzierten CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten (Tag 8) durchflusszytometrisch als MFI. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung aus 4 unabhängigen Versuchen. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA mit nachfolgendem Dunnett's post-hoc Test.

5 Diskussion

5.1 Monozytensubpopulationen bei chronischer Nierenerkrankung und Atherosklerose

Die chronische Nierenerkrankung (CKD) geht mit einem immens erhöhten kardiovaskulären Risiko einher, dessen pathophysiologische Grundlage eine stark beschleunigte atherosklerotische Gefäßveränderung ist. Die Initiierung der Atherosklerose beginnt bereits in sehr frühen Stadien der chronischen Nierenerkrankung, lange vor dem Einsetzen einer Nierenersatztherapie (87, 98). Die Progression der Atherosklerose wird zentral durch die chronische Inflammation begünstigt (34).

Monozyten sind zentrale Mediatoren der chronischen Inflammation sowie der Atherogenese (76). Obwohl die pathophysiologische Rolle von Monozyten in der Atherosklerose als gesichert angesehen werden kann, konnte in großen epidemiologischen Studien kein eindeutiger Zusammenhang zwischen erhöhten Monozytenzahlen und dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen erkannt werden (102). Dieser Widerspruch könnte auf der Tatsache beruhen, dass Monozyten eine heterogene Population darstellen und frühere Studien zur Bedeutung von Monozyten bei kardiovaskulären Erkrankungen diese Heterogenität nicht berücksichtigten.

Passlick *et al.* (1989) beschrieben erstmals die Heterogenität von Monozyten: Basierend auf der differentiellen Expression des Lipopolysaccharid-Co-Rezeptors CD14 sowie des Fc γ -Rezeptors CD16 identifizierten sie die CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten sowie die CD16-positiven Monozyten (68). Im Laufe der folgenden Jahre wurden die beiden Monozytensubpopulationen näher charakterisiert, wobei den CD16-positiven Monozyten schon bald ein besonders proinflammatorisches Potenzial zugeschrieben wurde.

So konnten Frankenberger *et al.* eine vermehrte Expression des proinflammatorischen Zytokins TNF- α sowie eine verminderte Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 in CD16-positiven Monozyten nachweisen (27). In einer Kokultur von CD16-positiven Monozyten mit Tumorzellen wurde eine starke Bildung des proinflammatorischen Zytokins IL-12 von dieser Monozytensubpopulation nachgewiesen (91).

Auch phänotypisch konnten Unterschiede zwischen den beiden Monozytensubpopulationen aufgezeigt werden. So differiert die Expression von Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche von CD14⁺CD16⁻ und CD16-positiven Monozyten. Die CD16-positiven Monozyten zeichnen sich durch eine hohe Expression des Fraktalkinrezeptors (CX₃CR1) aus und

adhärieren, im Gegensatz zu CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten, stark an Fraktalkin (CX₃CL1) exprimierenden Endothelzellen (1). Im Gegensatz hierzu exprimieren die CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten nur in geringem Masse CX₃CR1, und weisen eine starke Expression des Chemokinrezeptors CCR2 auf (1), was ihnen ein großes Potential zur Migration nach Stimulation mit CCL2 verleiht (101). Im Jahr 2003 konnten Ancuta *et al.* erstmals die Differenzierung der CD16-positiven Monozyten in zwei Subpopulationen, die CD14⁺⁺CD16⁺ und die CD14⁺CD16⁺⁺ Monozyten, beschreiben und die CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten als diejenigen Zellen charakterisieren, die selektiv den proatherogenen Rezeptor CCR5 exprimieren (1). Weitere Arbeiten konnten die intermediären Monozyten von den anderen Monozytensubpopulationen durch eine verstärkte Expression proatherogener und proinflammatorischer Rezeptoren wie TLR2 (94) und ACE (93) abgrenzen und funktionell als besonders proinflammatorische Mediatoren des angeborenen Immunsystems charakterisieren, indem sie verstärkt TNF und IL1 β (14), sowie reaktive Sauerstoffspezies (105) bilden. Trotz dieser zentralen Rolle von intermediären Monozyten im Immunsystem wurde diese Monozytensubpopulation jahrelang mit den nichtklassischen Monozyten subsumiert. Erst seit der Einführung der offiziellen Nomenklatur im Jahre 2010 sind die intermediären Monozyten als eigenständige Monozytensubpopulation anerkannt (115).

Im Einklang mit ihrer zentralen Rolle in der Inflammationsreaktion, ist die Zellzahl intermediärer Monozyten bei zahlreichen inflammatorischen Erkrankungen, wie rheumatoider Arthritis, HIV, Tuberkulose, Sepsis und manifester Atherosklerose stark erhöht (114). Auch Patienten mit chronischer Nierenerkrankung zeigen eine signifikante Verschiebung in den Monozytensubpopulationen: Erstmals beschrieben Nocker *et al.* 1998 eine signifikant erhöhte Zellzahl von CD16-positiven Monozyten im Blut stabiler HD Patienten im Vergleich zu Kontrollprobanden, während die klassischen Monozyten sich in der Zellzahl nicht unterschieden. Eine nähere Differenzierung der CD16-positiven Monozyten in intermediäre und nichtklassische Monozyten fand hierbei jedoch nicht statt (66). Spätere Arbeiten konnten diese Ergebnisse bestätigen und (9, 81) die Zellzunahme der CD16-positiven Monozyten sowohl auf eine Zunahme der intermediären als auch der nichtklassischen Monozyten zurückführen (36).

In der vorliegenden Dissertationsarbeit konnte die erhöhte Zellzahl intermediärer und nichtklassischer Monozyten bei Hämodialysepatienten ebenfalls bestätigt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch *in vitro* eine Differenzierung von Monozyten aus hämatopoetischen Stammzellen unter urämischen Bedingungen zu einer verstärkten Bildung intermediärer Monozyten führt. Die Urämie beeinflusste auch die funktionellen

Charakteristika der intermediären Monozyten, was in einer verstärkten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und einer erhöhten Phagozytoserate der urämisch differenzierten intermediären Monozyten mündete.

Die Bedeutung intermediärer Monozyten reflektiert sich in klinischen Studien, welche die prospektive Bedeutung von Monozytensubpopulationen bei chronisch nierenkranken Menschen untersuchten. In einer ersten prospektiven Studie wurden 94 Dialysepatienten rekrutiert, welche für mindestens 35 Monate bzgl. des Auftretens eines kardiovaskulären Ereignisses nachverfolgt wurden. Nur die intermediären Monozyten, nicht die anderen Monozytensubpopulationen oder die Gesamtmonozyten, erwiesen sich dabei als unabhängige Prädiktoren für kardiovaskuläre Ereignisse (36). Eine nähere Charakterisierung der intermediären Monozyten zeigte, dass die Oberflächenexpression des ACE (93) sowie die intradialytische Kinetik (71) ebenso die Bedeutung dieser Zellpopulation als Prädiktoren im kardiovaskulären Kontext verstärken. Auch bei chronisch nierenkranken, nicht dialysepflichtigen Patienten sowie bei kardiovaskulären Risikopatienten wurden die intermediären Monozyten als unabhängige Prädiktoren für kardiovaskuläre Ereignisse nachfolgend charakterisiert (74, 75). Basierend auf diesen Beobachtungen werden intermediäre Monozyten bereits als potentiell Therapieziel in der kardiovaskulären Medizin diskutiert (37, 40).

5.2 Bedeutung des C1 Metabolismus bei chronischer Nierenerkrankung und Atherosklerose

Jedoch sind bis heute die pathophysiologischen Mechanismen, die zu der vermehrten Zellzahl intermediärer Monozyten bei chronisch nierenkranken Menschen führen, weitgehend unbekannt. Das urämische Milieu umfasst ein sehr breites Feld an bereits bekannten und noch unbekanntem Stoffwechselprodukten (18), von denen zahlreiche immunmodulatorisch wirken können. Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, welche Komponenten des urämischen Milieus eine vermehrte Differenzierung intermediärer Monozyten induzieren könnten.

