

**Untersuchungen zur  
Molekularbiologie und Pathobiochemie  
von *Pseudoxanthoma elasticum* (PXE)**

**Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
an der Universität Bielefeld**

**vorgelegt von  
Veronika Schulz**

**Bielefeld / Bad Oeynhausen**

**Juni 2005**

**Diese Arbeit entstand unter der Leitung von**

**Prof. Dr. med. Knut Kleesiek**

**am**

**Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin**

**Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen**

**Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum**

**in Bad Oeynhausen**

**in der Zeit von**

**Februar 2002 bis Juni 2005**

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Kleesiek

2. Gutachter: Prof. Dr. J. Frey

Tag der mündlichen Prüfung: 29.08.2005





## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Knut Kleesiek möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und sein Interesse am Fortgang der Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Frey, Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld, danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Christian Götting, der mir während der gesamten Doktorarbeit mit Rat und Tat zur Seite stand, gilt mein aufrichtiger Dank für die sehr gute Betreuung, das stete Interesse am Fortgang meiner Arbeit sowie für viele wertvolle Anregungen und Diskussionen.

Frau Dipl.-Biochem. Sylvia Schön, Herrn Dipl.-Biochem. Elmar Thyzel und Herrn Dipl.-Biochem. Christian Prante möchte ich für die ständige Diskussionsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit, ihre Geduld und die schöne Zeit in Bad Oeynhausen danken.

Meinen Kollegen Herrn Dr. Jens Dreier, Herrn Dr. Martin Gastens, Herrn Dr. Joachim Kuhn, Herrn Dr. Michael Schmidt, Frau Dipl.-Biol. Doris Hendig, Frau Dipl.-Biochem. Sandra Müller, Frau Dipl.-Biol. Manuela Schöttler, Frau Dipl.-Biol. Sabine Siegling, Frau Dipl.-Ing. Melanie Störmer, Frau Alexandra Adam und Frau Marlen Ewald danke ich für die Bereitstellung von Materialien, die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft als auch für die gute Zusammenarbeit.

Meinen ehemaligen Diplomandinnen Frau Dipl.-Biol. Doris Hendig und Frau Dipl.-Biochem. Maja Henjakovic danke ich besonders für ihren Beitrag zum Gelingen meiner Doktorarbeit.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Instituts für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin für die ständige Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre.

Für die Bereitstellung von Untersuchungsmaterialien und für hilfreiche Diskussionen danke ich den nachfolgend aufgeführten Kooperationspartnern:

- Frau Prof. Dr. Christiane Slizska, PXE-Ambulanz der Dermatologischen Klinik, Krankenhaus Bethesda, Freudenberg;
- Herr Prof. Dr. Martin Schillinger, Klinische Abteilung Angiologie, Universitätsklinik für Innere Medizin II, Universität Wien, Österreich;
- Herr Prof. Dr. Bruno Stieger, Abteilung für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Zürich, Schweiz;
- Herr Prof. Dr. Gary D. Kruh, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA;
- Selbsthilfegruppe für PXE-Erkrankte Deutschlands 1999 e.V., Freudenberg, Vorsitzender: Herr Peter Hof und Frau Maria Hof.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich besonders herzlich, da sie mir immer zur Seite gestanden und mich unterstützt haben.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b><i>Pseudoxanthoma elasticum</i> (PXE)</b>	<b>2</b>
2.1.1	PXE-Symptomatik	2
2.1.2	Therapiemöglichkeiten	5
2.1.3	Prävalenz und Vererbung von PXE	6
2.1.4	Das MRP6-Protein	6
2.1.5	Das <i>ABCC6</i> -Gen und PXE-verursachende <i>ABCC6</i> -Mutationen	8
<b>2.2</b>	<b>Abdominales Aortenaneurysma</b>	<b>11</b>
<b>2.3</b>	<b>Gegenstände und Ziele dieser Arbeit</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>Materialien</b>	<b>13</b>
<b>3.1</b>	<b>Patienten- und Kontrollkohorten</b>	<b>13</b>
3.1.1	PXE-Patienten	13
3.1.2	AAA-Patienten	13
3.1.3	Kontrollpersonen	14
<b>3.2</b>	<b>Antikörper</b>	<b>15</b>
3.2.1	Primärantikörper	15
3.2.2	Sekundärantikörper	16
<b>3.3</b>	<b>Bakterienstämme</b>	<b>16</b>
<b>3.4</b>	<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>16</b>
<b>3.5</b>	<b>Enzyme und Inhibitoren</b>	<b>17</b>
<b>3.6</b>	<b>Kommerzielle Reaktions- und Nachweissysteme</b>	<b>18</b>
<b>3.7</b>	<b>Längen- und Größenstandards</b>	<b>18</b>
<b>3.8</b>	<b>Peptide</b>	<b>18</b>
<b>3.9</b>	<b>Plasmide</b>	<b>18</b>
<b>3.10</b>	<b><i>Primer</i>, Mikrosatellitenmarker und Hybridisierungssonden</b>	<b>19</b>
<b>3.11</b>	<b>Programme</b>	<b>22</b>
<b>3.12</b>	<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>23</b>
<b>3.13</b>	<b>Sonstige Materialien</b>	<b>24</b>
<b>3.14</b>	<b>Zellkulturen</b>	<b>24</b>
3.14.1	Zelllinien	24
3.14.2	Primärkulturen	24
<b>3.15</b>	<b>Zellkulturmedien, -lösungen und -reagenzien</b>	<b>24</b>

<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>26</b>
<b>4.1</b>	<b>Methoden zur Kultivierung prokaryontischer Zellen</b>	<b>26</b>
4.1.1	Allgemeines	26
4.1.2	Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur und auf Festmedium	26
4.1.3	Sicherung von Bakterien als Glycerinkulturen	26
4.1.4	Transformation kompetenter Zellen	26
<b>4.2</b>	<b>Methoden zur Kultivierung eukaryontischer Zellen</b>	<b>27</b>
4.2.1	Kulturbedingungen	27
4.2.2	Bestimmung der Zellzahl	27
4.2.3	Passagieren von adhärent wachsenden Zellen	27
4.2.4	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	28
4.2.5	Isolierung humaner Dermalfibroblasten	28
4.2.6	Transfektion eukaryontischer Zellen	28
<b>4.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>29</b>
4.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	29
4.3.2	Isolierung genomischer DNA aus EDTA-Blut	29
4.3.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen	30
4.3.4	cDNA-Synthese durch Reverse Transkription	30
4.3.5	Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen	30
4.3.6	DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
4.3.7	<i>Primer-Design</i>	32
4.3.8	Agarosegel-Elektrophorese	32
4.3.9	Längenbestimmung von DNA-Fragmenten	32
4.3.10	Haplotypen-Analyse mit Mikrosatellitenmarkern	33
4.3.11	Denaturierende Hochdruck-Flüssigkeitschromatografie (DHPLC)	33
4.3.12	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	35
4.3.13	Sequenzierung von DNA-Fragmenten	35
4.3.14	RFLP-Analyse	36
4.3.15	Konstruktion von Erkennungssequenzen durch PCR	37
4.3.16	DNA-Quantifizierung durch <i>LightCycler-Real-Time-PCR</i>	37
4.3.17	Mutationsdetektion durch <i>Real-Time-PCR</i> /Schmelzkurvenanalytik	39
<b>4.4</b>	<b>Biochemische Methoden</b>	<b>39</b>
4.4.1	Proteinisolierung aus eukaryontischen Zellen	39
4.4.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	39
4.4.3	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	39
4.4.4	<i>Coomassie-Blue</i> -Färbung	40
4.4.5	<i>Western-Blot</i>	40

4.4.6	<i>Dot-Blot</i>	41
4.4.7	Immundetektion immobilisierter Proteine	41
4.4.8	MRP6-Immunfluoreszenzmikroskopie	41
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
<b>5.1</b>	<b>Mutationsdetektion in der <i>ABCC6</i>-DNA</b>	<b>43</b>
5.1.1	Nachweis von Mutationen im <i>ABCC6</i> -Gen bei PXE-Patienten	43
5.1.1.1	PCR-Amplifikation der <i>ABCC6</i> -Exons 1 - 31	43
5.1.1.2	Identifizierung der Wildtyp-DNA der <i>ABCC6</i> -Exons 1 - 31	44
5.1.1.3	Etablierung der DHPLC-Analysebedingungen	44
5.1.1.4	Sequenzvariationen in den <i>ABCC6</i> -Exons 1 - 10 bei PXE-Patienten	46
5.1.1.5	Sequenzvariationen in den <i>ABCC6</i> -Exons 11 - 20 bei PXE-Patienten	48
5.1.1.6	Sequenzvariationen in den <i>ABCC6</i> -Exons 21 - 31 bei PXE-Patienten	50
5.1.1.7	Etablierung von RFLP- und DHPLC-Mutationsnachweissystemen	54
5.1.1.8	Ausschluß einer <i>ABCC6</i> -Deletion mittels Haplotypen-Analyse	57
5.1.1.9	Zusammenfassung der PXE-Mutationen im <i>ABCC6</i> -Gen	59
5.1.2	Detektion von <i>ABCC6</i> -Sequenzvariationen bei AAA-Patienten	61
5.1.2.1	Mutationsanalyse ausgewählter <i>ABCC6</i> -Exons von AAA-Patienten	61
5.1.2.2	Sequenzvariationen im <i>ABCC6</i> -Gen bei AAA-Patienten	61
5.1.2.3	Einfluß der <i>ABCC6</i> -Variationen auf die AAA-Genese	63
<b>5.2</b>	<b>Nachweis und Quantifizierung von <i>ABCC6</i>-mRNA</b>	<b>65</b>
5.2.1	<i>ABCC6</i> -mRNA-Quantifizierung durch <i>LightCycler-Real-Time-PCR</i>	65
5.2.1.1	Auswahl sequenzspezifischer <i>Primer</i>	65
5.2.1.2	Etablierung einer <i>ABCC6</i> -cDNA-spezifischen Standard-PCR	65
5.2.1.3	Quantifizierung der <i>ABCC6</i> -cDNA durch <i>LightCycler-Real-Time-PCR</i>	65
<b>5.3</b>	<b>Untersuchung der MRP6-Proteinexpression</b>	<b>68</b>
5.3.1	Entwicklung eines Kaninchen-anti-MRP6-Antikörpers	68
5.3.1.1	PeptidAuswahl und Immunisierung	68
5.3.1.2	<i>Dot-Blot</i> -Analyse der Antiseren	68
5.3.1.3	<i>Western-Blot</i> -Analyse mit OEY1-Antiserum	69
5.3.1.4	Immunfluoreszenzmikroskopie mit OEY1-Antiserum	70
5.3.2	Untersuchung der MRP6-Expression in PXE-Fibroblasten	71
<b>5.4</b>	<b>Analyse des PXE-Phänotyps</b>	<b>73</b>
5.4.1	Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei PXE-Patienten	73
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>75</b>
6.1	Mutationsanalyse des <i>ABCC6</i> -Gens bei PXE-Patienten	75

---

6.2	<i>ABCC6</i> -Sequenzvariationen bei AAA-Patienten	82
6.3	Etablierung einer <i>ABCC6</i> -spezifischen <i>Real-Time</i> -PCR	83
6.4	Untersuchung der MRP6-Expression	83
6.5	Ausblick	84
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>Publikationen und Präsentationen</b>	<b>98</b>
<b>8.1</b>	<b>Publikationen</b>	<b>98</b>
<b>8.2</b>	<b>Präsentationen</b>	<b>98</b>
8.2.1	Kongreßvorträge	98
8.2.2	Auszeichnungen	99
8.2.3	Publizierte Kongreßbeiträge und Posterpräsentationen	99
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>103</b>
9.1	Abkürzungen für Aminosäuren	103
9.2	Abkürzungen für Basen	103
9.3	Sonstige Abkürzungen	103

## 1 Zusammenfassung

*Pseudoxanthoma elasticum* (PXE) ist eine seltene, vererbare Erkrankung, die durch eine progressive Kalzifizierung und Fragmentierung der elastischen Fasern im Bindegewebe der Haut, der Augen, des kardiovaskulären Systems und des Gastrointestinaltraktes charakterisiert ist. Im Jahre 2000 wurden erstmalig PXE-verursachende Mutationen in dem Gen *ABCC6* identifiziert. Das *ABCC6*-Gen besteht aus 31 Exons und kodiert das transmembrane Protein MRP6, dessen physiologische Funktion bislang unbekannt ist. Die Identifizierung des vollständigen Spektrums der PXE-verursachenden *ABCC6*-Mutationen ist bis heute ein aktueller Forschungsgegenstand.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig 53 deutsche PXE-Patienten und 16 Angehörige mittels denaturierender Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (DHPLC) bezüglich des Auftretens von Mutationen in den Exons 1 - 31 des *ABCC6*-Gens untersucht. Dabei konnten insgesamt 32 verschiedene PXE-Mutationen identifiziert werden. Diese beinhalteten 22 *Missense*-Mutationen, 4 Deletionen, 3 Spleißstellen-Alterationen und 3 *Nonsense*-Mutationen. Bei 48 PXE-Betroffenen konnte mindestens eine *ABCC6*-Mutation nachgewiesen werden. Die *ABCC6*-Alterationen lagen in homozygoter, gemischt heterozygoter und heterozygoter Form vor. Die Mutationsdetektionsrate betrug 74 %. Die meisten der *ABCC6*-Variationen traten einmalig auf. Häufigere PXE-Mutationen waren die *Nonsense*-Mutation p.R1141X und die Spleißstellen-Alteration c.2787+1G>T. 17 *ABCC6*-Variationen konnten in dieser Studie erstmalig detektiert und als PXE-verursachend eingestuft werden. Zu diesen zählten 15 *Missense*-Mutationen, 1 Spleißstellen-Alteration und 1 Deletion.

Des Weiteren konnte erstmals gezeigt werden, daß *ABCC6*-Alterationen keinen Risikofaktor für die Genese von abdominalen Aortenaneurysmen (AAA) darstellen. Bei der Mutationsanalyse der *ABCC6*-Exons 16 - 18, 24 und 28 - 30 von 133 AAA-Patienten wurden 5 *ABCC6*-Variationen detektiert, aber bei keiner dieser DNA-Alterationen wurde ein statistisch signifikanter Unterschied in der Allel-Frequenz zwischen AAA-Patienten und Kontrollpersonen beobachtet. Die Untersuchung beschränkte sich auf die *ABCC6*-Exons 16 - 18, 24 und 28 - 30, da diese funktionell wichtige MRP6-Domänen kodieren und bei PXE-Patienten sehr häufig Mutationen enthalten.

Zur Analyse der *ABCC6*-Transkription wurde ein *Real-Time*-PCR-Verfahren etabliert und optimiert, mit dem sich *ABCC6*-cDNA nachweisen läßt. Zusätzlich ermöglicht die *ABCC6*-cDNA-spezifische *LightCycler-Real-Time*-PCR die relative Quantifizierung von *ABCC6*-mRNA in verschiedenen Zellkulturen und Geweben.

In dieser Studie konnte weiterhin ein polyklonaler Kaninchen-anti-MRP6-Antikörper entwickelt werden, der zur Untersuchung der MRP6-Expression in Dermalfibroblasten von PXE-Patienten mit unterschiedlichem *ABCC6*-Genotyp eingesetzt wurde. Dabei stellte sich heraus, daß die MRP6-Expression mit den ermittelten *ABCC6*-Genotypen der PXE-Patienten korreliert und in den Fibroblasten verschiedener PXE-Patienten variiert.

Bei der Analyse der PXE-Phänotypen konnte eine signifikant positive Korrelation zwischen dem Alter der PXE-Patienten und der Anzahl der PXE-betroffenen Organe beobachtet werden. Korrelationen zwischen den Geno- und Phänotypen der PXE-Patienten waren nicht zu erkennen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Detektion von *ABCC6*-DNA-Variationen, zur Quantifizierung der *ABCC6*-mRNA und zum Nachweis der MRP6-Expression tragen zum Verständnis der Molekularbiologie von PXE und zukünftig zur Erstellung von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen als auch zur Klärung der PXE-Pathobiochemie bei.

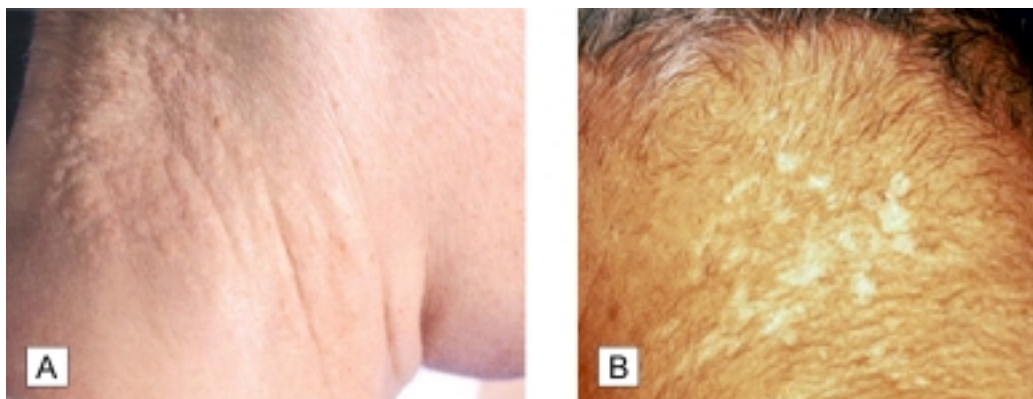
## 2 Einleitung

### 2.1 Pseudoxanthoma elasticum (PXE)

*Pseudoxanthoma elasticum* (PXE) ist eine seltene, vererbare, degenerative Erkrankung des elastischen Bindegewebes, die erstmals im Jahre 1881 beschrieben wurde (Rigal, 1881). Aus bislang noch unbekanntem Gründen kommt es im Verlauf der Erkrankung zu einer progressiven Kalzifizierung der elastischen Fasern im Bindegewebe, wodurch diese an Dehnbarkeit verlieren und fragmentieren (Neldner, 1988a). Die Erkrankung manifestiert sich bei den meisten Patienten durch Haut- und Augenhintergrundveränderungen und betrifft ferner das gastrointestinale und kardiovaskuläre System. Das Krankheitsbild von PXE ist sehr heterogen, was eine eindeutige Diagnosestellung erschwert. Verursacht wird die PXE-Erkrankung durch Mutationen in dem Gen *ABCC6* (*ATP-binding cassette transporter subfamily C member 6*), die zu einer Modifikation oder zu einem Verlust des Proteins MRP6 (*multidrug resistance-associated protein 6*) führen (Bergen *et al.*, 2000; Le Saux *et al.*, 2000; Ringpfeil *et al.*, 2000; Struk *et al.*, 2000). Die Identifizierung neuer PXE-verursachender Mutationen und die Aufklärung der MRP6-Funktion sind Gegenstände der aktuellen Forschung.

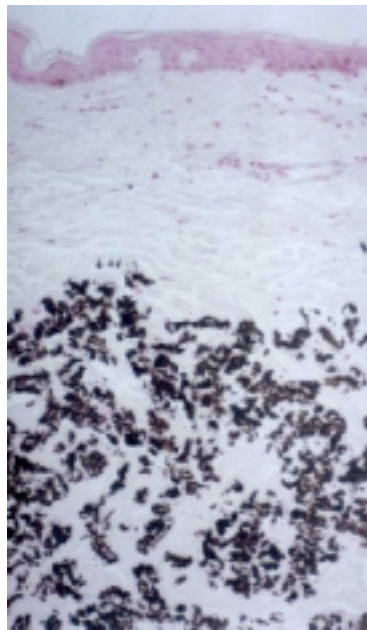
#### 2.1.1 PXE-Symptomatik

PXE ist eine Bindegewebserkrankung mit sehr variablem Phänotyp. Das häufigste Symptom der PXE-Erkrankung sind Hautläsionen in Form von schlaffen, faltigen Hautpartien mit kleinen gelblichen Papeln (Abb. 2-1), die hauptsächlich an den Seiten des Halses, im Nackenbereich und in den Arm- und Kniebeugen auftreten (Hu *et al.*, 2003a; Uitto *et al.*, 1998; Darier, 1896; Rigal, 1881). Die einzelnen Papeln können linear oder retikular angeordnet sein oder größere Plaques ausbilden (Schneider *et al.*, 1984).



**Abb. 2-1:** A: PXE-betroffene Hautpartie mit charakteristischen Papeln und Plaques an der rechten Halsseite eines PXE-Patienten (Hu *et al.*, 2003a). B: PXE-betroffene Hautpartie mit vereinzelt Papeln an der linken Halsseite eines PXE-Patienten (<http://www.pxe.org/>).

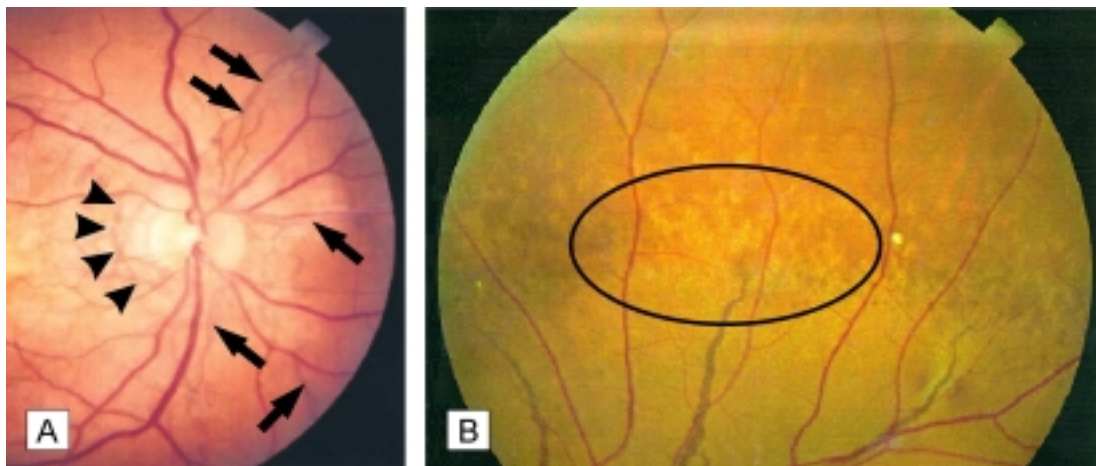
Die Hautveränderungen treten oftmals bereits in der Kindheit oder Adoleszenz auf und stellen daher meistens ein primäres PXE-Symptom dar (Jacobi und Schreiber, 1997). Sie sind nicht als lebensbedrohlich, sondern eher als kosmetisches Problem zu betrachten. Verursacht werden die Hautläsionen durch eine Kalzifizierung und Fragmentierung der elastischen Fasern in der mittleren Epidermisschicht (Lebwohl *et al.*, 1993; Neldner, 1988a; Uitto und Shamban, 1987). Diese histopathologischen Merkmale können durch eine Hautbiopsie und eine anschließende *von Kossa*-Färbung der Gewebeschnitte nachgewiesen werden (Abb. 2-2).



**Abb. 2-2:** Von *Kossa*-Färbung PXE-betroffener Haut. Kalzifizierte Elastinfasern sind schwarz angefärbt (<http://www.pxe.org/>).

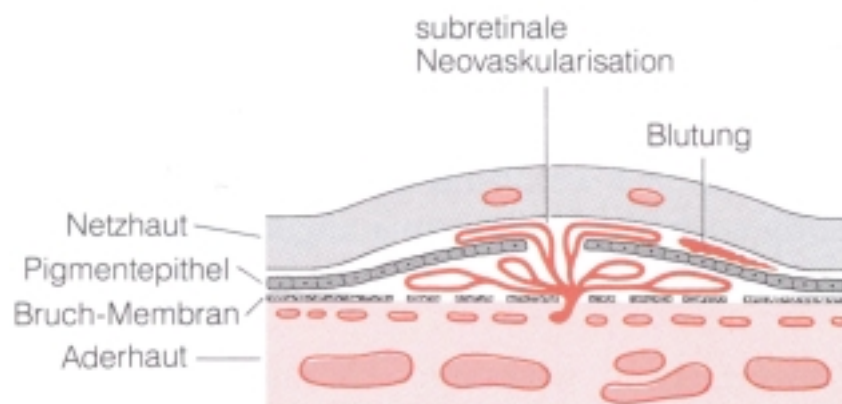
Die meisten PXE-Patienten leiden sowohl unter Hautalterationen als auch unter Veränderungen des Augenhintergrunds, die überwiegend ab der zweiten oder dritten Lebensdekade zu beobachten sind. Eine Kombination dieser Symptome wurde erstmalig im Jahre 1929 von dem Ophthalmologen Grönblad und dem Dermatologen Strandberg beschrieben, weshalb die PXE-Erkrankung auch unter dem Synonym Grönblad-Strandberg-Syndrom bekannt ist (Sherer *et al.*, 1999; Grönblad, 1929; Strandberg, 1929). Charakteristische Merkmale der Augenhintergrundveränderungen sind die durch Hyperpigmentierung der Netzhaut entstehende *Peau d'orange* und die als *Angioid streaks* bezeichneten Risse in der pathologisch verdickten und kalzifizierten Bruch-Membran (Clarkson und Altman, 1982; Dreyer und Green, 1978; Shimizu, 1961). Bei einer Retina-Angiographie zeigen sich die *Angioid streaks* als rötliche, unregelmäßige, gefäßähnliche Streifen im Augenhintergrund, während eine Marmorierung der Netzhaut auf eine *Peau d'orange* hinweist (Abb. 2-3).





**Abb. 2-3:** Retina-Angiographien von PXE-Patienten. A: Augenhintergrund eines Patienten mit *Angioid streaks* nahe der *Macula lutea*. Pfeile und Pfeilspitzen kennzeichnen breite und schmale *Angioid streaks* (Hu *et al.*, 2003a). B: Retina-Angiographie eines Patienten mit *Peau d'orange*. Im markierten Bereich ist die charakteristische *Peau d'orange* besonders deutlich zu erkennen (<http://www.pxe.org/>).

Die Degeneration der Bruch-Membran kann zu einer subretinalen Neovaskularisation führen (Secretan *et al.*, 1998). Dabei durchdringen die Blutgefäße der Aderhaut die rissige Bruch-Membran und wachsen unter das Pigmentepithel und die Netzhaut (Abb. 2-4). Die durch die subretinale Neovaskularisation entstehende Makuladegeneration hat eine Beeinträchtigung der Sehschärfe zur Folge (Mansour *et al.*, 1988; Grönblad, 1958). Da die neugebildeten Blutgefäße ebenfalls von der fortschreitenden Kalzifizierung der elastischen Fasern betroffen sind, kann es im Rahmen der Neovaskularisation zu Hämorrhagien kommen. Treten diese im Bereich der *Macula lutea* auf, können die Blutungen und die resultierende Narbenbildung zu einem Verlust des zentralen Sehvermögens führen (Weenink *et al.*, 1996).



**Abb. 2-4:** Schematische Darstellung der subretinalen Neovaskularisation, die zu einer Makuladegeneration und zu Hämorrhagien unter der Netzhaut führen kann (Grehn und Leydhecker, 1995).

Wesentlich seltener als Haut- und Augenalterationen treten bei PXE-Betroffenen Veränderungen des kardiovaskulären Systems und des Gastrointestinaltraktes auf (Hu *et al.*, 2003a). Die Mineralisierung der Elastinkomponenten der Blutgefäße verringert die Elastizität der Gefäßwände und kann dadurch im Magen-Darm-Trakt lebensgefährliche innere Blutungen verursachen (Neldner und Struk, 2002; Cunningham *et al.*, 1980). Die Kalzifizierung bewirkt weiterhin eine Verengung der Blutgefäße. Daher zählen die Hypertonie, die Arteriosklerose und arterielle Verschlusskrankheiten, wie die Schaufensterkrankheit *Claudicatio intermittens*, zu den häufigsten kardiovaskulären PXE-Symptomen (Schneider *et al.*, 1984; Schachner und Young, 1974; Eddy und Farber, 1962; Carlborg und Grönblad, 1955). Die Arteriosklerose führt bei vielen jungen PXE-Patienten zu einem erhöhten Risiko, in frühen Lebensjahren einen Myokardinfarkt zu erleiden (Nolte, 2000; Schachner und Young, 1974; Wilhelm und Praver, 1972). Weitere Studien zeigten außerdem, daß ein Mitralklappen-Prolaps bei PXE-Patienten häufiger vorkommt als in der Gesamtbevölkerung (Lebwohl *et al.*, 1982).

Die Erstellung einer eindeutigen Diagnose der Erkrankung PXE ist derzeit immer noch problematisch, da das PXE-Krankheitsbild sehr heterogen ist und vom Arzt aufgrund der Seltenheit der Erkrankung oftmals nicht erkannt wird. Hinzu kommt, daß die PXE-Symptome auch Merkmale zahlreicher anderer Erkrankungen und somit nicht pathognomonisch sind (Hu *et al.*, 2003a). Von diagnostischer Relevanz sind vor allem der Nachweis kalzifizierter Elastinfasern in PXE-betroffenem Hautgewebe mittels von *Kossa*-Färbung und die Identifizierung retinaler *Angioid streaks* (Lebwohl *et al.*, 1994).

### **2.1.2 Therapiemöglichkeiten**

Eine Therapie und Heilung von PXE ist bislang nicht möglich. Gegenwärtig können nur die auftretenden Symptome behandelt werden. Die Hautveränderungen können durch chirurgische Eingriffe gemildert werden (Akali und Sharpe, 2003). Eine regelmäßige Kontrolle der Retina durch einen Augenarzt minimiert das Risiko eines Sehverlustes, da die Ausbreitung retinaler Hämorrhagien in einigen Fällen durch Lasertherapie zeitweise gestoppt werden kann (Neldner und Struk, 2002). Das Fortschreiten der Erkrankung, vor allem das Auftreten kardiovaskulärer Probleme, kann durch Vermeidung potentieller Risikofaktoren, wie z.B. Rauchen und fettreiche Kost, durchaus verzögert werden (Neldner und Struk, 2002). Studien belegen, daß eine kalziumarme Ernährung den Verlauf der Erkrankung positiv beeinflussen kann (Renie *et al.*, 1984). Die für eine Behandlung der frühen Arteriosklerose empfohlene Einnahme blutverdünnender Medikamente sollte bei PXE-Patienten aufgrund

des erhöhten Risikos gastrointestinaler Blutungen eingeschränkt oder vermieden werden (Neldner, 1993).

### 2.1.3 Prävalenz und Vererbung von PXE

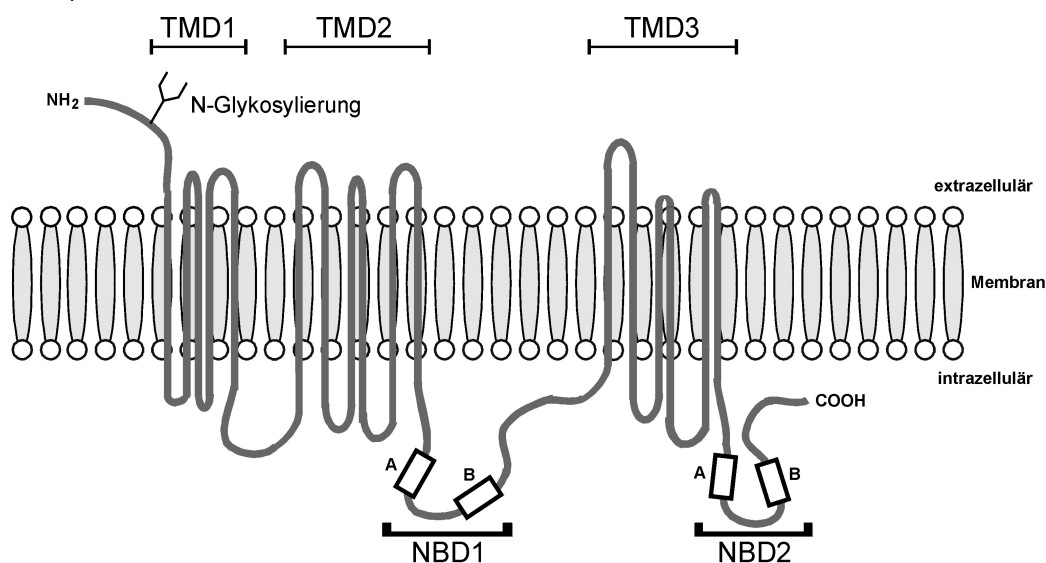
Nach bisherigen Daten scheint die Prävalenz der PXE-Erkrankung in der Bevölkerung weltweit bei ca. 1 : 70.000 - 1 : 100.000 zu liegen (Hu *et al.*, 2003a; Struk *et al.*, 1997). Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, daß zahlreiche PXE-Fälle aufgrund der problematischen PXE-Diagnosestellung in der Vergangenheit nicht erkannt wurden und auch zukünftig unerkannt bleiben. Demzufolge könnte die PXE-Prävalenz weit über dem angegebenen Literaturwert liegen. Die deutsche Selbsthilfegruppe für PXE-Erkrankte geht von etwa 700 - 1.000 PXE-Betroffenen in Deutschland aus (Selbsthilfegruppe für PXE-Erkrankte Deutschlands 1999 e.V., 2003). Verschiedene Studien belegen, daß PXE mit einem Verhältnis von ca. 2:1 überwiegend bei Frauen auftritt (Chassaing *et al.*, 2004; Neldner, 1988b). Wodurch diese Prädominanz verursacht wird, ist zur Zeit noch nicht bekannt. Auch die Art der Vererbung von PXE ist gegenwärtig nicht vollständig geklärt, da die meisten PXE-Fälle sporadisch auftreten (Hu *et al.*, 2003a; de Paepe *et al.*, 1991). In den PXE-betroffenen Familien dominiert eine autosomal rezessive Vererbungsform (Hu *et al.*, 2003b; Le Saux *et al.*, 2001; van Soest *et al.*, 1997; Neldner, 1988b; OMIM 264800). Nur in einigen seltenen Fällen wurde ein autosomal dominanter Vererbungsmodus beobachtet (Hausser und Anton-Lamprecht, 1991; Neldner, 1988b; Pope, 1974; OMIM 177850), wobei ein Auftreten der PXE-Erkrankung in drei aufeinanderfolgenden Generationen bisher nicht beschrieben wurde. Durch Kopplungsanalysen konnten im Jahre 1997 beide PXE-Varianten dem Gen-Locus 16p13.1 zugeordnet werden (van Soest *et al.*, 1997; Struk *et al.*, 1997). Nachdem der PXE-Locus durch weitere Untersuchungen auf 500 kb eingegrenzt wurde (Cai *et al.*, 2000), konnte im Jahre 2000 das Gen *ABCC6*, welches das Protein MRP6 kodiert, als PXE-Kandidatengen identifiziert werden (Bergen *et al.*, 2000; Le Saux *et al.*, 2000; Ringpfeil *et al.*, 2000; Struk *et al.*, 2000). Diese Studien zeigten außerdem, daß PXE auf verschiedene Mutationen im *ABCC6*-Gen zurückzuführen ist.

### 2.1.4. Das MRP6-Protein

Das MRP6-Protein gehört zu den ABC-Transporterproteinen, die die größte Familie transmembraner Proteine darstellen und an zahlreichen physiologischen Prozessen, wie z.B. der Immunantwort, der Signaltransduktion, der Detoxifizierung und der Vermittlung von Zytostatika-Resistenz, beteiligt sind (Pohl *et al.*, 2005, Dean *et al.*, 2001). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind 48 humane ABC-Transporterproteine bekannt, die ATP binden

können und die bei der ATP-Hydrolyse freiwerdende Energie nutzen, um eine Vielzahl an Molekülen durch Membranen zu befördern. Zu diesen Substanzen zählen u.a. Ionen, Lipide, Steroide, Peptide, Nukleoside und Zytostatika (Pohl *et al.*, 2005; Haimeur *et al.*, 2004; Dean *et al.*, 2001; Ambudkar und Gottesman, 1998). Der Transport verläuft in der Regel unidirektional, wobei die Moleküle meistens aus dem Zytoplasma in den extrazellulären Raum oder in intrazelluläre Kompartimente, wie Mitochondrien und Peroxisomen, geschleust werden (Dean *et al.*, 2001). MRP6 gehört zur Subfamilie C der sieben ABC-Transporter-Familien A-G, zu der insgesamt zwölf Proteine zählen, die u.a. am Transport von Chloridionen, organischen Anionen, Nukleosiden sowie Xenobiotika beteiligt sind und in einigen Fällen Arzneimittel-Resistenzen ausbilden (Dean *et al.*, 2001; Kruh *et al.*, 2001).

Das MRP6-Protein besteht aus 1503 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von ungefähr 165 kDa. Aufgrund der Aminosäuresequenz und des Hydrophobizitätsmusters wurde für das MRP6 eine Proteinstruktur postuliert, die drei Transmembrandomänen mit einer 5+6+6-Konfiguration der 17 Transmembranhelices aufweist (Abb. 2-5; Le Saux *et al.*, 2000; Kool *et al.*, 1999). Außerdem enthält das MRP6-Protein zwei intrazelluläre Nukleotidbindende Domänen (NBD). Die NBDs sind konservierte Merkmale der ABC-Transporter und werden durch je ein Walker A und Walker B Motiv charakterisiert, die an der Bindung und Hydrolyse von ATP beteiligt sind (Higgins, 1992). Zwischen dem Walker A und dem Walker B Motiv befindet sich weiterhin ein konserviertes ABC-Motiv, die Signatursequenz der ABC-Transporter (Belinsky und Kruh, 1999). Der aminotermine Teil von MRP6 ist extrazellulär lokalisiert und weist eine N-Glykosylierung am Asparaginrest 15 auf (Sinkó *et al.*, 2003; Kool *et al.*, 1999).



**Abb. 2-5:** Postulierte Proteinstruktur von MRP6 in der Zellmembran. In der Abbildung sind die drei Transmembrandomänen (TMD1-3) mit je 5, 6 und 6 Transmembranhelices, die zwei Nukleotidbindenden Domänen (NBD1 und 2), die Motive Walker A und B sowie die aminotermine N-Glykosylierung dargestellt.

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, daß MRP6 überwiegend in der Leber und den Nieren exprimiert wird und in der basolateralen Membran von Leber- und Nierenzellen lokalisiert ist. In anderen Geweben, vor allem in den von PXE betroffenen, wie z.B. der Retina und der Haut, wurde dagegen eine sehr geringe MRP6-Expression beobachtet (Scheffer *et al.*, 2002; Bergen *et al.*, 2000; Belinsky und Kruh, 1999; Kool *et al.*, 1999).

Die physiologische Funktion von MRP6 ist bislang noch unbekannt. Sequenzhomologien und Strukturähnlichkeiten zu anderen MRP-Proteinen, die als Transporter fungieren, als auch verschiedene *in vitro*-Experimente weisen jedoch darauf hin, daß MRP6 *in vivo* an der transmembranen Translokation verschiedener Substanzen beteiligt sein könnte. So wurden in neueren Efflux-Transport-Studien das anionische Cyclopentapeptid BQ-123, ein strukturelles Analogon des Neuropeptids Endothelin, und Glutathion-konjugierte organische Anionen, wie Leukotrien C<sub>4</sub>, als MRP6-Substrate identifiziert (Belinsky *et al.*, 2002; Ilias *et al.*, 2002). Außerdem konnte die Ausbildung einer Resistenz gegen verschiedene Zytostatika beobachtet werden (Belinsky *et al.*, 2002). Die physiologische Relevanz dieser *in vitro*-Transporteigenschaften und die Bedeutung von MRP6 bei der Entstehung von PXE sind gegenwärtig noch nicht geklärt. Daher zählen die Identifizierung physiologischer MRP6-Substrate und die Erforschung der PXE-Pathobiochemie zu den aktuellen Forschungsthemen.

### 2.1.5 Das **ABCC6**-Gen und PXE-verursachende **ABCC6**-Mutationen

Das **ABCC6**-Gen, das auf dem Chromosom 16p13.1 lokalisiert ist, beinhaltet 31 Exons und hat eine genomische Größe von etwa 75 kb. Der offene Leserahmen der **ABCC6**-mRNA umfaßt 4.512 bp und kodiert das Protein MRP6, wobei die Nukleotid-bindenden Schleifen 1 und 2 von den Exons 16 - 18 und 28 - 30 kodiert werden (Le Saux *et al.*, 2001; Belinsky und Kruh, 1999; Kool *et al.*, 1999). Im humanen Genom existieren weiterhin zwei Pseudogene von **ABCC6**, die homolog zum **ABCC6**-5'-Ende sind. Das Pseudogen **ABCC6-ψ1** enthält die Sequenz von Exon 1 bis Intron 9, während **ABCC6-ψ2** den Bereich von Exon 1 bis Intron 4 umfaßt (Cai *et al.*, 2001; Pulkkinen *et al.*, 2001).

Im Jahre 2000 wurden erstmalig PXE-verursachende Mutationen und eine Reihe von Polymorphismen im **ABCC6**-Gen identifiziert (Bergen *et al.*, 2000; Le Saux *et al.*, 2000; Struk *et al.*, 2000; Ringpfeil *et al.*, 2000). Bis heute sind 87 **ABCC6**-Mutationen beschrieben worden, die als PXE-verursachend eingestuft wurden. Zu diesen zählen *Nonsense*-, *Missense*- und Spleißstellen-Mutationen sowie Insertionen und Deletionen (Tab. 2-1). In der



Mutation	Veränderung im		Lokalisation	Referenz
	MRP6-Protein	ABCC6-Gen		
Missense	p.R1339C p.P1346S p.Q1347H p.G1354R p.R1357W p.D1361N p.K1394N p.E1400K p.S1403R p.I1424T p.R1459C	c.4015C>T c.4036C>T c.4041G>C c.4060G>C c.4069C>T c.4081G>A c.4182G>T c.4198G>A c.4209C>A c.4271T>C c.4377C>T	Exon 28 Exon 28 Exon 28 Exon 29 Exon 29 Exon 29 Exon 29 Exon 29 Exon 30 Exon 30 Exon 30	Le Saux <i>et al.</i> , 2001; Struk <i>et al.</i> , 2000 Gheduzzi <i>et al.</i> , 2004 Le Saux <i>et al.</i> , 2001 Pulkkinen <i>et al.</i> , 2001; Uitto <i>et al.</i> , 2001 Noji <i>et al.</i> , 2004 Le Saux <i>et al.</i> , 2001 Hu <i>et al.</i> , 2003b Chassaing <i>et al.</i> , 2004 Hendig <i>et al.</i> , 2004 Le Saux <i>et al.</i> , 2001 Hu <i>et al.</i> , 2003b
Spleißstellen		c.2787+1G>T c.3634-3C>A c.3736-1G>A	Intron 21 Intron 25 Intron 26	Le Saux <i>et al.</i> , 2000; Uitto <i>et al.</i> , 2001 Chassaing <i>et al.</i> , 2004 Le Saux <i>et al.</i> , 2001; Ringpfeil <i>et al.</i> , 2000
Insertion		c.938-939insT c.3544dupC c.4220insAGAA	Exon 8 Exon 25 Exon 30	Le Saux <i>et al.</i> , 2001 Gheduzzi <i>et al.</i> , 2004 Bergen <i>et al.</i> , 2000
Deletion		c.179del9 c.179-195del c.220-222del c.960delC c.1088-1120del c.1944del22 c.1995delG c.2322delC c.2542delG c.2835-2850del16 c.3775delT c.4101delC c.4182delG c.4318delA c.4434delA	Exon 2 Exon 2 Exon 3 Exon 8 Exon 9 Exon 16 Exon 16 Exon 18 Exon 19 Exon 22 Exon 27 Exon 29 Exon 29 Exon 30 Exon 31	Pulkkinen <i>et al.</i> , 2001 Le Saux <i>et al.</i> , 2001 Chassaing <i>et al.</i> , 2004 Meloni <i>et al.</i> , 2001 Chassaing <i>et al.</i> , 2004 Bergen <i>et al.</i> , 2000 Le Saux <i>et al.</i> , 2001 Le Saux <i>et al.</i> , 2001 Le Saux <i>et al.</i> , 2001 Hendig <i>et al.</i> , 2004 Bergen <i>et al.</i> , 2000; Le Saux <i>et al.</i> , 2000 Le Saux <i>et al.</i> , 2001 Hu <i>et al.</i> , 2003b Gheduzzi <i>et al.</i> , 2004 Hendig <i>et al.</i> , 2004
Intragenische Deletion		delEx15 delEx18 delEx23-29	Exon 15 Exon 18 Exon 23 - 29	Le Saux <i>et al.</i> , 2001 Gheduzzi <i>et al.</i> , 2004 Le Saux <i>et al.</i> , 2001; Ringpfeil <i>et al.</i> , 2001
Intergenische Deletion		delABCC6	ABCC6	Meloni <i>et al.</i> , 2001; Bergen <i>et al.</i> , 2000

Die Mehrheit der PXE-Mutationen befindet sich in den ABCC6-Exons 16 - 18, 24 und 28 - 30, die für die NBDs und den cytoplasmatischen Bereich zwischen der 15. und 16. Transmembranhelix kodieren. Die hohe Mutationsfrequenz in diesen Exons weist darauf hin, daß die betreffenden Domänen einen entscheidenden Einfluß auf die Funktion des MRP6-Proteins ausüben. Die meisten der PXE-verursachenden ABCC6-Mutationen treten sporadisch auf (Chassaing *et al.*, 2004; Hendig *et al.*, 2004; Le Saux *et al.*, 2001). Häufigere Mutationen sind die *Nonsense*-Mutation p.R1141X und die intragenische Deletion delEx23-29, wobei p.R1141X vor allem bei europäischen und delEx23-29 überwiegend bei amerikanischen PXE-Patienten zu finden ist (Le Saux *et al.*, 2001). Die heterozygote Form der p.R1141X-Mutation konnte außerdem in nicht-betroffenen PXE-Angehörigen und in der Normalbevölkerung nachgewiesen werden (Götting *et al.*, 2004; Trip *et al.*, 2002). Dabei zeigte sich, daß das Auftreten der p.R1141X-Mutation mit einem erhöhten Risiko koronarer Gefäßerkrankungen verbunden ist (Trip *et al.*, 2002).

Die Suche nach neuen PXE-Mutationen und somit die Identifizierung des kompletten ABCC6-Mutationsspektrums sind bis heute Gegenstände der aktuellen PXE-Grundlagenforschung.

## 2.2 Abdominales Aortenaneurysma (AAA)

Abdominale Aortenaneurysmen (AAA) sind lokalisierte Dilatationen der Aorta mit einem im Vergleich zu einem normalen Segment 1,5-fach vergrößerten Durchmesser (Prisant und Mondy, 2004). Aortenaneurysmen können sich auf der ganzen Länge der Aorta an einer beliebigen Stelle entwickeln,  $\frac{3}{4}$  sind jedoch in der *Aorta abdominalis* gelegen (MSD-*Manual*, 1993). Die Pathogenese eines Aneurysmas ist durch die Degradierung der extrazellulären Matrixkomponenten Elastin und Kollagen gekennzeichnet (Satta *et al.*, 1998; Verloes *et al.*, 1996; Ramsbottom *et al.*, 1994). Elastin gilt als der strukturelle Hauptbestandteil der Aortenwand und dementsprechend wird der Abbau der elastischen Fasern als initialer Schritt der AAA-Genese betrachtet (White *et al.*, 1993). Zu den Komplikationen der Aneurysmabildung zählen die lokale Thrombose mit Gefäßverschluss, die Embolisation von Thromben in die Gefäßperipherie sowie die plötzliche Ruptur des Aneurysmas, die zu Hämorrhagien führt und im Fall des AAAs eine hohe Letalität aufweist (Münch und Reitz, 1996; MSD-*Manual*, 1993). Die Ruptur oder die drohende Ruptur eines AAAs stellt einen chirurgischen Notfall dar, wobei das Operationsrisiko bei ruptierten AAAs etwa 50 % beträgt. In den industrialisierten Ländern leiden 1 - 6 % der Bevölkerung an AAAs (Verloes *et al.*, 1996). Da die Überlebensrate nach einer AAA-Ruptur eher gering ist, kann eine frühzeitige AAA-Diagnose lebenswichtig für die betroffenen Personen sein. Aus diesem Grund ist auch die Erforschung potentieller AAA-Risikofaktoren von besonderem Interesse.

Der aneurysmale Prozeß gilt als multifaktoriell. Dabei spielen sowohl biochemische und genetische Faktoren als auch Umwelteinflüsse eine entscheidende Rolle (Belsley und Tilson, 2003; Strauss *et al.*, 2003). Arteriosklerose und Hypertonie sind die häufigsten Ursachen von Aneurysmen, aber auch das Zigarettenrauchen trägt zum degenerativen Prozeß bei (Lederle *et al.*, 1997; Spittell, 1983). Eine familiäre Häufung von AAAs wurde ebenfalls beobachtet und weist auf die Existenz von Kandidatengen hin, die an der AAA-Genese beteiligt sind (Prisant und Mondy, 2004; Verloes *et al.*, 1995). Bislang wurden in mindestens 3 Genen Sequenzvariationen identifiziert, die mit dem Auftreten von AAAs assoziiert sind. Zu diesen zählen die Gene Matrix-Metalloproteinase-9 (Jones *et al.*, 2003), Methylentetrahydrofolat-Reduktase (Strauss *et al.*, 2003) und Hämoxygenase-1 (Schillinger *et al.*, 2002). Angeborene Bindegewebsstörungen wie das Marfan-Syndrom und das Turner-Syndrom können ebenfalls zur Ausbildung von Aneurysmen führen (MSD-*Manual*, 1993). Eine Beteiligung weiterer genetischer Faktoren an der AAA-Pathogenese ist sehr wahrscheinlich. Daher stellt die Charakterisierung einer Vielzahl von Genen, die möglicherweise die AAA-Entwicklung beeinflussen, einen aktuellen Gegenstand der Forschung dar. Basierend auf den histopathologischen Ähnlichkeiten der Erkrankungen AAA und PXE wird in dieser Studie das PXE-Kandidatengen *ABCC6* als AAA-Risikofaktor in Erwägung gezogen.



### 2.3 Gegenstände und Ziele dieser Arbeit

Der Einfluß der verschiedenen PXE-verursachenden *ABCC6*-Mutationen auf den Verlauf der PXE-Erkrankung und die pathologische Relevanz des MRP6-Proteins sind gegenwärtig noch völlig ungeklärt. Daher zählen sowohl die Identifizierung des vollständigen Spektrums der PXE-verursachenden *ABCC6*-Mutationen als auch Untersuchungen zur *ABCC6*-Transkription und MRP6-Expression zur aktuellen PXE-Forschung und tragen zukünftig vermutlich zur Klärung der pathobiochemischen Mechanismen von PXE bei.

Die Gegenstände und Ziele dieser Arbeit waren:

1. die Identifizierung neuer und bekannter PXE-verursachender Mutationen in den Exons 1 - 31 des *ABCC6*-Gens von 53 deutschen PXE-Patienten und 16 nicht oder noch nicht betroffenen Angehörigen mittels DHPLC-Analyse und DNA-Sequenzierung. Die pathologische Relevanz der neuen *ABCC6*-Variationen sollte durch die Untersuchung einer Kontrollkohorte von mindestens 100 Probanden mittels RFLP- oder DHPLC-Analyse überprüft werden.
2. die Suche nach Sequenzvariationen in ausgewählten Exons des *ABCC6*-Gens von 133 AAA-Patienten mittels DHPLC-Analyse und DNA-Sequenzierung sowie die Überprüfung, ob eventuell vorhandene *ABCC6*-Variationen einen Risikofaktor für die AAA-Genese darstellen. Hierbei sollte die Analyse auf die *ABCC6*-Exons 16 - 18, 24 und 28 - 30 beschränkt werden, da diese funktionell wichtige MRP6-Domänen kodieren und bei PXE-Patienten sehr häufig Mutationen enthalten.
3. die Etablierung und Optimierung eines *ABCC6*-cDNA-spezifischen *Real-Time*-PCR-Verfahrens zur relativen Quantifizierung von *ABCC6*-mRNA in verschiedenen Zellkulturen und Geweben unter Anwendung der *LightCycler*-Technologie.
4. die Entwicklung polyklonaler Kaninchen-anti-MRP6-Antikörper zur Untersuchung der MRP6-Expression in verschiedenen Zellkulturen und Geweben sowie die Überprüfung der Antikörper-Spezifität unter Anwendung von *Dot-Blot*-Untersuchungen, *Western-Blot*-Analysen und Immunfluoreszenzmikroskopie. Des Weiteren sollte die MRP6-Expression in Dermalfibroblasten von PXE-Patienten mit unterschiedlichem *ABCC6*-Genotyp unter Einsatz der neuen Kaninchen-anti-MRP6-Antikörper analysiert werden.
5. die Analyse der PXE-Phänotypen von 53 PXE-Patienten und die Suche nach Genotyp-Phänotyp-Korrelationen.

### 3 Materialien

#### 3.1 Patienten- und Kontrollkohorten

##### 3.1.1 PXE-Patienten

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen standen Hautproben von 2 PXE-Patienten und EDTA-Blutproben von 53 PXE-Patienten und 16 nicht oder noch nicht betroffenen Angehörigen zur Verfügung. Die Hautbiopsien, die Blutabnahme, die Erstellung der PXE-Diagnose, weitere Untersuchungen und die Befragung der Probanden hinsichtlich ihrer Anamnese erfolgten durch die PXE-Ambulanz der Dermatologischen Klinik im Krankenhaus Bethesda in Freudenberg. Die Charakteristika der PXE-Patienten und PXE-Angehörigen sind in der Tabelle 3-1 aufgelistet. Alle Probanden erklärten sich mit einer Teilnahme an dieser Studie einverstanden.

**Tab. 3-1:** Charakteristika der PXE-Patienten und PXE-Angehörigen. Die Werte stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen dar oder geben die Probanden-Anzahl (Prozent) an.

Charakteristika	PXE-Patienten n = 53	PXE-Angehörige n = 16
Männer	16 (30 %)	7 (44 %)
Alter (Jahre)	49 $\pm$ 14	45 $\pm$ 19
PXE-Diagnose-Alter (Jahre)	32 $\pm$ 17	/
Raucher	11 (21 %)	5 (31 %)
<i>Symptome:</i>		
Hautläsionen	49 (92 %)	0 (0 %)
Augensymptome	48 (91 %)	0 (0 %)
Hypertonie	19 (36 %)	1 (6 %)
Gefäßveränderungen	15 (28 %)	0 (0 %)
Herzerkrankungen	9 (17 %)	1 (6 %)
Gastrointestinaltraktbeteiligung	7 (13 %)	0 (0 %)
Nierenerkrankungen	7 (13 %)	0 (0 %)
Arthropathien	5 (9 %)	0 (0 %)

##### 3.1.2 AAA-Patienten

Für die in dieser Studie durchgeführten Analysen stand genomische DNA aus Blutproben von 133 AAA-Patienten zur Verfügung. Die Blutabnahme, die DNA-Isolierung, die Erstellung

der AAA-Diagnose, weitere Untersuchungen und die Befragung der Probanden hinsichtlich ihrer Anamnese erfolgten durch die Universitätsklinik für Notfallmedizin, das Klinische Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik sowie die Klinische Abteilung Angiologie der Universitätsklinik für Innere Medizin II an der Universität Wien in Österreich. Die Charakteristika der AAA-Patienten sind in der Tabelle 3-2 aufgeführt. Alle Probanden erklärten sich mit der Teilnahme an dieser Studie einverstanden.

**Tab. 3-2:** Charakteristika der AAA-Patienten. Die Werte stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen dar oder geben die AAA-Patienten-Anzahl (Prozent) an.

<b>Charakteristika</b>	<b>AAA-Patienten n = 133</b>
Männer	97 (73 %)
Alter (Jahre)	67 $\pm$ 12
Raucher	45 (34 %)
<i>Symptome:</i>	
Hypertonie	112 (84 %)
Diabetes mellitus	18 (14 %)
Hyperlipidämie	76 (57 %)
Koronare arterielle Verschlusskrankheit	52 (39 %)
Periphere arterielle Verschlusskrankheit	30 (23 %)
Chronische arterielle Verschlusskrankheit	27 (20 %)
Chronisches Nierenversagen	18 (14 %)
Marfan-Syndrom	0 (0 %)
Turner-Syndrom	0 (0 %)

### 3.1.3 Kontrollpersonen

Als gesunde Kontrollpersonen dienten anonymisierte Blutspender im Alter von 18 bis 68 Jahren aus Ostwestfalen-Lippe. Das Durchschnittsalter der Blutspender und die Standardabweichung betragen 40 Jahre  $\pm$  19 Jahre. Unter den Blutspendern befanden sich 45 % Männer und 55 % Frauen. Der Anteil der Raucher lag bei 34 %. Eine Voraussetzung für die Blutspende war ein Blutdruck  $>100/55$  mm Hg und  $<180/100$  mm Hg.

## 3.2 Antikörper

### 3.2.1 Primärantikörper

#### Kaninchen-anti-OEY1

Bioscience, Göttingen

Polyklonaler Antikörper (Antiserum) gegen das synthetische Peptid OEY1, das den Aminosäuren 336 - 348 im humanen MRP6-Protein entspricht.

#### Kaninchen-anti-OEY2

Bioscience, Göttingen

Polyklonaler Antikörper (Antiserum) gegen das synthetische Peptid OEY2, das den Aminosäuren 892 - 905 im humanen MRP6-Protein entspricht.

#### Kaninchen-anti-OEY3

Bioscience, Göttingen

Polyklonaler Antikörper (Antiserum) gegen das synthetische Peptid OEY3, das den Aminosäuren 1392 - 1404 im humanen MRP6-Protein entspricht.

#### Kaninchen-anti-RatteMRP6 (K14)

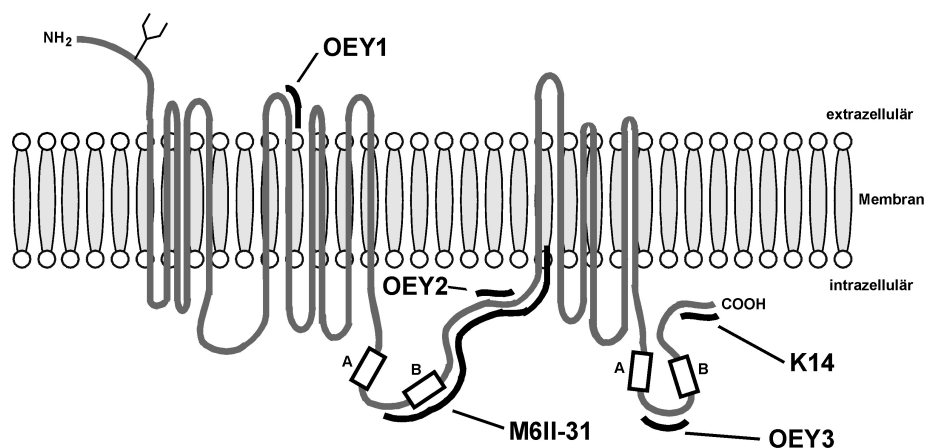
Prof. Dr. Bruno Stieger, Abteilung für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Zürich, Schweiz

Polyklonaler Antikörper (Antiserum) gegen ein synthetisches Peptid, das den 16 C-terminalen Aminosäuren im MRP6-Protein der Ratte entspricht (Madon *et al.*, 2000). Der Antikörper zeigt Kreuzreaktionen mit dem humanen MRP6-Protein (Sinkó *et al.*, 2003).

#### Ratte-anti-HumanMRP6 (M6II-31)

Acris, Hiddenhausen

Monoklonaler Antikörper gegen ein bakterielles Fusionsprotein, das die Aminosäuren 764 - 964 des humanen MRP6-Proteins enthält. Der Antikörper zeigt Kreuzreaktionen mit dem humanen MRP6-Protein.



**Abb. 3-1:** Lokalisation der Epitope der Antikörper OEY1, OEY2, OEY3, K14 und M6II-31 im MRP6.

### 3.2.2 Sekundärantikörper

Ziege-anti-Kaninchen-IgG/FITC, polyklonal	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen-IgG/HRPO, polyklonal	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Ratte-IgG/FITC, polyklonal	Dianova, Hamburg

### 3.3 Bakterienstämme

*Escherichia coli* TOP10 Invitrogen, Groningen, Niederlande

Genotyp: *F*, *mcrA*,  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ ,  $\phi 80lacZ\Delta M15$ ,  $\Delta lacX74$ , *recA1*, *araD139*,  $\Delta(ara-leu)7697$ , *galU*, *galK*, *rpsL*, (*Str<sup>R</sup>*), *endA1*, *nupG*.

Phänotyp: *amp<sup>S</sup>*.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der *E. coli*-Stamm TOP10 zur Anreicherung von Plasmid-DNA verwendet. *E. coli* TOP10 ist ein Sicherheitsstamm, der aufgrund von Gendefekten nur in Nährmedien wachsen kann und in einer natürlichen Umgebung nicht überlebensfähig ist.

### 3.4 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acetonitril, HPLC-Gradient Grade	Transgenomic, Omaha, USA
Agar	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose	Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V (BSA)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)	Peqlab, Erlangen
BSA - nicht acetyliert (20 mg/mL)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Citronensäure	Merck, Darmstadt
4-Chloro-1-naphthol	Merck, Darmstadt
<i>Coomassie Brilliant Blue</i> R250	Sigma-Aldrich, Steinheim
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs, 100 mM)	Promega, Madison, USA
Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Groningen, NL
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (0,5 $\mu$ g/ $\mu$ L)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formamid	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt

Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
MetaPhorAgarose	Cambrex, Verviers, Belgien
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mineralöl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Nonidet P40 (NP40)	Fluka, Steinheim
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Triethylammoniumacetat (TEAA)	Transgenomic, Omaha, USA
Pepton	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasser: <i>RotisolVHPLC-Gradient-Grade</i>	Roth, Karlsruhe
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	Braun, Melsungen
<i>Aqua B. Braun</i>	Braun, Melsungen
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), 30 %ig	Merck, Darmstadt

Alle Chemikalien wurden in höchstem Reinheitsgrad (p.A.) bezogen. Nicht aufgeführte Chemikalien und Reagenzien stammen von den Firmen Fluka (Steinheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Steinheim).

### 3.5 Enzyme und Inhibitoren

Protease-Inhibitor-Cocktail P2714	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>RNaseOUT</i>	Invitrogen, Groningen, NL
<i>SuperScript II</i>	Invitrogen, Groningen, NL
Kollagenase/Dispase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pronase E	Merck, Darmstadt
<i>Taq-DNA-Polymerase</i>	Qiagen, Hilden
<i>HotStar-Taq-DNA-Polymerase</i>	Qiagen, Hilden
<i>HotFire-Taq-DNA-Polymerase</i>	Solis Biodyne, Tartu, Estland
<i>Exonuclease I</i>	New England BioLabs, Frankfurt
<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>	Amersham Pharmacia, Freiburg
Restriktionsenzyme	Promega, Madison, USA; MBI Fermentas, St.Leon-Rot; New England BioLabs, Frankfurt

### 3.6 Kommerzielle Reaktions- und Nachweissysteme

<i>HiSpeed Plasmid Midi Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAamp DNA Blood Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAshredder Homogenizers</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit</i>	ABI, Foster City, USA
<i>MicroBio-Spin P-30 Tris Chromatography Columns</i>	Bio-Rad Laboratories, München
Bicinchoninsäure-Proteinbestimmungssystem	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>SuperSignal West Pico Kit (ECL-Kit)</i>	Pierce, Rockford, USA

### 3.7 Längen- und Größenstandards

1 kb DNA-Leiter	Invitrogen, Groningen, NL
DNA-Marker pUC19/Mspl	MBBL, Bielefeld
<i>GeneScan-500-TAMRA-SizeStandard</i>	ABI, Foster City, USA
<i>SeeBluePlus2 - PreStained Protein Standard</i>	Invitrogen, Groningen, NL

### 3.8 Peptide

OEY1: NH <sub>2</sub> -CLEFIGDPKPPAWK-COOH	Bioscience, Göttingen
OEY2: NH <sub>2</sub> -CKSVPEKDRRTTSEAQ-COOH	Bioscience, Göttingen
OEY3: NH <sub>2</sub> -KQYKCADRGEDLSV-COOH	Bioscience, Göttingen

### 3.9 Plasmide

pcDNA3.1(+)/MRP6 Prof. Dr. Gary D. Kruh, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA  
 Das Plasmid pcDNA3.1(+)/MRP6 besteht aus dem Vektor pcDNA3.1(+) (5428 bp) der Firma Invitrogen und der *ABCC6*-cDNA (4512 bp; *NCBI*: AF076622, Basen 24 - 4535), die in die MCS (*multiple cloning side*) des Vektors inseriert wurde. Das pcDNA3.1(+)/MRP6-Plasmid, das in *E. coli* TOP10 vervielfältigt werden kann, fungiert in eukaryontischen Zellen als MRP6-Expressionsvektor.

pcDNA4/HisMax/lacZ

Invitrogen, Groningen, NL

Das Plasmid pcDNA4/HisMax/lacZ (8321 bp) besitzt ein  $\beta$ -Galaktosidase kodierendes *lacZ*-Gen und wird daher unter Anwendung der Blau-Weiß-Selektion zur Bestimmung der Transfektionseffizienz bei eukaryontischen Zellen verwendet.

**3.10 Primer, Mikrosatellitenmarker und Hybridisierungssonden**

Die in dieser Arbeit verwendeten *Primer*, Mikrosatellitenmarker und Hybridisierungssonden wurden von den Firmen Invitrogen (Groningen, NL), Biomers (Ulm), Metabion (München) und Operon Biotechnologies (Köln) bezogen.

Zur Amplifikation der Exons 1 - 31 des *ABCC6*-Gens und zu deren Sequenzierung wurden die in der Tabelle 3-3 aufgelisteten *Primer* verwendet.

**Tab. 3-3:** *Primer* zur Amplifikation und Sequenzierung der *ABCC6*-Exons 1 - 31.

Exon	Primer	Primer-Sequenz (5' > 3')	Annealing-Temperatur [°C]	PCR-Produkt [bp]
1	E1U: E1L:	CAGCCCGAGAGATCTGCAGC TGCTGGGTCCAAAGTGTTTA	55	469
2	E2U: E2L:	TGTCCCCTGCCTCCCCGAA GATCCAAAAAGTTGCCTGGC	55	328
3+4	E3/4U: E3/4L:	TATAAGTGTGTGCATCGTGT TCCAGTTGGACATGGGGCC	61	736
5	E5U: E5L:	AGACTGAGACCTCAAAGTGG CCTCTGTCTCCATTCTTAT	51	219
6	E6U: E6L:	GGCCCTGGAGAAGCAGCTGT CACAGTTCGTCCTGTCTTCC	64	623
7	E7Ua: E7La:	ATGATGAGCTTTTCTGAAGT GATCCTGCAGGGGTGAATGG	51	242
8	E8U: E8L:	AAGGATGCCACTAAGAGACC CCCCCAACTCCCATGATTGC	56	450
9	E9U: E9L:	GATAACATTACTGCCC ACCAGCTGTACCTTCT	52	286
10	E10Ua: E10La:	GGAAGGACGAGGGGGAGAAGG GGTGGGGCTCAGTGGGTGG	66	320
	E10Ub: E10Lb:	TCACAGCGGACCTCTT GGTTGGCCTAAGAGAC	51	424
11	E11U: E11L:	GACCTGTGGCTTCCTCC CTCGGGATCTCCTGACAT	56	188
12	E12U: E12L:	CACCCCGCACTCCTTC CAACTGTCCCTGTCTTCATCTC	54	302
13	E13U: E13L:	GCACTCTCCAGGATG CATGCTTGCGTGTCTC	59	234
14	E14U: E14L:	CATCCATTGCCCCGAGC TGAGACACCGACCCCAAAC	56	280



Exon	Primer	Primer-Sequenz (5' > 3')	Annealing-Temperatur [°C]	PCR-Produkt [bp]
15	E15U: E15L:	TGGTTACTACGGGTGTCTG GGGTCTCCTGTAAATGGC	54	136
16	E16U: E16L:	AGCGAGGAAGTGGGAC AGAGGCGGGCTGAAC	58	241
17	E17U: E17L:	CCAAATGACTCCCAACT CTCCTGTGACCAAAGTAA	55	264
18	E18U: E18L:	GGTTAGGACTGGATGCT TTTCACCCTGTAGATGCT	51	289
19	E19U: E19L:	ATGCCAGTAGGACCCTT TTCTACCCCTTCCCTGC	52	277
20	E20U: E20L:	AATCATCTTGGCTAACTGG TGCGTGACAGGACTCTCTT	53	294
21	E21U: E21L:	AGGTGCTCAAGAAAGGT GGGTTAGGCACATACAC	52	300
22	E22U: E22L:	AGGGGTGGGGTAAAGGAG CACTGGGGGCTCTCTCTG	60	331
23	E23Ua: E23La:	CAGAGACAGGGGACTGGCTGA TGGGCCGCTCCTGAGGGT	69	432
	E23Ub: E23Lb:	CAGCCCCTAGATGTCC GTAGCGGGAGAGACCT	61	510
24	E24Ua: E24La:	CTCCCATCCATCCTTCT CCTCGCTACCATACAATATGA	56	307
	E24Ub: E24Lb:	TGACCTCGCTACCATACAAT CCTGTACTTGGGGCTCTCT	55	377
25	E25U: E25L:	TCTTCAAAGGTCCCCTA TCATCTTCTCTACTCCCT	55	368
26	E26U: E26L:	GCTGCCACCCTGTCTGT CCTGCCTCCCCTCTTTA	57	384
27	E27U: E27L:	GCAGGTTTGGGGAAGGT GAGGTGGGCCATCTTGT	57	385
28	E28Ua: E28La:	CCCCCTCCACCAGCCTCA CCTTTCCTCCCAACCCCG	66	201
	E28Ub: E28Lb:	CCGCAGAGAGCCAGGG GCCTTTCCTCCCAACCC	64	291
29	E29Ua: E29La:	CCTCGCCTCGGTCAGCAC TCCTGTTCCCTGGCTCTC	59	153
	E29Ub: E29Lb:	GCCATCCCCTCCTCTCC ATCAGCATCATCCCCAG	61	316
30	E30U: E30L:	TGCCTCCGCCTCCTTC CGTCCCAGCTAATTGTCCC	61	292
31	E31U: E31L:	GTACGGTTGAGGGTCTCTGG AGGGAGCCGCATGGAAAGC	61	254

Der Nachweis der *ABCC6*-Mutationen c.754C>T und c.1244T>C erfolgte durch RFLP-Analyse. Hierzu wurden mittels modifizierter *Primer* bei der Amplifikation der *ABCC6*-Exons 7 und 10 die Restriktionsschnittstellen der Enzyme *AluI* und *Hin6I* generiert. Die Sequenzen

der verwendeten *Primer* sind in der Tabelle 3-4 angegeben. Der Basenaustausch, der zur Synthese der Restriktionsschnittstelle führt, ist unterstrichen und in Fettdruck abgebildet.

**Tab. 3-4:** *Primer* zur RFLP-Mutationsanalyse.

Exon	<i>Primer</i>	<i>Primer-Sequenz (5' &gt; 3')</i>	<i>Annealing-Temperatur [°C]</i>	<i>PCR-Produkt [bp]</i>	<i>Enzym / Mutation</i>
7	E7Ub: E7Lb:	GGCCAATGATGAGCTTTTCTGAAGT AACTCCTCAGAAGAAGACTTGTTC <u>CC</u> <b>A</b> G	52	128	<i>AluI</i> / c.754C>T
10	E10Uc: E10Lc:	TCAGACTTGCCCTAACCCTGGGGTCACA GTGGGTGATGTGGTCAATCTGGTGT <u>G</u> CG	50	275	<i>Hin6I</i> / c.1244T>C

Die Mikrosatellitenmarker D16B9621 und D16S764 wurden zur Durchführung einer limitierten Haplotypen-Analyse eingesetzt. Die Sequenzen der Marker sind in der Tabelle 3-5 angegeben.

**Tab. 3-5:** Mikrosatellitenmarker zur Haplotypen-Analyse.

Marker	<i>Primer</i>	<i>Primer-Sequenz (5' &gt; 3')</i>	<i>Annealing-Temperatur [°C]</i>	<i>PCR-Produkt [bp]</i>
D16B9621	D16B9621U: D16B9621L:	FAM-GGCCGAGAAACGATGGTTATTT GAAGCTTGCCCTTTTAAAGAACCAACT	64	308 - 344
D16S764	D16S764U: D16S764L:	FAM-TTGTTAAGTGAGGCATGATGA TCTTGCATTCATCTTGCTTAT	59	119 -139

Zur partiellen Sequenzierung des Plasmids pcDNA3.1(+)/MRP6 und somit zur Identifizierung pcDNA3.1(+)/MRP6-transformierter *E. coli* TOP10-Klone wurden die in der Tabelle 3-6 aufgeführten *Primer* verwendet. Die *Primer* wurden so gewählt, daß das 3'- und 5'-Ende der *ABCC6*-cDNA und die angrenzenden pcDNA3.1(+)-Vektorbereiche nachgewiesen werden.

**Tab. 3-6:** *Primer* zur partiellen Sequenzierung des Plasmids pcDNA3.1(+)/MRP6.

<i>Primer</i>	<i>Primer-Sequenz (5' &gt; 3')</i>
pcDNA3.1(+)/MRP6/T7-Prom-For- <i>Primer</i> .	TAATACGACTCACTATAGGG
pcDNA3.1(+)/MRP6/BGH-Rev- <i>Primer</i> .	TAGAAGGCACAGTCGAGG

Die Synthese von cDNA erfolgte mit Oligo(dT)<sub>15-18</sub>-*Primern*. Zur Amplifikation der *ABCC6*-cDNA mittels Standard-PCR wurden die in der Tabelle 3-7 angegebenen *Primern* eingesetzt. Die Quantifizierung der *ABCC6*-cDNA wurde unter Verwendung des *LightCycler*-Systems durchgeführt. Hierzu wurden Hybridisierungssonden und *ABCC6*-Intron-überspannende

*Primer* benötigt. Die Sequenzen dieser *Primer* und Sonden sind in der Tabelle 3-8 dargestellt.

**Tab. 3-7:** *Primer* zum Nachweis der ABCC6-cDNA mittels Standard-PCR.

<i>Primer</i>	<i>Primer-Sequenz (5' &gt; 3')</i>	<i>Annealing-Temperatur [°C]</i>	<i>PCR-Produkt [bp]</i>
E23+24/3326U-cDNA- <i>Primer</i> E24+25/3523L-cDNA- <i>Primer</i>	TCAGAGCCTGTATGTGG CAAGCCACCTGTCAG	54	212
E24/3379U-cDNA- <i>Primer</i> E25/3631L-cDNA- <i>Primer</i>	GCTACTCGTCTGTCTGCT CAGCAGAGACAGAGAAGC	55	270
E23+24/3326U-cDNA- <i>Primer</i> E25/3631L-cDNA- <i>Primer</i>	TCAGAGCCTGTATGTGG CAGCAGAGACAGAGAAGC	52	323
E24/3379U-cDNA- <i>Primer</i> E26/3697L-cDNA- <i>Primer</i>	GCTACTCGTCTGTCTGCT CGATGCTGTTCTCTAGGT	55	336

**Tab. 3-8:** *Primer* und Sonden zum Nachweis der ABCC6-cDNA mittels *Real-Time-PCR*.

<i>Primer / Sonde</i>	<i>Primer-Sequenz (5' &gt; 3')</i>	<i>Annealing-Temperatur [°C]</i>	<i>PCR-Produkt [bp]</i>
E23+24/3326U-cDNA- <i>Primer</i> E24+25/3523L-cDNA- <i>Primer</i>	TCAGAGCCTGTATGTGG CAAGCCACCTGTCAG	56	212
E24-Donorsonde E24-Akzeptorsonde	GGCAGCACAGTGGTCCGG-FAM LC640-ATTCCGAACCCAGGCC-P		

Zum *LightCycler*-Nachweis der ABCC6-Exon24-Mutation c.3421C>T wurden die in der Tabelle 3-9 aufgelisteten *Primer* und Hybridisierungssonden verwendet. Die Position der c.3421C>T-Mutation innerhalb der Akzeptorsonde ist unterstrichen und in Fettdruck abgebildet.

**Tab. 3-9:** *Primer* und Sonden zur c.3421C>T-Mutationsanalyse im *LightCycler*-System.

<i>Exon / Mutation</i>	<i>Primer / Sonde</i>	<i>Primer-Sequenz (5' &gt; 3')</i>	<i>Annealing-Temperatur [°C]</i>	<i>PCR-Produkt [bp]</i>
24 / c.3421C>T	E24LCU- <i>Primer</i> : E24LCL- <i>Primer</i> : E24-Donorsonde E24-Akzeptorsonde	CTCCCATCCATCCTTCT CCTCGCTACCATAACAATATGA GGCAGCACAGTGGTCCGG-FAM LC640-ATTCC <u>CGA</u> ACCCAGGCC-P	56	307

### 3.11 Programme

*GeneScanAnalysis*

ABI, Foster City, USA

*Wavemaker*

Transgenomic, Omaha, USA

*StanfordMeltProgram*

<http://insertion.stanford.edu/>

<i>Chromas</i>	<a href="http://www.technelysium.com.au/chromas.html">http://www.technelysium.com.au/chromas.html</a>
<i>CloneManager</i>	Scientific & Educational Software, Durham, USA
<i>Clustal W</i>	<a href="http://www.ebi.ac.uk/clustalw/">http://www.ebi.ac.uk/clustalw/</a>
<i>NEBcutter</i>	<a href="http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html">http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html</a>
<i>Oligo Primer Analysis</i>	National Biosciences Inc., Plymouth, USA
<i>Seqman</i>	DNASStar Inc., Madison, USA
<i>SequenceAnalysis</i>	ABI, Foster City, USA
<i>Java Molecular Biology Directory</i>	PHD Computer Consultants Ltd., Withington, UK

### 3.12 Puffer und Lösungen

TBE-Puffer (10x)	Invitrogen, Groningen, NL
Auftragspuffer	0,05 % Xylencyanol, 0,05 % Bromphenolblau, 60 % Saccharose in dest. Wasser
DHPLC-Puffer A	0,1 M TEAA in HPLC-Gradient Grade-Wasser
DHPLC-Puffer B	0,1 M TEAA, 25 % Acetonitril in HPLC-Gradient Grade-Wasser
PBS	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in dest. Wasser; pH 7,4
PBS-T	PBS mit 0,1 % (v/v) Tween-20
<i>NuPAGE-SDS-SampleBuffer</i> (4x)	Invitrogen, Groningen, NL
<i>NuPAGE-ReducingAgent</i> (10x)	Invitrogen, Groningen, NL
<i>NuPAGE-Antioxidant</i>	Invitrogen, Groningen, NL
Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer (10x)	Anamed, Darmstadt
<i>Coomassie-Blue</i> -Lösung	1 % <i>Coomassie Brilliant Blue</i> R250 in Entfärberlösung; filtriert
Entfärberlösung	10 % Essigsäure; 40 % Methanol in dest. Wasser
Transferpuffer (25x)	Anamed, Darmstadt
Transferpuffer (1x)	4 % Transferpuffer (25x); 10 % Methanol; 0,1 % <i>NuPAGE-Antioxidant</i> in dest. Wasser
Block-Puffer	PBS-T mit 5 % Magermilchpulver
Citrat-Phosphat-Puffer	0,1 M Citronensäure; 0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O; pH 5,0
Chloronaphthol-Substratlösung	5 mL Citrat-Phosphat-Puffer; 1 mL 4-Chloro-1-naphthol-Lsg. (3 mg/mL in Methanol); 2,5 µL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %ig)

### 3.13 Sonstige Materialien

Tris-Glycin-Gele (8 - 16 % PAA)	Anamed, Darmstadt
<i>Blotting-Pads</i>	Invitrogen, Groningen, NL
Filterpapiere	Invitrogen, Groningen, NL
PVDF-Membranen	Invitrogen, Groningen, NL
Glaskapillaren	Roche, Mannheim
Magermilchpulver Sucofin	Trade Service Interational, Zeven
Röntgenfilme	Pierce, Rockford, USA
Fluoromount-G-Eindecklösung	SouthernBiotech, Birmingham, UK
Ziegenserum	Dako, Glostrup, Dänemark

### 3.14 Zellkulturen

#### 3.14.1 Zelllinien

<i>Chang Liver</i> , Hepatozytenkarzinom, human, CCL 13	ATCC, Rockville, USA
CHO-K1, Ovarzellinie, Chinesenhamster, ACC 110	DSMZ, Braunschweig
hTERT-BJ1, Fibroblastenzelllinie, human	ClontechLaboratories, Heidelberg

#### 3.14.2 Primärkulturen

Humane PXE-Dermalfibroblasten, Primärkulturen aus betroffenem Hautgewebe von PXE-Patienten: Die Entnahme des Hautgewebes erfolgte durch die PXE-Ambulanz der Dermatologischen Klinik, Krankenhaus Bethesda, Freudenberg.