Innerhalb der Urämietoxine unterscheidet man drei Klassen: Kleine wasserlösliche Urämietoxine (< 500 Da), Urämietoxine mit mittlerer molarer Masse (> 500 Da) und proteingebundene Urämietoxine (97). Zur letzteren Klasse gehört das Urämietoxin Homocystein, ein zentraler Metabolit im C1 Stoffwechsel des Organismus. Im C1 Metabolismus kann Homocystein entweder in einer Vit B₆ abhängigen Transsulfurierung zu Glutathion abgebaut, oder in einem Vit B₁₂ und Folsäure abhängigen Stoffwechselweg durch

die Methionin-Synthase bzw. durch die Betain-Homocystein-Methyltransferase mit Betain als Methylgruppendonor zu Methionin remethyliert werden (siehe Abbildung 18). Die Aminosäure Methionin ist Vorläufermetabolit des universellen Methylgruppendonors S-Adenosylmethionin (SAM), welcher an zahlreichen Methylierungsreaktionen in der Zelle beteiligt ist. Nach Abgabe seiner Methylgruppe entsteht S-Adenosylhomocystein (SAH), welches seinerseits durch die SAH-Hydrolase zu Homocystein verstoffwechselt wird. Diese Reaktion ist reversibel, so dass jegliche Akkumulation von Homocystein auch zu einem Anstieg von SAH im Organismus führt.

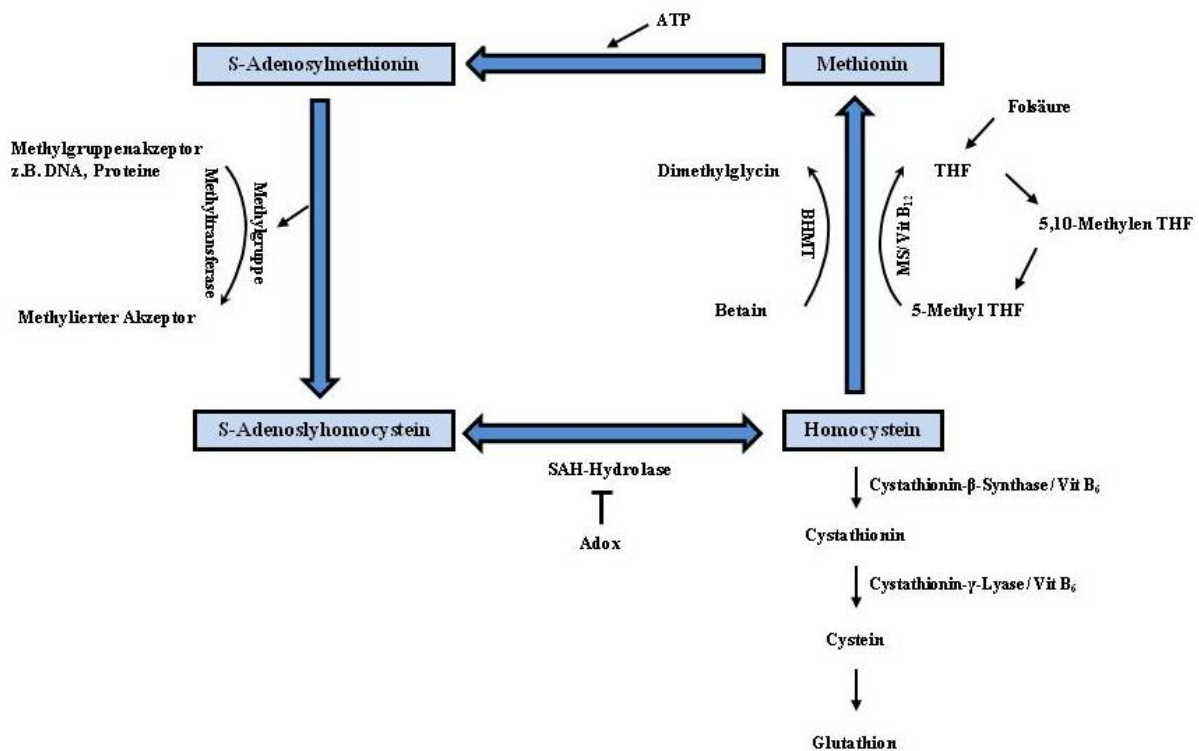


Abbildung 18. Schematische Darstellung des C1 Metabolismus. Homocystein wird im C1 Metabolismus über eine Remethylierung zu Methionin, welches seinerseits zu dem universellen Methylgruppendonor S-Adenosylmethionin metabolisiert wird. Nach einer Methylierungsreaktion wird aus S-Adenosylmethionin das S-Adenosylhomocystein, ein potenter Inhibitor von Methylierungsreaktionen. S-Adenosylhomocystein wird durch die SAH-Hydrolase erneut zu Homocystein hydrolysiert. Alternativ kann Homocystein über den Transsulfurierungsweg zu Cystathionin und schließlich zu Glutathion verstoffwechselt werden (Abbildung modifiziert nach (109)).

Die chronische Nierenerkrankung geht mit einem derangierten C1 Metabolismus, einer verminderten Ausscheidung, und einer eingeschränkten Metabolisierung von Homocystein einher (108). Es resultieren daraus bei Menschen mit chronischer Nierenerkrankung erhöhte Plasma-Homocysteinspiegel.

Interessanterweise wurden erhöhte Plasma-Homocysteinspiegel in zahlreichen Studien mit einer erhöhten Inzidenz für kardiovaskuläre Ereignisse assoziiert (2, 13, 59, 60). Erstmals

zeigte McCully im Jahre 1969 einen Zusammenhang zwischen erhöhten Plasma-Homocysteinspiegeln und atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen (62). Auch bei chronisch nierenkranken Patienten konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhten Plasma-Homocysteinspiegeln und dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen erkannt werden (60). Mit möglichen Pathomechanismen, über welche Homocystein die Ausbildung atherosklerotischer Gefäßveränderungen direkt als Mediator bedingen könnte, haben sich im Laufe der Zeit viele Forschungsgruppen beschäftigt. So wurde gezeigt, dass Homocystein die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies im Endothel induziert (80), eine prothrombotische Wirkung aufweist (6), sowie die Proliferation von Muskelzellen stimuliert (59).

5.3 Einfluss von Homocystein auf das Immunsystem

Zudem konnte Homocystein als Modulator des Immunsystems im Kontext der Atherosklerose beschrieben werden. Poddar *et al.* zeigten eine verstärkte Migration von Leukozyten, welche auf eine vermehrte Sekretion von MCP-1 und IL-8 von Endothelzellen nach Homocysteinstimulation zurückzuführen war (70). Einen direkten Effekt von Homocystein auf Monozyten konnten Zeng *et al.* beschreiben. So zeigten kultivierte Monozyten in einem mit Homocystein supplementierten Medium eine erhöhte Bildung der proinflammatorischen Zytokine IL-8 und MCP-1 (111).

Auch im Kontext der Monozytenheterogenität weisen erste tierexperimentelle Studien auf eine zentrale Rolle von Homocystein in der Regulation der Monozytenbiologie hin. Zhang *et al.* untersuchten den Einfluss der Hyperhomocysteinämie auf die Monozytenheterogenität in einem *apoE^{-/-} Cbs^{-/-}* Mausmodell. Die Defizienz der Cystathionin-β-Synthase (*Cbs*) induziert aufgrund einer gestörten Transsulfurierung eine Hyperhomocysteinämie in der Maus, während die Defizienz des Apolipoproteins E (*apoE*) eine Hypercholesterinämie induziert und eine etablierte Methode in der tierexperimentellen Forschung zur Pathophysiologie der Atherosklerose darstellt (8). Wurden die Tiere für acht Wochen einer fettreichen Diät ausgesetzt, so zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe, die keine homozygote Mutation im *Cbs* Gen aufwies, signifikant größere atherosklerotische Läsionen im aortalen Sinus, welche sich durch eine starke Infiltration mit Ly-6C exprimierenden Monozyten, dem murinen Äquivalent der humanen klassischen und intermediären Monozyten, auszeichneten. Auch im peripheren Blut, im Knochenmark und in der Milz war die Anzahl der klassischen (Ly-6C^{hi}) und intermediären (Ly-6C^{mid}) Monozyten bei *apoE^{-/-} Cbs^{-/-}* Mäusen unter Hochfettdiät stark erhöht. Die nichtklassischen (Ly-6C^{low}) Monozyten blieben sowohl von der

defizienten Cbs als auch von der Hochfettdiät unbeeinflusst. Wurden Milzzellen *in vitro* kultiviert, so beobachteten Zhang *et al.* einen zeitabhängigen Abfall der klassischen und intermediären Monozyten, welcher unter einer Homocysteinstimulation nicht erfolgte.

Im Rahmen unserer *in vitro* Untersuchungen an humanen Monozyten konnten wir ebenfalls aufzeigen, dass es zu einem zeitabhängigen Abfall der klassischen und intermediären Monozyten kommt, welcher v.a. nach einer 16 stündigen Kultivierung augenscheinlich wurde. Eine Stimulation der Zellen mit Homocystein führte zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der klassischen und v.a. der intermediären Monozyten. Eine kurzfristige Stimulation (5 h) induzierte eine selektive Zunahme der intermediären Monozyten.

Als Mechanismus der Homocystein-abhängigen Zellzunahme der intermediären Monozyten postulierten Zhang *et al.* die Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies, da die Zugabe von antioxidativen Substanzen, wie CAT (hydrogen peroxidase scavenger), SOD (superoxid anion scavenger) oder NADPH Oxidase Inhibitor, die Zellzunahme der intermediären Monozyten nach einer Homocystein-Stimulation inhibierte.

Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, die in einer späteren Publikation der selben Arbeitsgruppe beschrieben wurde, dass von den kultivierten Monozyten selbst, unter Zugabe von Homocystein zum Medium, vermehrt reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden (113). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie können diesen Mechanismus für die Zunahme intermediärer Monozyten bei Hyperhomocysteinämie nicht unterstützen, da eine Stimulation von Monozyten mit Homocystein keinen Anstieg in der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies erbrachte. Als möglicher Erklärungsansatz für diese vermeintlich widersprüchlichen Befunde könnte die begrenzte Übertragbarkeit der murinen Monozytenbiologie auf die humane Monozytenbiologie dienen. Im Gegensatz zu humanen Monozyten exprimieren murine Monozyten weder CD14 noch CD16, weshalb die Einteilung der Subpopulationen über andere Marker erfolgt. Zudem unterscheiden sich die humanen und murinen Monozyten in der Expression weiterer zentraler Marker wie CD36, CD9, TREM-1 sowie PPAR γ (43).

In einem zweiten Mausmodell, welches statt der Defizienz von apoE eine Defizienz des LDL Rezeptors aufwies, führten die Autoren eine Knochenmarkstransplantation von EGFP (enhanced green fluorescent protein) markierten Zellen durch und konnten hierdurch zeigen, dass die Hyperhomocysteinämie sowohl die Rekrutierung von Ly6C^{high}-Monozyten aus dem Knochenmark, als auch deren Differenzierung zu intermediären Monozyten im peripheren Blut induziert (113). Mittels Vitaminsubstitution mit Vit B₆, Vit B₁₂ und Folsäure konnten

nicht nur die Homocysteinspiegel in den Tieren gesenkt werden, sondern auch die vermehrte Rekrutierung der klassischen Monozyten reduziert und die Differenzierung der intermediären Monozyten vermindert werden. Es zeigte sich zudem eine Reduktion der atherosklerotischen Plaques und der Plasmaspiegel inflammatorischer Zytokine.

5.4 SAH als kardiovaskulärer Risikofaktor

Basierend auf der Tatsache, dass sich die Plasma-Homocysteinspiegel auch beim Menschen durch die orale Substitution mit Vit B₆, Vit B₁₂ und Folsäure relativ einfach senken lassen (7, 19, 57), wurde dieser naheliegende therapeutische Ansatz in zahlreichen Studien, hinsichtlich seines Effekts auf das kardiovaskuläre Outcome, untersucht. Allerdings zeigte die orale Vitaminsubstitution in großen Untersuchungen wie der Hope 2 Studie mit 5522 Patienten mit manifester atherosklerotischer Gefäßerkrankung oder Diabetes (57), der WENBIT-Studie (Western Norway B Vitamin Intervention Trial) mit 3096 Patienten mit koronarer Herzkrankheit oder Aortenstenose (19), der VISP-Studie (Vitamin Intervention for Stroke Prevention) mit 3680 Patienten nach stattgehabtem Schlaganfall (92) oder der NORVIT Studie (The Norwegian Vitamin Trial) mit 3749 Patienten nach akutem Myokardinfarkt (7), keinen positiven Einfluss auf die kardiovaskuläre Ereignisrate. Auch bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung können mittels Vitaminsubstitution die Homocysteinspiegel zwar gesenkt werden (47), das kardiovaskuläre Risiko und die Mortalität jedoch nicht (46).

Aufgrund der frustrierten Ergebnisse aus den Interventionsstudien zur Reduktion des kardiovaskulären Risikos durch Senkung von Homocystein diskutieren rezente Studien die Bedeutung anderer C1 Metabolite, v.a. von SAH, in der Pathophysiologie der Atherosklerose (99): Kerin *et al.* und Castro *et al.* konnten in kleinen Querschnittsstudien aufzeigen, dass die SAH-Spiegel im Plasma bei Patienten mit manifesten kardiovaskulären Erkrankungen im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden stärker erhöht sind als die Plasma-Homocysteinspiegel (11, 53). Auch bei chronisch nierenkranken dialysepflichtigen Patienten mit prävalenten kardiovaskulären Erkrankungen konnten im Vergleich zu dialysepflichtigen Patienten ohne diagnostizierte kardiovaskuläre Erkrankungen erhöhte SAH-Spiegel im Plasma erkannt werden (95). Wie die rezenten Daten von Xiao *et al.* zeigen, ist SAH nicht nur Marker, sondern auch unabhängiger Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse. Die Arbeitsgruppe konnte in einer prospektiven Studie mit 1003 koronarangiographierten Patienten zeigen, dass erhöhte SAH-Spiegel im Plasma unabhängig von Plasma-Homocysteinspiegeln mit einem deutlich erhöhten Risiko für zukünftige kardiovaskuläre

Ereignisse assoziiert sind (103). In diesem Zusammenhang ist von besonderem Interesse, dass Homocystein und SAH im C1 Metabolismus zwar direkt miteinander in Beziehung stehen und, dass Plasma-Homocysteinspiegel und SAH-Spiegel stark miteinander korrelieren (15), die Vitaminsubstitution mittels Vit B₆, Vit B₁₂ und Folsäure jedoch – im Gegensatz zu den Homocysteinspiegeln – die SAH-Spiegel nicht zu senken vermag (32, 42). Im Kontext der chronischen Nierenerkrankung erscheint bedeutsam, dass die Niere eine zentrale Rolle in der Eliminierung von SAH einnimmt (29) und folglich eine starke Korrelation zwischen abnehmender Nierenfunktion und ansteigenden SAH-Spiegeln im Plasma besteht (45, 109).

In ersten experimentellen Arbeiten wurden die möglichen zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen identifiziert, welche die Assoziation zwischen erhöhten SAH-Spiegeln im Plasma und dem vermehrten Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen erklären könnten. An *apoE*^{-/-} Mäusen, bei welchen mittels spezifischer Diät bzw. Inhibition der SAH-Hydrolase die SAH-Spiegel im Plasma selektiv erhöht wurden, konnte gezeigt werden, dass es zu einer beschleunigten atherosklerotischen Plaquebildung kam, die auf eine verstärkte Proliferation von glatten Muskelzellen und vermehrtem oxidativen Stress zurückzuführen war (56, 58). Zudem konnte an kultivierten Endothelzellen gezeigt werden, dass SAH in diesen Zellen eine proapoptotische Wirkung aufweist (83).

5.5 Bedeutung von SAH für das Immunsystem

Der Einfluss von SAH auf die Regulation des Immunsystems und besonders auf die Monozytenbiologie wurde bislang kaum untersucht. In den 80er Jahren des vorherigen Jahrhunderts konnten vereinzelte Studien zur Bedeutung der SAH-Hydrolase Inhibition, welche zu einem Anstieg der intrazellulären SAH-Spiegel führt, eine beeinträchtigte funktionelle Immunantwort von Monozyten, wie etwa der Phagozytose oder Chemotaxis, aufzeigen (55, 69, 84).

Seitdem rückte die Idee, dass SAH die Monozytenbiologie zu regulieren vermag, zunehmend in den Hintergrund. Aufgrund dessen liegen keinerlei Daten zum Einfluss von SAH auf die Monozytenheterogenität vor. In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde deshalb erstmals der Einfluss einer Erhöhung intrazellulärer SAH Konzentrationen in Monozyten subpopulationen auf deren Differenzierung untersucht. In Einklang mit der Stimulation von Monozyten mit Homocystein führte eine Stimulation mit Adenosine 2'3'dialdehyde (Adox), einem Inhibitor der SAH-Hydrolase, der selektiv die intrazelluläre SAH Konzentration erhöht, unabhängig von den Homocysteinspiegeln (12, 83), sowohl zeit-

als auch konzentrationsabhängig zu einem Anstieg der intermediären Monozyten. Da eine Stimulation mit Homocystein die intrazellulären SAH-Spiegel in den Zellen ebenfalls ansteigen lässt (83), kann postuliert werden, dass der immunmodulatorische Effekt der Homocysteinstimulation auf die intrazelluläre Erhöhung der SAH-Spiegel zurückzuführen ist. Die Stimulation von Monozyten direkt mit SAH führte ebenso zu einem Anstieg intermediärer Monozyten, wobei die vordefinierte Signifikanzgrenze nur bei der niedrigsten Konzentration unterschritten wurde. Die Literatur liefert keine eindeutigen Daten über die zelluläre Aufnahme von SAH; Sipkens *et al* berichtete jedoch, dass die Stimulation von Lymphoblasten mit SAH (bis zu 25 $\mu\text{mol/l}$) die intrazelluläre SAH Konzentration nicht zu erhöhen vermochte (83). Zukünftige Studien müssen die zellulären Transportmechanismen von SAH weiter erörtern.