### 3.15 Zellkulturmedien, -lösungen und -reagenzien

LB-Medium	1 % Pepton; 1 % NaCl; 0,5 % Hefeextrakt in dest. Wasser
LB-Ampicillin-Medium	LB-Medium mit 50 - 150 µg/L Ampicillin
LB-Ampicillin-Agar	LB-Medium oder LB-Ampicillin-Medium mit 2 % Agar
SOC-Medium	2 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM MgSO <sub>4</sub> ; 20 mM Glukose in dest. Wasser
Ampicillin-Lösung	200 mg/mL Ampicillin in 70 %igem Ethanol

X-Gal-Färbelösung	100 $\mu$ L X-Gal-Lösung (20mg/mL in DMF); 20 $\mu$ L 0,5 M Kaliumferricyanid; 20 $\mu$ L 0,5 M Kaliumferrocyanid; 5 $\mu$ L 1 M $MgCl_2$ ; ad 2 mL PBS
DMEM	PAA, Cölbe
Ham's F12	PAA, Cölbe
RPMI-1640	Cambrex, Verviers, Belgien
<i>Fibroblast Growth Medium</i> (FGM)	PromoCell, Heidelberg
Antibiotika-Lösung	10.000 U Penicillin; 10 mg Streptomycin; 25 $\mu$ g Amphotericin B / mL; Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin (200 mM)	PAA, Cölbe
Fötales Kälberserum (FCS)	Biowest, Nuaille, Frankreich
PBS	Cambrex, Verviers, Belgien
Trypsin-EDTA-Lösung (10x)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Einfriermedium	FCS mit 10 % DMSO
<i>CryoSFM</i> -Medium	PromoCell, Heidelberg
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Detach250-Kit</i>	PromoCell, Heidelberg
<i>Fugene6</i> -Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
Lysis-Puffer	137,5 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl pH 7,8; 8,7 % Glycerin; 0,5 mM EDTA pH 8,0; 5 % 1x Protease-Inhibitor-Cocktail P2714; 1 % NP40 in dest. Wasser

## 4 Methoden

### 4.1 Methoden zur Kultivierung prokaryontischer Zellen

#### 4.1.1 Allgemeines

Verwendete Geräte und Materialien werden vor und nach ihrem Gebrauch autoklaviert. Um Kontaminationen durch Pilze oder andere Bakterien zu vermeiden, erfolgt die Handhabung der eingesetzten *E. coli*-Kulturen unter sterilen Bedingungen.

#### 4.1.2 Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur und auf Festmedium

Für die Vermehrung von *E. coli*-Stämmen wird eine Anzucht entweder in Flüssigkultur oder auf Festmedium verwendet. Für eine Flüssigkultur werden 10 - 50 mL LB-Medium bzw. bei Ampicillin-resistenten Stämmen LB-Ampicillin-Medium mit frischen Zellen inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bei der Anzucht auf LB-Festmedien oder LB-Ampicillin-Festmedien werden die Zellen in 200 µL Flüssigmedium aufgenommen, gleichmäßig auf einer Agarplatte verteilt und für 20 - 48 h bei 37 °C inkubiert.

#### 4.1.3 Sicherung von Bakterien als Glycerinkulturen

Um Bakterien über einen langen Zeitraum revitalisierbar zu lagern, werden diese bei -80 °C als Glycerinkultur eingefroren. Hierzu werden 2 mL einer frischen Flüssigkultur 5 min bei 800x g zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen werden in 0,5 mL Überstand resuspendiert, mit 0,5 mL Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert.

#### 4.1.4 Transformation kompetenter Zellen

Transformationskompetente *E. coli*-Zellen adsorbieren an ihrer Oberfläche Plasmide, die durch Hitzeschock in die Zelle aufgenommen werden können. Im Rahmen dieser Arbeit sind ausschließlich kommerziell erhältliche kompetente *E. coli*-Zellen des Stammes TOP10 verwendet worden.

Zur Transformation werden die bei -80 °C gelagerten Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 µL Plasmid-Lösung versetzt. Nach vorsichtigem Durchmischen wird der Ansatz 30 min auf Eis und danach 30 - 45 sec im Wasserbad bei 42 °C inkubiert. Anschließend werden die Zellen 2 min auf Eis gekühlt und mit 900 µL vorgewärmtem SOC-Medium versetzt. Die Zellsuspension wird 1 h bei 37 °C im Rollinkubator inkubiert und anschließend 5 min bei 800x g zentrifugiert. Das Zellpellet wird in ca. 100 µL Überstand resuspendiert und auf einer LB-Ampicillin-Platte ausgestrichen. Die Platte wird invertiert und für 12 - 16 h bei 37 °C

inkubiert. Zur Analyse der Klone wird eine Flüssigkultur angelegt, die Plasmid-DNA aus den Zellen isoliert und durch DNA-Sequenzierung überprüft.

## 4.2 Methoden zur Kultivierung eukaryontischer Zellen

### 4.2.1 Kulturbedingungen

Alle Zellkulturarbeiten werden unter einer sterilen Werkbank mit sterilen Materialien durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgt in Zellkulturschalen bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5 % Kohlendioxid und 99 % Luftfeuchtigkeit. Das Zellkulturmedium wird alle 2 bis 4 Tage gewechselt. Die verwendeten Medien und die damit kultivierten Zelltypen sind nachfolgend aufgeführt:

DMEM: hTERT-BJ1, humane PXE-Dermalfibroblasten,

FGM: humane PXE-Dermalfibroblasten,

Ham's F12: CHO-K1,

RPMI-1640: *Chang Liver*.

Die Medien DMEM, Ham's F12 und RPMI-1640 werden vor Gebrauch mit 100.000 U/L Penicillin, 100 mg/L Streptomycin, 0,25 mg/L Amphotericin B, 2 mM L-Glutamin und 10 % fötalem Kälberserum (FCS) versetzt. Dem Medium FGM wird ein vom Hersteller mitgelieferter Zusatz zugegeben.

### 4.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wird ein Volumenteil einer Zellsuspension mit einem definierten Volumenteil einer 0,4 %igen Trypanblau-Lösung gemischt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung wird dann die Lebendzellzahl mittels einer Neubauerzählkammer und unter Verwendung eines Phasenkontrastmikroskops ermittelt. Lebende Zellen erscheinen bei der Betrachtung im Phasenkontrastmikroskop hell. Tote Zellen und Zelltrümmer sind dunkel angefärbt.

### 4.2.3 Passagieren von adhärent wachsenden Zellen

Zur Vermeidung einer Kontaktinhibition und zur weiteren Vermehrung werden adhärent wachsende Zellen, die eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht haben, passagiert. Hierzu wird zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Um die Zellen abzulösen, werden diese maximal 10 min bei Raumtemperatur (RT) in 1x Trypsin-EDTA-



Lösung in PBS inkubiert. Nach Zugabe von FCS-haltigem Zellkulturmedium im Verhältnis 1:1 wird die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 300x g zentrifugiert. Das Zellpellet wird in Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellsuspension in neue Zellkulturschalen ausgesät. Bei der Kultivierung von Zellen mit dem Medium FGM erfolgt das Passagieren der Zellen mit dem *Detach250-Kit* der Firma PromoCell. Hierzu werden die Zellen zunächst mit HepesBSS-Lösung gewaschen und anschließend maximal 10 min bei RT in Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Nach Zugabe von TNS-Lösung im Verhältnis 1:1 wird die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 300x g zentrifugiert. Das Zellpellet wird in FGM resuspendiert und die Zellsuspension in neue Zellkulturschalen ausgesät.

#### **4.2.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen**

Zur Konservierung von Zellkulturen werden ca.  $1 \times 10^7$  Zellen entweder in 0,5 mL Zellkulturmedium aufgenommen und mit 0,5 mL Einfriermedium vermischt oder in 1 mL *CryoSFM*-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wird in vorgekühlte Kryoröhrchen gegeben. Anschließend werden die Kryoröhrchen in Aluminiumblöcken und Styroporboxen langsam auf -80 °C abkühlt und nach 24 - 48 h in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen von Gefrierkulturen erfolgt möglichst schnell in einem auf 37 °C temperierten Wasserbad. Die noch kalte Zellsuspension wird in Zellkulturmedium aufgenommen und in Zellkulturschalen ausgesät.

#### **4.2.5 Isolierung humaner Dermalfibroblasten**

Humane Dermalfibroblasten werden aus steril entnommenen Hautbiopsien isoliert. Hierzu wird die Hautprobe zunächst mit einem Skalpell von Fettgewebe befreit, fein zerschnitten und 90 min bei 37 °C in 0,5 % Pronase E in FGM inkubiert. Anschließend wird die Haut für 5 min bei 300x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Danach wird die Probe einmal mit PBS gewaschen und für 24 h bei 37 °C in 1 % Kollagenase/Dispase in FGM inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wird die Haut in FGM aufgenommen, in eine 5 cm Zellkulturschale überführt und bei 37 °C inkubiert. Nach ca. 48 - 96 h können adhärente Dermalfibroblasten im Phasenkontrastmikroskop beobachtet werden. In diesem Fall wird das Hautstück aus der Zellkulturschale entfernt und das Medium gewechselt. Die isolierten Dermalfibroblasten werden weiter bei 37 °C kultiviert.

#### **4.2.6 Transfektion eukaryontischer Zellen**

Zur Transfektion eukaryontischer Zellen werden  $1 - 3 \times 10^5$  Zellen in eine 35 mm Zellkulturschale gegeben und für 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend wird das Zellkulturmedium gewechselt. Dann werden 100 µL Zusatz-freies Zellkulturmedium

mit 3  $\mu\text{L}$  *Fugene6*-Transfektionsreagenz für 5 min bei RT inkubiert. Der Reaktionsansatz wird mit ca. 1 - 5  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA versetzt, für 25 min bei RT inkubiert und im Anschluß zu den Zellen gegeben. Die Proteinexpression wird nach 24 - 48 h analysiert.

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz werden die Zellen mit einem *lacZ*-Kontrollplasmid transfiziert. Nach 24 - 48 h werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, 10 min bei RT mit 3 % Paraformaldehyd in PBS fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und für 2 - 4 h mit frisch angesetzter X-Gal-Färbelösung bei 37 °C inkubiert. Der Anteil transfizierter blau gefärbter Zellen wird mikroskopisch bestimmt.

### 4.3 Molekularbiologische Methoden

#### 4.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmid-Isolierung aus 50 mL Flüssigkultur erfolgt mit dem *HiSpeed Plasmid Midi Kit* der Firma Qiagen, das auf einer alkalischen Lyse der Zellen mit NaOH und anschließender Aufreinigung der Plasmide über Anionenaustauschersäulen basiert.

Die Flüssigkultur wird zunächst für 15 min bei 3.000x g zentrifugiert. Im Anschluss wird das Pellet in 6 mL Puffer P1 resuspendiert. Die Lyse erfolgt durch Zugabe von 6 mL Puffer P2, mehrmaliges Invertieren und 5-minütige Inkubation. Anschließend werden 6 mL Puffer P3 zugegeben. Genomische DNA und Zelltrümmer werden mit Hilfe von *QIAfilter Cartridges* abgetrennt. Nach dem Äquilibrieren einer *HiSpeed*-Säule mit 4 mL Puffer QBT wird das Filtrat auf die Säule aufgetragen, mit 20 mL Puffer QC gewaschen und die Plasmid-DNA mit 5 mL Puffer QF eluiert. Anschließend wird die DNA mit 3,5 mL Isopropanol präzipitiert und auf ein *QIAprecipitator* Modul gegeben. Nach dem Waschen mit 70 %igem Ethanol und dem Trocknen der Membran mittels Durchpressen von Luft wird die Plasmid-DNA mit 1 mL TE-Puffer eluiert und bei -20 °C gelagert.

#### 4.3.2 Isolierung genomischer DNA aus EDTA-Blut

Die Isolierung genomischer DNA aus EDTA-Blut erfolgt mit dem *QIAamp DNA Blood Mini Kit* der Firma Qiagen, bei dem die Blutzellen zunächst enzymatisch und mit Detergenzien lysiert werden. Hierzu werden 20  $\mu\text{L}$  Proteinase K mit 200  $\mu\text{L}$  EDTA-Blut und 200  $\mu\text{L}$  Lysepuffer AL gemischt und in einem Heizblock für 10 min bei 56 °C inkubiert. Danach werden 200  $\mu\text{L}$  Ethanol zur Probe gegeben. Das Lysat wird auf eine Silikat-Säule pipettiert und für 1 min bei 8.000x g zentrifugiert. Nach dem Waschen mit je 500  $\mu\text{L}$  Puffer AW1 und Puffer AW2 wird die Säule in ein neues Sammelgefäß gestellt und 1 min bei 13.000x g zentrifugiert. Die DNA wird nach 5-minütiger Inkubation mit 200  $\mu\text{L}$  AE-Puffer durch Zentrifugieren bei 8.000x g für 1 min von der Säule eluiert und bei -20 °C gelagert.

### 4.3.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen erfolgt mit dem *RNeasy Mini Kit* der Firma Qiagen. Hierzu werden  $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$  Zellen mit 600  $\mu\text{L}$  RLT-Puffer und 6  $\mu\text{L}$   $\beta$ -Mercaptoethanol lysiert, auf eine *QIAshredder*-Säule gegeben und für 2 min bei 13.000x g zentrifugiert. Nach Zugabe von 600  $\mu\text{L}$  Ethanol wird das homogenisierte Lysat auf eine Silikat-Säule aufgetragen und bei 8.000x g für 1 min zentrifugiert. Anschließend wird einmal mit 700  $\mu\text{L}$  RW1-Puffer und zweimal mit je 500  $\mu\text{L}$  RPE-Puffer gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren bei 13.000x g für 1 min wird die RNA mit 30 - 50  $\mu\text{L}$  RNase-freiem Wasser durch Zentrifugieren für 1 min bei 8.000x g eluiert. Um die RNA-Ausbeute zu steigern, wird gegebenenfalls ein zweiter Elutionsschritt mit 30  $\mu\text{L}$  RNase-freiem Wasser durchgeführt. Anschließend werden bis zu 4  $\mu\text{L}$  Ribonuklease-Inhibitor *RNaseOUT* zum Eluat gegeben. Die Gesamt-RNA wird bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  oder  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 4.3.4 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

Zur Synthese von komplementärer DNA (cDNA, *complementary DNA*) wird die aus eukaryontischen Zellen isolierte RNA revers transkribiert. Hierzu werden Oligo-dT-*Primer*, mit denen lediglich polyadenylierte RNA revers transkribiert wird, und das retrovirale Enzym Reverse Transkriptase verwendet.

Zur cDNA-Synthese werden 1 - 5  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA mit 1  $\mu\text{L}$  Oligo-dT-*Primer* (25  $\mu\text{M}$ ) und 1  $\mu\text{L}$  dNTPs (je 25 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) gemischt. Der Ansatz wird mit RNase-freiem Wasser auf 12  $\mu\text{L}$  aufgefüllt, für 5 min bei  $65\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert und auf Eis abgekühlt. Dann erfolgt die Zugabe von 4  $\mu\text{L}$  5x *SuperScript II First-Strand-Buffer*, 2  $\mu\text{L}$  0,1 M DTT und 1  $\mu\text{L}$  RNase-Inhibitor *RNaseOUT*. Der Ansatz wird gut gemischt und für 2 min bei  $42\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wird 1  $\mu\text{L}$  Reverse Transkriptase *SuperScript II* dazugegeben und der Reaktionsansatz für 50 min bei  $42\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wird der Reaktionsansatz für 15 min auf  $70\text{ }^\circ\text{C}$  erhitzt und dann auf Eis abgekühlt. Die cDNA, die bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert wird, kann ohne weitere Aufreinigung für eine PCR oder andere Anwendungen eingesetzt werden.

### 4.3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen

DNA- und RNA-Konzentrationen können photometrisch bestimmt werden. Dabei wird die Absorption einer wässrigen DNA- oder RNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und die DNA- oder RNA-Konzentration der Lösung anhand des ermittelten Absorptionwertes berechnet.

Die Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen erfolgt mit einem *GeneQuant*-Photometer der Firma Amersham Pharmacia Biotech gemäß den Anweisungen des Herstellers.

#### 4.3.6 DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) handelt es sich um ein Verfahren zur Vervielfältigung von definierten DNA-Bereichen. Ein typischer Reaktionsansatz zur präparativen und analytischen Synthese von DNA-Fragmenten mittels PCR wird wie folgt hergestellt:

<i>Template</i> -DNA	2,0 µL
10x PCR-Puffer	5,0 µL
<i>forward-Primer</i> (25 µM)	1,0 µL
<i>reverse-Primer</i> (25 µM)	1,0 µL
dNTPs (je 25 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	0,5 µL
<i>Taq</i> - oder <i>HotStart-Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µL)	0,3 µL
Wasser ( <i>Aqua ad iniectabilia</i> )	ad 50 µL.

Der PCR-Ansatz wird mit Mineralöl überschichtet, wenn zur DNA-Amplifikation Thermocycler ohne beheizbare Deckel verwendet werden. Folgendes Thermocycler-Programm wird in der Regel zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten herangezogen:

Programmschritt	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Denaturierung / Aktivierung: <i>Taq</i> -Polymerase	1 min	95 °C	1
<i>HotStart-Taq</i> -DNA-Polymerase	15 min		
Denaturierung	1 min	94 °C	35
<i>Annealing</i>	1 min	50 - 70 °C	
Extension	1 min	72 °C	
Extension	15 min	72 °C	1
Kühlen	10 min	4 °C	1

Durch die Verwendung von *HotStart-Taq*-DNA-Polymerasen, die durch einen initialen Denaturierungsschritt aktiviert werden, kann die Spezifität einer PCR erhöht werden, da störende Effekte durch eine unspezifische Anlagerung und Polymerisation der Oligonukleotid-*Primer* vor Beginn der Temperaturzyklen vermieden werden. Die Analyse der PCR-Ansätze erfolgt durch Agarosegel-Elektrophorese, DHPLC oder DNA-Sequenzierung.

### 4.3.7 Primer-Design

Das Design der PCR-*Primer* erfolgt mit dem Programm *Oligo Primer Analysis*. Die ausgewählten *Primer* haben in der Regel eine Länge von 15 - 25 Basen und einen Anteil von 40 bis 60 % Guanin und Cytosin. Zusätzlich ist darauf zu achten, daß die Oligonukleotide keine stabilen *Primer*-Dimere und Sekundärstrukturen, wie Haarnadelstrukturen am 3'-Ende, bilden können. Die Schmelztemperatur der *Primer* wird zwischen 50 und 70 °C gewählt, wobei sich die Schmelztemperaturen eines *Primer*-Paares nicht mehr als 2 °C unterscheiden sollten.

### 4.3.8 Agarosegel-Elektrophorese

Bei der Agarosegel-Elektrophorese werden DNA-Fragmente aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die Mobilität ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus der Länge des entsprechenden DNA-Fragments. Die DNA-Banden im Agarosegel können mit Ethidiumbromid, das in doppelsträngige DNA interkaliert und nach Anregung durch UV-Strahlung sichtbares Licht emittiert, visualisiert werden.

Zur Herstellung von Agarosegelen werden 1,5 - 2,5 % Agarose in 60 mL oder 100 mL 1x TBE-Puffer erhitzt, vollständig gelöst und nach Zugabe von 0,1 µg Ethidiumbromid / mL 1x TBE-Puffer luftblasenfrei in eine horizontale Gelkammer mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Nach der Polymerisation des Agarosegels wird die Gelkammer in eine Elektrophorese-Apparatur eingesetzt, mit 1x TBE-Puffer überschichtet und der Probenkamm herausgezogen. Anschließend werden die DNA-Proben mit Auftragspuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Bei der Auftrennung von RNA-Präparationen wird die Probe zusätzlich mit Formamid versetzt. Die Elektrophorese der DNA- oder RNA-Fragmente erfolgt bei einer Spannung von 110 bis 150 V und maximaler Stromstärke für etwa 25 bis 45 min. Um die DNA- oder RNA-Banden im Agarosegel zu visualisieren, wird das Gel nach der Elektrophorese im UV-Licht betrachtet. Die Dokumentation erfolgt mittels eines computerunterstützten Bilderfassungssystems.

### 4.3.9 Längenbestimmung von DNA-Fragmenten

Zur Bestimmung der Länge von DNA-Fragmenten wird bei der Agarosegel-Elektrophorese ein DNA-Längenstandard eingesetzt und durch Vergleich der Laufstrecken der einzelnen Fragmente des Längenstandards mit der Wanderungstrecke der Probe die Fragmentlänge der DNA-Probe abgeschätzt.

#### 4.3.10 Haplotypen-Analyse mit Mikrosatellitenmarkern

Zur Bestimmung des Haplotyps eines Individuums wird dessen genomische DNA einer PCR unterworfen, in der als *Primer* Mikrosatellitenmarker eingesetzt werden. Nach erfolgter PCR werden die Amplifikate mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* der Firma Qiagen aufgereinigt. Da einer der beiden PCR-*Primer* am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxy-Fluoreszein (FAM) gekoppelt ist, können die DNA-Fragmente am Kapillarsequencer *ABI Prism 310* der Firma Applied Biosystems elektrophoretisch aufgetrennt und fluorometrisch detektiert werden. Hierzu werden 0,3 µL des aufgereinigten PCR-Ansatzes mit 1 µL DNA-Längenstandard *GeneScan-500-TAMRA-SizeStandard* und 23,7 µL Wasser (*RotisolvHPLC-Gradient Grade*) versetzt und 2 min bei 90 °C denaturiert. Das elektrophoretische Laden der Probe erfolgt für 5 sec bei einer Spannung von 15 kV. Die Kapillarelektrophorese wird bei 15 kV und 60 °C für 50 min durchgeführt. Die Fragmentlängenbestimmung der PCR-Produkte erfolgt mit dem Programm *GeneScanAnalysis*.

#### 4.3.11 Denaturierende Hochdruck-Flüssigkeitschromatografie (DHPLC)

Die denaturierende Hochdruck-Flüssigkeitschromatografie (DHPLC, *Wavesystem*, Transgenomic) kombiniert das Verfahren der Heteroduplex-DNA-Analyse mit einer Ionenpaar-Umkehr-Phasen-HPLC und wird daher zur Detektion von DNA-Mutationen herangezogen (Xiao und Oefner, 2001). Zur Trennung von DNA-Fragmenten werden Kapillarsäulen (*DNA-SepCartridge*, Transgenomic) mit einer hydrophoben stationären Phase aus alkylierten Polystyrol-Divinylbenzol-Partikeln verwendet. Als mobile Phase dient eine Mischung aus den Puffern A und B, die 0,1 M Triethylammoniumacetat (TEAA) enthält und deren Acetonitrilkonzentration vom Mischungsverhältnis abhängig ist (A: 0,1 M TEAA in HPLC-*Gradient-Grade*-H<sub>2</sub>O; B: 0,1 M TEAA, 25 % Acetonitril in HPLC-*Gradient-Grade*-H<sub>2</sub>O). Das TEAA ermöglicht die Bindung des negativ geladenen DNA-Rückgrats an die hydrophobe Säulenmatrix. Mit steigender Acetonitrilkonzentration nimmt die Affinität der DNA-Fragmente zur stationären Phase ab und schließlich wird die DNA von der Säule eluiert. Dabei wird Heteroduplex-DNA aufgrund ihrer Basenfehlpaarungen eher eluiert als Homoduplex-DNA. Eine optimale Trennung der Hetero- und Homoduplexes wird bei einer DHPLC-Temperatur erreicht, bei der der helikale Anteil des zu untersuchenden DNA-Bereiches 50 - 80 % beträgt. Besitzt das DNA-Fragment mehrere Schmelzdomänen, wird die DHPLC bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Die Detektion der eluierten DNA erfolgt mit Hilfe eines UV-Detektors bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Für die DHPLC-Mutationsanalyse wird zunächst der zu untersuchende DNA-Bereich eines oder mehrerer Probanden mittels PCR amplifiziert. Die Konzentration der PCR-Produkte wird nach einer Elektrophorese im Agarosegel abgeschätzt. Anschließend wird ein PCR-

Amplifikat, das durch DNA-Sequenzierung eindeutig als Wildtyp identifiziert wurde, mit dem analogen, zu analysierenden PCR-Produkt eines Probanden im Verhältnis 1:1 gemischt. Das Volumen des Reaktionsansatzes beträgt 20 µL. Zur Bildung von Hetero- und Homoduplices wird das Reaktionsgemisch für 5 min bei 94 °C denaturiert und langsam in 2 °C-Schritten innerhalb von 40 min auf 8 °C abgekühlt. Die DHPLC erfolgt bei einer Fließgeschwindigkeit des Puffergemisches von 0,9 mL/min. Die optimalen Analysetemperaturen und Acetonitril-Gradienten werden für jedes zu untersuchende DNA-Fragment mit Hilfe der Programme *Wavemaker* und *StanfordMeltProgram* nach Eingabe der Wildtyp-DNA-Sequenz ermittelt. Für die Untersuchung der Exons 1 - 31 des *ABCC6*-Gens mittels DHPLC wurden folgende Analysebedingungen gewählt:

Exon	PCR-Produkt	Ofentemperatur / [°C]	Puffer B: Anfangs- / Endkonzentration / [%]
1	1	66,3; 67,0	57 / 65; 56 / 64
2	2	62,5; 63,0	56 / 64; 56 / 64
3/4	3/4	60,0; 60,6; 61,7; 64,3	61 / 69; 61 / 69; 59 / 67; 53 / 61
5	5	60,5; 62,5; 64,0	52 / 60; 50 / 58; 48 / 56
6	6	57,5; 60,2; 61,4; 62,3	62 / 70; 59 / 67; 58 / 66; 57 / 65
7	7	61,0; 62,1	54 / 62; 53 / 61
8	8	60,7; 61,5; 62,6	60 / 68; 58 / 66; 57 / 65
9	9b	61,5; 63,2	55 / 63; 55 / 63
10	10a	62,6; 63,7; 64,7	58 / 66; 56 / 64; 55 / 63
	10b	62,8; 64,3	58 / 66; 57 / 65
11	11	61,3; 63,5; 66,0	52 / 60; 48 / 66; 41 / 49
12	12	61,6; 62,8; 65,5	55 / 63; 55 / 63; 49 / 57
13	13	62,6; 63,5; 65,0	55 / 63; 55 / 63; 50 / 58
14	14	63,0; 64,0	55 / 63; 54 / 64
15	15	59,0; 62,0; 64,0	55 / 63; 53 / 61; 51 / 59
16	16	62,5; 65,0	55 / 63; 51 / 59
17	17	61,0; 63,5	54 / 62; 52 / 60
18	18	61,5; 64,0	55 / 63; 55 / 63
19	19	61,0; 63,0	57 / 65; 55 / 63
20	20	60,5; 64,0	57 / 65; 53 / 61
21	21	59,0; 62,0; 63,5	55 / 63; 53 / 61; 51 / 59
22	22	63,5; 65,5	56 / 64; 55 / 63
23	23b	62,6; 63,5	60 / 68; 58 / 66
24	24	60,0; 62,5	57 / 65; 55 / 63
25	25	61,9; 62,9; 64,0	59 / 67; 58 / 66; 57 / 65
26	26	61,0; 62,0; 62,5	57 / 65; 57 / 65; 57 / 65
27	27	61,5; 64,3	57 / 65; 57 / 65
28	28a	63,0; 65,0; 66,5	52 / 60; 48 / 66; 41 / 49
29	29a	62,0; 63,0	43 / 51; 45 / 53
30	30	64,0; 66,0	56 / 64; 54 / 62
31	31	63,0; 64,7	54 / 62; 52 / 60

Die Elutionsprofile der Reaktionsansätze werden mit dem Chromatogramm einer Probe, die ausschließlich Wildtyp-DNA enthält, verglichen. Treten Abweichungen auf, weist dies auf das

Vorkommen einer DNA-Variation hin. Zur Identifizierung dieser DNA-Alteration wird das PCR-Amplifikat des betreffenden Probanden einer DNA-Sequenzierung unterworfen.

#### 4.3.12 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus enzymatischen Reaktionen wird das *QIAquick PCR Purification Kit* der Firma Qiagen verwendet. Mit dieser Methode werden aus den Reaktionsansätzen *Primer*, Nukleotide, Enzyme und Salze entfernt.

Hierzu werden fünf Volumen PB-Puffer mit einem Volumen PCR-Ansatz gemischt. Der Ansatz wird auf eine *QIAquick*-Säule gegeben und 1 min bei 13.000x g zentrifugiert. Nach dem Waschen mit 750 µL PE-Puffer wird die DNA mit 50 µL EB-Puffer eluiert.

Zur enzymatischen Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionsansätzen wird das *ExoSAP*-Verfahren (*Exo*: *Exonuclease I*; *SAP*: *Shrimp Alkaline Phosphatase*) verwendet. Dabei werden Einzelstrang-DNA-Fragmente von der Exonuklease I abgebaut und freie 5'-Phosphatgruppen von der alkalischen Phosphatase abgespalten.

Hierzu werden 5 µL PCR-Ansatz, 1 µL Exonuklease I (1 U/µL) und 1 µL alkalische Phosphatase (1 U/µL) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird der Reaktionsansatz zur Inaktivierung der Enzyme für 15 min bei 80 °C inkubiert und auf 4 °C abgekühlt.

#### 4.3.13 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die DNA-Sequenzierung erfolgt gemäß der Didesoxynukleotid-Methode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) mit anschließender Auftrennung der Fragmente durch eine automatisierte Kapillarelektrophorese. Der Sequenzieransatz enthält neben Desoxynukleotiden zusätzlich Didesoxynukleotide, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind und daher in einem einzigen Ansatz detektiert werden können. Die Kapillarelektrophorese und die Fluoreszenzdetektion werden unter Verwendung des Kapillarsequenzers *ABI Prism 310* der Firma Applied Biosystems durchgeführt.

Für die Sequenzierung wird folgender Reaktionsansatz verwendet:

Aufgereinigtes PCR-Produkt	3,0 µL
<i>forward</i> - oder <i>reverse-Primer</i> (25 µM)	1,5 µL
<i>BigDye v1.1 Premix</i>	4,0 µL
<i>BigDye Sequencing Buffer</i> (5x)	2,0 µL
Wasser ( <i>RotisolVHPLC-Gradient-Grade</i> )	ad 20 µL.

Der Reaktionsansatz muss zusätzlich mit Mineralöl überschichtet werden, wenn Thermo-cycler ohne beheizbaren Deckel verwendet werden.



Folgendes Programm wird für die Sequenzierreaktion verwendet:

Programmschritt	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Aktivierung	2 min	95 °C	1
Denaturierung	10 sec	95 °C	25
<i>Annealing</i>	10 sec	48 °C	
Extension	4 min	60 °C	
Kühlen	∞	4 °C	1

Zur Abtrennung freier Didesoxynukleotide wird der Reaktionsansatz über eine Gelfiltration mittels *MicroBio-Spin*-Säulen aufgereinigt. Hierzu wird die Säule zunächst mehrmals invertiert, damit die Gelmatrix resuspendiert wird und Luftblasen entfernt werden. Anschließend wird die geöffnete Säule bei 1.000x g für 2 min zentrifugiert, um das Säulenmaterial zu verdichten. Der Reaktionsansatz wird auf die Gelmatrix gegeben und bei 1.000x g für 4 min zentrifugiert. Das Eluat (20 µL) wird mit 20 µL Wasser (*RotisolVHPLC-Gradient-Grade*) verdünnt und 2 min bei 94 °C denaturiert. Das elektrophoretische Laden der Probe erfolgt für 15 - 30 sec bei einer Spannung von 4 - 6 kV. Die Kapillarelektrophorese wird bei 15 kV und 50 °C für 35 - 50 min durchgeführt. Die Sequenzanalyse erfolgt mit den Programmen *SequenceAnalysis*, *Chromas* und *Seqman*.

#### 4.3.14 RFLP-Analyse

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) genutzt, um das Vorkommen bestimmter Mutationen und Polymorphismen oder deren Abwesenheit in verschiedenen Kollektiven zu überprüfen. Hierzu werden Restriktionsenzyme verwendet, die doppelsträngige DNA durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung an spezifischen Erkennungssequenzen spalten. Durch die sequenzspezifische Restriktion eines PCR-Produktes und die anschließende DNA-Fragmentlängenbestimmung kann eine in der Erkennungssequenz des Restriktionsenzymys liegende Mutation nachgewiesen werden. Die sequenzspezifische Suche nach verfügbaren Restriktionsenzymen erfolgt mit den Programmen *CloneManager* und *NEBcutter*. Die Restriktionsenzyme werden gemäß den Anweisungen der Hersteller eingesetzt.

Ein typischer Restriktionsansatz sieht wie folgt aus:

PCR-Produkt	5,0 µL
10x Reaktionspuffer	2,0 µL
Restriktionsenzym (5 - 20 U/µL)	0,5 µL
Wasser ( <i>Aqua ad iniectabilia</i> )	ad 20 µL.

Die Inkubation des Restriktionsansatzes erfolgt für 2 - 16 h bei der für das jeweilige Restriktionsenzym optimalen Temperatur. Anschließend wird der Restriktionsansatz mit 5 µL Auftragspuffer gemischt und in einem 1,5 - 2,5 %igen Agarosegel durch Elektrophorese aufgetrennt.

#### 4.3.15 Konstruktion von Erkennungssequenzen durch PCR

Liegt eine Punktmutation nicht innerhalb der Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym, kann über eine PCR mit einem modifizierten *Primer* eine Restriktionsschnittstelle in das Amplifikat eingefügt werden. Hierzu wird ein *Primer* benötigt, der nahe seinem 3'-Ende einen Basenaustausch aufweist, der eine Restriktionsschnittstelle generiert. Die zu untersuchende Punktmutation sollte sich innerhalb der generierten Erkennungssequenz und somit in der Nähe des *Primer*-3'-Endes befinden. Nach erfolgter PCR kann die Punktmutation durch RFLP-Analyse nachgewiesen werden.

#### 4.3.16 DNA-Quantifizierung durch *LightCycler-Real-Time-PCR*

Die *Real-Time-PCR* (Echtzeit-PCR) ist ein PCR-Verfahren, das den Prozess der Amplifikation und Detektion eines PCR-Produktes vereint. Im Rahmen dieser Arbeit werden für die Detektion und Quantifizierung von Amplifikaten sequenzspezifische Hybridisierungssonden eingesetzt. Dabei handelt es sich um zwei Oligonukleotide, die mit verschiedenen Fluorophoren markiert sind. Eines der Oligonukleotide ist am 3'-Ende an das *Donor*-Fluorophor 6-Carboxy-Fluoreszein (FAM) gekoppelt, während die andere Sonde am 5'-Ende mit dem Akzeptor-Fluorophor LightCycler Red 640 (LC Red 640) konjugiert ist. Die Sequenzen der Oligonukleotide werden so gewählt, daß sie an ihrer Zielsequenz in direkter Nachbarschaft hybridisieren. In diesem Fall kommt es über eine Anregung des 3'-Donor-Fluorophors FAM und dessen Emission bei 470 nm zu einem Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfer (FRET) auf das 5'-Akzeptor-Fluorophor LC Red 640, das dadurch angeregt wird und dessen Emission bei 640 nm photometrisch detektiert wird. Die Emission wird während der *Annealing*-Phase gemessen, wodurch die Amplifikation des PCR-Produktes verfolgt werden kann. Für die Quantifizierung wird der  $C_p$ -Wert (*crossing point*) genutzt. Hierbei handelt es sich um die Zyklenanzahl, bei der das Fluoreszenz-Grundsignal

überschritten wird und die Amplifikation des PCR-Produktes in der exponentiellen Phase eintritt. Nach Abschluss der Amplifikation besteht die Möglichkeit einer Schmelzkurvenanalytik zur eindeutigen Identifizierung des PCR-Produktes. Als Schmelztemperatur wird die Temperatur bezeichnet, bei der die Akzeptorsonde von der Donorsonde getrennt wird und es zu einer maximalen Senkung des Fluoreszenzsignals kommt.

Die *Real-Time*-PCR wird mit dem *LightCycler*-System der Firma Roche durchgeführt. Eine Besonderheit dieses PCR-Systems sind die kurzen Analysenzeiten, da durch die Verwendung von Glaskapillaren sehr hohe Temperaturübertragungsraten realisiert werden können.

Der in dieser Arbeit verwendete *Real-Time*-PCR-Ansatz setzt sich zusammen aus:

DNA-Template	1,0 µL
10x Reaktionspuffer (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,0 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,0 µL
<i>forward-Primer</i> (25 µM)	0,5 µL
<i>reverse-Primer</i> (25 µM)	0,5 µL
nicht-acetyliertes BSA (20 mg/mL)	0,5 µL
Donor-Sonde (1 µM)	3,0 µL
Akzeptor-Sonde (1 µM)	3,0 µL
dNTPs ( je 25 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)	0,25 µL
<i>HotStar-Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µL)	0,25 µL
Wasser ( <i>Aqua ad iniectabilia</i> )	ad 20 µL.

Folgendes Programm wird für die *Real-Time*-PCR herangezogen:

Programmschritt	Zeit	Temperatur	Heizrate	Zyklenzahl
Aktivierung <i>HotStar-Taq</i> -DNA-Polymerase	10 min	95 °C	20 °C/s	1
Denaturierung	3 sec	95 °C	20 °C/s	60
Annealing	15 sec	56 °C		
Extension	10 sec	72 °C		
Schmelzkurve	20 sec	95 °C	20 °C/s	1
	30 sec	40 bis 85 °C	0,15 °C/s	
Kühlen	30 sec	40 °C	20 °C/s	1

#### 4.3.17 Mutationsdetektion durch *Real-Time-PCR* und Schmelzkurvenanalytik

Durch eine *Real-time-PCR* mit Hybridierungs sonden und anschließender Schmelzkurvenanalyse können bekannte Punktmutationen nachgewiesen werden. Die Mutationsdetektion erfolgt dabei während der Schmelzkurvenanalyse und basiert auf dem FRET-Prinzip. Die Akzeptorsonde, die im Vergleich zur Donorsonde eine niedrigere Schmelztemperatur besitzt, wird so gewählt, daß sie bei der Hybridisierung mit dem PCR-Amplifikat die zu untersuchende Punktmutation einschließt. Liegt eine Punktmutation im PCR-Amplifikat vor, wird die Schmelztemperatur der Akzeptorsonde aufgrund der Basenfehlpaarung herabgesetzt. Demzufolge kann bei ausreichender Schmelztemperaturdifferenz zwischen den Hybriden Wildtyp-Akzeptorsonde und Mutante-Akzeptorsonde mit dieser Methode eindeutig zwischen Wildtyp, heterozygoter Mutante und homozygoter Mutante differenziert werden.

### 4.4 Biochemische Methoden

#### 4.4.1 Proteinisolierung aus eukaryontischen Zellen

Adhärent wachsende Zellen werden zunächst in Suspension gebracht und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen in 200 µL Lysis-Puffer pro  $1 \times 10^7$  Zellen aufgenommen, gemischt, für 15 min auf Eis inkubiert und für 10 min bei 13.000x g zentrifugiert. Der Überstand wird mit 1/4 Volumen 4x *NuPAGE-SDS-SampleBuffer* und 1/10 Volumen 10x *NuPAGE-ReducingAgent* versetzt und für 10 min auf 94 °C erhitzt. Das Lysat kann direkt in einer SDS-PAGE aufgetrennt oder bei -20 °C gelagert werden.

#### 4.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen erfolgt mit dem *Bicinchoninic acid*-Verfahren, das auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen durch Proteine in alkalischer Lösung basiert. 4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolin (*Bicinchoninic acid*) ist ein für  $\text{Cu}^+$ -Ionen spezifisches chromogenes Reagenz, dessen Umsetzung photometrisch bei 562 nm quantifiziert werden kann. Zur Kalibrierung des Testsystems wird eine Verdünnungsreihe einer Rinderserumalbumin-Lösung verwendet.