5.6 Bedeutung epigenetischer Regulationsmechanismen bei Atherosklerose und chronischer Nierenerkrankung

In diesem Zusammenhang ist bedeutsam, dass SAH, als starker Inhibitor von Methyltransferasen (56), ein wichtiger Modulator epigenetischer Regulationsmechanismen ist. Die Epigenetik befasst sich mit der Regulation der Genexpression und umfasst neben Histonmodifikationen und RNA Interferenz die DNA-Methylierung als zentralen Mechanismus der Genregulation. Eine hohe intrazelluläre SAH-Konzentration resultiert in einer unphysiologisch starken Inhibition von Methylierungsreaktionen, wie der DNA-Methylierung, was in einer Dysregulation zahlreicher zellulärer Prozesse münden kann. Folglich ist eine Dysregulation in der DNA-Methylierung mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert worden (20). Einen ersten Zusammenhang zwischen humanen Erkrankungen und epigenetischer Dysregulation erkannten Feinberg *et al.*, die eine DNA-Hypomethylierung in humanen Krebszellen beobachteten (23).

Auch in der kardiovaskulären Medizin nimmt die Erforschung einer derangierten DNA-Methylierung als zugrundeliegender Pathomechanismus der Atherogenese eine zentrale Position ein. Die Atherosklerose ist ein komplexer Mechanismus, in welchem verschiedene Zellen wie Monozyten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen ihre Genexpression verändern, um schließlich einen komplizierten atherosklerotischen Plaque zu bilden. Dabei sind an sämtlichen Prozessen epigenetische Regulationsmechanismen beteiligt (108).

Die Untersuchung der globalen DNA-Methylierung im Kontext der Atherosklerose erbrachte jedoch kontroverse Ergebnisse. Baccarelli *et al.* beobachteten bei der Analyse der LINE-1

(long interspersed nucleotide element-1) Methylierung, einem Surrogatmarker der globalen DNA-Methylierung, in PBMCs von 712 älteren Männern eine DNA-Hypomethylierung (3). Dabei war der Grad der Hypomethylierung zu Studienbeginn unabhängiger Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse. Im Gegensatz hierzu zeigte sich in der Singapore Chinese Health Study eine Assoziation zwischen der Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen und einer DNA-Hypermethylierung in PBMCs von 129 männlichen Probanden (54).

Die Analyse von atherosklerotischem Gewebe unterstützt die Bedeutung der DNA-Hypomethylierung bei kardiovaskulären Erkrankungen. So zeigte sich in einer genomweiten Analyse eine reduzierte DNA-Methylierung in atherosklerotischen Koronararterien im Vergleich zu gesunden Kontrollgefäßen (10). Im Einklang damit stehen tierexperimentelle Forschungsergebnisse, die eine globale DNA-Hypomethylierung in atherosklerotischen Läsionen von *ApoE*^{-/-} Mäusen beschreiben (39).

Die Erforschung epigenetischer Mechanismen in der Nephrologie rückte erst in den letzten Jahren in das Blickfeld der Wissenschaft. Das unphysiologische urämische Milieu, v.a. ein veränderter C1 Metabolismus und die chronische Inflammation chronisch nierenkranker Menschen haben eine zentrale Bedeutung für den Methylierungsgrad der DNA, da epigenetische Mechanismen sehr dynamisch und abhängig von Umweltfaktoren sind (88).

Ingrosso *et al.* untersuchten erstmals die globale DNA-Methylierung bei chronisch nierenkranken Menschen mit Hyperhomocysteinämie. Die DNA aus PBMCs von 32 dialysepflichtigen Patienten war dabei im Vergleich zur DNA von 11 Kontrollprobanden hypomethyliert, wobei eine positive Korrelation zwischen dem Grad der Hypomethylierung und den Plasma Homocysteinspiegeln bestand (44). Im Gegensatz dazu konnten Nanayakkara *et al.* keine Assoziation zwischen der DNA-Methylierung in PBMCs von 93 CKD Patienten im Stadium 2-4 und den Plasma-Homocysteinspiegeln aufzeigen. Die DNA-Methylierung war auch nicht assoziiert mit dem Stadium der chronischen Nierenerkrankung, der endothelialen Funktion und der Prävalenz einer subklinischen Atherosklerose (63). In einer weiteren Studie wurden chronisch nierenkranke Patienten anhand inflammatorischer Parameter in zwei Gruppen eingeteilt (CRP \geq 10 mg/l, n = 62; CRP < 10 mg/l, n = 93): Dabei zeigte sich eine globale DNA-Hypermethylierung bei Patienten mit erhöhten inflammatorischen Parametern im Vergleich zu den Patienten mit niedrigen inflammatorischen Parametern. Zudem war die DNA-Hypermethylierung sowohl mit der Gesamt- als auch mit der kardiovaskulären Mortalität assoziiert (86). Eine erste genomweite Analyse der DNA-Methylierung in PBMCs von zehn chronisch nierenkranken Hämodialysepatienten im Vergleich zu 10 alters- und geschlechtsgleichen Probanden weist

eher auf eine zentrale Bedeutung der DNA-Hypomethylierung im Kontext der chronischen Nierenerkrankung hin (106). In dieser Studie wurden zudem differentiell methylierte Gene identifiziert, welche mit distinkten proatherogenen Prozessen wie dem Lipidmetabolismus und –transport (u.a. *HMGCR*, *SREBF1*, *LRP5*, *EPHX2*, *FDPS*), der Zellproliferation und Zellzyklusregulation (u.a. *MIK67*, *TP53*, *ALOX12*), Angiogenese (u.a. *ANGPT2*, *ADAMTS10*, *FLT4*) und Inflammation (u.a. *TNFSF10*, *LY96*, *IFNGR1*, *HSPA1A*, *IL12RB1*), assoziiert sind. In Einklang mit diesen Daten konnte in der vorliegenden Dissertationsarbeit gezeigt werden, dass die Urämie *per se* eine DNA-Hypomethylierung in sich differenzierenden Monozyten induziert. Dies ergab die genomweite DNA-Methylierungsanalyse, welche 388 differentiell methylierte Loci identifizierte, wovon 303 in Monozyten, welche unter Urämiebedingungen differenziert wurden, hypomethyliert waren. Die Gene Ontology Analyse der differentiell methylierten Loci identifizierte zahlreiche Gene, welche für Transkriptionsfaktoren codieren (u.a. *HHEX*, *BATF3*, *SALL1*). Transkriptionsfaktoren spielen eine zentrale Rolle in der Monozytendifferenzierung, wie beispielsweise *HHEX*, welches in der vorliegenden Arbeit in urämischen Monozyten als differentiell methyliert identifiziert wurde. *HHEX* ist ein Transkriptionsrepressor, dessen Defizienz, wie in einem Tiermodell mit *Hex*^{-/-} Mäusen gezeigt, mit einer gestörten Monozytendifferenzierung einhergeht (52).

Ebenso wurden differentiell methylierte Gene in urämischen Monozyten identifiziert, welche für Proteinkinasen codieren (u.a. *PRKCE*, *CDC42*, *BPB*) und eine wichtige Rolle in der Regulation von Monozyten spielen. *PRKCE*, welches für die Proteinkinase C, Epsilon codiert, wurde beispielsweise im Zusammenhang mit der Transkriptionsregulation, Immunantwort und dem Zellwachstum diskutiert und in der vorliegenden Arbeit als differentiell methyliert identifiziert (65).

In diesem Zusammenhang ist bedeutsam, dass die Dysregulation einzelner Gene Auswirkungen auf ganze Signalkaskaden haben kann, da viele Gene in manigfaltiger Weise voneinander abhängig sind, wie die im Rahmen dieser Studie durchgeführte Interaktionsanalyse der differentiell methylierten Gene in urämischen Monozyten darlegt.

Darüber hinaus unterstützen die Daten einerseits die zentrale Rolle von Monozyten in der Atherogenese chronisch nierenkranker Menschen, andererseits stützen sie frühere Daten zur differentiellen Methylierung Atherosklerose relevanter Gene bei urämischen Patienten (106); so identifizierte die hier durchgeführte Analyse mittels der Genetic Association Database auch bei *in vitro* differenzierten Monozyten zahlreiche Gene, die mit Infektion/ Inflammation (u.a. *SMYD2*, *CDC34*, *PTGIR*, *CRHR2*), sowie mit kardiovaskulären Erkrankungen (u.a. *HDAC1*, *TPK1*, *ADAMTS7*) assoziiert sind.