#### 4.4.3 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine häufig angewandte Methode zur Trennung und Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen (Weber und Osborn, 1969; Laemmli, 1970). Die aufzutrennenden Proteine werden vor der Elektrophorese durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert. SDS verleiht den Proteinen eine hohe negative

Ladung, die die ursprüngliche Eigenladung der Proteine maskiert. Daher werden SDS-beladene Proteine bei der Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgrund ihrer molaren Massen getrennt. Durch den Vergleich mit einem Protein-Größenstandard können die Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine bestimmt werden.

Für die SDS-PAGE werden vorgefertigte Tris-Glycin-Gradientengele (8 - 16 % Polyacrylamid) verwendet. Das Polyacrylamidgel wird in einer Elektrophoresekammer befestigt. In die innere Pufferkammer werden 200 mL 1x Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer und 0,5 mL *NuPAGE-Antioxidant* gegeben. Die äußere Pufferkammer wird mit 800 mL 1x Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer befüllt. Danach wird der Probenkamm entfernt. Die Proben werden vor dem Auftragen auf das Gel mit 1/4 Volumen 4x *NuPAGE-SDS-SampleBuffer* und mit 1/10 Volumen 10x *NuPAGE-ReducingAgent* versetzt und für 10 min auf 94 °C erhitzt. Jeweils 25 µL der vorbereiteten Proben und 10 µL Protein-Größenstandard *SeeBluePlus2* werden in die Geltaschen gegeben. Die Elektrophorese eines Gels wird bei 120 V und 50 mA für ca. 1,5 h durchgeführt. Werden zwei Gele verwendet, erfolgt die SDS-Page bei 160 V und 75 mA für ca. 1,5 h. Die aufgetrennten Proteine können durch eine *Coomassie-Blue*-Färbung oder eine Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden.

#### **4.4.4 Coomassie-Blue-Färbung**

Proteinbanden im Polyacrylamidgel können durch eine *Coomassie-Blue*-Färbung visualisiert werden, da der Farbstoff *Coomassie-Brilliant-Blue* Proteine blau anfärbt. Aus der übrigen Gelmatrix lässt sich der Farbstoff durch intensives Waschen mit Entfärberlösung entfernen. Mit der *Coomassie-Blue*-Färbung kann weniger als ein Mikrogramm eines Proteins nachgewiesen werden. Zur Färbung wird das Polyacrylamidgel für 30 min unter ständigem Schütteln in *Coomassie-Blue*-Lösung inkubiert. Anschließend wird das Gel mit Entfärberlösung und Wasser bis zur Entfärbung der Gelmatrix gewaschen.

#### **4.4.5 Western-Blot**

Bei einer *Western-Blot*-Analyse werden Proteine nach einer SDS-PAGE auf eine Membran übertragen und können anschließend durch Immundetektion spezifisch nachgewiesen werden.

Der Transfer der im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Membran erfolgt mit dem *XCell II-Blot Modul* der Firma Invitrogen. Die *Blotting-Pads* und Filterpapiere werden vor ihrer Verwendung in 1x Transferpuffer getränkt. Die Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran) wird kurz in Methanol geschwenkt, mit deionisiertem Wasser abgespült und anschließend für einige Minuten in 1x Transferpuffer inkubiert. Dann werden die *Blotting-Pads*, Filterpapiere, Polyacrylamidgele und PVDF-Membranen nach den Anweisungen des *Blot Modul*-Herstellers luftblasenfrei auf der Kathode übereinandergeschichtet. Das Modul

wird durch Auflegen der Anode geschlossen, in die Transferkammer gestellt und mit 1x Transferpuffer gefüllt. Befinden sich im Modul 2 Polyacrylamidgele, wird der Methanolanteil des 1x Transferpuffers von 10 % auf 20 % erhöht. Die äußere Kammer wird mit deionisiertem Wasser gefüllt. Der Transfer erfolgt bei 30 V und 170 mA für 100 min. Die transferierten Proteine können dann durch Immundetektion nachgewiesen werden.

#### **4.4.6 Dot-Blot**

Die *Dot-Blot*-Analyse ist eine Methode zum schnellen Nachweis spezifischer Antigen-Antikörper-Reaktionen. Das Verfahren erlaubt die schnelle Fixierung aller Proteine einer Lösung auf einer Membran und deren Detektion mit spezifischen Antikörpern.

Zunächst wird 1 µL Methanol auf eine PVDF-Membran aufgetragen, um die Membran zu aktivieren. Sofort danach wird auf denselben Auftragspunkt 1 µL Probe gegeben. Anschließend wird die Membran getrocknet und einer Immundetektion unterworfen.

#### **4.4.7 Immundetektion immobilisierter Proteine**

Auf einer Membran immobilisierte Proteine können durch Immundetektion mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Die Membran wird zunächst für 1 h bei RT unter ständigem Schütteln in Block-Puffer inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Danach wird die Membran dreimal für 10 min bei RT mit PBS-T gewaschen. Die Immundetektion bestimmter Proteine erfolgt durch Inkubation der Membran mit einem spezifischen Primärantikörper in PBS-T in geeigneter Verdünnung (1:1.000 - 1:2.000) unter ständigem Schwenken entweder für 1 - 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Im Anschluß wird die Membran dreimal für 10 min mit PBS-T gewaschen und 1 h bei RT unter ständigem Schütteln mit einem HRPO-gekoppelten Sekundärantikörper in PBS-T (Verdünnung 1:20.000) inkubiert. Die Membran wird erneut dreimal für 10 min mit PBS-T gewaschen und entweder a) für 5 min in Citrat-Phosphat-Puffer äquilibriert und zur Farbentwicklung für 1 - 2 h im Dunkeln in Chloronaphthol-Substratlösung inkubiert oder b) für 1 min in ECL-Lösung (*enhanced chemiluminescence*) inkubiert. Die ECL-Lösung enthält ein Substrat, welches in einer lichterzeugenden Reaktion von der HRPO umgesetzt wird. Die Chemilumineszenz wird ausgenutzt, um einen auf die Membran gelegten Film zu belichten, der anschließend in einem Röntgenfilm Prozessor entwickelt wird. Durch die Variation der Belichtungszeit erlaubt das ECL-Verfahren eine optimale Visualisierung unterschiedlich starker Banden. Außerdem ist die ECL-Methode mit einer Nachweisgrenze von 1 ng Protein/Bande ein sehr sensibles System.

#### **4.4.8 MRP6-Immunfluoreszenzmikroskopie**

Transmembranproteine können mit spezifischen Antikörpern, die mit einem

Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, auf der Oberfläche von Zellen unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops detektiert werden. Hierzu werden die adhärenen Zellen, die in 35 mm Zellkulturschalen auf Deckgläschen kultiviert wurden, zunächst zweimal mit PBS gewaschen und für 5 min bei RT mit Aceton fixiert. Zur Entfernung von Acetonrückständen werden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und dann für 1 - 2 h bei RT mit einem spezifischen Primärantikörper in PBS in geeigneter Verdünnung (1:10 - 1:100) inkubiert. Zum Blockieren freier Bindungsstellen werden der Primärantikörper-Lösung 2 % Ziegen Serum zugesetzt. Im Anschluß werden die Zellen dreimal für je 10 min mit PBS gewaschen und für 1 h bei RT im Dunkeln mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper in PBS in geeigneter Verdünnung (1:100 - 1:800) inkubiert. Die Zellen werden im Dunkeln dreimal für je 10 min mit PBS gewaschen. Danach werden die Deckgläschen mit einem Tropfen Fluoromount-Eindecklösung auf Objektträgern fixiert. Abschließend können die Zellen im Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Die Dokumentation erfolgt mittels einer an das Mikroskop angeschlossenen Kamera und eines computerunterstützten Bilderfassungssystems.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Mutationsdetektion in der *ABCC6*-DNA

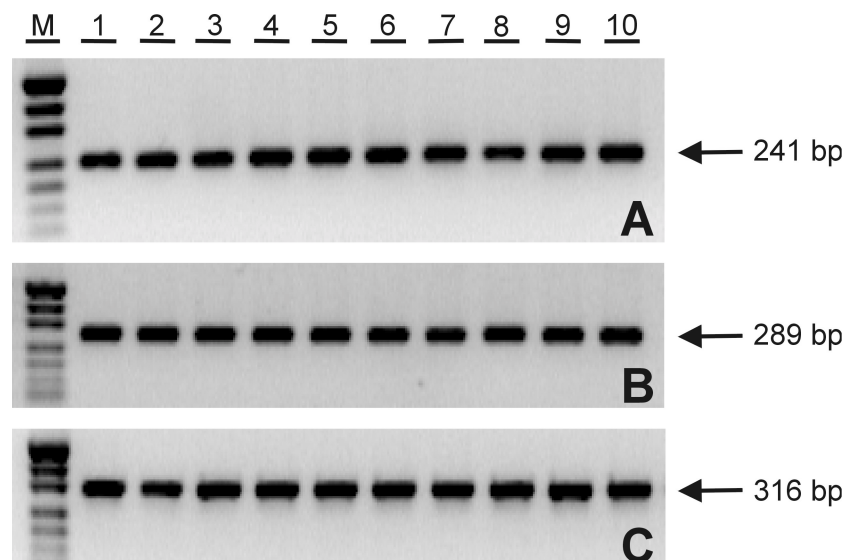
#### 5.1.1 Nachweis von Mutationen im *ABCC6*-Gen bei PXE-Patienten

Zum Nachweis von Sequenzvariationen im *ABCC6*-Gen bei PXE-Patienten wurden zunächst die Exons 1 - 31 des *ABCC6*-Gens der PXE-Patienten und PXE-Angehörigen durch PCR amplifiziert. Anschließend wurden die zu untersuchenden DNA-Fragmente zur Bildung von Heteroduplices mit einem korrespondierenden Wildtyp-DNA-Amplifikat, dessen Wildtyp-Sequenz durch Sequenzierung verifiziert wurde, gemischt, durch Erhitzen denaturiert und durch langsames Abkühlen renaturiert. Nach erfolgter DHPLC-Analyse wurden die Elutionsprofile der Reaktionsgemische mit den Elutionsprofilen nicht gemischter Wildtyp-DNA-Amplifikate verglichen. Exon-Fragmente, die abweichende Chromatogramme lieferten, wurden zur Identifizierung von DNA-Variationen bidirektional sequenziert. Bei erstmalig detektierten Sequenzänderungen wurden die PCR-Amplifikation und die anschließende DNA-Sequenzierung wiederholt, um die Sequenzabweichung zu verifizieren und eventuelle Amplifikationsfehler der *Taq*-Polymerase auszuschließen. Des Weiteren wurde die Frequenz der DNA-Alteration in einer Gruppe von 100 Blutspendern mittels RFLP- oder DHPLC-Analyse bestimmt, um zu prüfen, ob es sich bei der untersuchten DNA-Variation um eine PXE-verursachende Mutation oder einen nicht PXE-assoziierten Polymorphismus handelt.

##### 5.1.1.1 PCR-Amplifikation der *ABCC6*-Exons 1 - 31

Die Amplifikation der *ABCC6*-Exons 1 - 31 erfolgte mittels PCR. Hierzu wurden zuerst verschiedene *Primer* zur Amplifikation der *ABCC6*-Exons 9 - 31 und der angrenzenden Intron-Bereiche generiert. Die Sequenzen der *Primer* zur Amplifikation der Exons 1 - 8 und der angrenzenden Intron-Bereiche wurden der Literatur entnommen (Pulkkinen *et al.*, 2001). Die *Primer*-Paare zur Amplifikation der *ABCC6*-Exons 1 - 9 wurden so gewählt, daß die Vervielfältigung der *ABCC6*-Pseudogene ausgeschlossen wurde. Die optimalen *Annealing*-Temperaturen aller *Primer*-Paare wurden experimentell ermittelt. Für die DHPLC-Analyse mußten die Exon-Fragmente ohne Nebenprodukte und in ausreichend hoher Konzentration amplifiziert werden. Die Reinheit und die Quantität der DNA-Amplifikate wurden daher nach erfolgter PCR für jedes *Primer*-Paar mittels Agarosegel-Elektrophorese kontrolliert (Abb. 5-1). Die zur Amplifikation der *ABCC6*-Exons 1 - 31 ausgewählten *Primer*-Paare und *Annealing*-Temperaturen sind im Kapitel Materialien aufgeführt.





**Abb. 5-1:** PCR-Amplifikate der *ABCC6*-Exons 16 (A), 18 (B) und 30 (C) von PXE-Patienten. Die Längen der Exon-Fragmente sind in Basenpaaren angegeben. Spur M: Marker pUC19/*MspI*, Spuren 1 - 10: PCR-Amplifikate von 10 PXE-Patienten.

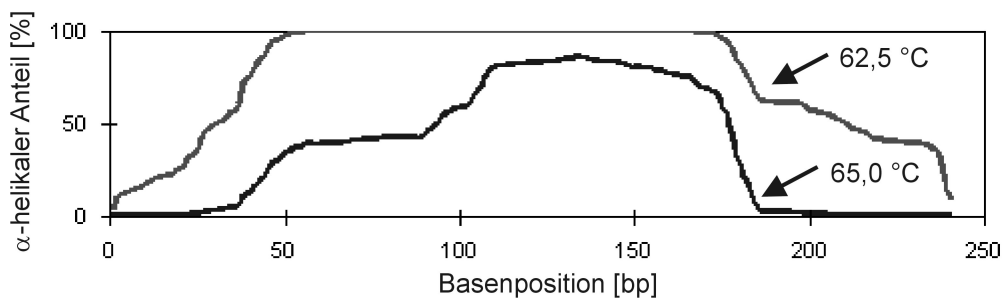
#### 5.1.1.2 Identifizierung der Wildtyp-DNA der *ABCC6*-Exons 1 - 31

Zur Identifizierung der Wildtyp-DNA der *ABCC6*-Exons 1 - 31 wurden die *ABCC6*-Exon-Fragmente von einigen Blutspendern mittels PCR amplifiziert und bidirektional sequenziert. Durch einen Vergleich der ermittelten DNA-Sequenzen mit der veröffentlichten genomischen *ABCC6*-Sequenz (NCBI: *BAC clone* U91318) wurde für jedes Exon-Fragment jeweils ein Blutspender mit eindeutiger Wildtyp-DNA-Sequenz identifiziert. Die Wildtyp-DNA-Exon-Fragmente wurden anschließend für die DHPLC-Analyse der PXE-Proben in ausreichender Menge mittels PCR amplifiziert.

#### 5.1.1.3 Etablierung der DHPLC-Analysebedingungen

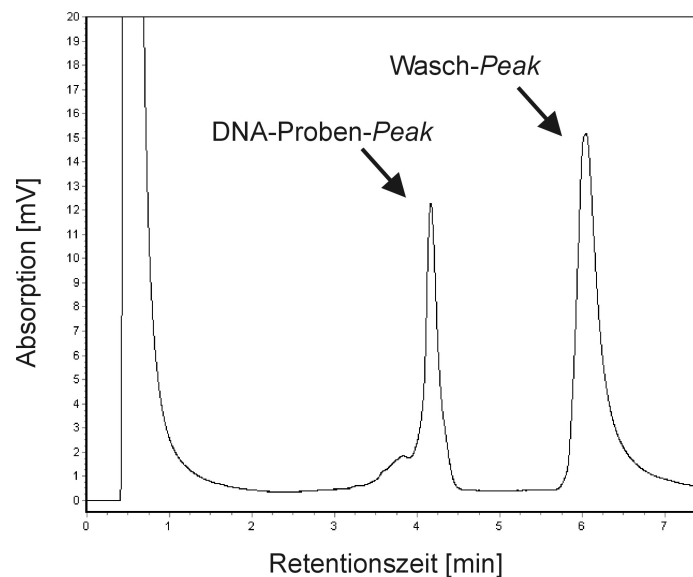
Für die DHPLC-Analyse wurden für jedes zu untersuchende DNA-Exon-Fragment ein geeigneter Acetonitril-Gradient und die optimale Analysetemperatur ermittelt. Enthielt das DNA-Fragment mehrere Schmelzdomänen, wurde das PCR-Produkt bei verschiedenen Analysetemperaturen untersucht. Die Abbildung 5-2 zeigt exemplarisch den  $\alpha$ -helikalen Anteil für die verschiedenen Schmelzbereiche des DNA-Fragments Exon16 bei unterschiedlichen Analysetemperaturen. Bei einer Analysetemperatur von 62,5 °C liegen im Exon-Fragment 16 lediglich die Schmelzbereiche von 1 - 50 und von 90 - 241 Basenpaaren partiell denaturiert vor, während der Abschnitt von 50 - 190 Basenpaaren bei dieser Temperatur einen  $\alpha$ -helikalen Anteil von 100 % aufweist. Erst bei einer Temperatur von 65,0 °C wird für die Schmelzdomäne zwischen den Basenpaaren 50 - 190 ein  $\alpha$ -helikaler Anteil von 40 - 80 % erreicht. Zur Mutationsanalyse der verschiedenen Schmelzbereiche des

Exon16-Amplifikats wurde das Exon-Fragment daher sowohl bei einer Säulentemperatur von 62,5 °C als auch bei 65,0 °C analysiert.



**Abb. 5-2:** Darstellung des  $\alpha$ -helikalen Anteils der verschiedenen Schmelzdomänen im *ABCC6*-Fragment Exon16 bei den Analysetemperaturen 62,5 °C und 65,0 °C.

Der Acetonitril-Gradient wurde für jedes *ABCC6*-Exon-Fragment so eingestellt, daß die Elution der DNA-Probe nach einer Retentionszeit von 3 - 5 Minuten erfolgte. Dadurch wurde der DNA-Proben-Peak weder vom Injektions-Peak noch vom Wasch-Peak überlagert (Abb. 5-3).



**Abb. 5-3:** DHPLC-Chromatogramm des *ABCC6*-Fragments Exon16 bei einer Analysetemperatur von 62,5 °C. Die Elution des DNA-Fragments erfolgt bei einer Retentionszeit von etwa 4,1 min.

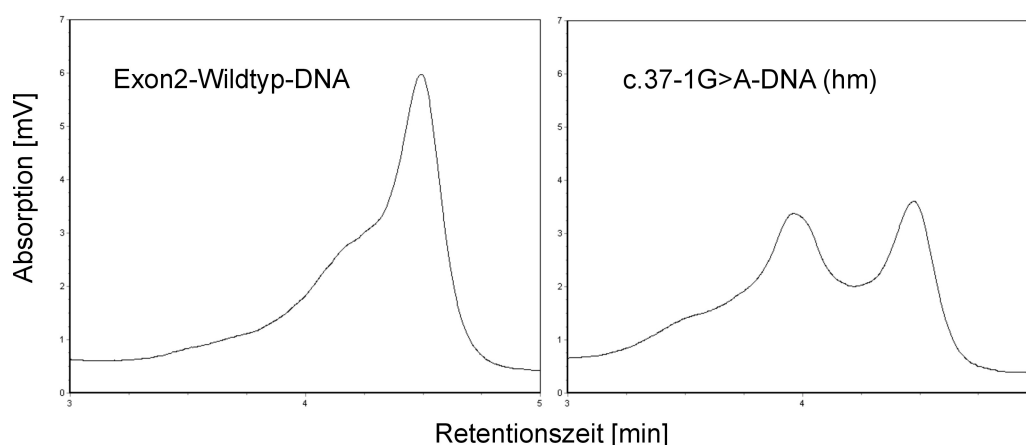
Die zur DHPLC-Analyse der *ABCC6*-Exons 1 - 31 ausgewählten Acetonitril-Gradienten und Säulentemperaturen sind im Kapitel Methoden aufgelistet.

#### 5.1.1.4 Sequenzvariationen in den *ABCC6*-Exons 1 - 10 bei PXE-Patienten

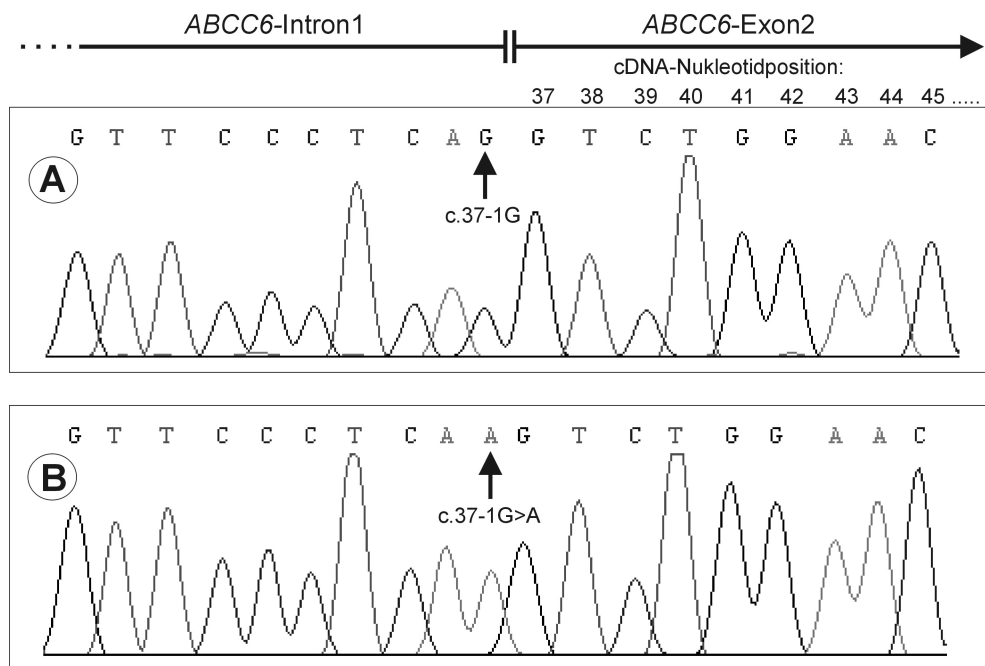
Durch DHPLC-Analyse und DNA-Sequenzierung konnten in den Exons 1 - 10 des *ABCC6*-Gens von 53 PXE-Patienten und 16 Angehörigen 12 unterschiedliche Sequenzvariationen identifiziert werden. Sechs dieser Alterationen wurden in der Literatur als nicht PXE-assoziierte Polymorphismen beschrieben (Le Saux *et al.*, 2002; Meloni *et al.*, 2001; Pulkkinen *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 2001): c.473C>T (p.A158V), c.645G>A (p.T215T), c.793A>G (p.R265G), c.1141T>C (p.L381L), c.1233T>C (p.N411N) und c.1245G>A (p.V415V). Die beiden *ABCC6*-Variationen c.1132C>T (p.Q378X) und c.1171A>G (p.R391G) konnten ebenfalls in der PXE-Kohorte detektiert werden und sind in früheren Studien als PXE-verursachende Mutationen klassifiziert worden (Chassaing *et al.*, 2004; Cai *et al.*, 2001; Pulkkinen *et al.*, 2001). Außerdem wurden bei der Untersuchung der *ABCC6*-Exons 1 - 10 im Rahmen dieser Arbeit 4 neue Sequenzvariationen identifiziert, die nachfolgend näher beschrieben werden.

#### c.37-1G>A

Bei der DHPLC-Analyse des *ABCC6*-Exons 2 des PXE-Kollektivs wich das in der Abbildung 5-4 dargestellte Chromatogramm eindeutig vom Elutionsprofil der Wildtyp-DNA ab. Die anschließende DNA-Sequenzierung des betreffenden Fragments ergab, daß es sich bei der detektierten DNA-Veränderung um einen homozygoten G>A-Basenaustausch handelte (Abb. 5-5). Die G>A-Variation befindet sich von der *ABCC6*-cDNA-Sequenz ausgehend an Position c.37-1 und liegt somit innerhalb der Spleißregion des Introns 1 der genomischen *ABCC6*-DNA (Abb. 5-5). In der PXE-Kohorte trat die c.37-1G>A-Alteration lediglich bei einer PXE-Patientin auf.



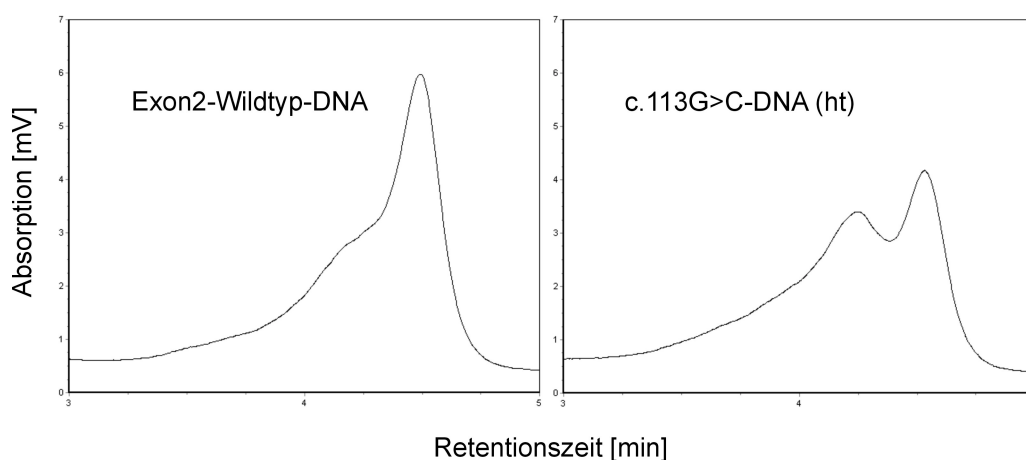
**Abb. 5-4:** DHPLC-Elutionsprofil des *ABCC6*-Exon2-Wildtyp-Fragments und des Amplifikats eines homozygoten (hm) c.37-1G>A-Trägers bei einer Analysetemperatur von 62,5 °C.



**Abb. 5-5:** Elektropherogramm der Sequenzierung des *ABCC6*-Exon2-Wildtyp-Fragments (A) und des Amplifikats eines homozygoten c.37-1G>A-Trägers (B). Die Position c.37-1G, die DNA-Variation c.37-1G>A und die *ABCC6*-Intron1-Exon2-Grenzgebiete sind angegeben.

#### c.113G>C (p.W38S)

Im *ABCC6*-Exon 2 konnte mittels DNA-Sequenzierung eine heterozygote G>C-Substitution identifiziert werden, die bei der DHPLC-Analyse zu einem charakteristischen Chromatogramm führte (Abb. 5-6). Die G>C-Transversion erfolgte an Position c.113 der *ABCC6*-cDNA und bewirkt im MRP6-Protein einen Aminosäureaustausch von Tryptophan gegen Serin an Position 38. Die c.113G>C-Variation wurde in der PXE-Gruppe bei einer PXE-Patientin detektiert.



**Abb. 5-6:** Chromatogramm des *ABCC6*-Exon2-Wildtyp-Fragments und des Amplifikats eines heterozygoten (ht) c.113G>C-Trägers bei einer DHPLC-Analysetemperatur von 62,5 °C.

c.754C>T (p.L252F)

Eine Transition von C>T wurde im Exon 7 des *ABCC6*-Gens an Position c.754 identifiziert. Durch die DNA-Veränderung erfolgt in der MRP6-Sequenz der Austausch der aliphatischen Aminosäure Leucin gegen die aromatische Verbindung Phenylalanin an Position 252. Im PXE-Kollektiv wurde die c.754C>T-Alteration bei 2 PXE-Patienten nachgewiesen. Die DNA-Sequenzierung der Exon7-Amplifikate zeigte, daß es sich bei beiden PXE-Patienten um heterozygote c.754C>T-Träger handelte.

c.1244T>C (p.V415A)

Durch DHPLC-Analyse und DNA-Sequenzierung konnte in 2 *ABCC6*-Exon10-Fragmenten erstmalig die Nukleotidsubstitution c.1244T>C identifiziert werden. Diese DNA-Variation resultiert in einem Aminosäureaustausch an Position 415 des MRP6-Proteins. Dabei wird die Aminosäure Valin durch Alanin ersetzt. Die c.1244T>C-Alteration trat bei 2 PXE-Patienten in heterozygoter Form auf.

**5.1.1.5 Sequenzvariationen in den *ABCC6*-Exons 11 - 20 bei PXE-Patienten**

In den Exons 11 - 20 des *ABCC6*-Gens von 53 PXE-Patienten und 16 Angehörigen wurden mittels DHPLC-Analyse und DNA-Sequenzierung 11 verschiedene Sequenzvariationen detektiert. Vier dieser DNA-Abweichungen wurden bereits in anderen Studien als nicht PXE-assoziierte Polymorphismen kategorisiert (Struk *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001, Le Saux *et al.*, 2000): c.1841T>C (p.V614A), c.1890C>G (p.T630T), c.1896C>A (p.H632Q) und c.2490C>T (p.A830A). Die 3 weiteren *ABCC6*-Variationen c.1552C>T (p.R518X), c.1995delG und c.2294G>A (p.R765Q) wurden dagegen in der Literatur als PXE-verursachende Mutationen beschrieben (Meloni *et al.*, 2001; Le Saux *et al.*, 2001). Außerdem wurden bei der Untersuchung der *ABCC6*-Exons 11 - 20 erstmalig die 4 nachfolgend aufgeführten Sequenzvariationen identifiziert.

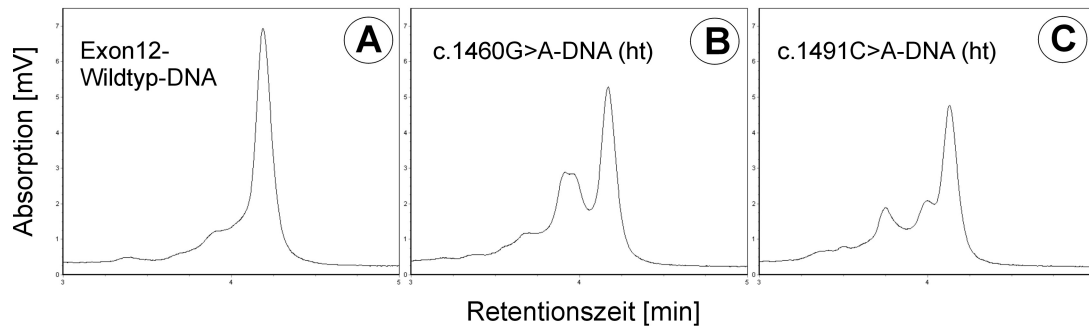
c.1460G>A (p.R487Q) und c.1491C>A (p.N497K)

Bei der DHPLC-Analyse des *ABCC6*-Exons 12 wurden verschiedene Elutionsprofile erhalten, die vom Wildtyp-Chromatogramm abwichen (Abb 5-7).

Der Verlauf des Chromatogramms B in der Abbildung 5-7 ist auf eine heterozygote c.1460G>A-Substitution im *ABCC6*-Exon12-Fragment einer PXE-Patientin zurückzuführen. Durch die G>A-Transition erfolgt in der MRP6-Sequenz an Position 487 der Austausch der positiv geladenen Aminosäure Arginin gegen die ungeladene Aminosäure Glutamin. Die c.1460G>A-Variation wurde in der PXE-Gruppe bei einer PXE-Betroffenen nachgewiesen.

Das DHPLC-Elutionsprofil C ist kennzeichnend für einen heterozygoten c.1491C>A-Austausch im *ABCC6*-Exon12-Amplifikat einer PXE-Patientin. Diese Transversion führt zu

einer Aminosäuresubstitution an Position 497 im MRP6-Protein. Dabei wird die ungeladene Verbindung Asparagin durch das basische Lysin ersetzt. In der PXE-Kohorte trat die c.1491C>A-Variation lediglich bei einer PXE-Patientin auf.

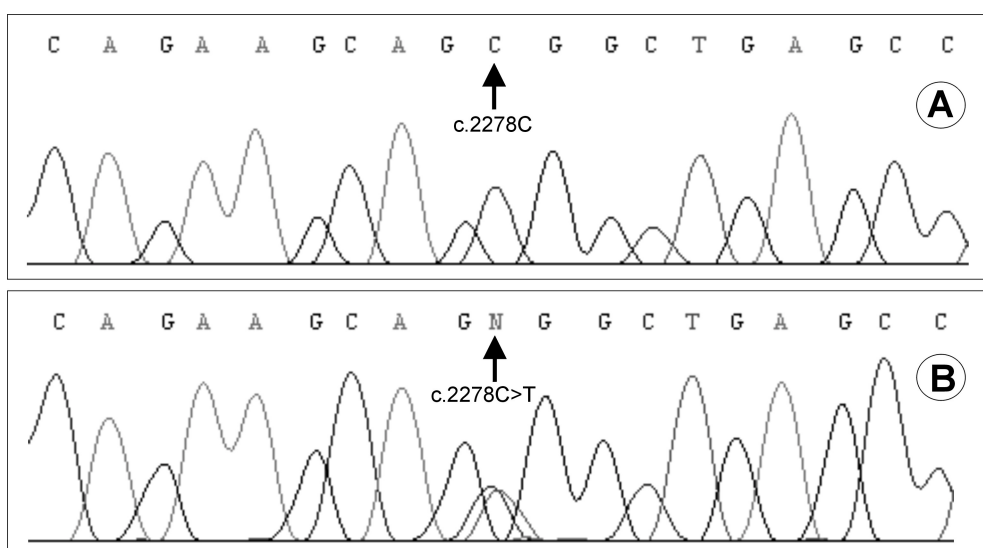


**Abb. 5-7:** DHPLC-Elutionsprofil des *ABCC6*-Exon12-Wildtyp-Fragments (A), des Amplifikats einer heterozygoten (ht) c.1460G>A-Trägerin (B) und des PCR-Produktes einer heterozygoten c.1491C>A-Trägerin (C) bei einer Analysetemperatur von 61,6 °C.

#### c.2252T>A (p.M751K) und c.2278C>T (p.R760W)

Im *ABCC6*-Exon 18 konnten mittels Sequenzierung die DNA-Veränderungen c.2252T>A und c.2278C>T identifiziert werden, die bei der DHPLC-Analyse der Exon18-Amplifikate charakteristische Chromatogramme lieferten.

Die c.2278C>T-Transition wurde bei einer PXE-Patientin in heterozygoter Form gefunden (Abb.5-8) und verursacht im MRP6-Protein an Position 760 eine Substitution der positiv geladenen Aminosäure Arginin durch das apolare Tryptophan.



**Abb. 5-8:** Elektropherogramm der Sequenzierung des *ABCC6*-Exon18-Wildtyp-Fragments (A) und des Amplifikats eines heterozygoten c.2278C>T-Trägerin (B). Die Position c.2278C und die DNA-Variation c.2278C>T sind markiert.

Die c.2252T>A-Variation bewirkt in der MRP6-Sequenz den Ersatz der apolaren Aminosäure Methionin<sup>751</sup> durch die basische Aminosäure Lysin<sup>751</sup>. Im PXE-Kollektiv trat die c.2252T>A-Alteration bei 2 PXE-Patientinnen in heterozygotem Status auf.

#### 5.1.1.6 Sequenzvariationen in den *ABCC6*-Exons 21 - 31 bei PXE-Patienten

Die DHPLC-Untersuchung der *ABCC6*-Exons 21 - 31 von 53 PXE-Patienten und 16 Angehörigen führte zur Detektion von 23 unterschiedlichen Sequenzvariationen. In kürzlich veröffentlichten Studien wurden 5 dieser DNA-Veränderungen als nicht PXE-assoziierte Polymorphismen oder neutrale Variationen eingestuft (Morcher *et al.*, 2003; Le Saux *et al.*, 2002; Le Saux *et al.*, 2001; Ringpfeil *et al.*, 2000): c.2835C>T (p.P945P), c.2836C>A (p.L946I), c.3190C>T (p.R1064W), c.3723G>C (p.W1241C) und c.3803G>A (p.R1268Q). Des Weiteren wurden die 9 *ABCC6*-Alterationen c.2787+1G>T, c.3413G>A (p.R1138Q), c.3421C>T (p.R1141X), c.3736-1G>A, c.3775delT, c.3902C>T (p.T1301I), c.3940C>T (p.R1314W), c.3941G>A (p.R1314Q) und c.4182delG als PXE-verursachende Mutationen charakterisiert (Hu *et al.*, 2003b; Le Saux *et al.*, 2001; Bergen *et al.*, 2000; Le Saux *et al.*, 2000; Ringpfeil *et al.*, 2000). Neun weitere *ABCC6*-Variationen wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig identifiziert und werden daher im folgenden ausführlicher vorgestellt.

##### c.3145T>G (p.S1049A) und c.3188T>G (p.L1063R)

Im *ABCC6*-Exon 23 wurden die Nukleotidsubstitutionen c.3145T>G und c.3188T>G in heterozygoter Form detektiert. Durch die c.3145T>G-Transversion, die in der PXE-Gruppe bei einem Patienten vorlag, wird im MRP6-Protein die polare Aminosäure Serin<sup>1049</sup> durch das hydrophobe Alanin<sup>1049</sup> ersetzt. Die c.3188T>G-Variation, die ebenfalls bei einem PXE-Betroffenen gefunden wurde, führt an Position 1063 zum Austausch der neutralen Aminosäure Leucin gegen die basische Verbindung Arginin.

##### c.3340C>T (p.R1114C), c.3341G>A (p.R1114H) und c.3389C>T (p.T1130M)

Die DHPLC-Analyse des *ABCC6*-Exons 24 lieferte verschiedene Chromatogramme, die nicht dem Elutionsprofil der Wildtyp-DNA entsprachen. Die Abweichungen konnten auf die Basensubstitutionen c.3340C>T, c.3341G>A und c.3389C>T zurückgeführt werden. Durch die c.3340C>T-Transition wird in der *ABCC6*-cDNA das Basentriplett CGC, das im MRP6-Protein die basische Aminosäure Arginin<sup>1114</sup> kodiert, in TGC umgewandelt und kodiert infolgedessen die ungeladene Aminosäure Cystein (Abb 5-9). Die c.3341G>A-Variation verursacht einen Austausch von Arginin<sup>1114</sup> gegen Histidin<sup>1114</sup>, während die c.3389C>T-Alteration in einer Substitution der polaren Aminosäure Threonin durch die apolare Substanz Methionin an Position 1130 der MRP6-Sequenz resultiert. In der PXE-Kohorte konnten eine

heterozygote c.3340C>T-, eine heterozygote c.3341G>A- und eine homozygote c.3389C>T-Trägerin identifiziert werden, wobei alle 3 Probandinnen PXE-Patientinnen waren.

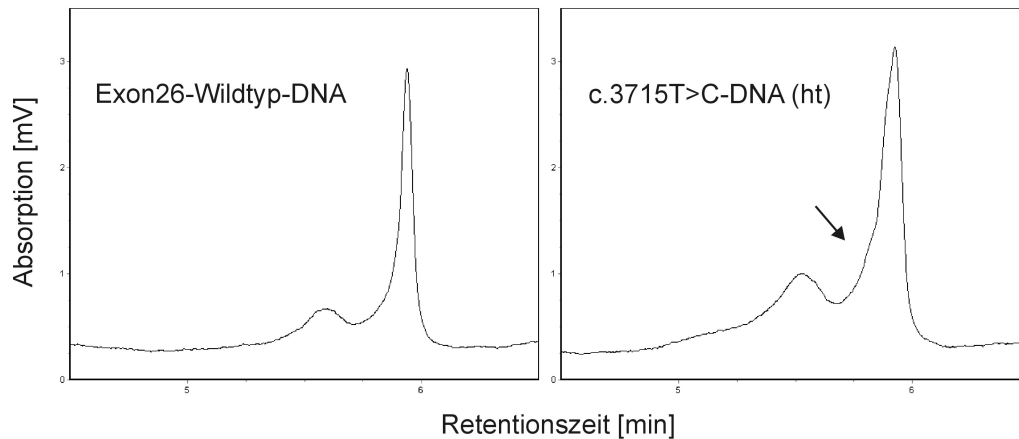
<b>A</b> Wildtyp	c.3316	gtggtagct	catgccagct	gagatgcttg	gagtcagcca	gctactcgtc
	p.1106	V V S	S C Q	L R R	L E S A	S Y S
	c.3366	tgtctgctcc	cacatggctg	agacgtcca	gggcagcaca	gtggtcgggg
	p.1122	S V C S	H M A	E T F	Q G S T	V V R
<b>B</b> c.3340C>T p.R1114C	c.3316	gtggtagct	catgccagct	gagatgcttg	gagtcagcca	gctactcgtc
	p.1106	V V S	S C Q	L R C	L E S A	S Y S
	c.3366	tgtctgctcc	cacatggctg	agacgtcca	gggcagcaca	gtggtcgggg
	p.1122	S V C S	H M A	E T F	Q G S T	V V R
<b>C</b> c.3341G>A p.R1114H	c.3316	gtggtagct	catgccagct	gagatgcttg	gagtcagcca	gctactcgtc
	p.1106	V V S	S C Q	L R H	L E S A	S Y S
	c.3366	tgtctgctcc	cacatggctg	agacgtcca	gggcagcaca	gtggtcgggg
	p.1122	S V C S	H M A	E T F	Q G S T	V V R
<b>D</b> c.3389C>T p.T1130M	c.3316	gtggtagct	catgccagct	gagacgcttg	gagtcagcca	gctactcgtc
	p.1106	V V S	S C Q	L R R	L E S A	S Y S
	c.3366	tgtctgctcc	cacatggctg	agatgctcca	gggcagcaca	gtggtcgggg
	p.1122	S V C S	H M A	E M F	Q G S T	V V R

**Abb. 5-9:** Einfluß der *ABCC6*-Variationen c.3340C>T, c.3341G>A und c.3389C>T auf die MRP6-Sequenz. A): Wildtyp-Sequenz der *ABCC6*-cDNA von Position 3337 - 3436 und die translatierte Aminosäuresequenz. Die Markierungen zeigen die Arginin<sup>1114</sup>- und Threonin<sup>1130</sup>-kodierenden Kodons. B): *ABCC6*-cDNA mit c.3340C>T-Variation, die in der MRP6-Sequenz zu einem R>C-Austausch führt. C): *ABCC6*-cDNA mit c.3341G>A-Variation, die in der MRP6-Sequenz eine R>H-Substitution bewirkt. D): *ABCC6*-cDNA mit c.3389C>T-Variation, die in der MRP6-Sequenz in einem T>M-Austausch resultiert.

#### c.3715T>C (p.Y1239H)

Bei der Untersuchung des *ABCC6*-Exons 26 wich das in der Abbildung 5-10 dargestellte DHPLC-Elutionsprofil vom Chromatogramm der Wildtyp-DNA ab. Die DNA-Sequenzierung des betreffenden Amplifikats ergab, daß es sich bei der detektierten DNA-Variation um einen heterozygoten T>C-Basenaustausch handelte. Die T>C-Transition erfolgte an Position 3715 der *ABCC6*-cDNA und bewirkt im MRP6-Protein den Ersatz der ungeladenen Aminosäure Tyrosin<sup>1239</sup> durch das basische Histidin<sup>1239</sup>. Im PXE-Kollektiv konnte die c.3715T>C-Alteration bei einem PXE-Patienten nachgewiesen werden.





**Abb. 5-10:** Chromatogramm des *ABCC6*-Exon26-Wildtyp-Fragments und des PCR-Produktes eines heterozygoten (ht) c.3715T>C-Trägers bei einer DHPLC-Analysetemperatur von 62,0 °C. Die Chromatogrammmabweichung ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

#### c.3932G>A (p.G1311E)

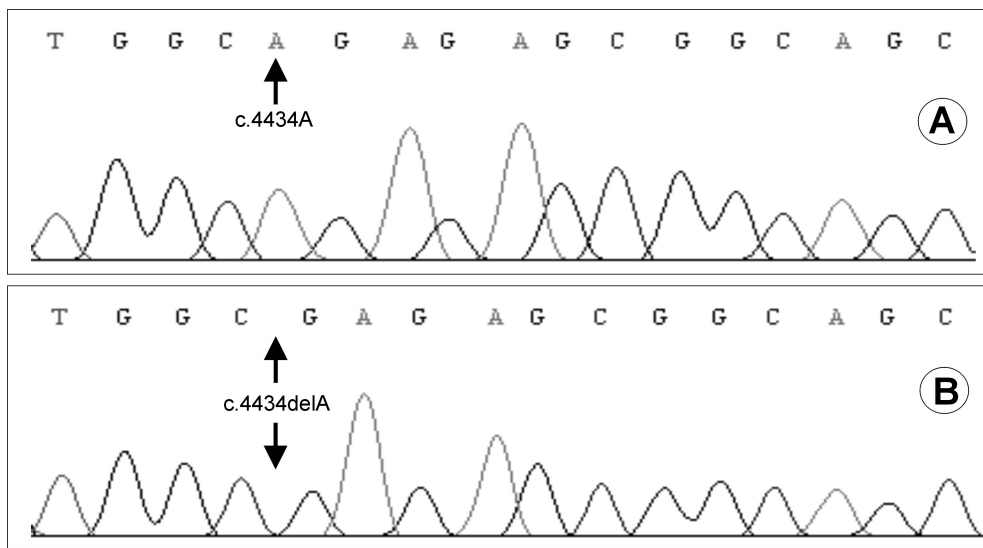
Eine Transition von G>A wurde im Exon 28 des *ABCC6*-Gens an Position c.3932 identifiziert. Durch die DNA-Veränderung wird im MRP6-Protein die apolare Aminosäure Glycin<sup>1311</sup> gegen die negativ geladene Verbindung Glutamat ausgetauscht. Die c.3932G>A-Alteration wurde bei einer PXE-Betroffenen in heterozygoter Form detektiert.

#### c.4209C>A (p.S1403R)

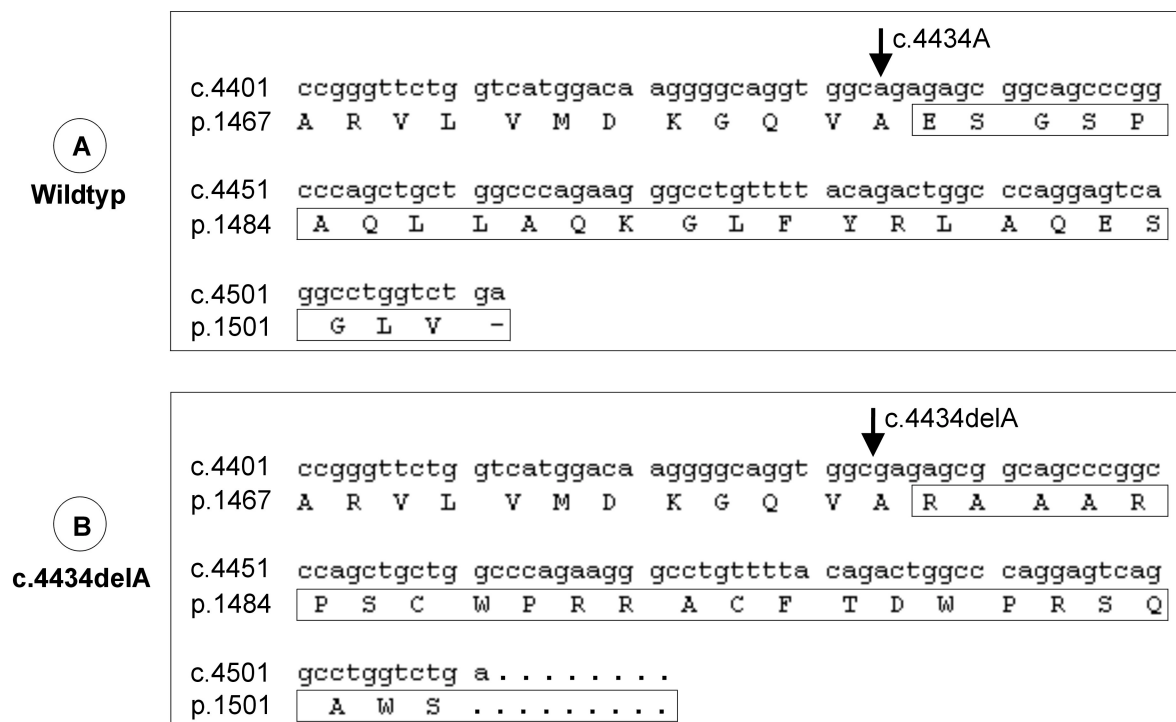
Mittels DHPLC-Analyse und DNA-Sequenzierung konnte im *ABCC6*-Exon 30 erstmalig die Variation c.4209C>A nachgewiesen werden. Dieser Nukleotidaustausch führt zu einer Änderung der MRP6-Sequenz. Dabei wird in Position 1403 die neutrale Aminosäure Serin durch die basische Substanz Arginin substituiert. Die c.4209C>A-Alteration wurde in der PXE-Gruppe bei einem PXE-Patienten gefunden. Die DNA-Sequenzierung des Exon30-Amplifikats zeigte, daß es sich bei diesem Probanden um einen heterozygoten c.4209C>A-Träger handelte.

#### c.4434delA

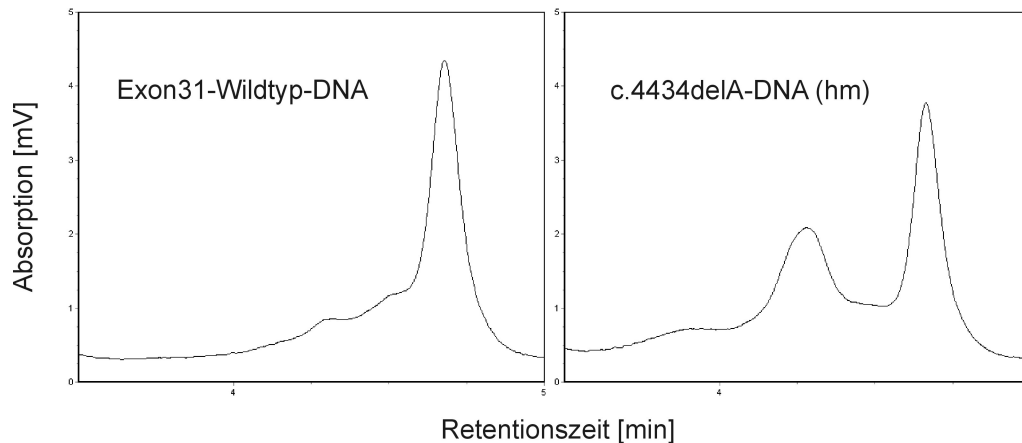
Eine Deletion der Pyrimidinbase Adenin wurde im Exon 31 einer PXE-Betroffenen an Position 4434 der *ABCC6*-cDNA in homozygoter Form identifiziert (Abb. 5-11). Durch die c.4434delA-Variation wird das Kodon-Leseraster der *ABCC6*-cDNA verschoben. Dies bewirkt eine Modifizierung der MRP6-Sequenz ab Position 1479 und eine Änderung des ursprünglichen Stop-Kodons am Ende des *ABCC6*-cDNA-Leserasters, wodurch sich das MRP6-Protein verlängert (Abb. 5-12). In der PXE-Gruppe trat die c.4434delA-Deletion, die bei der DHPLC-Analyse zu einem charakteristischen Chromatogramm führt (Abb. 5-13), lediglich bei einer PXE-Patientin auf.



**Abb. 5-11:** Elektropherogramm der Sequenzierung des *ABCC6*-Exon31-Wildtyp-Amplifikats (A) und des DNA-Fragments einer PXE-Patientin mit homozygoter c.4434delA-Deletion (B). Die Position c.4434A und die c4434delA-Variation sind angegeben.



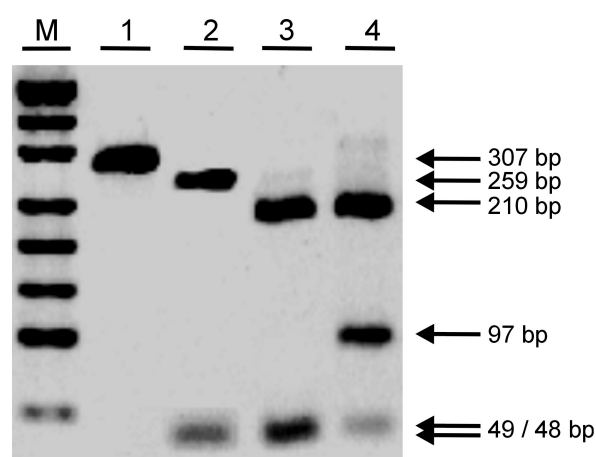
**Abb. 5-12:** Auswirkung der *ABCC6*-Variation c.4434delA auf die MRP6-Sequenz. A): Wildtyp-*ABCC6*-cDNA von Position 4401 - 4512 und die kodierten Aminosäuren. Die Markierungen zeigen die Position c.4434A und die Aminosäuren, die durch die c.4434delA-Deletion verändert werden. B): *ABCC6*-cDNA mit c.4434delA-Variation und die resultierende Aminosäuresequenz. Die modifizierten Aminosäuren und die Position der c.4434delA-Deletion sind gekennzeichnet.



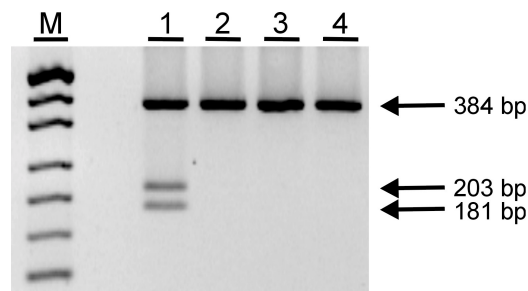
**Abb. 5-13:** DHPLC-Elutionsprofil des *ABCC6*-Exon31-Wildtyp-Fragments und des PCR-Produktes einer homozygoten (hm) c.4434delA-Trägerin bei einer Analysetemperatur von 64,7 °C.

#### 5.1.1.7 Etablierung von RFLP- und DHPLC-Mutationsnachweissystemen

Zur Überprüfung, ob es sich bei den 17 neuen *ABCC6*-Alterationen um PXE-verursachende Mutationen oder nicht PXE-assoziierte Polymorphismen handelt, wurden die Frequenzen dieser DNA-Variationen in 100 Blutspendern bestimmt. Lag die zu untersuchende DNA-Alteration innerhalb der Erkennungssequenz eines Restriktionsenzymes, wurde ein RFLP-Testsystem zum Nachweis der Sequenzvariation entwickelt. Dabei wurden die *ABCC6*-Exons der Blutspender mittels PCR amplifiziert und anschließend unter Verwendung einer Restriktionsendonuklease spezifisch restringiert (Abb. 5-14 und 5-15). Die etablierten RFLP-Verfahren sind in der Tabelle 5-1 aufgelistet.



**Abb. 5-14:** *Esp3I*-Restriktion des Exon24-Amplifikats. Spur M: Marker pUC19/*MspI*, Spur 1: *Esp3I*-unbehandeltes Exon24-Fragment, Spur 2: *Esp3I*-Restriktion des PCR-Produktes eines homozygoten c.3389C>T-Trägers, Spur 3: *Esp3I*-Restriktion eines Exon24-Wildtyp-Amplifikats, Spur 4: *Esp3I*-Restriktion des Fragments eines heterozygoten c.3341G>A-Trägers.

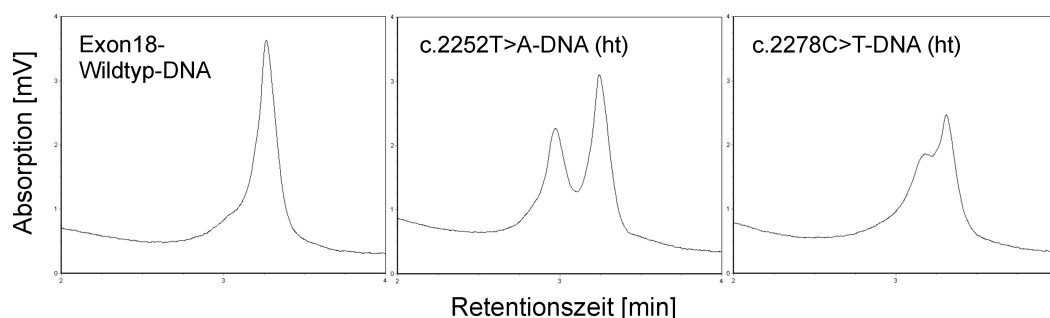


**Abb. 5-15:** *Hsp92II*-Restriktion des Exon26-Amplifikats. Spur M: Marker pUC19/*MspI*, Spur 1: *Hsp92II*-Restriktion des PCR-Produktes eines heterozygoten c.3715T>C-Trägers, Spuren 2 - 4: *Esp3I*-Restriktion des Exon24-Wildtyp-Fragments.

**Tab. 5-1:** RFLP-Testsysteme zur Detektion von *ABCC6*-Variationen.

Exon	<i>ABCC6</i> -Variation	PCR-Produkt [bp]	Enzym	Restriktionsprodukte [bp]		
				wt	Mutation (hm)	Mutation (ht)
24	c.3340C>T	307	<i>Esp3I</i>	210, 49, 48	210, 97	210, 97, 49, 48
24	c.3341G>A	307	<i>Esp3I</i>	210, 49, 48	210, 97	210, 97, 49, 48
24	c.3389C>T	307	<i>Esp3I</i>	210, 49, 48	259, 48	259, 48
26	c.3715T>C	384	<i>Hsp92II</i>	384	203, 181	384, 203, 181
26	c.3723G>C	384	<i>Hsp92I</i>	215, 169	384	384, 215, 169
28	c.3932G>A	201	<i>AluI</i>	105, 96	105, 74, 22	105, 96, 74, 22
30	c.4209C>A	292	<i>BseYI</i>	261, 23, 8	284, 8	284, 261, 23, 8

Die Mehrheit der neuen *ABCC6*-Alterationen war nicht innerhalb der Erkennungssequenz einer Restriktionsendonuklease lokalisiert. Die meisten der betreffenden Exon-Amplifikate führten jedoch bei der DHPLC-Untersuchung unter bestimmten Analysebedingungen zu einem charakteristischen Chromatogramm, das eindeutig vom Elutionsprofil des Wildtyp-Fragments unterschieden werden konnte (Abb. 5-16). Der Nachweis dieser Sequenzvariationen in der Gruppe der Blutspender erfolgte daher mittels DHPLC bei einer optimalen Analysetemperatur und einem geeigneten Acetonitril-Gradienten.



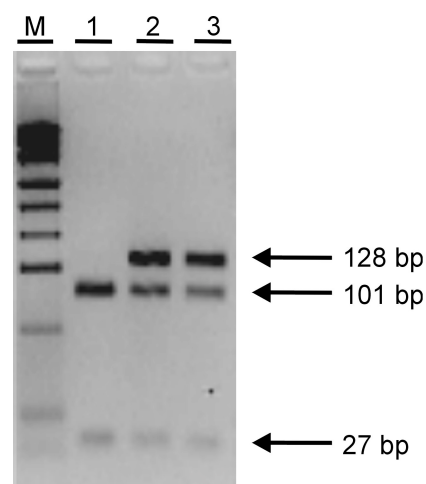
**Abb. 5-16:** Chromatogramm des *ABCC6*-Exon18-Wildtyp-Amplifikats, des PCR-Produktes einer heterozygoten (ht) c.2252T>A-PXE-Patientin und des Fragments einer heterozygoten c.2278C>T-PXE-Patientin bei einer DHPLC-Analysetemperatur von 64,0 °C.

Folgende DHPLC-Testsysteme zur Mutationsdetektion wurden etabliert:

**Tab. 5-2:** DHPLC-Verfahren zum Nachweis von *ABCC6*-Variationen.

Exon	<i>ABCC6</i> -Variation	PCR-Produkt [bp]	DHPLC-Analysebedingungen	
			Ofentemperatur [°C]	Puffer B: Anfangs- / Endkonzentration [%]
i-1	c.37-1G>A	328	62,5	56 / 64
2	c.133G>C	328	62,5	56 / 64
12	c.1460G>A	302	61,6	55 / 63
12	c.1491C>A	302	61,6	55 / 63
18	c.2252T>A	289	64,0	55 / 63
18	c.2278C>T	289	64,0	55 / 63
23	c.3145T>G	510	62,6	60 / 68
23	c.3188T>G	510	62,6	60 / 68
31	c.4434delA	292	64,7	52 / 60

Zwei der neuen *ABCC6*-Variationen befanden sich weder innerhalb der Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym, noch lieferten sie bei der DHPLC-Analyse unverwechselbare Chromatogramme. Infolgedessen wurde bei der Untersuchung der Blutspender in die entsprechenden Exon-Amplifikate mittels modifizierter PCR-*Primer* eine die DNA-Alteration umschließende Restriktionsschnittstelle eingefügt, so daß die *ABCC6*-Variation nach erfolgter PCR durch eine RFLP-Analyse nachgewiesen werden konnte (Abb. 5-17). Dieses kombinierte Verfahren wurde zum Nachweis der in der Tabelle 5-3 angegebenen *ABCC6*-Variationen durchgeführt.



**Abb. 5-17:** *AluI*-Restriktion des Exon7-Amplifikats. Spur M: Marker pUC19/*MspI*, Spur 1: *AluI*-Restriktion des Exon7-Wildtyp-Fragments, Spuren 2 und 3: *AluI*-Restriktion des PCR-Produktes eines heterozygoten c.754C>T-PXE-Patienten.

**Tab. 5-3:** RFLP-Systeme zur Mutationsdetektion nach Einfügen einer Schnittstelle mittels PCR.

Exon	ABCC6-Variation	PCR-Produkt [bp]	Enzym	Restriktionsprodukte [bp]		
				wt	Mutation (hm)	Mutation (ht)
7	c.754C>T	128	<i>AluI</i>	101, 27	128	128, 101, 27
10	c.1244T>C	275	<i>Hin6I</i>	275	247, 28	275, 247, 28

Die Untersuchung von 100 Blutspendern unter Anwendung der im Rahmen dieser Arbeit etablierten RFLP- und DHPLC-Nachweissysteme zeigte, daß alle 100 Kontrollpersonen in Bezug auf die 17 neuen in der PXE-Kohorte identifizierten *ABCC6*-Sequenzvariationen negativ waren. Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß es sich bei den erstmalig detektierten *ABCC6*-Alterationen um PXE-verursachende Mutationen handelt.

#### 5.1.1.8 Ausschluß einer *ABCC6*-Deletion mittels Haplotypen-Analyse

Um ausschließen zu können, daß Probanden der PXE-Gruppe eine Deletion des kompletten *ABCC6*-Gens aufweisen, wurden die betreffenden Personen einer limitierten Haplotypen-Analyse unterworfen. Hierzu wurde von jedem Probanden der Genotyp bezüglich der *ABCC6*-Polymorphismen c.1841T>C, c.2490C>T, c.3803G>A, c.4404-76A>G und c.4404-31G>A durch RFLP-Analyse der Exon-Amplifikaten 14, 19, 27 und 30 ermittelt. Zusätzlich wurde eine PCR mit den Mikrosatellitenmarkern D16S764 und D16B9621 durchgeführt. D16S764 und D16B9621 begrenzen einen chromosomalen Bereich von weniger als 500 kb, wobei der Marker D16S764 vor dem *ABCC6*-Gen liegt und der Abschnitt D16B9621 hinter dem *ABCC6*-Gen lokalisiert ist (Cai *et al.*, 2000). Nach erfolgter PCR mit den polymorphen Markern D16S764 und D16B9621 wurden die unterschiedlichen Längen der amplifizierten DNA-Fragmente bestimmt. Heterozygotie in mindestens einem der intragenischen *ABCC6*-Polymorphismen, in einer der im PXE-Kollektiv identifizierten *ABCC6*-Mutationen und/oder in beiden Mikrosatellitenmarker-Bereichen wurde als Hinweis auf die Abwesenheit einer Deletion des *ABCC6*-Gens oder eines größeren chromosomalen Bereiches gewertet (Tab. 5-4). Nach diesen Kriterien konnte durch die limitierte Haplotypen-Analyse bei 51 der 53 PXE-Patienten (96 %) und bei 14 der 16 Angehörigen (88 %) eine heterozygote Deletion des kompletten *ABCC6*-Gens ausgeschlossen werden. Eine homozygote *delABCC6*-Mutation lag bei keinem der PXE-Betroffenen und der Angehörigen vor. Die detaillierten Ergebnisse der limitierten Haplotypen-Analyse sind in der Tabelle 5-4 aufgelistet.

**Tab. 5-4:** Haplotypen der PXE-Patienten und ihrer Angehörigen. Heterozygote Merkmale in den *ABCC6*-Polymorphismen, PXE-Mutationen und in beiden Mikrosatellitenmarkern (MSM) sind schwarz gekennzeichnet (cht: gemischt (*compound*) heterozygot, ht: heterozygot, hm: homozygot, wt: Wildtyp). Die PXE-Familien sind fortlaufend nummeriert; die einzelnen Mitglieder einer Familie werden durch nachgestellte Zahlen erfaßt.

Familie-Proband	PXE-Patient	Haplotyp										
		c.1841T>C, c.2490C>T, c.3803G>A, c.4404-76A>G, c.4404-31G>A					MSM D16S764 (bp)	MSM D16B9621 (bp)	PXE-Mutation: Status			
1	ja	hm	ht	wt	wt	hm	131/135	308/324	p.R1141X	p.R1141X		hm
2	ja	hm	hm	wt	wt	ht	131/135	324	p.R1141X	p.R1141X		hm
3	ja	ht	ht	wt	wt	hm	139	324	p.R1141X	p.R1141X		hm
4	ja	hm	ht	wt	wt	hm	131	324	p.R1141X	p.R1141X		hm
5	ja	hm	wt	hm	wt	wt	135	324	c.37-1G>A	c.37-1G>A		hm
6	ja	hm	ht	wt	wt	ht	131	324/344	c.4182delG	c.4182delG		hm
7	ja	wt	wt	wt	wt	hm	135/139	324	c.4434delA	c.4434delA		hm
8	ja	ht	ht	wt	wt	ht	131/139	316	p.Q378X	p.R1141X		cht
9-1	ja	ht	wt	wt	wt	hm	135/139	324/332	c.2787+1G>T	p.R1141X		cht
9-2	nein	hm	ht	wt	wt	hm	127/139	324	p.R1141X			cht
10	ja	wt	wt	wt	wt	wt	135	324/332	p.Q378X	c.2787+1G>T		cht
11	ja	ht	wt	wt	wt	hm	131/139	332	c.1995delG	c.2787+1G>T		cht
12	ja	ht	ht	wt	wt	ht	131/135	324/332	c.2787+1G>T	c.4182delG		cht
13	ja	ht	ht	wt	wt	hm	127/135	324	p.R1141X			ht
14	ja	hm	hm	wt	wt	hm	131	324	p.R1141X			ht
15	ja	hm	ht	ht	wt	ht	119/135	324/332	c.1995delG	p.R765Q		cht
16-1	ja	ht	ht	wt	wt	ht	127/131	324	p.R760W	p.R1141X		cht
16-2	nein	hm	ht	wt	wt	hm	127/131	324	p.R1141X			ht
17	ja	ht	ht	wt	wt	hm	131/139	324	p.R1141X	p.G1311E		cht
18	ja	ht	wt	wt	wt	hm	131/135	324	p.R1141X	p.Y1239H		cht
19-1	ja	ht	wt	ht	wt	wt	127/139	324/332	p.L252F	p.V415A	p.R765Q	cht
19-2	ja	ht	wt	ht	wt	wt	131/135	324/332	p.L252F	p.V415A	p.R765Q	cht
20	ja	wt	ht	ht	wt	wt	131/135	324/332	c.3775delT			ht
21	ja	ht	hm	wt	wt	ht	131/135	324	p.R1141X			ht
22-1	ja	wt	wt	wt	wt	wt	131	324/332	p.R518X			ht
22-2	ja	wt	wt	wt	wt	wt	131	324/332	p.R518X			ht
22-3	nein	ht	wt	ht	wt	wt	131/135	324				wt
23	ja	ht	ht	wt	wt	ht	127/131	324	p.W38S			ht
24	ja	ht	wt	wt	hm	hm	131/135	324/332				wt
25-1	ja	ht	ht	wt	wt	ht	131/135	324	p.R1141X			ht
25-2	ja	ht	ht	wt	wt	ht	135	324	p.R1141X			ht
25-3	ja	ht	wt	ht	wt	wt	131/135	316/324	p.R487Q			ht
25-4	nein	ht	ht	ht	wt	ht	127/135	324	p.R1141X			ht
25-5	nein	ht	ht	ht	wt	ht	131	324	p.R1141X			ht
25-6	nein	wt	wt	ht	wt	wt	131/135	324				wt
26	ja	ht	wt	wt	wt	ht	119/131	324/332	p.Q378X	p.R1114H		cht
27-1	ja	hm	wt	hm	wt	wt	131	324/332	p.R1314Q			ht
27-2	nein	hm	wt	hm	wt	wt	131	324	p.R1314Q			ht
28	ja	hm	ht	wt	ht	hm	135/139	324/332	c.1995delG	p.R1114C		cht
29-1	ja	hm	ht	ht	wt	hm	135/139	324/332	p.L1063R	p.R1141X		cht
29-2	nein	hm	ht	ht	wt	ht	127/139	324	p.R1141X			ht
29-3	nein	hm	ht	ht	wt	ht	135/139	324	p.R1141X			ht
29-4	nein	hm	wt	hm	wt	wt	127/135	324				wt
30	ja	ht	ht	wt	wt	hm	127/135	324	p.M751K	p.R1141X		cht
31-1	ja	ht	ht	wt	wt	ht	127/131	324				wt
31-2	nein	ht	ht	wt	wt	hm	127	324				wt
31-3	nein	ht	ht	wt	wt	ht	131	324/328				wt
31-4	nein	ht	ht	wt	wt	ht	127/131	324				wt
32	ja	hm	ht	wt	ht	ht	131	324	p.T1130M	p.T1130M		hm
33-1	ja	wt	wt	wt	wt	hm	135	324/332	c.2787+1G>T	p.W1241C		cht
33-2	nein	wt	wt	wt	wt	hm	131/135	324	p.W1241C			ht
34	ja	ht	hm	wt	wt	ht	131/135	324				wt
35	ja	ht	ht	wt	wt	hm	131	324/332	p.S1049A	c.3736-1G>A	p.S1403R	cht
36	ja	wt	wt	wt	wt	wt	131	324/332	c.2787+1G>T			ht
37	ja	ht	ht	wt	wt	hm	127/131	324	p.R1141X	p.R1314W		cht
38	ja	wt	wt	wt	wt	hm	135	324	p.N497K			ht
39	ja	ht	ht	wt	wt	hm	127/135	324	p.M751K	p.R1141X		cht
40-1	ja	hm	ht	wt	wt	ht	131	324	p.R1141X			ht
40-2	nein	hm	wt	ht	wt	wt	131	324/328				wt
40-3	nein	hm	wt	hm	wt	wt	131	324/328				wt

Familie-Proband	PXE-Patient	Haplotyp										
		c.1841T>C, c.2490C>T, c.3803G>A, c.4404-76A>G, c.4404-31G>A					MSM D16S764 (bp)	MSM D16B9621 (bp)	PXE-Mutation: Status			
41-1	ja	ht	ht	wt	ht	hm	131/135	316/324	p.R391G	p.R1141X		cht
41-2	ja	ht	ht	wt	ht	hm	131	316/324	p.R391G	p.R1141X		cht
42	ja	ht	wt	ht	wt	wt	131/135	324/340				wt
43-1	ja	hm	ht	ht	wt	ht	135/139	324	p.R1141X			ht
43-2	ja	ht	wt	ht	wt	wt	127/135	324/344				wt
43-3	ja	hm	ht	ht	wt	ht	135/139	324	p.R1141X			ht
44-1	ja	ht	wt	wt	ht	ht	119/131	324	p.R1138Q			ht
44-2	ja	ht	wt	wt	ht	ht	119/131	324	p.R1138Q			ht
45	ja	ht	ht	wt	wt	hm	127/135	324/332	p.R1141X	p.T1301I		cht

### 5.1.1.9 Zusammenfassung der PXE-Mutationen im *ABCC6*-Gen

In dieser Arbeit wurde erstmalig eine Kohorte von 53 deutschen PXE-Patienten und 16 Angehörigen mittels DHPLC-Analyse und DNA-Sequenzierung bezüglich des Auftretens von Mutationen in den Exons 1 - 31 des *ABCC6*-Gens untersucht. Dabei konnten insgesamt 32 verschiedene PXE-verursachende Mutationen identifiziert werden. Diese beinhalteten 22 *Missense*-Mutationen, 4 Deletionen, 3 *Nonsense*-Mutationen und 3 Spleißstellen-Alterationen. Die *ABCC6*-Variationen lagen in homozygoter, gemischt heterozygoter und heterozygoter Form vor. Von 106 analysierten Allelen trugen 78 eine PXE-verursachende *ABCC6*-Mutationen, so daß die Mutationsdetektionsrate bei 74 % lag. Bei 48 PXE-Betroffenen (91 %) konnte mindestens eine *ABCC6*-Mutation nachgewiesen werden. Die meisten der PXE-Mutationen traten im Kollektiv einmalig auf. Häufigere Mutationen waren die *Nonsense*-Mutation p.R1141X und die Spleißstellen-Alteration c.2787+1G>T (Tab. 5-5). Im Rahmen dieser Studie wurden 17 *ABCC6*-Variationen erstmalig detektiert. Ihre Abwesenheit in einem Kontrollkollektiv von 100 Blutspendern deutete darauf hin, daß es sich bei diesen DNA-Alterationen um PXE-verursachende Mutationen handelt. Die Lokalisation der neuen PXE-Mutationen im *ABCC6*-Gen und im MRP6-Protein ist in der Abbildung 5-18 ersichtlich. Alle in dieser Arbeit identifizierten PXE-Mutationen sind in der Tabelle 5-5 zusammengefaßt.

**Tab. 5-5:** Zusammenfassung der in dieser Studie identifizierten PXE-verursachenden Mutationen im *ABCC6*-Gen. Mutationen, die erstmalig detektiert wurden, sind in Fettdruck dargestellt.

Exon	Veränderung im		Status	Allel-Frequenz in		
	<i>ABCC6</i> -Gen	MRP6-Protein		PXE-Patienten	PXE-Angehörigen	Blutspendern
i-1	<b>c.37-1G&gt;A</b>	<b>Leseraster-Wechsel</b>	hm	2 / 106	0 / 32	0 / 200
2	<b>c.113G&gt;C</b>	<b>p.W38S</b>	ht	1 / 106	0 / 32	0 / 200
7	<b>c.754C&gt;T</b>	<b>p.L252F</b>	ht	2 / 106	0 / 32	0 / 200
9	c.1132C>T	p.Q378X	ht	3 / 106	0 / 32	----
9	c.1171A>G	p.R391G	ht	2 / 106	0 / 32	----
10	<b>c.1244T&gt;C</b>	<b>p.V415A</b>	ht	2 / 106	0 / 32	0 / 200
12	<b>c.1460G&gt;A</b>	<b>p.R487Q</b>	ht	1 / 106	0 / 32	0 / 200
12	<b>c.1491C&gt;A</b>	<b>p.N497K</b>	ht	1 / 106	0 / 32	0 / 200



Exon	Veränderung im		Status	Allel-Frequenz in		
	ABCC6-Gen	MRP6-Protein		PXE-Patienten	PXE-Angehörigen	Blutspendern
12	c.1552C>T	p.R518X	ht	2 / 106	0 / 32	----
16	c.1995delG	Leseraster-Wechsel	ht	3 / 106	0 / 32	----
18	<b>c.2252T&gt;A</b>	<b>p.M751K</b>	ht	2 / 106	0 / 32	0 / 200
18	<b>c.2278C&gt;T</b>	<b>p.R760W</b>	ht	1 / 106	0 / 32	0 / 200
18	c.2294G>A	p.R765Q	ht	3 / 106	0 / 32	----
i-21	c.2787+1G>T	Leseraster-Wechsel	ht	6 / 106	0 / 32	----
23	<b>c.3145T&gt;G</b>	<b>p.S1049A</b>	ht	1 / 106	0 / 32	0 / 200
23	<b>c.3188T&gt;G</b>	<b>p.L1063R</b>	ht	1 / 106	0 / 32	0 / 200
24	<b>c.3340C&gt;T</b>	<b>p.R1114C</b>	ht	1 / 106	0 / 32	0 / 200
24	<b>c.3341G&gt;A</b>	<b>p.R1114H</b>	ht	1 / 106	0 / 32	0 / 200
24	<b>c.3389C&gt;T</b>	<b>p.T1130M</b>	hm	2 / 106	0 / 32	0 / 200
24	c.3413G>A	p.R1138Q	ht	2 / 106	0 / 32	----
24	c.3421C>T	p.R1141X	hm, ht	28 / 106	6 / 32	----
26	<b>c.3715T&gt;C</b>	<b>p.Y1239H</b>	ht	1 / 106	0 / 32	0 / 200
26	c.3723G>C	p.W1241C	ht	1 / 106	1 / 32	0 / 200
i-26	c.3736-1G>A	Leseraster-Wechsel	ht	1 / 106	0 / 32	----
27	c.3775delT	Leseraster-Wechsel	ht	1 / 106	0 / 32	----
28	c.3902C>T	p.T1301I	ht	1 / 106	0 / 32	----
28	<b>c.3932G&gt;A</b>	<b>p.G1311E</b>	ht	1 / 106	0 / 32	0 / 200
28	c.3940C>T	p.R1314W	ht	1 / 106	0 / 32	----
28	c.3941G>A	p.R1314Q	ht	1 / 106	1 / 32	----
29	c.4182delG	Leseraster-Wechsel	hm, ht	3 / 106	0 / 32	----
30	<b>c.4209C&gt;A</b>	<b>p.S1403R</b>	ht	1 / 106	0 / 32	0 / 200
31	<b>c.4434delA</b>	<b>Leseraster-Wechsel</b>	hm	2 / 106	0 / 32	0 / 200

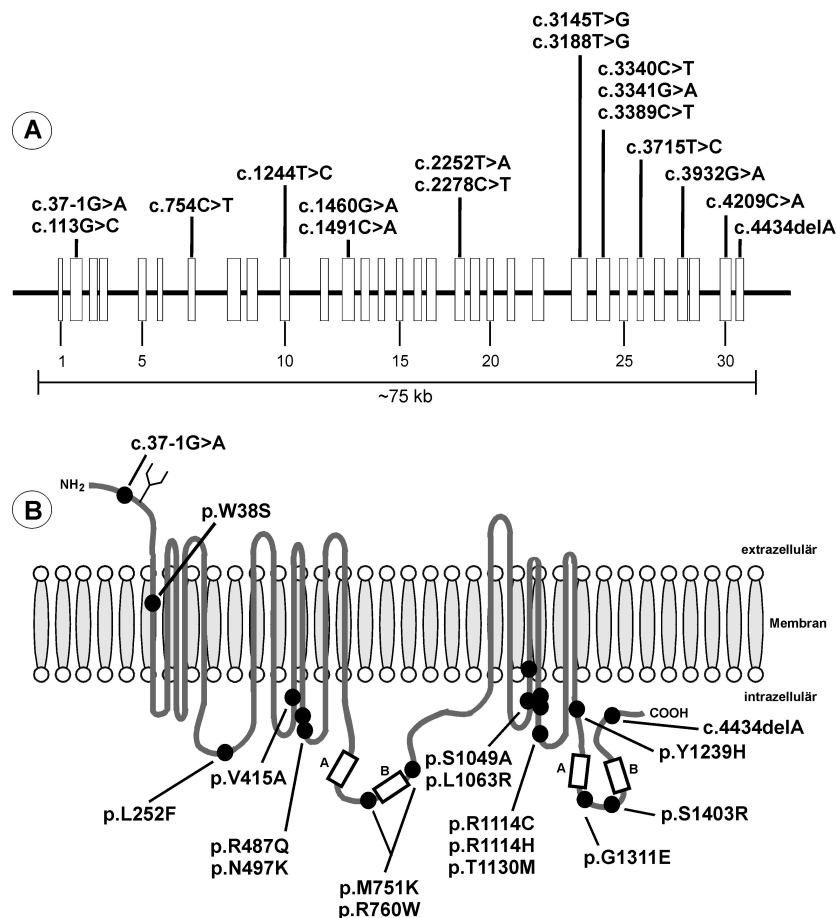


Abb. 5-18: Lokalisation der 17 neuen PXE-Mutationen im ABCC6-Gen (A) und im MRP6-Protein (B).