5.7 Ausblick

Die Identifizierung von Mediatoren und Regulatoren, welche die vermehrte Bildung intermediärer Monozyten bei chronisch nierenkranken Menschen vermitteln, ist von zentralem wissenschaftlichem Interesse, da intermediäre Monozyten bereits jetzt als zukünftige therapeutische Ziele zur Reduktion des hohen kardiovaskulären Risikos diskutiert werden (37, 40). Aktuell gibt es verschiedene medizinische Maßnahmen, unter welchen sich die Zellzahl der intermediären Monozyten reduziert, wie beispielsweise die Behandlung einer morbidem Adipositas mittels bariatrischer Chirurgie (30), der Umstieg von Hämodialyse auf on-line-Hämodiafiltration (9) sowie die Einnahme von Glukokortikoiden (16, 26, 35, 50, 78). Diese Maßnahmen sind nicht generell auf chronisch nierenkranke Menschen übertragbar, so dass neue Ansätze zur Modifikation intermediärer Monozyten etabliert werden sollten.

Der Eingriff in epigenetische Regulationsmechanismen bietet eine potentielle therapeutische Option, um in die Immundysfunktion chronisch nierenkranker Menschen einzugreifen. In anderen humanmedizinischen Fachgebieten ist der Einsatz von Modulatoren epigenetischer Mechanismen als therapeutische Maßnahme bereits eingeführt. Seit 2004 wird der DNA-Methyltransferase Inhibitor Azacitidin in der onkologischen Therapie des myelodysplastischen Syndroms eingesetzt und erwies sich gegenüber der Standardtherapie als lebensverlängernd (25). Betrachtet man allerdings das Nebenwirkungsprofil, so ist die momentan äußerst unspezifische Wirkung von Medikamenten mit epigenetischem Wirkmechanismus als problematisch einzustufen.

In Zukunft erscheint die Entwicklung spezifischerer Pharmaka erstrebenswert, welche die Regulation bestimmter Gene selektiv beeinflussen, um eine gezielte Modulation eines dysregulierten Immunsystems zu ermöglichen. Einen Ansatz liefern hierbei die hochspezifisch wirksamen miRNAs, kurze, nichtcodierende RNAs, die entscheidend an der Genregulation auf posttranskriptionaler Ebene beteiligt sind, indem sie entweder die spezifische mRNA degradieren oder die Translation dieser spezifischen mRNA inhibieren (110). Da inzwischen bestimmte miRNAs (miR-146 und miR-155) als Regulatoren der Monozytenheterogenität identifiziert werden konnten, erscheint eine solche selektive Modulation des dysregulierten Immunsystems chronisch nierenkranker Menschen in den nächsten Jahrzehnten nicht unrealisierbar (17, 22).

6 Literaturverzeichnis

1. Ancuta, P., Rao, R., Moses, A., Mehle, A., Shaw, S. K., Luscinskas, F. W., and Gabuzda, D. (2003) Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J Exp Med* 197, 1701-1707
2. Anderson, J. L., Muhlestein, J. B., Horne, B. D., Carlquist, J. F., Bair, T. L., Madsen, T. E., and Pearson, R. R. (2000) Plasma homocysteine predicts mortality independently of traditional risk factors and C-reactive protein in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Circulation* 102, 1227-1232
3. Baccarelli, A., Wright, R., Bollati, V., Litonjua, A., Zanobetti, A., Tarantini, L., Sparrow, D., Vokonas, P., and Schwartz, J. (2010) Ischemic heart disease and stroke in relation to blood DNA methylation. *Epidemiology* 21, 819-828
4. Baigent, C., Landray, M. J., Reith, C., Emberson, J., Wheeler, D. C., Tomson, C., Wanner, C., Krane, V., Cass, A., Craig, J., Neal, B., Jiang, L., Hooi, L. S., Levin, A., Agodoa, L., Gaziano, M., Kasiske, B., Walker, R., Massy, Z. A., Feldt-Rasmussen, B., Krairitichai, U., Ophascharoensuk, V., Fellstrom, B., Holdaas, H., Tesar, V., Wiecek, A., Grobbee, D., de Zeeuw, D., Gronhagen-Riska, C., Dasgupta, T., Lewis, D., Herrington, W., Mafham, M., Majoni, W., Wallendszus, K., Grimm, R., Pedersen, T., Tobert, J., Armitage, J., Baxter, A., Bray, C., Chen, Y., Chen, Z., Hill, M., Knott, C., Parish, S., Simpson, D., Sleight, P., Young, A., and Collins, R. (2011) The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 377, 2181-2192
5. Belge, K. U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., Espevik, T., and Ziegler-Heitbrock, L. (2002) The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 168, 3536-3542
6. Bienvenu, T., Ankri, A., Chadeaux, B., Montalescot, G., and Kamoun, P. (1993) Elevated total plasma homocysteine, a risk factor for thrombosis. Relation to coagulation and fibrinolytic parameters. *Thromb Res* 70, 123-129
7. Bonaa, K. H., Njolstad, I., Ueland, P. M., Schirmer, H., Tverdal, A., Steigen, T., Wang, H., Nordrehaug, J. E., Arnesen, E., and Rasmussen, K. (2006) Homocysteine

- lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 354, 1578-1588
8. Breslow, J. L. (1996) Mouse models of atherosclerosis. *Science* 272, 685-688
 9. Carracedo, J., Merino, A., Nogueras, S., Carretero, D., Berdud, I., Ramirez, R., Tetta, C., Rodriguez, M., Martin-Malo, A., and Aljama, P. (2006) On-line hemodiafiltration reduces the proinflammatory CD14+CD16+ monocyte-derived dendritic cells: A prospective, crossover study. *J Am Soc Nephrol* 17, 2315-2321
 10. Castillo-Diaz, S. A., Garay-Sevilla, M. E., Hernandez-Gonzalez, M. A., Solis-Martinez, M. O., and Zaina, S. (2010) Extensive demethylation of normally hypermethylated CpG islands occurs in human atherosclerotic arteries. *Int J Mol Med* 26, 691-700
 11. Castro, R., Rivera, I., Struys, E. A., Jansen, E. E., Ravasco, P., Camilo, M. E., Blom, H. J., Jakobs, C., and Tavares de Almeida, I. (2003) Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease. *Clin Chem* 49, 1292-1296
 12. Castro, R., Rivera, I., Martins, C., Struys, E. A., Jansen, E. E., Clode, N., Graca, L. M., Blom, H. J., Jakobs, C., and de Almeida, I. T. (2005) Intracellular S-adenosylhomocysteine increased levels are associated with DNA hypomethylation in HUVEC. *J Mol Med (Berl)* 83, 831-836
 13. Clarke, R., Daly, L., Robinson, K., Naughten, E., Cahalane, S., Fowler, B., and Graham, I. (1991) Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 324, 1149-1155
 14. Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S. Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S. K., Moshous, D., Picard, C., Jais, J. P., D'Cruz, D., Casanova, J. L., Trouillet, C., and Geissmann, F. (2010) Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33, 375-386
 15. Dayal, S., Bottiglieri, T., Arning, E., Maeda, N., Malinow, M. R., Sigmund, C. D., Heistad, D. D., Faraci, F. M., and Lentz, S. R. (2001) Endothelial dysfunction and elevation of S-adenosylhomocysteine in cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Circ Res* 88, 1203-1209
 16. Dayyani, F., Belge, K. U., Frankenberger, M., Mack, M., Berki, T., and Ziegler-Heitbrock, L. (2003) Mechanism of glucocorticoid-induced depletion of human CD14+CD16+ monocytes. *J Leukoc Biol* 74, 33-39

17. Donners, M. M., Wolfs, I. M., Stoger, L. J., van der Vorst, E. P., Pottgens, C. C., Heymans, S., Schroen, B., Gijbels, M. J., and de Winther, M. P. (2012) Hematopoietic miR155 deficiency enhances atherosclerosis and decreases plaque stability in hyperlipidemic mice. *PLoS One* 7, e35877
18. Duranton, F., Cohen, G., De Smet, R., Rodriguez, M., Jankowski, J., Vanholder, R., and Argiles, A. (2012) Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol* 23, 1258-1270
19. Ebbing, M., Bleie, Å., Ueland, P., and et al. (2008) Mortality and cardiovascular events in patients treated with homocysteine-lowering b vitamins after coronary angiography: A randomized controlled trial. *JAMA* 300, 795-804
20. Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., and Jones, P. A. (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429, 457-463
21. Esse, R., Rocha, M. S., Barroso, M., Florindo, C., Teerlink, T., Kok, R. M., Smulders, Y. M., Rivera, I., Leandro, P., Koolwijk, P., Castro, R., Blom, H. J., and de Almeida, I. T. (2013) Protein arginine methylation is more prone to inhibition by S-adenosylhomocysteine than DNA methylation in vascular endothelial cells. *PLoS One* 8, e55483
22. Etzrodt, M., Cortez-Retamozo, V., Newton, A., Zhao, J., Ng, A., Wildgruber, M., Romero, P., Wurdinger, T., Xavier, R., Geissmann, F., Meylan, E., Nahrendorf, M., Swirski, F. K., Baltimore, D., Weissleder, R., and Pittet, M. J. (2012) Regulation of monocyte functional heterogeneity by miR-146a and Relb. *Cell Rep* 1, 317-324
23. Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983) Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301, 89-92
24. Fellstrom, B. C., Jardine, A. G., Schmieder, R. E., Holdaas, H., Bannister, K., Beutler, J., Chae, D. W., Chevaile, A., Cobbe, S. M., Gronhagen-Riska, C., De Lima, J. J., Lins, R., Mayer, G., McMahon, A. W., Parving, H. H., Remuzzi, G., Samuelsson, O., Sonkodi, S., Sci, D., Suleymanlar, G., Tsakiris, D., Tesar, V., Todorov, V., Wiecek, A., Wuthrich, R. P., Gottlow, M., Johnsson, E., and Zannad, F. (2009) Rosuvastatin and cardiovascular events in patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 360, 1395-1407
25. Fenaux, P., Mufti, G. J., Hellstrom-Lindberg, E., Santini, V., Finelli, C., Giagounidis, A., Schoch, R., Gattermann, N., Sanz, G., List, A., Gore, S. D., Seymour, J. F., Bennett, J. M., Byrd, J., Backstrom, J., Zimmerman, L., McKenzie, D., Beach, C. L., and Silverman, L. R. (2009) Efficacy of azacitidine compared with that of

- conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *The Lancet Oncology* 10, 223-232
26. Fingerle-Rowson, G., Angstwurm, M., Andreesen, R., and Ziegler-Heitbrock, H. W. (1998) Selective depletion of CD14⁺ CD16⁺ monocytes by glucocorticoid therapy. *Clin Exp Immunol* 112, 501-506
 27. Frankenberger, M., Sternsdorf, T., Pechumer, H., Pforte, A., and Ziegler-Heitbrock, H. W. (1996) Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* 87, 373-377
 28. Gansevoort, R. T., Correa-Rotter, R., Hemmelgarn, B. R., Jafar, T. H., Heerspink, H. J., Mann, J. F., Matsushita, K., and Wen, C. P. (2013) Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet* 382, 339-352
 29. Garibotto, G., Valli, A., Anderstam, B., Eriksson, M., Suliman, M. E., Balbi, M., Rollando, D., Vigo, E., and Lindholm, B. (2009) The kidney is the major site of S-adenosylhomocysteine disposal in humans. *Kidney Int* 76, 293-296
 30. Ghanim, H., Aljada, A., Hofmeyer, D., Syed, T., Mohanty, P., and Dandona, P. (2004) Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation* 110, 1564-1571
 31. Go, A. S., Chertow, G. M., Fan, D., McCulloch, C. E., and Hsu, C.-y. (2004) Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization. *N Engl J Med* 351, 1296-1305
 32. Green, T. J., Skeaff, C. M., McMahon, J. A., Venn, B. J., Williams, S. M., Devlin, A. M., and Innis, S. M. (2010) Homocysteine-lowering vitamins do not lower plasma S-adenosylhomocysteine in older people with elevated homocysteine concentrations. *Br J Nutr* 103, 1629-1634
 33. Hansson, G. K. (2005) Mechanisms of disease - Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352, 1685-1695
 34. Hansson, G. K. (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352, 1685-1695
 35. Heimbeck, I., Hofer, T. P., Eder, C., Wright, A. K., Frankenberger, M., Marei, A., Boghdadi, G., Scherberich, J., and Ziegler-Heitbrock, L. (2010) Standardized single-platform assay for human monocyte subpopulations: Lower CD14⁺CD16⁺⁺ monocytes in females. *Cytometry A* 77, 823-830

36. Heine, G. H., Ulrich, C., Seibert, E., Seiler, S., Marell, J., Reichart, B., Krause, M., Schlitt, A., Kohler, H., and Girndt, M. (2008) CD14(++)CD16+ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney Int* 73, 622-629
37. Heine, G. H., Ortiz, A., Massy, Z. A., Lindholm, B., Wiecek, A., Martinez-Castelao, A., Covic, A., Goldsmith, D., Suleymanlar, G., London, G. M., Parati, G., Sicari, R., Zoccali, C., and Fliser, D. (2012) Monocyte subpopulations and cardiovascular risk in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 8, 362-369
38. Herrmann, W., Herrmann, M., and Obeid, R. (2007) Hyperhomocysteinaemia: a critical review of old and new aspects. *Curr Drug Metab* 8, 17-31
39. Hiltunen, M. O., Turunen, M. P., Hakkinen, T. P., Rutanen, J., Hedman, M., Makinen, K., Turunen, A. M., Aalto-Setälä, K., and Ylä-Herttuala, S. (2002) DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions. *Vasc Med* 7, 5-11
40. Hristov, M., and Weber, C. (2011) Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 106, 757-762
41. Hsu, R. K., and Hsu, C.-y. (2013) Temporal Trends in Prevalence of CKD: The Glass Is Half Full and Not Half Empty. *Am J Kidney Dis* 62, 214-216
42. Hubner, U., Geisel, J., Kirsch, S. H., Kruse, V., Bodis, M., Klein, C., Herrmann, W., and Obeid, R. (2013) Effect of 1 year B and D vitamin supplementation on LINE-1 repetitive element methylation in older subjects. *Clin Chem Lab Med* 51, 649-655
43. Ingersoll, M. A., Spanbroek, R., Lottaz, C., Gautier, E. L., Frankenberger, M., Hoffmann, R., Lang, R., Haniffa, M., Collin, M., Tacke, F., Habenicht, A. J. R., Ziegler-Heitbrock, L., and Randolph, G. J. (2010) Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 115, e10-e19
44. Ingrosso, D., Cimmino, A., Perna, A. F., Masella, L., De Santo, N. G., De Bonis, M. L., Vacca, M., D'Esposito, M., D'Urso, M., Galletti, P., and Zappia, V. (2003) Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinaemia in patients with uraemia. *Lancet* 361, 1693-1699
45. Jabs, K., Koury, M. J., Dupont, W. D., and Wagner, C. (2006) Relationship between plasma S-adenosylhomocysteine concentration and glomerular filtration rate in children. *Metabolism* 55, 252-257

46. Jamison, R. L., Hartigan, P., Kaufman, J. S., and et al. (2007) Effect of homocysteine lowering on mortality and vascular disease in advanced chronic kidney disease and end-stage renal disease: A randomized controlled trial. *JAMA* 298, 1163-1170
47. Jungers, P., Joly, D., Massy, Z., Chauveau, P., Nguyen, A. T., Aupetit, J., and Chadeaux, B. (1999) Sustained reduction of hyperhomocysteinaemia with folic acid supplementation in predialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 14, 2903-2906
48. Kannel, W. B., McGee, D., and Gordon, T. (1976) A general cardiovascular risk profile: the Framingham Study. *Am J Cardiol* 38, 46-51
49. Kato, S., Chmielewski, M., Honda, H., Pecoits-Filho, R., Matsuo, S., Yuzawa, Y., Tranaeus, A., Stenvinkel, P., and Lindholm, B. (2008) Aspects of immune dysfunction in end-stage renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 3, 1526-1533
50. Kawanaka, N., Yamamura, M., Aita, T., Morita, Y., Okamoto, A., Kawashima, M., Iwahashi, M., Ueno, A., Ohmoto, Y., and Makino, H. (2002) CD14⁺,CD16⁺ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 46, 2578-2586
51. KDIGO Kidney Disease Improving Global Outcomes. Clinical Practice Guidelines. <http://kdigo.org/home/guidelines/>.
52. Keng, V. W., Yagi, H., Ikawa, M., Nagano, T., Myint, Z., Yamada, K., Tanaka, T., Sato, A., Muramatsu, I., Okabe, M., Sato, M., and Noguchi, T. (2000) Homeobox Gene Hex Is Essential for Onset of Mouse Embryonic Liver Development and Differentiation of the Monocyte Lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 276, 1155-1161
53. Kerins, D. M., Koury, M. J., Capdevila, A., Rana, S., and Wagner, C. (2001) Plasma S-adenosylhomocysteine is a more sensitive indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine. *Am J Clin Nutr* 74, 723-729
54. Kim, M., Long, T. I., Arakawa, K., Wang, R., Yu, M. C., and Laird, P. W. (2010) DNA methylation as a biomarker for cardiovascular disease risk. *PLoS One* 5, e9692
55. Leonard, E. J., Skeel, A., Chiang, P. K., and Cantoni, G. L. (1978) The action of the adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, 3-deazaadenosine, on phagocytic function of mouse macrophages and human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 84, 102-109
56. Liu, C., Wang, Q., Guo, H., Xia, M., Yuan, Q., Hu, Y., Zhu, H., Hou, M., Ma, J., Tang, Z., and Ling, W. (2008) Plasma S-Adenosylhomocysteine Is a Better Biomarker