### 5.1.2 Detektion von *ABCC6*-Sequenzvariationen bei AAA-Patienten

Zur Identifizierung von Alterationen im *ABCC6*-Gen bei 133 AAA-Patienten wurden PCR-amplifizierte *ABCC6*-Exon-Fragmente der AAA-Patienten einer Mutationsanalyse mittels DHPLC und DNA-Sequenzierung unterzogen. Erstmals detektierte Sequenzabweichungen wurden durch eine Wiederholung der PCR-Amplifikation mit anschließender DNA-Sequenzierung verifiziert. Außerdem wurden die Frequenzen der DNA-Variationen in einer Kontrollgruppe von mindestens 100 Blutspendern bestimmt, um zu prüfen, ob es sich bei den *ABCC6*-Alterationen lediglich um nicht AAA-assoziierte Polymorphismen handelt oder ob sie einen Risikofaktor für die AAA-Bildung darstellen. Die Mutationsanalyse der AAA-Patienten wurde auf die *ABCC6*-Exons 16 - 18, 24 und 28 - 30 beschränkt, da diese Abschnitte wichtige Funktionsbereiche des MRP6-Proteins kodieren und laut dieser und anderer Studien die meisten Mutationen aufweisen (Hu *et al.*, 2003; Le Saux *et al.*, 2001).

#### 5.1.2.1 Mutationsanalyse ausgewählter *ABCC6*-Exons von AAA-Patienten

Zur Mutationsanalyse der *ABCC6*-Exons 16 - 18, 24 und 28 - 30 von 133 AAA-Patienten wurden die relevanten Exons zunächst mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden diejenigen *Primer*, *Annealing*-Temperaturen und PCR-Bedingungen verwendet, die im Rahmen dieser Arbeit zur Untersuchung der PXE-Kohorte ausgewählt wurden. Die Reinheit und die Quantität der DNA-Amplifikate wurden nach erfolgter PCR durch eine Agarosegel-Elektrophorese kontrolliert. Anschließend wurden die PCR-Produkte einer DHPLC-Analyse unterworfen. Dabei entsprachen die verwendeten Acetonitril-Gradienten, Analysetemperaturen und Wildtyp-DNA-Amplifikate ebenfalls denen, die bereits bei der Untersuchung des PXE-Kollektivs festgelegt wurden. Exon-Fragmente, die vom Wildtyp-DNA-Chromatogramm abweichende Elutionsprofile lieferten, wurden zur Identifizierung von DNA-Variationen bidirektional sequenziert.

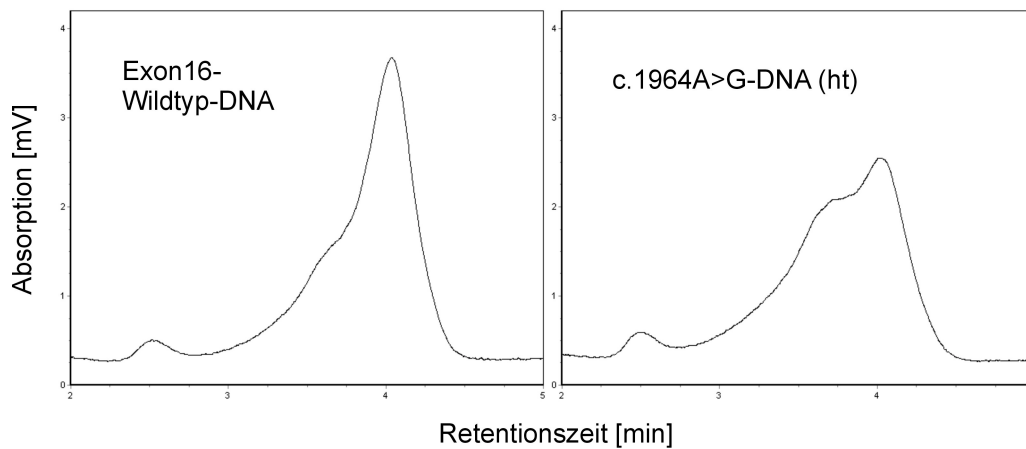
#### 5.1.2.2 Sequenzvariationen im *ABCC6*-Gen bei AAA-Patienten

Durch DHPLC-Analyse und DNA-Sequenzierung konnten in den Exons 16 - 18, 24 und 28 - 30 des *ABCC6*-Gens von 133 AAA-Patienten 5 unterschiedliche Sequenzvariationen identifiziert werden, die nachfolgend näher beschrieben werden.

##### c.1964A>G (pQ655R)

Im *ABCC6*-Exon 16 konnte mittels DNA-Sequenzierung eine heterozygote A>G-Substitution identifiziert werden, die bei der DHPLC-Analyse zu einem charakteristischen Chromatogramm führte (Abb. 5-19). Die A>G-Transition erfolgte an Position c.1964 der *ABCC6*-cDNA und bewirkt im MRP6-Protein den Austausch der positiv geladenen Aminosäure Arginin<sup>655</sup> gegen die ungeladene Verbindung Glutamin. Die c.1964A>G-

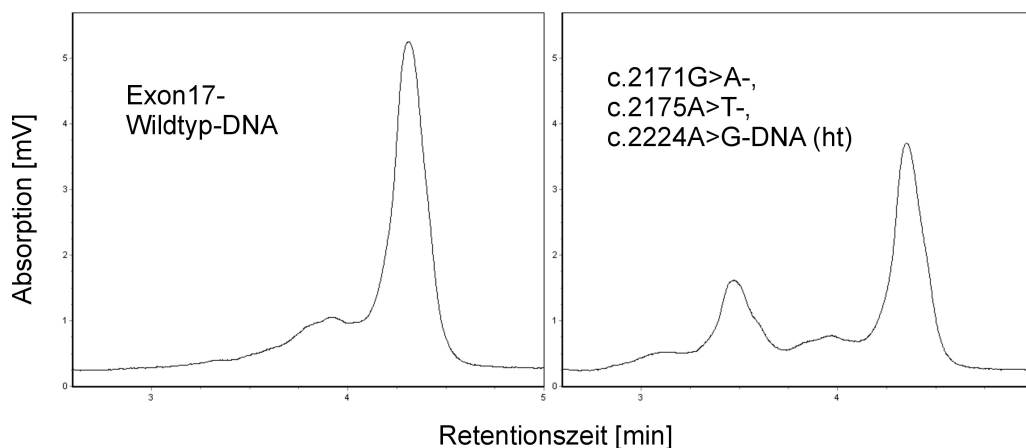
Variation, die im Rahmen dieser Arbeit erstmalig detektiert wurde, konnte in der AAA-Kohorte bei einem Patienten nachgewiesen werden.



**Abb. 5-19:** Chromatogramm des *ABCC6*-Exon16-Wildtyp-Fragments und des PCR-Produktes eines heterozygoten (ht) c.1964A>G-Trägers bei einer DHPLC-Analysetemperatur von 65,0 °C.

c.2171G>A (p.R724K), c.2175A>T (p.V725V) und c.2224A>G (p.I742V)

Bei der Untersuchung des *ABCC6*-Exons 17 wich das in der Abbildung 5-20 dargestellte DHPLC-Elutionsprofil eindeutig vom Chromatogramm der Wildtyp-DNA ab. Die Sequenzierung des betreffenden Amplifikats zeigte, daß die Abweichung durch die 3 DNA-Variationen c.2171G>A, c.2175A>T und c.2224A>G verursacht wurde.



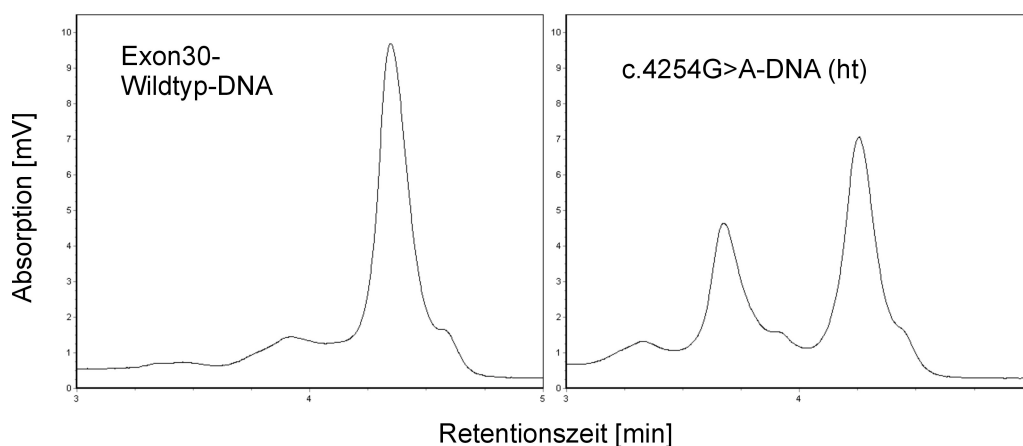
**Abb. 5-20:** DHPLC-Elutionsprofil des *ABCC6*-Exon17-Wildtyp-Amplifikats und des Fragments eines heterozygoten (ht) c.2171G>A-, c.2175A>T- und c.2224A>G-Trägers bei einer Analysetemperatur von 64,0 °C.

Der Austausch c.2171G>A führt in der MRP6-Sequenz zum Ersatz der Aminosäure Arginin durch Lysin an Position 724, während die c.2224A>G-Transition in einer Substitution von

Isoleucin<sup>742</sup> durch Valin resultiert. Die c.2175A>T-Transversion hat keine Auswirkung auf das MRP6-Protein, da sowohl das ursprüngliche Kodon GTA als auch das durch die c.2175A>T-Variation veränderte Basentriplett GTT die Aminosäure Valin<sup>725</sup> kodiert. Die Kombination der Alterationen c.2171G>A, c.2175A>T und c.2224A>G trat bei 3 Patienten in heterozygoter Form auf.

#### c.4254G>A (p.R1418R)

Eine Transition von G>A wurde im Exon 30 des *ABCC6*-Gens an Position c.4254 identifiziert. Bei der c.4254G>A-Variation handelt es sich um eine stumme Sequenzalteration, da sie keine Modifizierung der MRP6-Sequenz bewirkt. Der c.4254G>A-Austausch, der in dieser Studie erstmalig detektiert wurde, konnte bei 6 AAA-Patienten in heterozygoter Form nachgewiesen werden und liefert bei der DHPLC-Analyse ein eindeutig identifizierbares Chromatogramm (Abb. 5-21).



**Abb. 5-21:** Chromatogramm des *ABCC6*-Exon30-Wildtyp-Amplifikats und des PCR-Produktes eines heterozygoten (ht) c.4254G>A-Trägers bei einer DHPLC-Analysetemperatur von 61,0 °C.

#### **5.1.2.3 Einfluß der *ABCC6*-Variationen auf die AAA-Genese**

Zur Klärung, ob die in der AAA-Kohorte detektierten *ABCC6*-Alterationen mit dem Krankheitsbild AAA assoziiert sind, wurden die Frequenzen dieser DNA-Variationen in einer Kontrollgruppe von mindestens 100 Blutspendern mittels DHPLC-Analyse ermittelt. Die Untersuchung zeigte, daß die Exon16-Alteration c.1964A>G in der Kontrollkohorte nicht vorlag, während die Kombination der *ABCC6*-Abweichungen c.2171G>A, c.2175A>T und c.2224A>G im Exon 17 bei 2 von 127 Kontrollpersonen in heterozygoter Form auftrat. Die DNA-Alteration c.4254G>A im Exon 30 wurde bei 2 von 122 Blutspendern nachgewiesen. Bei keiner der 5 Variationen war der Unterschied in der Allel-Frequenz zwischen den AAA-Patienten und den Blutspendern statistisch signifikant (Tab. 5-6). Demzufolge handelt es sich bei den *ABCC6*-Alterationen c.2171G>A, c.2175A>T, c.2224A>G und c.4254G>A um nicht

AAA-assoziierte Polymorphismen und es besteht kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von *ABCC6*-Variationen in den untersuchten Exons und der Genese von AAA.

**Tab. 5-6:** Sequenzvariationen im *ABCC6*-Gen bei AAA-Patienten und Blutspendern.

Exon	Veränderung im		Status	Allel-Frequenz in		p-Wert
	<i>ABCC6</i> -Gen	MRP6-Protein		AAA-Patienten	Blutspendern	
16	c.1964A>G	p.Q655R	ht	1 / 266	0 / 286	> 0,05
17	c.2171G>A	p.R724K	ht	3 / 266	2 / 254	> 0,05
17	c.2175A>T	p.V725V	ht	3 / 266	2 / 254	> 0,05
17	c.2224A>G	p.I742V	ht	3 / 266	2 / 254	> 0,05
30	c.4254G>A	p.R1418R	ht	6 / 266	2 / 244	> 0,05

## 5.2 Nachweis und Quantifizierung von *ABCC6*-mRNA

### 5.2.1 *ABCC6*-mRNA-Quantifizierung durch *LightCycler-Real-Time-PCR*

Zum Nachweis der *ABCC6*-mRNA in verschiedenen Zellkulturen sollte im Rahmen dieser Arbeit ein *Real-Time-PCR*-Verfahren entwickelt werden, welches die relative Quantifizierung der *ABCC6*-mRNA ermöglicht. Die Etablierung der *LightCycler-Real-Time-PCR* erfolgte in drei Schritten, die nachfolgend erläutert werden.

#### 5.2.1.1 Auswahl sequenzspezifischer *Primer*

Zur Amplifikation von *ABCC6*-cDNA wurden verschiedene *ABCC6*-Intron-überspannende *Primer*-Paare generiert, die bei der PCR ein Produkt mit einer Länge von maximal 350 bp lieferten.

#### 5.2.1.2 Etablierung einer *ABCC6*-cDNA-spezifischen Standard-PCR

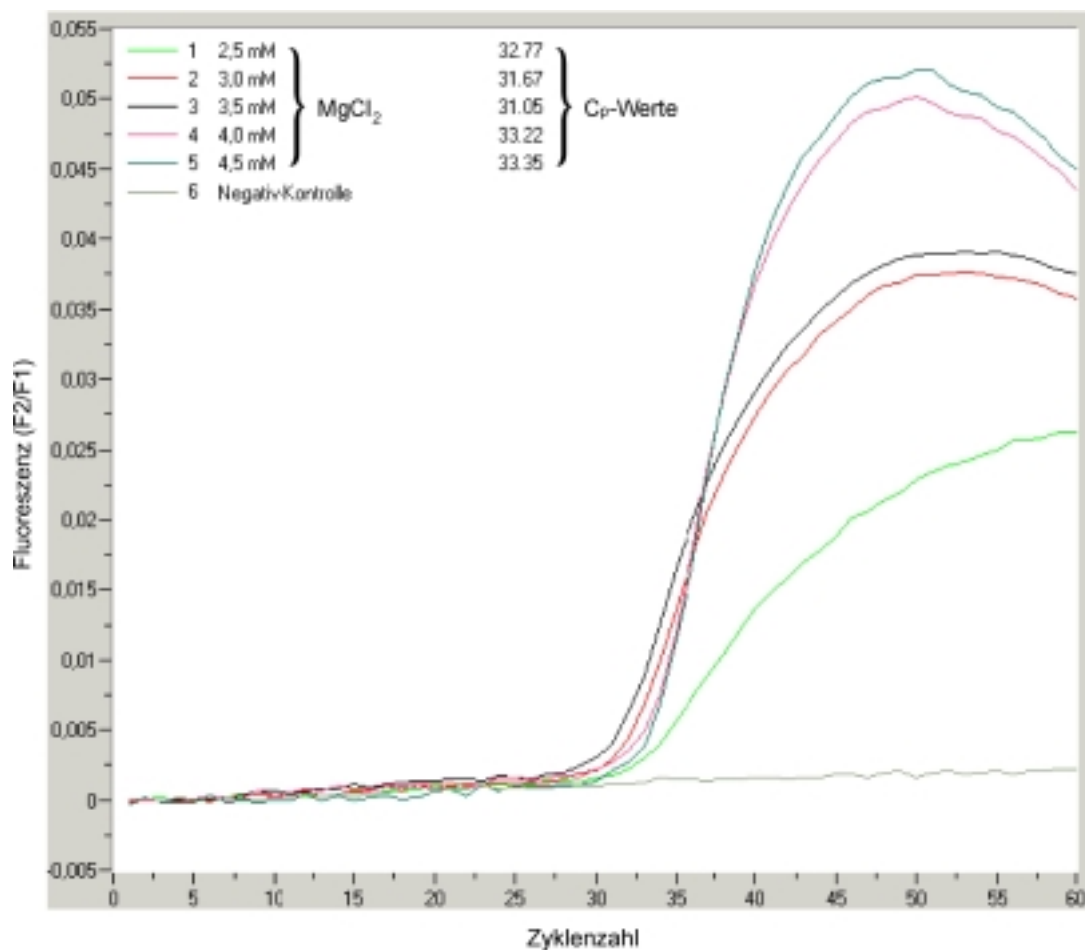
Zur Etablierung einer *ABCC6*-cDNA-spezifischen Standard-PCR wurde jedes ausgewählte *Primer*-Paar in einer PCR bei *Annealing*-Temperaturen von 50 - 60 °C getestet. Hierzu wurde ein Thermoblock-*Cycler* verwendet. Als *Template* diente cDNA, die durch reverse Transkription einer spezifischen Menge isolierter Gesamt-RNA aus *Chang Liver*-Zellen synthetisiert wurde. Nach erfolgter PCR wurden die Reinheit und die Quantität der DNA-Amplifikate mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft. *Primer*-Paare, die ein spezifisches PCR-Produkt in ausreichend hoher Konzentration lieferten, wurden für die Etablierung der *LightCycler-Real-Time-PCR* eingesetzt.

#### 5.2.1.3 Quantifizierung der *ABCC6*-cDNA durch *LightCycler-Real-Time-PCR*

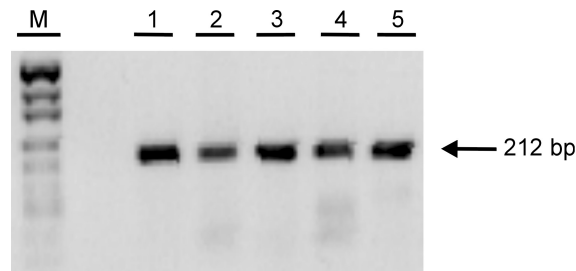
Zur Entwicklung einer *ABCC6*-cDNA-spezifischen *Real-Time-PCR* wurden die ausgewählten *Primer*-Paare im *LightCycler*-System getestet. Als Hybridisierungs sonden wurden Oligonukleotide verwendet, die in der Arbeitsgruppe bereits in einem etablierten Verfahren zum Nachweis der *ABCC6*-Mutation c.3421C>T in Exon 24 eingesetzt wurden (Götting *et al.*, 2004). Die optimale MgCl<sub>2</sub>-Konzentration des PCR-Ansatzes und die geeigneten *Annealing*-Temperaturen der *Primer*-Paare wurden experimentell ermittelt. Dazu wurde die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration der PCR-Ansätze in 0,5 mM-Schritten von 2,5 auf 4,5 mM erhöht und die *Annealing*-Temperatur in einem Bereich von 54 - 57 °C variiert. Als *Template* diente cDNA, die durch reverse Transkription einer spezifischen Menge isolierter Gesamt-RNA aus *Chang-Liver*-Zellen synthetisiert wurde. Nach erfolgter PCR wurden die Reaktionsansätze zur Detektion unspezifischer Nebenprodukte einer Agarosegel-Elektrophorese unterzogen. Das spezifische *ABCC6*-Produkt wurde durch eine Schmelzkurven-Analyse charakterisiert. Anschließend wurden alle Daten bezüglich einer ausreichenden Amplifikat-Quantität, PCR-

Spezifität und Schmelzkurvencharakteristik beurteilt. Dabei konnte ein *Primer*-Paar ermittelt werden, das bei einer *Annealing*-Temperatur von 56 °C und einer MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von 4,0 mM sowohl eine hohe Amplifikat-Signalintensität (Abb. 5-22) als auch eine ausreichende PCR-Spezifität (Abb. 5-23) lieferte. Zusätzlich führte die Schmelzkurven-Analyse bei einer MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von 4,0 mM zu einer eindeutigen Amplifikat-Sonden-Charakteristik. Die entsprechende Schmelztemperatur des Amplifikat-Sonden-Hybriden betrug 65,2 °C (Abb. 5-24). Die Sequenzen der ausgewählten *Primer* sind im Kapitel Materialien aufgeführt.

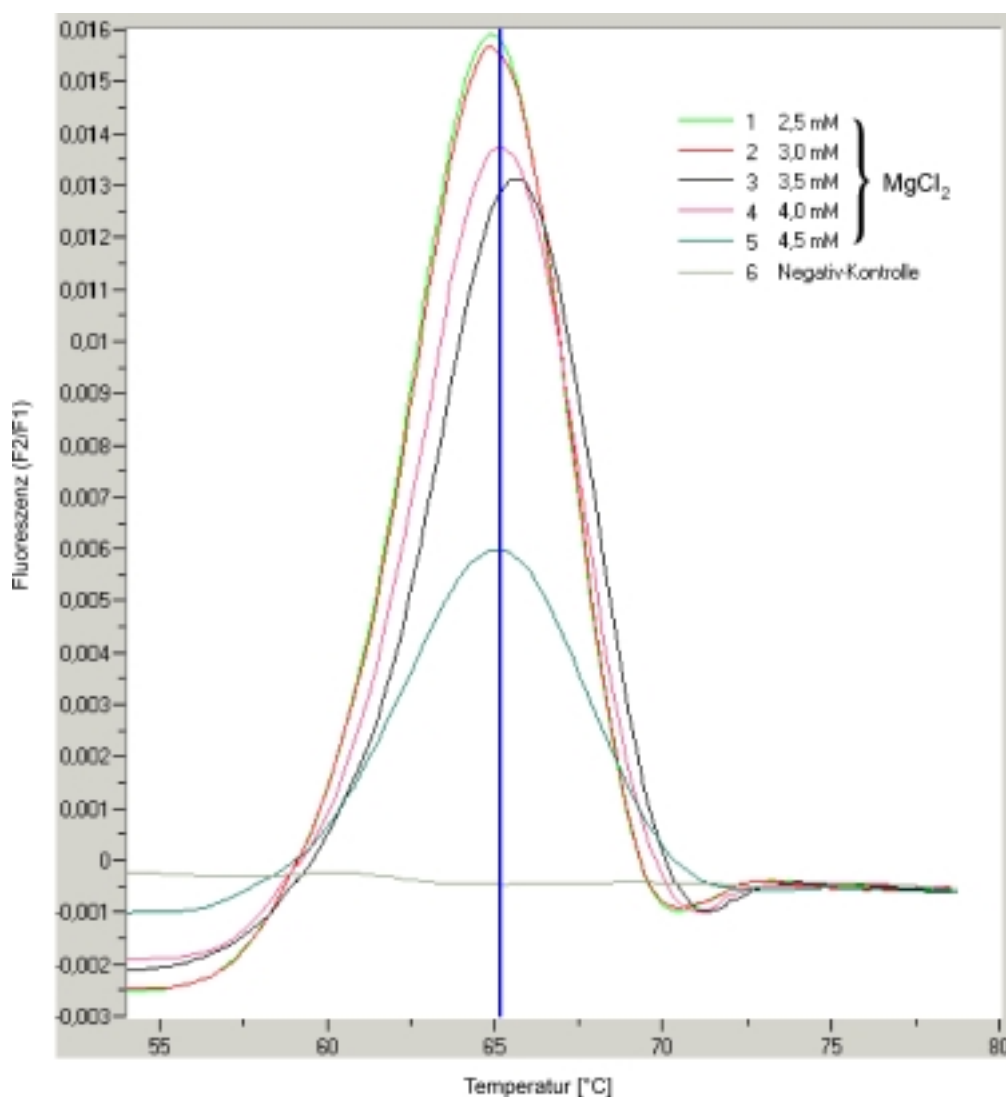
Zur Quantifizierung der *ABCC6*-cDNA wurde der C<sub>p</sub>-Wert genutzt. Hierbei handelt es sich um die Zyklanzahl, bei der das Fluoreszenz-Grundsignal überschritten wird und die Amplifikation des PCR-Produktes in die exponentiellen Phase eintritt. Der C<sub>p</sub>-Wert der *Chang-Liver-ABCC6*-cDNA betrug unter Verwendung des ausgewählten *Primer*-Paares bei einer *Annealing*-Temperatur von 56 °C und einer MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von 4,0 mM 33,2 Zyklen (Abb. 5-22). Wird dieser C<sub>p</sub>-Wert mit den C<sub>p</sub>-Werten konstant exprimierter Haushaltsgene korreliert, ist eine relative Quantifizierung der *ABCC6*-cDNA möglich.



**Abb. 5-22:** Detektion des *ABCC6*-Amplifikats im Verlauf einer *LightCycler-Real-Time-PCR* und Einfluß der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration auf die Amplifikationseffizienz. Die MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen und C<sub>p</sub>-Werte der PCR-Ansätze 1 - 5 sind angegeben. Der PCR-Ansatz 6 zeigt eine Negativ-Kontrolle ohne *Template*.



**Abb. 5-23:** *LightCycler-Real-Time-PCR*-Produkte nach einer Elektrophorese im Agarosegel und Einfluß der  $MgCl_2$ -Konzentration auf die PCR-Spezifität. Die  $MgCl_2$ -Konzentration der PCR-Ansätze 1 - 5 wurde in 0,5 mM-Schritten von 2,5 auf 4,5 mM erhöht. Die Länge des *ABCC6*-Amplifikats ist angegeben. Spur M: Marker pUC19/*Mspl*.



**Abb. 5-24:** Auswirkung der  $MgCl_2$ -Konzentration auf die Schmelzkurvencharakteristik. Abgebildet ist die 1. Ableitung der Fluoreszenzintensität gegen die Temperatur ( $-d(F2/F1)/dT$ ) und das Schmelzverhalten des *ABCC6*-Amplifikat/Sonden-Hybriden in Abhängigkeit von der  $MgCl_2$ -Konzentration, die in den PCR-Ansätzen 1 - 5 in 0,5 mM-Schritten von 2,5 auf 4,5 mM erhöht wurde. Bei einer  $MgCl_2$ -Konzentration von 4,0 mM lag die Schmelztemperatur des *ABCC6*-Amplifikats mit den Sonden bei ca. 65,2 °C. Der PCR-Ansatz 6 zeigt eine Negativ-Kontrolle ohne *Template*.



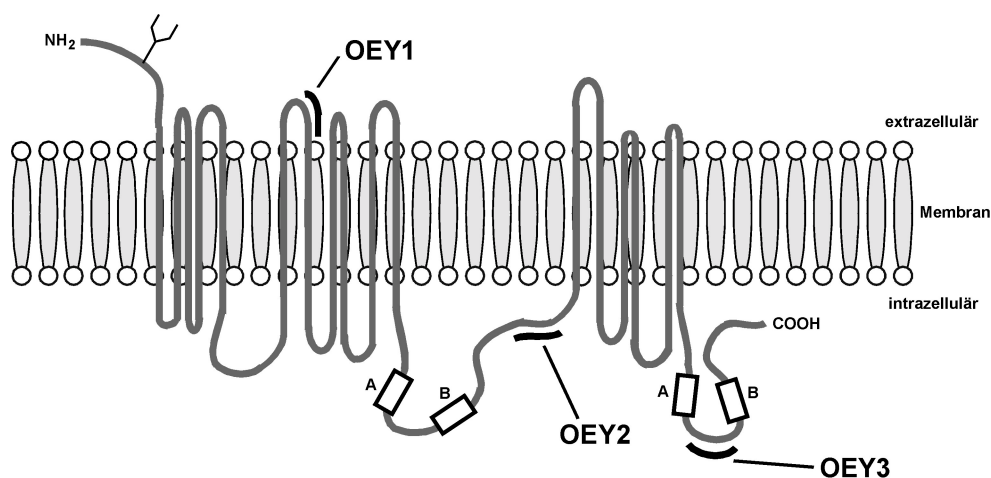
## 5.3 Untersuchung der MRP6-Proteinexpression

### 5.3.1 Entwicklung eines Kaninchen-anti-MRP6-Antikörpers

Zur Untersuchung der MRP6-Expression sollte im Rahmen dieser Arbeit ein polyklonaler Kaninchen-anti-MRP6-Antikörper entwickelt werden.

#### 5.3.1.1 PeptidAuswahl und Immunisierung

Zur Herstellung polyklonaler anti-MRP6-Antikörper wurden jeweils zwei Kaninchen dreimal im Abstand von vier Wochen mit einem der synthetischen Peptide OEY1, 2 und 3 immunisiert. Die eingesetzten Oligopeptide wurden mit Hilfe des Programms *Java Molecular Biology Directory* aufgrund ihrer relativ hohen Immunogenität-Indices ausgewählt. Die Sequenzen der Peptide, die im Kapitel Materialien angegeben sind, entsprechen cytoplasmatischen und extrazellulären Bereichen im humanen MRP6-Protein (Abb. 5-25). Homologien zu anderen Proteinen wurden durch einen *NCBI*-Protein-Datenbank-Vergleich ausgeschlossen. Vor der ersten Immunisierung wurde den Kaninchen Blut zur Herstellung eines Präimmunserums entnommen. Die Antiseren wurden vier Wochen nach der 1., 2. und 3. Immunisierung gewonnen.



**Abb. 5-25:** Lokalisation der Epitope der Antikörper OEY1, OEY2 und OEY3 im MRP6-Protein.

#### 5.3.1.2 Dot-Blot-Analyse der Antiseren

Der Erfolg der OEY1-, OEY2- und OEY3- Immunisierungen wurde zunächst durch eine *Dot-Blot*-Analyse der Kaninchen-Seren überprüft. Dabei zeigten die anti-OEY1-Seren der Kaninchen A und B eine Wechselwirkung sowohl mit dem OEY1-Antigen als auch mit einem Hepatozyten-Lysat (Tab. 5-7). Eine unspezifische Kreuzreaktion zwischen den entsprechenden Präimmunseren und dem OEY1-Peptid bzw. dem *Chang-Liver*-Lysat trat nicht auf, während bei den Präimmunseren der zur OEY2- und OEY3-Immunisierung eingesetzten Kaninchen C - F in einigen Fällen unspezifische Reaktionen beobachtet

wurden. Eine spezifische Wechselwirkung zwischen den OEY2-Antisera und dem OEY2-Peptid blieb dagegen aus. Die Ergebnisse der *Dot-Blot*-Analysen sind in der Tabelle 5-7 zusammengefaßt.

**Tab. 5-7:** Ergebnisse der *Dot-Blot*-Analysen der Kaninchen-anti-OEY1-, OEY2- und OEY3-Seren. Bewertung der Farbreaktion: +++ = sehr starkes Farbsignal; ++ = starkes Farbsignal; + = schwaches Farbsignal; +/- = sehr schwaches Farbsignal; - = kein Farbsignal.

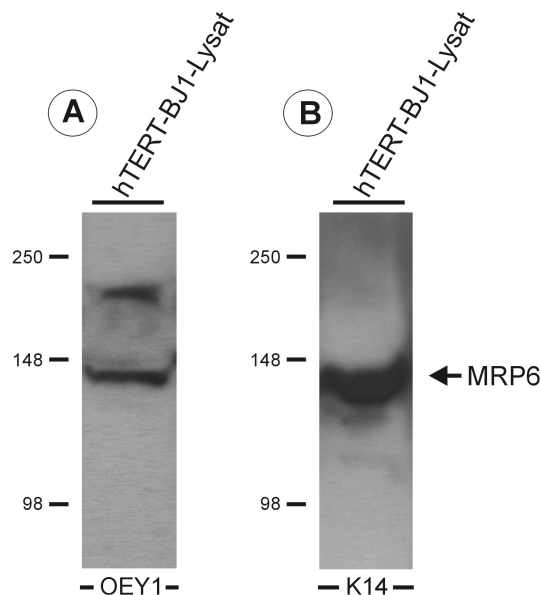
Antigen \ Serum / Verdünnung	Präimmuns- serum		Serum nach 1. Immunisierung			Serum nach 2. Immunisierung			Serum nach 3. Immunisierung		
	1:100	1:1000	1:10	1:100	1:1000	1:10	1:100	1:1000	1:10	1:100	1:1000
<b>OEY1-Kaninchen A:</b>											
OEY1 (1 mg/mL)	-	-	+++	++	+	+++	+++	++	+++	++	+/-
Hepatozyten-Lysat	-	-	+++	+/-	+/-	++	++	+/-	++	+	+/-
<b>OEY1-Kaninchen B:</b>											
OEY1 (1 mg/mL)	-	-	++	+	-	+++	+++	++	+++	+++	+/-
Hepatozyten-Lysat	-	-	++	++	++	+++	+++	+/-	+++	+	+/-
<b>OEY2-Kaninchen C:</b>											
OEY2 (1 mg/mL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hepatozyten-Lysat	+	+/-	+++	+++	+	+	++	+	+++	++	+/-
<b>OEY2-Kaninchen D:</b>											
OEY2 (1 mg/mL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hepatozyten-Lysat	+	++	+++	+++	+	+++	++	+	+++	++	+
<b>OEY3-Kaninchen E:</b>											
OEY3 (1 mg/mL)	-	-	-	-	-	+	+/-	-	+++	+/-	-
Hepatozyten-Lysat	+++	+/-	+++	++	+/-	+++	+++	+/-	+++	+++	+/-
<b>OEY3-Kaninchen F:</b>											
OEY3 (1 mg/mL)	-	-	-	-	-	+++	-	-	+++	+	+/-
Hepatozyten-Lysat	+++	+/-	+++	++	+/-	+++	++	+/-	+++	++	+/-

Die OEY1-Antisera wurden aufgrund der positiven *Dot-Blot*-Ergebnisse in weiteren Analysen hinsichtlich ihrer MRP6-Spezifität untersucht.

### 5.3.1.3 Western-Blot-Analyse mit OEY1-Antiserum

Zur Kontrolle, ob die polyklonalen Kaninchen-anti-OEY1-Antikörper ebenfalls gegen das humane MRP6-Protein gerichtet sind, wurde ein Zellysat der humanen Fibroblasten-Zelllinie hTERT-BJ1 in einer SDS-PAGE aufgetrennt und einem *Western-Blot* unterworfen. Die anschließende Immundetektion erfolgte unter Verwendung der Kaninchen-anti-OEY1-Seren. Die anti-OEY1-*Western-Blot*-Analyse führte zu zwei starken Banden, die in der Abbildung 5-26-A dargestellt sind. Eine weitere *Western-Blot*-Analyse mit dem bereits etablierten

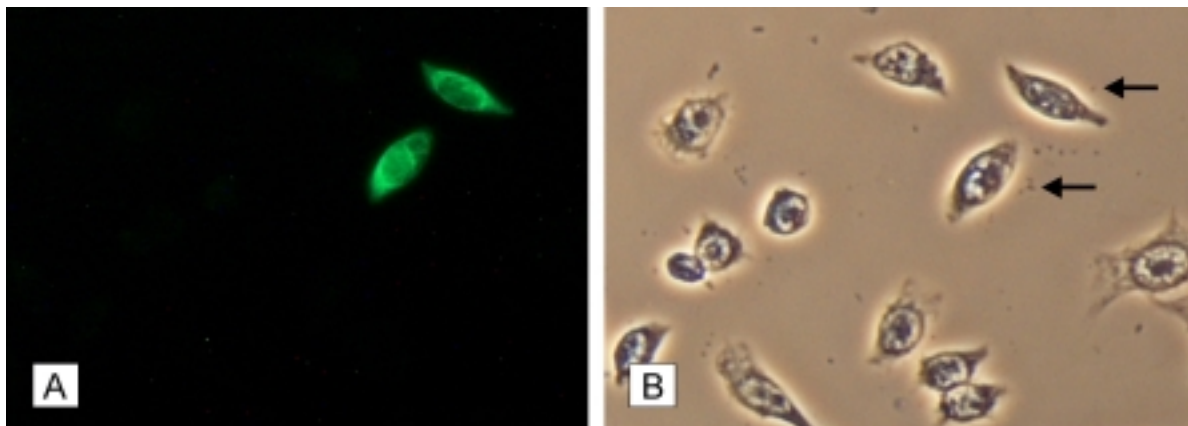
anti-MRP6-Antikörper K14 zeigte, daß es sich bei einer dieser Banden um MRP6 handelte (Abb. 5-26-B; Sinkó *et al.*, 2003; Madon *et al.*, 2000). Demzufolge konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich ein MRP6-spezifischer Kaninchen-Antikörper entwickelt werden, der die Untersuchung der MRP6-Expression z.B. in verschiedenen Zellkulturen mittels *Western-Blot*-Analyse in dieser und in weiteren Studien ermöglicht.



**Abb. 5-26:** MRP6-Immundetektion mit OEY1- und K14-Seren. Jeweils  $2 \times 10^6$  hTERT-BJ1-Zellen wurden lysiert, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und A) einer anti-OEY1- oder B) einer anti-K14-*Western-Blot*-Analyse unterworfen. Die relativen Molekulargewichte eines Protein-Größenstandards sind in kDa angegeben.

#### 5.3.1.4 Immunfluoreszenzmikroskopie mit OEY1-Antiserum

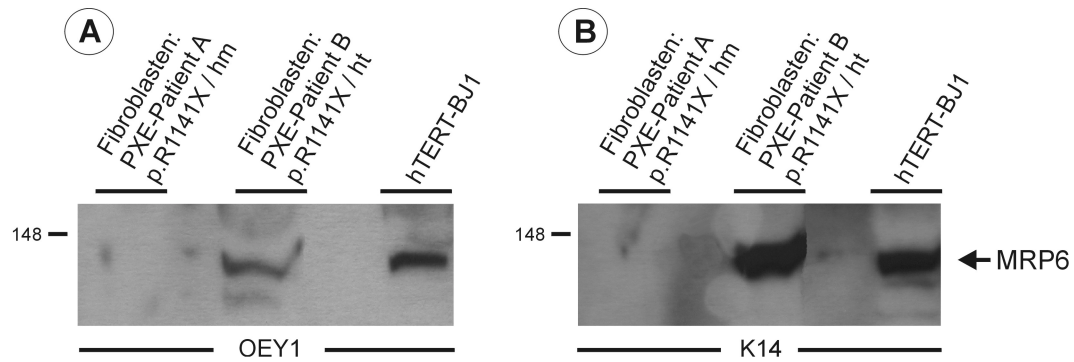
Um zu prüfen, ob die polyklonalen Kaninchen-anti-OEY1-Antikörper auch zur Untersuchung der MRP6-Expression mittels Immunfluoreszenzmikroskopie geeignet sind, wurden CHO-K1-Zellen zunächst mit dem Vektor pcDNA3.1(+)/MRP6 transfiziert. Anschließend sollte das humane MRP6-Protein mit dem Kaninchen-anti-OEY1-Serum immunologisch nachgewiesen werden. Zur Transfektionskontrolle wurde die MRP6-Immunfluoreszenz-Analyse mit dem bereits etablierten Ratte-anti-MRP6-Primärantikörper M6II-31 durchgeführt (Hu *et al.*, 2003c; Scheffer *et al.*, 2002). Während bei den Kontrollversuchen eindeutig zwischen den transfizierten und nicht-transfizierten CHO-K1-Zellen unterschieden werden konnte (Abb. 5-27), wurden bei der Fluoreszenzmikroskopie mit dem OEY1-Antikörper alle CHO-K1-Zellen gleich stark angefärbt. Dieses Ergebnis zeigt, daß der anti-OEY1-Antikörper nicht ausschließlich an humanem MRP6 sondern auch an anderen Proteinen bindet und somit für die Untersuchung der MRP6-Expression mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nicht geeignet ist.



**Abb. 5-27:** Expression und Immundetektion von humanem MRP6 in CHO-K1-Zellen nach einer Transfektion mit dem Vektor pcDNA3.1(+)/MRP6. A) Immunfluoreszenzmikroskopie pcDNA3.1(+)/MRP6-transfizierter CHO-K1-Zellen unter Verwendung des anti-MRP6-Antikörpers M6II-31 und eines FITC-konjugierten Sekundärantikörpers. B) Das mikroskopische Feld der Aufnahme A im Phasenkontrast. Die pcDNA3.1(+)/MRP6-transfizierten CHO-K1-Zellen sind mit einem Pfeil markiert. Alle Zellen sind 400-fach vergrößert dargestellt.