- of Atherosclerosis Than Homocysteine in Apolipoprotein E-Deficient Mice Fed High Dietary Methionine. *J Nutr* 138, 311-315
57. Lonn, E., Yusuf, S., Arnold, M. J., Sheridan, P., Pogue, J., Micks, M., McQueen, M. J., Probstfield, J., Fodor, G., Held, C., and Genest, J., Jr. (2006) Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med* 354, 1567-1577
 58. Luo, X., Xiao, Y., Song, F., Yang, Y., Xia, M., and Ling, W. (2012) Increased plasma S-adenosyl-homocysteine levels induce the proliferation and migration of VSMCs through an oxidative stress-ERK1/2 pathway in apoE(-/-) mice. *Cardiovasc Res* 95, 241-250
 59. Majors, A., Ehrhart, L. A., and Pezacka, E. H. (1997) Homocysteine as a risk factor for vascular disease. Enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 2074-2081
 60. Mallamaci, F., Zoccali, C., Tripepi, G., Fermo, I., Benedetto, F. A., Cataliotti, A., Bellanuova, I., Malatino, L. S., and Soldarini, A. (2002) Hyperhomocysteinemia predicts cardiovascular outcomes in hemodialysis patients. *Kidney Int* 61, 609-614
 61. Maron, B. A., and Loscalzo, J. (2006) Homocysteine. *Clin Lab Med* 26, 591-609, vi
 62. McCully, K. S. (1969) Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 56, 111-128
 63. Nanayakkara, P. W. B., Kiefte-de Jong, J. C., Stehouwer, C. D. A., van Ittersum, F. J., Olthof, M. R., Kok, R. M., Blom, H. J., van Guldener, C., ter Wee, P. M., and Smulders, Y. M. (2008) Association between global leukocyte DNA methylation, renal function, carotid intima-media thickness and plasma homocysteine in patients with stage 2-4 chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 23, 2586-2592
 64. Natoli, G. (2010) Maintaining cell identity through global control of genomic organization. *Immunity* 33, 12-24
 65. Newton, A. C. (1995) Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 270, 28495-28498
 66. Nockher, W. A., and Scherberich, J. E. (1998) Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. *Infect Immun* 66, 2782-2790
 67. O'Connell, R. M., Rao, D. S., Chaudhuri, A. A., and Baltimore, D. (2010) Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol* 10, 111-122

68. Passlick, B., Flieger, D., and Ziegler-Heitbrock, H. W. (1989) Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74, 2527-2534
69. Pike, M. C., Kredich, N. M., and Snyderman, R. (1978) Requirement of S-adenosyl-L-methionine-mediated methylation for human monocyte chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 3928-3932
70. Poddar, R., Sivasubramanian, N., DiBello, P. M., Robinson, K., and Jacobsen, D. W. (2001) Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation* 103, 2717-2723
71. Rogacev, K. S., Ziegelin, M., Ulrich, C., Seiler, S., Girndt, M., Fliser, D., and Heine, G. H. (2009) Haemodialysis-induced transient CD16+ monocytopenia and cardiovascular outcome. *Nephrol Dial Transplant* 24, 3480-3486
72. Rogacev, K. S., Ulrich, C., Blomer, L., Hornof, F., Oster, K., Ziegelin, M., Cremers, B., Grenner, Y., Geisel, J., Schlitt, A., Kohler, H., Fliser, D., Girndt, M., and Heine, G. H. (2010) Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *Eur Heart J* 31, 369-376
73. Rogacev, K. S., and Heine, G. H. (2010) Human monocyte heterogeneity--a nephrological perspective. *Nephrol Ther* 6, 219-225
74. Rogacev, K. S., Seiler, S., Zawada, A. M., Reichart, B., Herath, E., Roth, D., Ulrich, C., Fliser, D., and Heine, G. H. (2011) CD14++CD16+ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *Eur Heart J* 32, 84-92
75. Rogacev, K. S., Cremers, B., Zawada, A. M., Seiler, S., Binder, N., Ege, P., Grosse-Dunker, G., Heisel, I., Hornof, F., Jeken, J., Rebling, N. M., Ulrich, C., Scheller, B., Bohm, M., Fliser, D., and Heine, G. H. (2012) CD14++CD16+ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J Am Coll Cardiol* 60, 1512-1520
76. Ross, R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340, 115-126
77. Sarnak, M. J., Levey, A. S., Schoolwerth, A. C., Coresh, J., Culeton, B., Hamm, L. L., McCullough, P. A., Kasiske, B. L., Kelepouris, E., Klag, M. J., Parfrey, P., Pfeffer, M., Raij, L., Spinosa, D. J., and Wilson, P. W. (2003) Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure

- Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation* 108, 2154-2169
78. Scherberich, J. E., and Nockher, W. A. (1999) CD14⁺⁺ monocytes, CD14⁺/CD16⁺ subset and soluble CD14 as biological markers of inflammatory systemic diseases and monitoring immunosuppressive therapy. *Clin Chem Lab Med* 37, 209-213
79. Schiffrin, E. L., Lipman, M. L., and Mann, J. F. (2007) Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation* 116, 85-97
80. Schini-Kerth, V. B. (2003) Homocysteine, a proinflammatory and proatherosclerotic factor: role of intracellular reactive oxygen species. *Circ Res* 93, 271-273
81. Sester, U., Sester, M., Heine, G., Kaul, H., Girndt, M., and Kohler, H. (2001) Strong depletion of CD14(+)CD16(+) monocytes during haemodialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 16, 1402-1408
82. Sharma, P., Kumar, J., Garg, G., Kumar, A., Patowary, A., Karthikeyan, G., Ramakrishnan, L., Brahmachari, V., and Sengupta, S. (2008) Detection of altered global DNA methylation in coronary artery disease patients. *DNA Cell Biol* 27, 357-365
83. Sipkens, J. A., Hahn, N. E., Blom, H. J., Lougheed, S. M., Stehouwer, C. D., Rauwerda, J. A., Krijnen, P. A., van Hinsbergh, V. W., and Niessen, H. W. (2012) S-Adenosylhomocysteine induces apoptosis and phosphatidylserine exposure in endothelial cells independent of homocysteine. *Atherosclerosis* 221, 48-54
84. Snyderman, R., Pike, M. C., and Kredich, N. M. (1980) Role of transmethylated reactions in cellular motility and phagocytosis. *Mol Immunol* 17, 209-218
85. Stenvinkel, P., Pecoits-Filho, R., and Lindholm, B. (2003) Coronary Artery Disease in End-Stage Renal Disease: No Longer a Simple Plumbing Problem. *J Am Soc Nephrol* 14, 1927-1939
86. Stenvinkel, P., Karimi, M., Johansson, S., Axelsson, J., Suliman, M., Lindholm, B., Heimbürger, O., Barany, P., Alvestrand, A., Nordfors, L., Qureshi, A. R., Ekstrom, T. J., and Schalling, M. (2007) Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation - a novel risk factor for cardiovascular disease? *J Intern Med* 261, 488-499
87. Stenvinkel, P., Carrero, J. J., Axelsson, J., Lindholm, B., Heimbürger, O., and Massy, Z. (2008) Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: how do new pieces fit into the uremic puzzle? *Clin J Am Soc Nephrol* 3, 505-521