### 5.3.2 Untersuchung der MRP6-Expression in PXE-Fibroblasten

Zur Untersuchung der MRP6-Expression in Dermalfibroblasten von PXE-Patienten wurden die entsprechenden Zellysate einer SDS-PAGE und einem *Western-Blot* unterworfen. Die MRP6-Immundetektion erfolgte mit dem Kaninchen-anti-MRP6-Serum OEY1 und wurde mit dem anti-MRP6-Antikörper K14 verifiziert. Beide *Western-Blot*-Analysen zeigten, daß die Dermalfibroblasten des PXE-Patienten A, der ein homozygoter Träger der *ABCC6-Nonsense*-Mutation p.R1141X ist, kein MRP6-Protein exprimieren (Abb. 5-28). Dagegen lieferten die Dermalfibroblasten des PXE-Patienten B, bei dem außer einer heterozygoten p.R1141X-Mutation keine weitere *ABCC6*-Mutation identifiziert wurde, eine deutlich erkennbare MRP6-Bande (Abb. 5-28). Diesen Resultaten zufolge korreliert die MRP6-Expression mit den in dieser Studie ermittelten *ABCC6*-Genotypen der PXE-Patienten A und B und variiert in den Fibroblasten verschiedener PXE-Patienten.



**Abb. 5-28:** Untersuchung der MRP6-Expression in PXE-Dermalfibroblasten. Jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen wurden lysiert, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und A) einer anti-OEY1- oder B) einer anti-K14-*Western-Blot*-Analyse unterworfen. Die Fibroblasten stammen von PXE-Patienten, die entweder homozygote (PXE-Patient A) oder heterozygote (PXE-Patient B) Träger der *ABCC6*-Nonsense-Mutation p.R1141X sind. Als Positivkontrolle wurden hTERT-BJ1-Zellen eingesetzt. Das relative Molekulargewicht eines Protein-Größenstandards ist in kDa angegeben; hm = homozygot, ht = heterozygot.

## 5.4 Analyse des PXE-Phänotyps

### 5.4.1 Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei PXE-Patienten

Die in dieser Arbeit ermittelten Geno- und Phänotypen der PXE-Patienten und Angehörigen sind in der Tabelle 5-8 aufgeführt. Von den 53 PXE-Patienten erwiesen sich 8 als homozygote (15 %), 22 als gemischt heterozygote (42 %) und 18 als heterozygote (34 %) *ABCC6*-Mutationsträger. Folglich liegt bei 48 PXE-Betroffenen mindestens eine *ABCC6*-Mutation vor (91 %), während bei 5 Patienten keine *ABCC6*-Mutation identifiziert werden konnte (9 %). Das Vererbungsmuster der *ABCC6*-Mutationen, der Mutationstyp und die Position der Mutation innerhalb des MRP6-Proteins üben im untersuchten Patienten-Kollektiv keinen erkennbaren Einfluß auf die Ausprägung des PXE-Phänotyps aus. Hypertonie und Veränderungen im Bereich der Augen, der Haut, des Herzens, des Gastrointestinaltrakts und des vaskulären Systems wurden bei der Beurteilung des PXE-Phänotyps berücksichtigt. Die einzelnen Symptome traten mit folgender Häufigkeit im Patienten-Kollektiv auf: Hautläsionen: 92 %, Augensymptome: 91 %, Hypertonie: 36 %, Gefäßveränderungen: 28 %, Herzerkrankungen: 17 % und Gastrointestinaltraktbeteiligung: 7 %. Die durchschnittliche Anzahl der PXE-Symptome und die zugehörige Standardabweichung betragen  $2,8 \pm 1,3$ . Eine signifikant positive Korrelation ( $p < 0.02$ ) konnte zwischen dem Alter der PXE-Patienten und der Anzahl der PXE-betroffenen Organe beobachtet werden, d.h. mit zunehmendem Alter erhöht sich die Anzahl der PXE-spezifischen Symptome.

**Tab. 5-8:** Genotypen und Phänotypen der PXE-Patienten und ihrer Angehörigen. N = Anzahl der PXE-spezifischen Symptome; m = männlich; w = weiblich; cht = gemischt (*compound*) heterozygot; ht = heterozygot; hm = homozygot; wt = Wildtyp; A = Augen; G = Gastrointestinaltrakt; H = Haut; He = Herz; Ht = Hypertonie; V = vaskuläres System. Die PXE-Familien sind fortlaufend nummeriert; die einzelnen Mitglieder einer Familie werden durch nachgestellte Zahlen erfaßt. Mutationen, die im Rahmen dieser Arbeit erstmalig identifiziert wurden, sind in Fettdruck dargestellt.

Familie-Proband	Geschlecht / Alter		PXE-Patient / Diagnose		Genotyp			Phänotyp		
					ABCC6-Mutation: Status			Organbeteiligung	N	
1	m	36	ja	11	p.R1141X	p.R1141X		hm	A, H, G	3
2	w	44	ja	39	p.R1141X	p.R1141X		hm	A, H, G, Ht	4
3	w	41	ja	7	p.R1141X	p.R1141X		hm	A, H	2
4	w	46	ja	19	p.R1141X	p.R1141X		hm	A, H, Ht	3
5	w	59	ja	55	<b>c.37-1G&gt;A</b>	<b>c.37-1G&gt;A</b>		hm	A, H, Ht	3
6	w	64	ja	16	c.4182delG	c.4182delG		hm	A, H, He, V, Ht	5
7	w	24	ja	15	<b>c.4434delA</b>	<b>c.4434delA</b>		hm	A, H	2
8	m	60	ja	23	p.Q378X	p.R1141X		cht	A, H	2
9-1	w	79	ja	65	c.2787+1G>T	p.R1141X		cht	A, H, Ht	3
9-2	w	51	nein	/	p.R1141X			ht		0
10	w	55	ja	35	p.Q378X	c.2787+1G>T		cht	A, H, G, He, V, Ht	6
11	w	47	ja	14	c.1995delG	c.2787+1G>T		cht	H	1
12	w	36	ja	24	c.2787+1G>T	c.4182delG		cht	A, H	2
13	w	56	ja	8	p.R1141X			ht	A, H	2
14	m	72	ja	55	p.R1141X			ht	E, S, H, V	4

Familie- Proband	Geschlecht / Alter		PXE-Patient / Diagnose		Genotyp				Phänotyp	
					ABCC6-Mutation: Status				Organ- beteiligung	N
15	w	69	ja	51	c.1995delG	p.R765Q		cht	A, H	2
16-1	w	19	ja	11	<b>p.R760W</b>	p.R1141X		cht	H	1
16-2	w	55	nein	/	p.R1141X			ht		0
17	w	59	ja	50	p.R1141X	<b>p.G1311E</b>		cht	A, H, He, V, Ht	5
18	m	55	ja	32	p.R1141X	<b>p.Y1239H</b>		cht	A, H	2
19-1	m	63	ja	53	<b>p.L252F</b>	<b>p.V415A</b>	p.R765Q	cht	A, He	2
19-2	w	58	ja	48	<b>p.L252F</b>	<b>p.V415A</b>	p.R765Q	cht	A, H	2
20	m	54	ja	44	c.3775delT			ht	A, H, V, Ht	4
21	m	52	ja	43	p.R1141X			ht	A, H, Ht	3
22-1	m	47	ja	36	p.R518X			ht	A, H, G, He, V	5
22-2	m	45	ja	34	p.R518X			ht	A, H, He	3
22-3	m	17	nein	/				wt		0
23	w	35	ja	22	<b>p.W38S</b>			ht	A, H, Ht	3
24	w	40	ja	30				wt	A	1
25-1	m	58	ja	46	p.R1141X			ht	A, H, Ht	3
25-2	m	19	ja	10	p.R1141X			ht	H	1
25-3	w	46	ja	18	<b>p.R487Q</b>			ht	A, H, V	3
25-4	w	50	nein	/	p.R1141X			ht		0
25-5	w	60	nein	/	p.R1141X			ht		0
25-6	w	81	nein	/				wt		0
26	w	63	ja	30	p.Q378X	<b>p.R1114H</b>		cht	A, H, Ht	3
27-1	w	59	ja	49	p.R1314Q			ht	A, Ht	2
27-2	m	29	nein	/	p.R1314Q			ht		0
28	w	30	ja	10	c.1995delG	<b>p.R1114C</b>		cht	A, H	2
29-1	m	67	ja	52	<b>p.L1063R</b>	p.R1141X		cht	A	1
29-2	w	39	nein	/	p.R1141X			ht		0
29-3	m	17	nein	/	p.R1141X			ht		0
29-4	w	15	nein	/				wt		0
30	w	50	ja	46	<b>p.M751K</b>	p.R1141X		cht	A, H, V	3
31-1	w	27	ja	24				wt	H	1
31-2	m	56	nein	/				wt		0
31-3	w	64	nein	/				wt		0
31-4	w	33	nein	/				wt		0
32	w	35	ja	19	<b>p.T1130M</b>	<b>p.T1130M</b>		hm	A, H	2
33-1	w	33	ja	19	c.2787+1G>T	p.W1241C		cht	A, H	2
33-2	m	63	nein	/	p.W1241C			ht	Ht	1
34	m	47	ja	15				wt	A, H, G, He, V, Ht	6
35	m	72	ja	63	<b>p.S1049A</b>	c.3736-1G>A	<b>p.S1403R</b>	cht	A, H	2
36	w	34	ja	16	c.2787+1G>T			ht	A, H	2
37	w	42	ja	8	p.R1141X	p.R1314W		cht	A, H, V	3
38	w	37	ja	20	<b>p.N497K</b>			ht	A, H	2
39	w	54	ja	33	<b>p.M751K</b>	p.R1141X		cht	A, H, V, Ht	4
40-1	m	53	ja	49	p.R1141X			ht	A, H, G, He, V	5
40-2	m	54	nein	/				wt	H	1
40-3	m	42	nein	/				wt		0
41-1	w	52	ja	38	p.R391G	p.R1141X		cht	A, H	2
41-2	w	43	ja	28	p.R391G	p.R1141X		cht	A, H	2
42	w	64	ja	58				wt	H, Ht	2
43-1	w	51	ja	27	p.R1141X			ht	A, H, Ht	3
43-2	w	18	ja	9				wt	A, H	2
43-3	w	54	ja	26	p.R1141X			ht	A, H, V, Ht	4
44-1	w	64	ja	49	p.R1138Q			ht	A, H, G, V	4
44-2	w	62	ja	48	p.R1138Q			ht	A, H, Ht	3
45	m	56	ja	25	p.R1141X	p.T1301I		cht	A, H, V	3

## 6 Diskussion

Die physiologische und pathologische Relevanz des MRP6-Proteins und der Einfluß der verschiedenen PXE-verursachenden *ABCC6*-Mutationen auf den Verlauf der PXE-Erkrankung sind bislang noch völlig ungeklärt. Die Suche nach neuen PXE-Mutationen und somit die Identifizierung des kompletten *ABCC6*-Mutationsspektrums sind daher bis heute Gegenstände der PXE-Grundlagenforschung. Analysen zur *ABCC6*-Transkription und Untersuchungen zur MRP6-Expression zählen ebenfalls zu den aktuellen Forschungsthemen und spielen eine Rolle bei der zukünftigen Klärung der PXE-Pathobiochemie.

### 6.1 Mutationanalyse des *ABCC6*-Gens bei PXE-Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig 53 deutsche PXE-Patienten und 16 nicht oder noch nicht betroffene Angehörige bezüglich des Auftretens von Sequenzvariationen im *ABCC6*-Gen untersucht. Dabei wurden zahlreiche nicht PXE-assoziierte Polymorphismen als auch verschiedene PXE-verursachende *ABCC6*-Mutationen mittels DHPLC detektiert und durch DNA-Sequenzierung identifiziert.

Die DHPLC ist eine relativ neue Methode zur Detektion von DNA-Sequenzvariationen, die auf einer Heteroduplexanalyse beruht, bei der partiell denaturierte Hetero- und Homoduplexe durch eine Ionenpaar-Umkehr-Phasen-HPLC voneinander getrennt werden (Xiao und Oefner, 2001). Das DHPLC-Verfahren ist durch kurze Analysezeiten und eine hohe Sensitivität bei der Identifizierung von Mutationen charakterisiert. In den meisten Fällen zeigten Proben mit einer bestimmten DNA-Alteration ein reproduzierbares Elutionsprofil, welches charakteristisch für die betreffende Sequenzvariation war. Hierdurch war eine Zuordnung der entsprechenden Proben zur jeweiligen *ABCC6*-Alteration ohne Sequenzierung jeder Einzelprobe möglich. Lieferten zwei Amplifikate mit verschiedenen Mutationen ein nahezu identisches Chromatogramm, konnte in der Regel über eine Änderung der DHPLC-Analysebedingungen eine Differenzierung der Elutionsprofile erzielt werden. Die Chromatogramme von Proben mit einer homozygoten Sequenzvariation ließen sich von solchen mit der gleichen heterozygoten Sequenzvariation – jeweils gemischt mit dem Wildtyp-DNA-Amplifikat – zum Teil nicht unterscheiden. Eine Zuordnung war in diesen Fällen jedoch problemlos über den Vergleich der Elutionsprofile der ungemischten Amplifikate möglich. Bei homozygot vorliegenden Sequenzvariationen wurde ein Elutionsprofil erhalten, das dem der Wildtypprobe glich, bei heterozygoten DNA-Alterationen wurde das für die Variation charakteristische Elutionsprofil beobachtet.



Unter optimierten Analysebedingungen ist die DHPLC eine schnelle, effiziente und zuverlässige Methode zur Detektion von Mutationen. Trotz der hohen Sensitivität der DHPLC-Methode besteht jedoch die Möglichkeit, daß Mutationen in den PCR-Produkten unentdeckt bleiben, wenn sie unter den gewählten DHPLC-Bedingungen nicht zu einem vom Wildtyp abweichenden Elutionschromatogramm führen. Die Mutationsanalyse einer Vielzahl von Genen ergab für das Verfahren der DHPLC mit anschließender Sequenzierung eine Mutationsdetektionsrate von 95 bis 100 % (Jones *et al.*, 1999; O'Donovan *et al.*, 1998). Ravnik-Glavač *et al.* konnten durch Optimierung der DHPLC-Analysebedingungen für 400 bekannte Mutationen im CFTR-Gen (*Cystic fibrosis transmembrane regulator*) eine Mutationsdetektionsrate von 100 % erreichen (Ravnik-Glavač *et al.*, 2002). Andere gegenwärtig angewendete Methoden zur Mutationsdetektion, wie z.B. die Einzelstrang-Konformationspolymorphismus-Analyse (SSCP-Analyse), sind durch eine geringere Sensitivität und deutlich mehr Zeit- und Arbeitsaufwand charakterisiert (Keller *et al.*, 2001; Hayashi und Yandell, 1993).

In dieser Arbeit konnten mittels DHPLC-Analyse 32 bekannte und bislang unbekannte PXE-verursachende *ABCC6*-Mutationen in deutschen PXE-Patienten detektiert werden. Diese beinhalteten 22 *Missense*-Mutationen (69 %), 4 Deletionen (13 %), 3 *Nonsense*-Mutationen (9 %) und 3 Spleißstellen-Alterationen (9 %). Die meisten der PXE-Mutationen traten in der Kohorte einmalig auf. Häufigere Mutationen waren die *Nonsense*-Mutation p.R1141X (26 %) und die Spleißstellen-Alteration c.2787+1G>T (6 %).

Frühere und aktuelle Studien, in denen PXE-Patienten anderer Nationalitäten untersucht wurden, lieferten ähnliche Ergebnisse: Die Mehrheit der PXE-verursachenden *ABCC6*-Mutationen trat vereinzelt auf (Chassaing *et al.*, 2004; Gheduzzi *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2003a; Le Saux *et al.*, 2001). Häufigere Mutationen waren die intragenische Deletion delEx23-29 und die *Nonsense*-Mutation p.R1141X. Während die delEx23-29-Deletion mit 28 % bei amerikanischen und 4 % bei europäischen PXE-Patienten zu finden war, kam die p.R1141X-Mutation mit 4 % bei amerikanischen und 28 % bei europäischen PXE-Betroffenen vor (Le Saux *et al.*, 2001). In den europäischen Ländern variierte die p.R1141X-Frequenz; sie betrug 30 % bei niederländischen (Hu *et al.*, 2003c), 26 % bei italienischen (Gheduzzi *et al.*, 2004) und 13 % bei französischen PXE-Patienten (Chassaing *et al.*, 2004). Außerdem wurde in Frankreich und Italien ein gehäuftes Auftreten der Mutationen p.R518X und p.R518Q beobachtet. Dabei lag der Anteil der beiden Variationen zusammen bei ungefähr 20 % (Chassaing *et al.*, 2004; Gheduzzi *et al.*, 2004). Im Rahmen dieser Studie trat die p.R518X-Mutation lediglich in einer Familie auf. Sowohl die p.R518Q-Mutation als auch die delEx23-29-Deletion lagen in der untersuchten Gruppe nicht vor (Götting *et al.*, 2004). Eine heterozygote Deletion des kompletten *ABCC6*-Gens konnte durch eine limitierte

Haplotypen-Analyse bei 51 der 53 PXE-Patienten (96 %) ausgeschlossen werden. Die homozygote Form der delABCC6-Mutation war bei keinem Probanden vorhanden.

Die in einer früheren Studie als neutrale Variation beschriebene DNA-Alteration p.W1241C wurde in dieser Arbeit bei einer PXE-Patientin in gemischt heterozygotem Status mit der PXE-Mutation c.2787+1G>T nachgewiesen (Le Saux *et al.*, 2001). Der nicht PXE-betroffene Vater dieser Patientin erwies sich als heterozygoter p.W1241C-Träger. Aufgrund der Segregation der gemischt heterozygoten Form der p.W1241C-Variation mit der PXE-Erkrankung wurde die p.W1241C-Mutation, deren Vorkommen in einer Kontrollgruppe von 100 Blutspendern sowohl in dieser als auch in der Studie von Le Saux *et al.* (2001) ausgeschlossen wurde, als PXE-verursachende ABCC6-Mutation eingestuft.

Die Mutationsdetektionsrate in der deutschen PXE-Patienten-Kohorte betrug 74 %, d.h. von 106 analysierten Allelen trugen 78 eine PXE-verursachende ABCC6-Mutationen. Dieser Wert korreliert mit den Mutationsdetektionsraten bisheriger PXE-Studien, die zwischen 55 % und 83 % lagen (Chassaing *et al.*, 2004; Gheduzzi *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2003b; Le Saux *et al.*, 2001). Von den 53 PXE-Patienten erwiesen sich 8 als homozygote (15 %), 22 als gemischt heterozygote (42 %) und 18 als heterozygote (34 %) ABCC6-Mutationsträger. Folglich wurde bei 48 PXE-Betroffenen (91 %) mindestens eine ABCC6-Mutation nachgewiesen. Bei 5 PXE-Patienten (9 %) konnte dagegen keine ABCC6-Mutation detektiert werden. Weitere, bislang unentdeckte PXE-verursachende Mutationen könnten z.B. in den ABCC6-Intronbereichen und in den regulatorischen Sequenzen der ABCC6-Promotorregion vorliegen (Arányi *et al.*, 2005). Das Vorkommen derartiger PXE-Mutationen wäre eine Erklärung für die oftmals beschriebene Existenz einer geringen Zahl von PXE-Patienten, bei denen keine Mutation in den ABCC6-Exons 1 - 31 gefunden wurde (Chassaing *et al.*, 2004; Gheduzzi *et al.*, 2004; Morcher *et al.*, 2003; Le Saux *et al.*, 2001).

In dieser als auch in anderen PXE-Studien waren die meisten der identifizierten ABCC6-Mutationen in den Exons 16 - 18, 24 und 28 - 30 lokalisiert, wobei die Anzahl der Mutationen in den Exons 24 und 28 - 30 überwog (Chassaing *et al.*, 2004; Gheduzzi *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2003b; Le Saux *et al.*, 2001). Die Exons 16 - 18 und 28 - 30 kodieren die NBDs 1 und 2 des MRP6-Proteins, während das Exon 24 den cytoplasmatischen Bereich zwischen der 15. und 16. Transmembranhelix kodiert (Le Saux *et al.*, 2001). Die hohe Anzahl der Mutationen in diesen Exons weist darauf hin, daß die betreffenden Domänen eine wichtige Rolle für die Funktion des MRP6-Proteins spielen. Die Tatsache, daß die Mehrheit der PXE-Mutationen in der zweiten NBD lokalisiert ist, läßt die Vermutung zu, daß die beiden NBDs des MRP6-Proteins und anderer ABC-Transportproteine in ihrer Funktion nicht äquivalent sind (Le Saux *et al.*, 2001). Transportstudien mit humanem MRP1, das dem MRP6-Protein in Bezug auf die

Aminosäuresequenz und die Struktur sehr ähnelt, zeigten, daß Mutationen in der NBD2 zu einem völligen Verlust der MRP1-Transportfunktion führen und zusätzlich die Nukleotidbindung der NBD1 beeinflussen (Renes *et al.*, 2000). Dagegen resultierten Mutationen in der NBD1 des MRP1-Proteins lediglich in einer bis zu 70 % verminderten Transportaktivität (Gao *et al.*, 2000; Hou *et al.*, 2000). Neuere MRP6-Untersuchungen belegen, daß *ABCC6*-Mutationen in der NBD2 zu einem Verlust der Transportfunktion des humanen MRP6-Proteins führen (Ilias *et al.*, 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 17 *ABCC6*-Variationen erstmalig detektiert. Zu diesen zählen 15 *Missense*-Mutationen, 1 Deletion und 1 Spleißstellen-Alteration. Alle 17 *ABCC6*-Variationen traten bei PXE-Betroffenen auf und waren bei Angehörigen nicht zu finden. Ihre Abwesenheit in einer Kontrollgruppe von 100 Blutspendern bekräftigt die Annahme, daß es sich bei den neuen DNA-Alterationen um PXE-verursachende Mutationen handelt. Die Deletion c.4434delA und die Spleißstellen-Alteration c.37-1G>A wurden in homozygoter Form bei denjenigen PXE-Patienten lokalisiert, bei denen eine heterozygote Deletion des kompletten *ABCC6*-Gens durch eine limitierte Haplotypen-Analyse nicht ausgeschlossen werden konnte. Demzufolge besteht die Möglichkeit, daß die beiden neuen Mutationen mit der *ABCC6*del-Mutation in gemischt heterozygoter Form vorliegen. Unabhängig vom tatsächlichen Genotypstatus wurden die Deletion c.4434delA und die Spleißstellen-Alteration c.37-1G>A im Rahmen dieser Studie als PXE-verursachende Mutationen eingestuft, da sie einen Leserasterwechsel in der *ABCC6*-cDNA bewirken, der vermutlich zu einem nicht funktionsfähigen MRP6-Protein oder zu einem MRP6-Verlust führt. Auch die 15 erstmalig beschriebenen *Missense*-Mutationen p.W38S, p.L252F, p.V415A, p.R487Q, p.N497K, p.M751K, p.R760W, p.S1049A, p.L1063R, p.R1114C, p.R1114H, p.T1130M, p.Y1239H, p.G1311E und p.S1403R wurden aufgrund ihres Auftretens in PXE-Betroffenen und ihrer Abwesenheit in PXE-Angehörigen und Kontrollpersonen den PXE-verursachenden Mutationen zugeordnet. Bei der Beurteilung der Pathogenität dieser neuen Mutationen wurde außerdem berücksichtigt, 1.) ob die Mutationen eine Aminosäure verändern, die in den MRP-Proteinen 1 - 8 als auch in den MRP6-Proteinen der Maus und der Ratte konserviert ist (Abb. 6-1), 2.) ob sie in funktionell wichtigen Bereich des MRP6-Proteins lokalisiert sind (Abb. 6-2), 3.) ob die heterozygoten Mutationen in den betreffenden PXE-Patienten in einem gemischt heterozygoten Genotypstatus auftreten (Tab. 6-1) und 4.) ob eine Segregation der Mutation mit der PXE-Erkrankung innerhalb der Familie zu beobachten ist (Tab. 6-1).

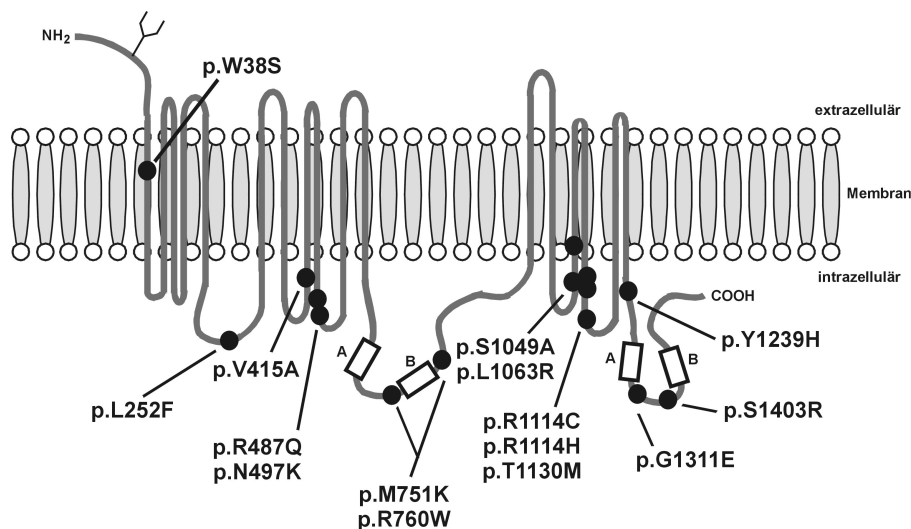
Ein Vergleich der Proteinsequenzen verschiedener MRP-Proteine zeigt, daß die 7 *Missense*-Mutationen p.W38S, p.R487Q, p.R760W, p.R1114C, p.R1114H, p.Y1239H und p.S1403R zum Austausch einer Aminosäure führen, die sowohl in den MRP-Proteinen 1 - 8 als auch in

<b>MRP6 Mutation:</b>		<b>p.W38S</b>	<b>p.L252F</b>	<b>p.V415A</b>	<b>p.R487Q</b>	<b>p.N497K</b>
Humanes	MRP6 (NP_001162):	G <b>V</b> VVP	SR <b>L</b> EK	VS <b>V</b> DV	DS <b>R</b> AR	LR <b>N</b> SK
Maus	MRP6 (NP_061265):	SS <b>V</b> VVP	SQ <b>L</b> ER	VSV <b>D</b> I	AS <b>R</b> AR	LRT <b>V</b> R
Ratte	MRP6 (NP_112275):	GS <b>V</b> VVP	SQ <b>L</b> ER	VSV <b>D</b> V	AS <b>R</b> AR	LRT <b>V</b> R
Humanes	MRP1 (NP_004987):	YL <b>W</b> AC	PV <b>L</b> VK	MS <b>V</b> DA	DN <b>R</b> IK	LN <b>G</b> IK
Humanes	MRP2 (NP_000383):	FL <b>W</b> LL	SK <b>F</b> ET	MS <b>V</b> DA	DK <b>R</b> LK	LS <b>G</b> IK
Humanes	MRP3 (SP_O15438):	YL <b>W</b> VA	QQ <b>L</b> LE	MS <b>V</b> DA	DS <b>R</b> IK	LN <b>G</b> IK
Humanes	MRP4 (SP_O15439):	--- <b>---</b>	EEL <b>Q</b> G	LS <b>N</b> DV	DA <b>R</b> IR	IT <b>G</b> IR
Humanes	MRP5 (SP_O15440):	--- <b>---</b>	RR <b>L</b> ER	CS <b>N</b> DG	DE <b>R</b> VQ	LT <b>Y</b> IK
Humanes	MRP7 (TR_Q8NHX7):	--- <b>---</b>	R <b>V</b> FQA	LG <b>T</b> DS	DA <b>R</b> VK	LS <b>G</b> IR
Humanes	MRP8 (TR_Q9BX80):	--- <b>---</b>	QR <b>L</b> HR	FT <b>G</b> DV	DQ <b>R</b> IR	LT <b>C</b> IK
<b>MRP6 Mutation:</b>		<b>p.M751K</b>	<b>p.R760W</b>	<b>p.S1049A</b>	<b>p.L1063R</b>	<b>p.R1114C</b>
Humanes	MRP6 (NP_001162):	Q <b>G</b> MNL	KQ <b>R</b> LS	R <b>F</b> SKE	DK <b>L</b> RS	LR <b>R</b> LE
Maus	MRP6 (NP_061265):	Q <b>G</b> MNL	KQ <b>R</b> LS	R <b>F</b> SKE	DK <b>L</b> RS	LR <b>R</b> LE
Ratte	MRP6 (NP_112275):	Q <b>G</b> MNL	KQ <b>R</b> LS	R <b>F</b> SKE	DK <b>M</b> RT	LR <b>R</b> LE
Humanes	MRP1 (NP_004987):	KG <b>V</b> NL	KQ <b>R</b> VS	R <b>F</b> SKE	EV <b>I</b> KM	LK <b>R</b> LE
Humanes	MRP2 (NP_000383):	KG <b>I</b> NL	KQ <b>R</b> IS	RF <b>A</b> GD	QS <b>L</b> RS	LR <b>R</b> LD
Humanes	MRP3 (SP_O15438):	KG <b>I</b> NL	RQ <b>R</b> VS	CF <b>S</b> KD	PV <b>I</b> LM	LK <b>R</b> LE
Humanes	MRP4 (SP_O15439):	RG <b>T</b> TL	KAR <b>V</b> N	RF <b>S</b> KD	LT <b>F</b> LD	VK <b>R</b> LE
Humanes	MRP5 (SP_O15440):	RG <b>A</b> NL	RQ <b>R</b> IS	RF <b>S</b> KD	FQ <b>A</b> EM	LK <b>R</b> LD
Humanes	MRP7 (TR_Q8NHX7):	KG <b>V</b> TL	RAR <b>I</b> A	RF <b>S</b> FD	FI <b>L</b> NI	LR <b>R</b> LG
Humanes	MRP8 (TR_Q9BX80):	RG <b>P</b> NL	KQ <b>R</b> IS	CF <b>A</b> GD	IF <b>S</b> EQ	FK <b>R</b> LE
<b>MRP6 Mutation:</b>		<b>p.R1114H</b>	<b>p.T1130M</b>	<b>p.Y1239H</b>	<b>p.G1311E</b>	<b>p.S1403R</b>
Humanes	MRP6 (NP_001162):	LR <b>R</b> LE	AE <b>T</b> FQ	QD <b>Y</b> AW	AS <b>G</b> LL	DL <b>S</b> VG
Maus	MRP6 (NP_061265):	LR <b>R</b> LE	AE <b>T</b> FQ	QD <b>Y</b> AR	AW <b>G</b> LL	DL <b>S</b> VG
Ratte	MRP6 (NP_112275):	LR <b>R</b> LE	AE <b>T</b> FQ	QD <b>Y</b> VH	TW <b>G</b> LL	DL <b>S</b> VG
Humanes	MRP1 (NP_004987):	LK <b>R</b> LE	NE <b>T</b> LL	KE <b>Y</b> SE	TL <b>G</b> LF	NL <b>S</b> VG
Humanes	MRP2 (NP_000383):	LR <b>R</b> LD	SE <b>T</b> VS	TE <b>Y</b> TK	TN <b>C</b> LF	NL <b>S</b> IG
Humanes	MRP3 (SP_O15438):	LK <b>R</b> LE	SE <b>T</b> VT	KE <b>Y</b> SK	TL <b>C</b> LF	NL <b>S</b> VG
Humanes	MRP4 (SP_O15439):	VK <b>R</b> LE	SS <b>S</b> LQ	IE <b>Y</b> TD	IS <b>A</b> LF	N <b>F</b> SVG
Humanes	MRP5 (SP_O15440):	LK <b>R</b> LD	TSS <b>I</b> Q	NH <b>Y</b> IK	GM <b>A</b> LF	N <b>F</b> SVG
Humanes	MRP7 (TR_Q8NHX7):	LR <b>R</b> LG	AD <b>T</b> LA	EE <b>Y</b> TC	LL <b>V</b> LF	SL <b>S</b> LG
Humanes	MRP8 (TR_Q9BX80):	FK <b>R</b> LE	LN <b>S</b> LQ	LQ <b>Y</b> MK	GM <b>A</b> LF	N <b>F</b> SVG

**Abb. 6-1:** Vergleich verschiedener MRP-Sequenzen. Die Zugangsnummern der MRP-Proteine in den Datenbanken *NCBI* (NP), *Swiss-Prot* (SP) und *TrEMBL* (TR) und die Positionen der PXE-Missense-Mutationen p.W38S, p.L252F, p.V415A, p.R487Q, p.N497K, p.M751K, p.R760W, p.S1049A, p.L1063R, p.R1114C, p.R1114H, p.T1130M, p.Y1239H, p.G1311E und p.S1403R sind angegeben. Aminosäuren, die sowohl in den MRP-Proteinen 1 - 8 als auch in den MRP6-Proteinen der Maus und der Ratte konserviert sind, wurden mit einem schwarzen Hintergrund unterlegt. Aminosäuren, die lediglich in einigen dieser MRPs oder nicht konserviert sind, wurden grau markiert.

den MRP6-Proteinen der Maus und der Ratte hoch konserviert ist (Abb. 6-1). Die *Missense*-Mutationen p.L252F, p.V415A, p.M751K, p.S1049A, p.L1063R, p.T1130M und p.G1311E bewirken dagegen eine Substitution von Aminosäuren, die lediglich in einigen dieser Proteine konserviert sind (Abb. 6-1). Die Aminosäure N<sup>497</sup> ist nicht konserviert. Allerdings tritt an der relevanten Position in allen MRP-Proteinen eine ungeladene Aminosäure auf (Abb. 6-1). Folglich könnte die Mutation p.N497K, die zu der basischen Aminosäure Lysin führt, einen entscheidenden negativen Einfluß auf die korrekte Faltung und somit auf die Funktion des MRP6-Proteins ausüben.

Von den 15 neuen *Missense*-Mutationen sind die meisten Alterationen in den NBDs und der cytoplasmatischen Schleife zwischen der 15. und 16. Transmembranhelix lokalisiert (Abb. 6-2). Dementsprechend treten diese Variationen in Bereichen auf, die für die Funktion des MRP6-Proteins sehr wahrscheinlich von essentieller Bedeutung sind.



**Abb. 6-2:** Lokalisation der 15 neuen PXE-*Missense*-Mutationen im transmembranen MRP6-Protein.

Das Auftreten der neuen *Missense*-Mutationen in überwiegend gemischt heterozygotem Status stellt einen weiteren Hinweis auf die Pathogenität dieser *ABCC6*-Variationen dar (Tab. 6-1). Im Falle der PXE-Patienten 19-1, 19-2 und 35 liegen darüber hinaus jeweils drei heterozygote DNA-Alterationen vor (Tab. 6-1). Ob die Kombination aus drei verschiedenen Variationen bei diesen Patienten die Ursache der PXE-Erkrankung ist, kann an dieser Stelle nicht eindeutig beurteilt werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß erst das gemeinsame Vorkommen dieser *ABCC6*-Mutationen zu einer Manifestation der Erkrankung führt und demzufolge jede dieser DNA-Alterationen ein pathogenes Potential besitzt. Da von der Mehrheit der PXE-Patienten keine DNA-Proben von direkten Angehörigen zur Verfügung standen, konnte eine potentielle Segregation der neuen *ABCC6*-*Missense*-Mutationen mit der PXE-Erkrankung in den meisten Fällen nicht untersucht werden. Lediglich in den PXE-

Familien 16 und 29 lieferten die ermittelten Genotypen der PXE-Betroffenen und Angehörigen zusätzliche Informationen über die Pathogenität der neuen Variationen p.R760W und p.L1063R. Beide Alterationen traten in PXE-Patienten in gemischt heterozygoter Form mit der PXE-verursachenden *Nonsense*-Mutation p.R1141X auf, während in nicht betroffenen Familienmitgliedern entweder keine PXE-Mutation oder lediglich eine heterozygote p.R1141X-Mutation vorlag (Tab. 6-1). Das gemischt heterozygote Vorkommen der Variationen p.R760W und p.L1063R korreliert demnach mit dem Auftreten der PXE-Erkrankung.

**Tab. 6-1:** Genotypen der PXE-Patienten, die Träger der neuen PXE-*Missense*-Mutationen sind, und ihrer Angehörigen. Mutationen, die im Rahmen dieser Arbeit erstmalig identifiziert wurden, sind in Fettdruck dargestellt. M = männlich; w = weiblich; cht = gemischt (*compound*) heterozygot; ht = heterozygot; hm = homozygot; wt = Wildtyp. Die PXE-Familien sind nummeriert; die einzelnen Mitglieder einer Familie werden durch nachgestellte Zahlen erfaßt.

Familie- Proband	Geschlecht / Alter		PXE-Patient / Verwandtschaftsbeziehung		Genotyp: <i>ABCC6</i> -Mutation / Status			
16-1	w	19	ja	PXE-Betroffene	<b>p.R760W</b>	p.R1141X		cht
16-2	w	55	nein	Mutter von 16-1	p.R1141X			ht
17	w	59	ja		p.R1141X	<b>p.G1311E</b>		cht
18	m	55	ja		p.R1141X	<b>p.Y1239H</b>		cht
19-1	m	63	ja	Bruder von 19-2	<b>p.L252F</b>	<b>p.V415A</b>	p.R765Q	cht
19-2	w	58	ja	Schwester von 19-1	<b>p.L252F</b>	<b>p.V415A</b>	p.R765Q	cht
23	w	35	ja		<b>p.W38S</b>			ht
25-1	m	58	ja	PXE-Betroffener	p.R1141X			ht
25-2	m	19	ja	Sohn von 25-1	p.R1141X			ht
25-3	w	46	ja	Großcousine von 25-1	<b>p.R487Q</b>			ht
25-4	w	50	nein	Ehefrau von 25-1	p.R1141X			ht
25-5	w	60	nein	Schwester von 25-1	p.R1141X			ht
25-6	w	81	nein	Mutter von 25-1				wt
26	w	63	ja		p.Q378X	<b>p.R1114H</b>		cht
28	w	30	ja		c.1995delG	<b>p.R1114C</b>		cht
29-1	m	67	ja	PXE-Betroffener	<b>p.L1063R</b>	p.R1141X		cht
29-2	w	39	nein	Tochter	p.R1141X			ht
29-3	m	17	nein	Enkel	p.R1141X			ht
29-4	w	15	nein	Enkelin				wt
30	w	50	ja		<b>p.M751K</b>	p.R1141X		cht
32	w	35	ja		<b>p.T1130M</b>	<b>p.T1130M</b>		hm
35	m	72	ja		<b>p.S1049A</b>	c.3736-1G>A	<b>p.S1403R</b>	cht
38	w	37	ja		<b>p.N497K</b>			ht
39	w	54	ja		<b>p.M751K</b>	p.R1141X		cht

Mit der Identifizierung der 17 neuen PXE-verursachenden *ABCC6*-Mutationen konnte im Rahmen dieser Arbeit ein entscheidender Beitrag zur Aufdeckung des vollständigen *ABCC6*-Mutationsspektrums bei PXE-Patienten geleistet werden. Obwohl der Einfluß der neuen und bekannten PXE-Mutationen auf die Ausprägung des PXE-Phänotyps bislang noch nicht geklärt werden konnte, tragen die Resultate zukünftig eventuell zur Erstellung von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen und zur Klärung der Molekularbiologie von PXE bei.

## 6.2 *ABCC6*-Sequenzvariationen bei AAA-Patienten

Aortenaneurysmen können durch zahlreiche pathogene Einflüsse verursacht werden, zu denen sowohl Umweltfaktoren als auch biochemische und genetische Mechanismen zählen (Belsley und Tilson, 2003; Strauss *et al.*, 2003). Sequenzvariationen in verschiedenen Genen konnten in aktuellen Studien als Risikofaktoren für die AAA-Genese identifiziert werden (Jones *et al.*, 2003; Strauss *et al.*, 2003; Schillinger *et al.*, 2002). Da der aneurysmale Prozeß multifaktoriell ist und bislang nur eine sehr begrenzte Anzahl von DNA-Alterationen bezüglich einer AAA-Assoziation untersucht wurden, steht die Analyse von Sequenzvariationen weiterer Gene, die möglicherweise die AAA-Entwicklung beeinflussen, im Fokus des Interesses.

Die AAA-Genese ist ebenso wie die Erkrankung PXE durch die Degradierung der extrazellulären Matrixkomponente Elastin gekennzeichnet (Satta *et al.*, 1998; Verloes *et al.*, 1996; Ramsbottom *et al.*, 1994). PXE führt unter anderem zu Veränderungen im vaskulären System und in einigen Fällen wurden aneurysmale Dilatationen diagnostiziert (Farmakis *et al.*, 2004; Gheduzzi *et al.*, 2003; Bertulezzi *et al.*, 1998). Basierend auf den histopathologischen Ähnlichkeiten der Erkrankungen AAA und PXE, wurde in dieser Studie das PXE-Kandidatengen *ABCC6* als AAA-Risikofaktor in Betracht gezogen.