88. Stenvinkel, P., and Ekstrom, T. J. (2008) Epigenetics--a helpful tool to better understand processes in clinical nephrology? *Nephrol Dial Transplant* 23, 1493-1496
89. Suliman, M. E., Qureshi, A. R., Barany, P., Stenvinkel, P., Filho, J. C., Anderstam, B., Heimbürger, O., Lindholm, B., and Bergstrom, J. (2000) Hyperhomocysteinemia, nutritional status, and cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Kidney Int* 57, 1727-1735
90. Suliman, M. E., Lindholm, B., Barany, P., and Bergstrom, J. (2001) Hyperhomocysteinemia in chronic renal failure patients: relation to nutritional status and cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med* 39, 734-738
91. Szaflarska, A., Baj-Krzyworzeka, M., Siedlar, M., Weglarczyk, K., Ruggiero, I., Hajto, B., and Zembala, M. (2004) Antitumor response of CD14+/CD16+ monocyte subpopulation. *Exp Hematol* 32, 748-755
92. Toole, J. F., Malinow, M. R., Chambless, L. E., Spence, J. D., Pettigrew, L. C., Howard, V. J., Sides, E. G., Wang, C. H., and Stampfer, M. (2004) Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial. *JAMA* 291, 565-575
93. Ulrich, C., Heine, G. H., Garcia, P., Reichart, B., Georg, T., Krause, M., Kohler, H., and Girndt, M. (2006) Increased expression of monocytic angiotensin-converting enzyme in dialysis patients with cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant* 21, 1596-1602
94. Urra, X., Cervera, A., Obach, V., Climent, N., Planas, A. M., and Chamorro, A. (2009) Monocytes are major players in the prognosis and risk of infection after acute stroke. *Stroke* 40, 1262-1268
95. Valli, A., Carrero, J. J., Qureshi, A. R., Garibotto, G., Barany, P., Axelsson, J., Lindholm, B., Stenvinkel, P., Anderstam, B., and Suliman, M. E. (2008) Elevated serum levels of S-adenosylhomocysteine, but not homocysteine, are associated with cardiovascular disease in stage 5 chronic kidney disease patients. *Clin Chim Acta* 395, 106-110
96. van Furth, R. (1982) Current view on the mononuclear phagocyte system. *Immunobiology* 161, 178-185
97. Vanholder, R., De Smet, R., Glorieux, G., Argiles, A., Baurmeister, U., Brunet, P., Clark, W., Cohen, G., De Deyn, P. P., Deppisch, R., Descamps-Latscha, B., Henle, T., Jorres, A., Lemke, H. D., Massy, Z. A., Passlick-Deetjen, J., Rodriguez, M., Stegmayr,

- B., Stenvinkel, P., Tetta, C., Wanner, C., and Zidek, W. (2003) Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int* 63, 1934-1943
98. Vanholder, R., Massy, Z., Argiles, A., Spasovski, G., Verbeke, F., and Lameire, N. (2005) Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. *Nephrol Dial Transplant* 20, 1048-1056
99. Wagner, C., and Koury, M. J. (2007) S-Adenosylhomocysteine—a better indicator of vascular disease than homocysteine? *The American Journal of Clinical Nutrition* 86, 1581-1585
100. Wanner, C., Krane, V., Marz, W., Olschewski, M., Mann, J. F., Ruf, G., and Ritz, E. (2005) Atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 353, 238-248
101. Weber, C., Belge, K. U., von Hundelshausen, P., Draude, G., Steppich, B., Mack, M., Frankenberger, M., Weber, K. S., and Ziegler-Heitbrock, H. W. (2000) Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol* 67, 699-704
102. Wheeler, J. G., Mussolino, M. E., Gillum, R. F., and Danesh, J. (2004) Associations between differential leucocyte count and incident coronary heart disease: 1764 incident cases from seven prospective studies of 30 374 individuals. *Eur Heart J* 25, 1287-1292
103. Xiao, Y., Zhang, Y., Wang, M., Li, X., Su, D., Qiu, J., Li, D., Yang, Y., Xia, M., and Ling, W. (2013) Plasma S-adenosylhomocysteine is associated with the risk of cardiovascular events in patients undergoing coronary angiography: a cohort study. *Am J Clin Nutr* 98, 1162-1169
104. Zannad, F., Kessler, M., Lehert, P., Grunfeld, J. P., Thuilliez, C., Leizorovicz, A., and Lechat, P. (2006) Prevention of cardiovascular events in end-stage renal disease: results of a randomized trial of fosinopril and implications for future studies. *Kidney Int* 70, 1318-1324
105. Zawada, A. M., Rogacev, K. S., Rotter, B., Winter, P., Marell, R. R., Fliser, D., and Heine, G. H. (2011) SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118, e50-61
106. Zawada, A. M., Rogacev, K. S., Hummel, B., Grun, O. S., Friedrich, A., Rotter, B., Winter, P., Geisel, J., Fliser, D., and Heine, G. H. (2012) SuperTAG methylation-

- specific digital karyotyping reveals uremia-induced epigenetic dysregulation of atherosclerosis-related genes. *Circ Cardiovasc Genet* 5, 611-620
107. Zawada, A. M., Rogacev, K. S., Schirmer, S. H., Sester, M., Bohm, M., Fliser, D., and Heine, G. H. (2012) Monocyte heterogeneity in human cardiovascular disease. *Immunobiology* 217, 1273-1284
108. Zawada, A. M., Rogacev, K. S., and Heine, G. H. (2013) Clinical relevance of epigenetic dysregulation in chronic kidney disease-associated cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant* 28, 1663-1671
109. Zawada, A. M., Rogacev, K. S., Hummel, B. r., Berg, J. T., Friedrich, A., Roth, H. J., Obeid, R., Geisel, J. r., Fliser, D., and Heine, G. H. (2014) S-adenosylhomocysteine is associated with subclinical atherosclerosis and renal function in a cardiovascular low-risk population. *Atherosclerosis* 234, 17-22
110. Zawada, A. M., Rogacev, K. S., Muller, S., Rotter, B., Winter, P., Fliser, D., and Heine, G. H. (2014) Massive analysis of cDNA Ends (MACE) and miRNA expression profiling identifies proatherogenic pathways in chronic kidney disease. *Epigenetics* 9, 161-172
111. Zeng, X., Dai, J., Remick, D. G., and Wang, X. (2003) Homocysteine mediated expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human monocytes. *Circ Res* 93, 311-320
112. Zhang, D., Jiang, X., Fang, P., Yan, Y., Song, J., Gupta, S., Schafer, A. I., Durante, W., Kruger, W. D., Yang, X., and Wang, H. (2009) Hyperhomocysteinemia promotes inflammatory monocyte generation and accelerates atherosclerosis in transgenic cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Circulation* 120, 1893-1902
113. Zhang, D., Fang, P., Jiang, X., Nelson, J., Moore, J. K., Kruger, W. D., Berretta, R. M., Houser, S. R., Yang, X., and Wang, H. (2012) Severe hyperhomocysteinemia promotes bone marrow-derived and resident inflammatory monocyte differentiation and atherosclerosis in LDLr/CBS-deficient mice. *Circ Res* 111, 37-49
114. Ziegler-Heitbrock, L. (2007) The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 81, 584-592
115. Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., Leenen, P. J., Liu, Y. J., MacPherson, G., Randolph, G. J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J. M., and Lutz, M. B. (2010) Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, e74-80

7 Danksagung

Ich möchte mich bei all denjenigen Personen bedanken, die dazu beigetragen haben, dass die vorliegende Promotionsarbeit angefertigt werden konnte.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Gunnar Heine für die Überlassung des Promotionsthemas, die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und seine Lehre, sein Engagement und seine Geduld im Rahmen der Betreuung dieser Promotionsarbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Danilo Fliser für die Möglichkeit zur Promotion in der Klinik für Innere Medizin IV des Universitätsklinikums des Saarlandes

Gleichermaßen danke ich meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Adam Zawada für die Einarbeitung in die wissenschaftliche Arbeit im Forschungslabor, für seine Geduld und tatkräftige Unterstützung vom Beginn der Datenerhebung bis zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Ich danke allen Mitarbeitern des Forschungslabors und der Ambulanz der Inneren Medizin IV für Ihre Hilfsbereitschaft in allen Belangen.

Weiterhin danke ich den Probanden für Ihre Bereitschaft, einen wertvollen Beitrag zu dieser Forschungsarbeit zu leisten.

Dem Verband Deutsche Nierenzentren danke ich für die Zuerkennung eines Promotionsstipendiums, welches mir die Teilnahmen an mehreren nationalen Kongressen ermöglichte.

8 Posterpräsentationen

Schneider JS, Zawada AM, Rogacev KS, Fliser D, Heine GH. Uremia triggers differentiation of proatherogenic CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes. Kongress für Nephrologie; 5. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie; Berlin, Deutschland.

Zawada AM, Schneider JS, Rogacev KS, Fliser D, Heine GH. Uremia Triggers Differentiation of Proatherogenic CD14⁺⁺CD16⁺ Monocytes. ASN (American Society of Nephrology); Atlanta, GA, USA.

Schneider JS, Zawada AM, Rogacev KS, Fliser D, Heine GH. Uremia triggers differentiation of CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes. 58. Jahres-Kongress der Saarländisch-Pfälzischen Internistengesellschaft; Neustadt, Mainz.