Durch Mutationsanalyse ausgewählter *ABCC6*-Exons von 133 AAA-Patienten konnten in dieser Arbeit 5 verschiedene Sequenzvariationen identifiziert werden. Die Untersuchung wurde auf die *ABCC6*-Exons 16 - 18, 24 und 28 - 30 beschränkt, da diese wichtige Funktionsbereiche des MRP6-Proteins kodieren und laut dieser und anderer Studien die meisten Mutationen aufweisen (Hu *et al.*, 2003; Le Saux *et al.*, 2001). Zur Klärung, ob die *ABCC6*-Alterationen mit dem Krankheitsbild AAA assoziiert sind, wurden die Frequenzen dieser DNA-Variationen in einer Kontrollgruppe von mindestens 120 Blutspendern ermittelt. Dabei zeigte sich, daß der Unterschied in der Allel-Frequenz zwischen den AAA-Patienten und den Blutspendern bei keiner der 5 Sequenzabweichungen statistisch signifikant war. Demzufolge konnte im Rahmen dieser Studie erstmalig gezeigt werden, daß *ABCC6*-Alterationen in den untersuchten Exons keinen Risikofaktor für die Genese von AAA darstellen.

Die statistische Aussagekraft der ermittelten Ergebnisse ist aufgrund der relativ geringen Kohortengrößen limitiert. Daher sollte die Validierung dieser initialen Resultate durch multizentrische Studien mit einem großen Patientenkollektiv erfolgen. Des weiteren könnten zukünftige Projekte die Mutationsanalyse der übrigen, bisher nicht untersuchten *ABCC6*-Exons beinhalten. Auch die Charakterisierung weiterer Gene, die an der AAA-Entwicklung

beteiligt sein könnten, wäre ein wichtiger Beitrag zur Identifizierung genetischer AAA-Risikofaktoren und somit zur Erforschung der AAA-Pathogenese.

### **6.3 Etablierung einer *ABCC6*-spezifischen *Real-Time*-PCR**

Ausgehend von der cDNA-Sequenz des humanen *ABCC6*-Gens wurde im Rahmen dieser Arbeit eine *ABCC6*-spezifische *Real-Time*-PCR entwickelt. Die Etablierung und Optimierung des Verfahrens erfolgte unter Anwendung des *LightCycler*-Systems. Eine Besonderheit der *LightCycler*-Technologie sind die kurzen Analysenzeiten, da durch die Verwendung von Glaskapillaren sehr hohe Temperaturübertragungsraten realisiert werden können. Das *Real-Time*-PCR-Verfahren beinhaltet gegenüber einer Standard-PCR den Vorteil, daß die Amplifikation der PCR-Produkte in Echt-Zeit verfolgt werden kann. Außerdem ermöglicht die *Real-Time*-PCR die relative Quantifizierung von mRNA in verschiedenen Zellkulturen und Geweben. Hierzu wird die Amplifikation des variabel exprimierten Zielgens mit der eines konstant exprimierten Haushaltsgens, das als interner Standard fungiert, korreliert. Bei der Auswahl des Standards sollte berücksichtigt werden, daß auch die Expression von Haushaltsgenen durchaus variieren kann und dementsprechend vor der Durchführung einer relativen Quantifizierung exakt analysiert werden muß (Schmittgen und Zakrajsek, 2000; Thellin *et al.*, 1999).

Unter Anwendung der etablierten und optimierten *ABCC6-Real-Time*-PCR konnte im Rahmen dieser Studie die *ABCC6*-cDNA einer humanen Hepatozyten-Zelllinie nachgewiesen und über den  $C_p$ -Wert quantitativ erfaßt werden. Zukünftig bildet die *ABCC6*-spezifische *Real-Time*-PCR die Grundlage für die relative *ABCC6*-mRNA-Quantifizierung in verschiedenen Zellkulturen und Geweben. In weiterführenden PXE-Projekten des Instituts für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin in Bad Oeynhausen wurde die *ABCC6-Real-Time*-PCR bereits erfolgreich zur relativen Quantifizierung von *ABCC6*-mRNA in Nieren- und Dermalfibroblasten-Zelllinien als auch in primären Dermalfibroblasten von PXE-Patienten eingesetzt. Auf diese Weise soll ermittelt werden, ob und wie stark die verschiedenen *ABCC6*-Mutationen der PXE-Patienten die *ABCC6*-mRNA-Synthese und somit die MRP6-Expression beeinflussen.

### **6.4 Untersuchung der MRP6-Expression**

Zum immunologischen Nachweis des MRP6-Proteins wurde im Rahmen dieser Arbeit ein polyklonaler Kaninchen-anti-MRP6-Antikörper entwickelt, der zur *Western-Blot*-Analyse eingesetzt werden kann. Da bislang keine Kaninchen-anti-MRP6-Antikörper erhältlich sind,



stellt dieser Antikörper ein wichtiges biochemisches Werkzeug zur Analyse der MRP6-Expression in humanen Zellen dar.

In dieser Studie konnte unter Einsatz des neuen Kaninchen-anti-MRP6-Antikörpers OEY1 eine qualitative Analyse der MRP6-Expression in Dermalfibroblasten von PXE-Patienten mit unterschiedlichem *ABCC6*-Genotyp bereits erfolgreich durchgeführt werden. Dabei stellte sich heraus, daß die Dermalfibroblasten eines PXE-Patienten, bei dem außer einer heterozygoten p.R1141X-*Nonsense*-Mutation keine weitere *ABCC6*-Mutation identifiziert werden konnte, im Vergleich zu den Dermalfibroblasten eines PXE-Patienten mit homozygoter p.R1141X-Mutation durchaus MRP6 exprimieren. Demnach korreliert die MRP6-Expression mit den in dieser Studie ermittelten *ABCC6*-Genotypen dieser PXE-Patienten. Ob das MRP6-Protein des heterozygoten p.R1141X-Trägers eine verminderte Aktivität besitzt, die möglicherweise auf bislang unentdeckte PXE-Mutationen zurückzuführen ist, oder ob der Patient eine im Vergleich zu Kontrollpersonen verminderte MRP6-Expression hat, muß in weiterführenden Studien geklärt werden. Auch eine Beteiligung anderer genetischer PXE-Risikofaktoren kann den vorliegenden Ergebnissen zufolge nicht ausgeschlossen werden und sollte zukünftig untersucht werden.

## 6.5 Ausblick

Die Identifizierung von *ABCC6*-Mutationen kann neben dem pathohistologischen Nachweis kalzifizierter elastischer Fasern in PXE-betroffenen Hautpartien die Erstellung einer eindeutigen Diagnose der Erkrankung PXE stützen. Viele PXE-Patienten sind Träger seltener *ABCC6*-Mutationen. Daher ist die *ABCC6*-Mutationsanalyse möglichst großer PXE-Kohorten verschiedener Nationalitäten eine Voraussetzung für die Identifizierung des kompletten PXE-Mutationsspektrums. Das *Screening* weiterer PXE-Patienten wird daher auch zukünftig ein Gegenstand der PXE-Grundlagenforschung sein. Der Einfluß der verschiedenen *ABCC6*-Mutationen auf die mRNA-Synthese und die MRP6-Expression, sollte ebenfalls in weiterführenden Projekten untersucht werden. Letztlich könnten derartige Analysen zur Erstellung von bislang nicht erkennbaren Genotyp-Phänotyp-Korrelationen führen. Hierzu würde auch die Formulierung einheitlicher Konsensus-Kriterien hinsichtlich des PXE-Phänotyps beitragen. Die Ausprägung der PXE-spezifischen Symptome könnte auch durch verschiedene Umwelteinflüsse oder durch Sequenzvariationen in anderen Genen, die in den Metabolismus des Bindegewebes involviert sind, beeinflusst werden. Die Erforschung dieser Zusammenhänge sollte daher ebenfalls ein Thema aktueller Untersuchungen sein. Eine weitere Herausforderung für die zukünftige Forschung stellt die Ermittlung des Substrats und der physiologischen Funktion des MRP6-Proteins dar. Dabei

sollten auch mögliche Wechselwirkungen von MRP6 mit physiologischen und xenobiotischen Molekülen, wie z.B. Zytokinen und Zytostatika, berücksichtigt und analysiert werden. Eine veränderte MRP6-Expression könnte dabei durch Anwendung des in dieser Arbeit entwickelten *Real-Time*-PCR-Verfahrens oder des neuen Kaninchen-anti-MRP6-Antikörper OEY1 aufgezeigt werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, welche Auswirkung eine gezielte Ausschaltung des MRP6-Proteins, z.B. durch interferierende RNA-Moleküle oder *ABCC6-Knock out*, auf die Komponenten der extrazellulären Matrix hat.

## 7 Literatur

- Akali, A.U., Sharpe, D.T. (2003). Cervical midline Z-plasty revision surgery for pseudoxanthoma elasticum. *Br. J. Plast. Surg.* **56**, 289-291.
- Ambudkar, S.V., Gottesman, M.M. (1998). ABC Transporters: Biochemical, cellular, and molecular aspects. *Method Enzymol.* **292**, 1-853.
- Belinsky, M.G., Chen, Z.S., Shchaveleva, I., Zeng, H., Kruh, G.D. (2002). Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6). *Cancer Res.* **62**, 6172-6177.
- Belinsky, M.G., Kruh, G.D. (1999). MOAT-E (ARA) is a full-length MRP/cMOAT subfamily transporter expressed in kidney and liver. *Brit. J. Cancer* **80**, 1342-1349.
- Belsley, S.J., Tilson, M.D. (2003). Two decades of research on etiology and genetic factors in the abdominal aortic aneurysm (AAA) with a glimpse into the 21st century. *Acta Chir. Belg.* **103**, 187-196.
- Bergen, A.A., Plomp, A.S., Schuurman, E.J., Terry, S., Breuning, M., Dauwerse, H., Swart, J., Kool, M., van Soest, S., Baas, F., ten Brink, J.B., de Jong, P.T.V.M. (2000). Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat. Genet.* **25**, 228-231.
- Bertulezzi, G., Paris, R., Moroni, M., Porta, C., Nastasi, G., Amadeo, A. (1998). Atrial septal aneurysm in a patient with pseudoxanthoma elasticum. *Acta Cardiol.* **53**, 223-225.
- Cai, L., Lumsden, A., Guenther, U.P., Neldner, S.A., Zach, S., Knoblauch, H., Ramesar, R., Hohl, D., Callen, D.F., Neldner, K.H., Lindpaintner, K., Richards, R.I., Struk, B. (2001). A novel Q378X mutation exists in the transmembrane transporter protein ABCC6 and its pseudogene: implications for mutation analysis in pseudoxanthoma elasticum. *J. Mol. Med.* **79**, 536-546.
- Cai, L., Struk, B., Adams, M.D., Ji, W., Haaf, T., Kang, H.L., Dho, S.H., Xu, X., Ringpfeil, F., Nancarrow, J., Zach, S., Schaen, L., Stumm, M., Niu, T., Chung, J., Lunze, K., Verrecchia, B., Goldsmith, L.A., Viljoen, D., Figuera, L.E., Fuchs, W., Lebwohl, M., Uitto, J., Richards, R., Hohl, D., Ramesar, R., Callen, D.F., Kim, U.J., Doggett, N.A., Neldner, K.H., Lindpaintner, K. (2000). A 500-kb region on chromosome 16p13.1

- contains the pseudoxanthoma elasticum locus: high-resolution mapping and genomic structure. *J. Mol. Med.* **78**, 36-46.
- Carlborg, U., Grönblad, E. (1955). The incidence of arteriosclerosis in pseudoxanthoma elasticum. *Acta Med. Scand.* **308**, 37-38.
- Chassaing, N., Martin, L., Mazereeuw, J., Barrié, L., Nizard, S., Bonafé, J.-L., Calvas, P., Hovnanian, A. (2004). Novel *ABCC6* mutations in pseudoxanthoma elasticum. *J. Invest. Dermatol.* **122**, 608-613.
- Clarkson, J.G., Altman, R.D. (1982). Angioid streaks. *Surv. Ophthalmol.* **26**, 235-246.
- Cotton, R.G., Scriver, C.R. (1998). Proof of "disease causing" mutation. *Hum. Mutat.* **12**, 1-3.
- Cunningham, J.R., Lippman, S.M., Renie, W.A., Francomano, C.A., Maumenee, I.H., Pyeritz, R.E. (1980). Pseudoxanthoma elasticum: treatment of gastrointestinal hemorrhage by embolization and observations on autosomal dominant inheritance. *Johns Hopkins Med. J.* **147**, 168-173.
- Darier, J. (1896). Pseudoxanthoma elasticum. *Monatsh. Prakt. Dermatol.* **23**, 609-617.
- Dean, M., Rzhetsky, A., Allikmets R. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* **11**, 1156-1166.
- De Paepe, A., Viljoen, D., Matton, M., Beighton, P., Lenaerts, V., Vossaert, K., De Bie, S., Voet, D., De Laey, J.J., Kint, A. (1991). Pseudoxanthoma elasticum: similar autosomal recessive subtype in Belgian and Afrikaner families. *Am. J. Med. Genet.* **38**, 16-20.
- Dreyer, R., Green, W.R. (1978). The pathology of angioid streaks: a study of twenty-one cases. *Trans. Pa. Acad. Ophthalmol.* **31**, 158-167.
- Eddy, D., Farber, E. (1962). Pseudoxanthoma elasticum. Internal manifestations. A report of cases and a statistical review of the literature. *Arch. Dermatol.* **86**, 729-740.

- Farmakis, D., Vesleme, V., Papadogianni, A., Tsaftaridis, P., Kapralos, P., Aessopos, A. (2004). Aneurysmatic dilatation of ascending aorta in a patient with beta-thalassemia and a pseudoxanthoma elasticum-like syndrome. *Ann. Hematol.* **11**, 11.
- Gao, M., Cui, H.R., Loe, D.W., Grant, C.E., Almquist, K.C., Cole, S.P., Deeley, R.G. (2000). Comparison of the functional characteristics of the nucleotide binding domains of multidrug resistance protein 1. *J. Biol. Chem.* **275**, 13098-13108.
- Germain, D.P., Perdu, J., Remones, V., Jeunemaitre, X. (2000). Homozygosity for the R1268Q mutation in MRP6, the pseudoxanthoma elasticum gene, is not disease-causing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **274**, 297-301.
- Gheduzzi, D., Guidetti, R., Anzivino, C., Tarugi, P., di Leo, E., Quaglino, D., Ronchetti, I.P. (2004). ABCC6 mutations in Italian families affected by pseudoxanthoma elasticum (PXE). *Hum. Mutat.* **24**, 438-439.
- Gheduzzi, D., Sammarco, R., Quaglino, D., Bercovitch, L., Terry, S., Taylor, W., Ronchetti, I.P. (2003). Extracutaneous ultrastructural alterations in pseudoxanthoma elasticum. *Ultrastruct. Pathol.* **27**, 375-384.
- Götting, C., Schulz, V., Hendig, D., Grundt, A., Dreier, J., Szliska, C., Brinkmann, T., Kleesiek, K. (2004). Assessment of a rapid-cycle PCR assay for the identification of the recurrent c.3421C>T mutation in the ABCC6 gene in pseudoxanthoma elasticum patients. *Lab. Invest.* **84**, 122-130.
- Grehn, F., Leydhecker, W. (1995). *Augenheilkunde*. Springer-Verlag Berlin, 26. Auflage.
- Grönblad, E. (1929). Angioid streaks-Pseudoxanthoma elasticum: vorläufige Mitteilung. *Acta Ophthalmol.* **7**, 329.
- Grönblad, E. (1958). Color photographs of angioid streaks in the late stages. *Acta Ophthalmol.* **36**, 472-474.
- Haimeur, A., Conseil, G., Deeley, R.G., Cole, S.P.C. (2004). The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr. Drug Metab.* **5**, 21-53.

- Hausser, I., Anton-Lamprecht, I. (1991). Early precinical diagnosis of dominant pseudoxanthoma elasticum by specific ultrastructural changes of the dermal elastic and collagen tissue in a family at risk. *Hum. Genet.* **87**, 693-700.
- Hayashi, K., Yandell, D.W. (1993). How sensitive is PCR-SSCP? *Hum. Mutat.* **2**, 338-346.
- Hendig, D., Schulz, V., Eichgrün, J., Szliska, C., Götting, C., Kleesiek, K. (2005). New ABCC6 gene mutations in German pseudoxanthoma elasticum patients. *J. Mol. Med.* **83**, 140-147.
- Higgins, C.F. (1992). ABC transporters: from microorganism to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 67-113.
- Hou, Y., Cui, L., Riordan, J.R., Chang, X. (2000). Allosteric interactions between the two non-equivalent nucleotide binding domains of multidrug resistance protein MRP1. *J. Biol. Chem.* **275**, 20280-20287.
- Hu, X., Plomp, A., Gorgels, T., ten Brink, J., Loves, W., Mannens, M., de Jong, P.T.V.M., Bergen, A.A. (2004). Efficient molecular diagnostic strategy for ABCC6 in pseudoxanthoma elasticum. *Genet. Test.* **8**, 292-300.
- Hu, X., Plomp, A., van Soest, S., Wijnholds, J., de Jong, P.T.V.M., Bergen, A.A. (2003a). Pseudoxanthoma elasticum: a clinical, histopathological, and molecular update. *Surv. Ophthalmol.* **48**, 424-438.
- Hu, X., Plomp, A., Wijnholds, J., Ten Brink, J., van Soest, S., van den Born, L.I., Leys, A., Peek, R., de Jong, P.T.V.M., Bergen, A.A. (2003b). ABCC6/MRP6 mutations: further insight into the molecular pathology of pseudoxanthoma elasticum. *Eur. J. Hum. Genet.* **11**, 215-224.
- Hu, X., Peek, R., Plomp, A., Ten Brink, J., Scheffer, G., van Soest, S., Leys, A., de Jong, P.T.V.M., Bergen, A.A. (2003c). Analysis of the frequent R1141X mutation in the ABCC6 gene in pseudoxanthoma elasticum. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 1824-1829.

- Ilias, A., Urban, Z., Seidl, T.L., Le Saux, O., Sinko, E., Boyd, C.D., Sarkadi, B., Varadi, A. (2002). Loss of ATP-dependent transport activity in pseudoxanthoma elasticum-associated mutants of human ABCC6 (MRP6). *J. Biol. Chem.* **277**, 16860-16867.
- Jacobi, H., Schreiber, G. (1997). Pseudoxanthoma elasticum. Skin changes as a marker of systemic illness. *Der Hautarzt* **48**, 191-194.
- Jones, A.C., Austin, J., Hansen, N., Hoogendorn, B., Oefner, P.J., Cheadle, J.P., O'Donovan, M.C. (1999). Optimal temperature selection for mutation detection by denaturing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis. *Clin. Chem.* **45**, 1133-1140.
- Jones, G.T., Phillips, V.L., Harris, E.L., Rossaak, J.I., Van Rij, A.M. (2003). Functional matrix metalloproteinase-9 polymorphism (C-1562T) associated with abdominal aortic aneurysm. *J. Vasc. Surg.* **38**, 1363-1367.
- Keller, G., Hartmann, A., Mueller, J., Höfler, H. (2001). Denaturing high pressure liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of somatic p53 mutations. *Lab. Invest.* **81**, 1735-1737.
- Kool, M., Van Der Linden, M., De Haas, M., Baas, F., Borst, P. (1999). Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer Res.* **59**, 175-182.
- Kruh, G.D., Zeng, H., Rea, P.A., Liu, G., Chen, Z.-S., Lee, K., Belinsky, M.G. (2001). MRP subfamily transporters and resistance to anticancer agents. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 493-501.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lebwohl, M.G., Distefano, D., Prioleau, P.G., Uram, M., Yannuzzi, L.A., Fleischmajer, R. (1982). Pseudoxanthoma elasticum and mitral-valve prolapse. *N. Engl. J. Med.* **307**, 228-231.

- Lebwohl, M., Neldner, K., Pope, F.M., De Paepe, A., Christiano, A.M., Boyd, C.D., Uitto, J., Mckusick, V.A. (1994). Classification of pseudoxanthoma elasticum: report of a consensus conference. *J. Am. Acad. Dermatol.* **30**, 103-107.
- Lebwohl, M., Schwartz, E., Lemlich, G., Lovelace, O., Shaikh-Bahai, F., Fleischmajer, R. (1993). Abnormalities of connective tissue components in lesional and non-lesional tissue of patients with pseudoxanthoma elasticum. *Arch. Dermatol. Res.* **285**, 121-126.
- Lederle, F.A., Johnson, G.R., Wilson, S.E., Chute, E.P., Littooy, F.N., Bandyk, D., Krupski, W.C., Barone, G.W., Acher, C.W., Ballard, D.J. (1997). Prevalence and associations of abdominal aortic aneurysm detected through screening. Aneurysm Detection and Management (ADAM) Veterans Affairs Cooperative Study Group. *Ann. Intern. Med.* **126**, 441-449.
- Le Saux, O., Beck, K., Sachsinger, C., Silvestri, C., Treiber, C., Göring, H.H.H., Johnson, E.W., De Paepe, A., Pope, F.M., Pasquali-Ronchetti, I., Bercovitch, L., Marais, A.S., Viljoen, D.L., Terry, S.F., Boyd, C.D. (2001). A spectrum of ABCC6 mutations is responsible for pseudoxanthoma elasticum. *Am. J. Hum. Genet.* **69**, 749-764.
- Le Saux, O., Beck, K., Sachsinger, C., Treiber, C., Göring, H.H.H., Curry, K., Johnson, E.W., Bercovitch, L., Marais, A.S., Terry, S.F., Viljoen, D.L., Boyd, C.D. (2002). Evidence for a founder effect for pseudoxanthoma elasticum in the Afrikaner population of South Africa. *Hum. Genet.* **111**, 331-338.
- Le Saux, O., Urban, Z., Tschuch, C., Csiszar, K., Bacchelli, B., Quaglino, D., Pasquali-Ronchetti, I., Pope, F.M., Richards, A., Terry, S., Bercovitch, L., De Paepe, A., Boyd, C.D. (2000). Mutations in a gene encoding an ABC transporter cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat. Genet.* **25**, 223-227.
- Madon, J., Hagenbuch, B., Landmann, L., Meier, P.J., Stieger, B. (2000). Transport function and hepatocellular localization of mrp6 in rat liver. *Mol. Pharmacol.* **57**, 634-641.
- Mansour, A.M., Shields, J.A., Annesley, W.H. Jr., el-Baba, F., Tasman, W., Tomer, T.L. (1988). Macular degeneration in angioid streaks. *Ophthalmologica* **197**, 36-41.



- Meloni, I., Rubegni, P., de Aloe, G., Bruttini, M., Pianigiani, E., Cusano, R., Seri, M., Mondillo, S., Federico, A., Bardelli, A.M., Andreassi, L., Fimiani, M., Renieri, A. (2001). Pseudoxanthoma elasticum: Point mutations in the ABCC6 gene and a large deletion including also ABCC1 and MYH11. *Hum. Mutat.* **18**, 85.
- Morcher, M., Hausser, I., Brandt, T., Grond-Ginsbach, C. (2003). Heterozygous carriers of pseudoxanthoma elasticum were not found among patients with cervical artery dissections. *J. Neurol.* **250**, 983-986.
- MSD-Manual der Diagnostik und Therapie (1993). MSD Sharp & Dohme GmbH, Urban und Schwarzenberg, München.
- Münch, G., Reitz, J. (1996). Krankheitslehre für Ausbildung und Praxis. Nikol Verlagsgesellschaft mbH, Hamburg.
- Neldner, K.H. (1988a). Pseudoxanthoma elasticum. *Int. J. Dermatol.* **27**, 98-100.
- Neldner, K.H. (1988b). Pseudoxanthoma elasticum. *Clin. Derm.* **6**, 83-92.
- Neldner, K.H. (1993). Pseudoxanthoma elasticum. Connective tissue and its heritable disorders, Wiley-Liss Inc., New York, USA, 425-436.
- Neldner, K.H., Struk, B. (2002). Pseudoxanthoma elasticum. Connective tissue and its heritable disorders, Wiley-Liss Inc., New York, USA, 561-583.
- Noji, Y., Inazu, A., Higashikata, T., Nohara, A., Kawashiri, M.A., Yu, W., Todo, Y., Nozue, T., Uno, Y., Hifumi, S., Mabuchi, H. (2004). Identification of two novel missense mutations (p.R1221C and p.R1357W) in the ABCC6 (MRP6) gene in a Japanese patient with pseudoxanthoma elasticum (PXE). *Intern. Med.* **43**, 1171-1176.
- Nolte, K.B. (2000). Sudden cardiac death owing to pseudoxanthoma elasticum: a case report. *Hum. Pathol.* **31**, 1002-1004.
- O'Donovan, M.C., Oefner, P.J., Roberts, S.C., Austin, J., Hoogendorn, B., Guy, C., Speight, G., Upadhyaya, M., Sommer, S.S., McGuffin, P. (1998). Blind analysis of denaturing high performance liquid chromatography as a tool for mutation detection. *Genomics* **52**, 44-49.

- Pohl, A., Devaux, P.F., Herrmann, A. (2005). Function of prokaryotic and eukaryotic ABC proteins in lipid transport. *Biochim. Biophys. Acta* **1733**, 29-52.
- Pope, F.M. (1974). Autosomal dominant pseudoxanthoma elasticum. *J. Med. Genet.* **11**, 152-157.
- Prisant, L.M., Mondy, J.S. 3rd (2004). Abdominal aortic aneurysm. *J. Clin. Hypertens.* **6**, 85-89.
- Pulkkinen, L., Nakano, A., Ringpfeil, F., Uitto, J. (2001). Identification of ABCC6 pseudogenes on human chromosome 16p: implications for mutation detection in pseudoxanthoma elasticum. *Hum. Genet.* **109**, 356-365.
- Ramsbottom, D., Fitzgerald, P., Grace, P.A., Mcanena, O., Burke, P., Collins, P., Johnson, A., Croke, D.T., Bouchier-Hayes, D. (1994). Biochemical and molecular genetic studies of abdominal aortic aneurysm in an Irish population. *Eur. J. Vasc. Surg.* **8**, 716-722.
- Renes, J., de Vries, E., Jansen, P., Müller, M. (2000). The (patho)physiological functions of the MRP family. *Drug Resist. Updat.* **3**, 289-302.
- Renie, W.A., Pyeritz, R.E., Combs, J., Fine, S.L. (1984). Pseudoxanthoma elasticum: high calcium intake in early life correlates with severity. *Am. J. Med. Genet.* **19**: 235-244.
- Rigal, D. (1881). Observation pour servir à l'histoire de la cheloide diffuse xanthélasmique. *Ann. Dermatol. Syphilol.* **2**, 491-501.
- Ringpfeil, F., Lebwohl, M.G., Christiano, A.M., Uitto, J. (2000). Pseudoxanthoma elasticum: mutations in the MRP6 gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 6001-6006.
- Ringpfeil, F., Nakano, A., Uitto, J., Pulkkinen, L. (2001). Compound heterozygosity for a recurrent 16.5-kb Alu-mediated deletion mutation and single-base-pair substitutions in the ABCC6 gene results in pseudoxanthoma elasticum. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 642-652.

- Sanger, F., Nickler, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463-5467.
- Satta, J., Laurila, A., Paakko, P., Haukipuro, K., Sormunen, R., Parkkila, S., Juvonen, T. (1998). Chronic inflammation and elastin degradation in abdominal aortic aneurysm disease: an immunohistochemical and electron microscopic study. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **15**, 313-319.
- Schachner, L., Young, D. (1974). Pseudoxanthoma elasticum with severe cardiovascular disease in child. *Am. J. Dis. Child* **127**, 571-575.
- Scheffer, G.L., Xiaofeng, H., Pijnenborg, A., Wijnholds, J., Bergen, A.A., Scheper, R.J. (2002). MRP6 (ABCC6) detection in normal human tissues and tumors. *Lab. Invest.* **82**, 515-518.
- Schillinger, M., Exner, M., Mlekusch, W., Domanovits, H., Huber, K., Mannhalter, C., Wagner, O., Minar, E. (2002). Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism is associated with abdominal aortic aneurysm. *Thromb. Res.* **106**, 131-136.
- Schmittgen, T.D., Zakrajsek, B.A. (2000). Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J. Biochem. Biophys. Methods* **46**, 69-81.
- Schneider, T., Apel, H.-P., Kuhlwein, A., Mensing, H., Schaeg, G. (1984). Groenblad-Strandberg syndrome. *Z. Hautkr.* **59**, 1290-1300.
- Schulz, V., Hendig, D., Szliska, C., Götting, C., Kleesiek, K. (2005). Novel mutations in the ABCC6 gene of German patients with pseudoxanthoma elasticum. *Hum. Biol.* **77**, 367-384.
- Secretan, M., Zografos, L., Guggisberg, D., Piguet, B. (1998). Chorioretinal vascular abnormalities associated with angioid streaks and pseudoxanthoma elasticum. *Arch. Ophthalmol.* **116**, 1333-1336.
- Selbsthilfegruppe für PXE-Erkrankte Deutschlands 1999 e.V. (2003). PXE-Report - Informationen für Mitglieder, Betroffene und Interessierte. Ausgabe Nr. 3, Dritter Jahrgang, Freudenberg.

- Sherer, D.W., Sapadin, A., Lebwohl, M.G. (1999). Pseudoxanthoma elasticum: an update. *Dermatology* **199**, 3-7.
- Shimizu, K. (1961). Mottled fundus in association with pseudoxanthoma elasticum. *Jpn. J. Ophthalmol.* **5**, 1-3.
- Sinkó, E., Ilias, A., Ujhelly, O., Homolya, L., Scheffer, G.L., Bergen, A.A., Sarkadi, B., Varadi, A. (2003). Subcellular localization and N-glycosylation of human ABCC6, expressed in MDCKII cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **308**, 263-269.
- Spittell, J.A. Jr. (1983). Hypertension and arterial aneurysm. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1**, 533-540.
- Strandberg, J. (1929). Pseudoxanthoma elasticum. *Z. Haut Geschlechtskr.* **31**, 689-694.
- Strauss, E., Waliszewski, K., Gabriel, M., Zapalski, S., Pawlak, A.L. (2003). Increased risk of the abdominal aortic aneurysm in carriers of the MTHFR 677T allele. *J. Appl. Genet.* **44**, 85-93.
- Struk, B., Cai, L., Zach, S., Ji, W., Chung, J., Lumsden, A., Stumm, M., Huber, M., Schaen, L., Kim, C.A., Goldsmith, L.A., Viljoen, D., Figuera, L.E., Fuchs, W., Munier, F., Ramesar, R., Hohl, D., Richards, R., Neldner, K.H., Lindpaintner, K. (2000). Mutations of the gene encoding the transmembrane transporter protein ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *J. Mol. Med.* **78**, 282-286.
- Struk, B., Neldner, K.H., Rao, V.S., St Jean, P., Lindpaintner, K. (1997). Mapping of both autosomal recessive and dominant variants of pseudoxanthoma elasticum to chromosome 16p13.1. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1823-1828.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., de Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotech.* **75**, 291-295.
- Trip, M.D., Smulders, Y.M., Wegman, J.J., Hu, X., Boer, J.M., ten Brink, J.B., Zwinderman, A.H., Kastelein, J.J., Feskens, E.J., Bergen, A.A. (2002). Frequent mutation in the ABCC6 gene (R1141X) is associated with a strong increase in the prevalence of coronary artery disease. *Circulation* **106**, 773-775.

- Uitto, J., Boyd, C.D., Lebowitz, M.G., Moshell, A.N., Rosenbloom, J., Terry, S. (1998). International centennial meeting on pseudoxanthoma elasticum: progress in PXE research. *J. Invest. Dermatol.* **110**, 840-842.
- Uitto, J., Pulkkinen, L., Ringpfeil, F. (2001). Molecular genetics of pseudoxanthoma elasticum: a metabolic disorder at the environment-genome interface? *Trends Mol. Med.* **7**, 13-17.
- Uitto, J., Shamban, A. (1987). Heritable skin diseases with molecular defects in collagen or elastin. *Dermatol. Clin.* **5**, 63-84.
- Van Soest, S., Swart, J., Tijmes, N., Sandkuijl, L.A., Rommers, J., Bergen, A.A. (1997). A locus for autosomal recessive pseudoxanthoma elasticum, with penetrance of vascular symptoms in carriers, maps to chromosome 16p13.1. *Genome Res.* **7**, 830-834.
- Verloes, A., Sakalihasan, N., Koulischer, L., Limet, R. (1995). Aneurysms of the abdominal aorta: familial and genetic aspects in three hundred thirteen pedigrees. *J. Vasc. Surg.* **21**, 646-655.
- Verloes, A., Sakalihasan, N., Limet, R., Koulischer, L. (1996). Genetic aspects of abdominal aortic aneurysm. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **800**, 44-55.
- Wang, J., Near, S., Young, K., Connelly, P.W., Hegele, R.A. (2001). ABCC6 gene polymorphism associated with variation in plasma lipoproteins. *J. Hum. Genet.* **46**, 699-705.
- Weber, K., Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.
- Weenink, A.C., Dijkman, G., De Meijer, P.H. (1996). Pseudoxanthoma elasticum and its complications: two case reports. *Neth. J. Med.* **49**, 24-29.
- White, J.V., Haas, K., Phillips, S., Comerota, A.J. (1993). Adventitial elastolysis is a primary event in aneurysm formation. *J. Vasc. Surg.* **17**, 371-381.

Wilhelm, K., Paver, K. (1972). Sudden death in pseudoxanthoma elasticum. *Med. J. Aust.* **2**, 1363-1365.

Xiao, W., Oefner, P.J. (2001). Denaturing high-performance liquid chromatography: a review. *Hum. Mutat.* **17**, 439-474.

## 8 Publikationen und Präsentationen

### 8.1 Publikationen

1. Götting, C., **Schulz, V.**, Hendig, D., Grundt, A., Dreier, J., Szliska, C., Brinkmann, T., Kleesiek, K. (2004). Assessment of a rapid-cycle PCR assay for the identification of the recurrent c.3421C>T mutation in the ABCC6 gene in Pseudoxanthoma elasticum patients. *Lab. Invest.* **84**, 122-130.
2. Hendig, D., **Schulz, V.**, Eichgrün, J., Szliska, C., Götting, C., Kleesiek, K. (2005). New ABCC6 gene mutations in German Pseudoxanthoma elasticum patients. *J. Mol. Med.* **83**, 140-147.
3. **Schulz, V.**, Hendig, D., Szliska, C., Götting, C., Kleesiek, K. (2005). Novel mutations in the ABCC6 gene of German patients with Pseudoxanthoma elasticum. *Hum. Biol.* **77**, 367-384.
4. **Schulz, V.**, Hendig, D., Schillinger, M., Exner, M., Domanovits, H., Raith, M., Szliska, C., Kleesiek, K., Götting, C. (2005). Analysis of mutations in the ABCC6 gene among patients with abdominal aortic aneurysm (AAA) and Pseudoxanthoma elasticum (PXE). *J. Vasc. Res.* (in Revision).
5. **Schulz, V.**, Hendig, D., Henjakovic, M., Szliska, C., Kleesiek, K., Götting, C. (2005). A further insight into the ABCC6 mutation spectrum of German patients with Pseudoxanthoma elasticum (PXE). *Hum. Mutat.* (in Vorbereitung).

### 8.2 Präsentationen

#### 8.2.1 Kongreßvorträge

1. **Schulz, V.** (2002). Molekulare Diagnostik des Pseudoxanthoma elasticum (PXE): Identifizierung neuer PXE-assoziiierter Mutationen im humanen ABCC6-Gen. 6. Hj. Staudinger Symposium der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und der Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin, Kloster Banz, September 2002.

2. **Schulz, V.** (2003). Untersuchungen zur Pathobiochemie und Molekularbiologie des Pseudoxanthoma elasticum (PXE). 2. Jahrestagung der Selbsthilfegruppe für PXE-Erkrankte Deutschlands 1999 e.V., Freudenberg, März 2003.
3. **Schulz, V.** (2003). Pseudoxanthoma elasticum (PXE): Identification of novel mutations in the human ABCC6 gene. Joint Annual Meeting of the German and Swiss Connective Tissue Society, Ulm, März 2003.
4. **Schulz, V.** (2004). Pseudoxanthoma elasticum (PXE). Aktueller Stand der Forschung in Bad Oeynhausen. 3. Jahrestagung der Selbsthilfegruppe für PXE-Erkrankte Deutschlands 1999 e.V., Freudenberg, März 2004.

### 8.2.2 Auszeichnungen

1. Kleesiek, K., Grundt, A., **Schulz, V.**, Szliska, C., Brinkmann, T., Götting, C. (2002). New Pseudoxanthoma elasticum (PXE) causing mutations in the human ABCC6 gene. 18th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyoto, Japan, Oktober 2002. *Clin. Chem. Lab. Med.* **40**, Special Suppl., 130.  
**Auszeichnung: Excellent Poster Award.**
2. Götting, C., Hendig, D., **Schulz, V.**, Szliska, C., Kleesiek, K. (2005). Detection of novel ABCC6 sequence variations in Pseudoxanthoma elasticum patients from German descent. 19th IFCC - AACC International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Orlando, Florida, USA, Juli 2005 (*im Druck*).  
**Auszeichnung: Distinguished Abstract Award of the National Academy of Clinical Biochemistry.**

### 8.2.3 Publizierte Kongreßbeiträge und Posterpräsentationen

1. **Schulz, V.**, Grundt, A., Szliska, C., Brinkmann, T., Götting, C., Kleesiek, K. (2002). Molekulare Diagnostik des Pseudoxanthoma elasticum (PXE): Identifizierung neuer PXE-assoziiierter Mutationen im humanen ABCC6-Gen. 6. Hj. Staudinger Symposium der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und der Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin, Kloster Banz, September 2002. *DG Klinische Chemie Mitteilungen* **33**, 73-74.



2. **Schulz, V.**, Grundt, A., Szliska, C., Brinkmann, T., Götting, C., Kleesiek, K. (2002). Molecular diagnostic of Pseudoxanthoma elasticum (PXE): Detection of PXE-causing mutations using a new real-time PCR method. Annual Meeting of the Austrian Societies of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Salzburg, Österreich, September 2002. *Wiener Klinische Wochenschrift* **114**, Suppl. 4, 24.
3. Kleesiek, K., Grundt, A., **Schulz, V.**, Szliska, C., Brinkmann, T., Götting, C. (2002). New Pseudoxanthoma elasticum (PXE) causing mutations in the human ABCC6 gene. 18th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Kyoto, Japan, Oktober 2002. *Clin. Chem. Lab. Med.* **40**, Special Suppl., 130.
4. **Schulz, V.**, Grundt, A., Szliska, C., Brinkmann, T., Götting, C., Kleesiek, K. (2002). Identification of new Pseudoxanthoma elasticum (PXE) associated mutations in the human ABCC6 gene using DHPLC analysis. Annual Meeting of the German Society of Clinical Chemistry and the German Society of Laboratory Medicine, Düsseldorf, November 2002. *J. Lab. Med.* **26**, 527.
5. **Schulz, V.**, Grundt, A., Szliska, C., Brinkmann, T., Götting, C., Kleesiek, K. (2002). Molecular diagnostic of Pseudoxanthoma elasticum (PXE): Development of a new and rapid real-time PCR method for the detection of PXE-causing mutations. Annual Meeting of the German Society of Clinical Chemistry and the German Society of Laboratory Medicine, Düsseldorf, November 2002. *J. Lab. Med.* **26**, 526.
6. **Schulz, V.**, Grundt, A., Szliska, C., Brinkmann, T., Götting, C., Kleesiek, K. (2003). Pseudoxanthoma elasticum (PXE): Identification of novel mutations in the human ABCC6 gene. Joint Annual Meeting of the German and Swiss Connective Tissue Society, Ulm, März 2003. *Abstractband*, 36.
7. Götting, C., **Schulz, V.**, Grundt, A., Hendig, D., Szliska, C., Brinkmann, T., Kleesiek, K. (2003). Molecular genetics of Pseudoxanthoma elasticum (PXE): New mutations in the human ABCC6 gene. 15th IFCC - FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Barcelona, Spanien, Juni 2003. *Clin. Chem. Lab. Med.* **41**, Special Suppl., 323.
8. **Schulz, V.**, Hendig, D., Szliska, C., Brinkmann, T., Götting, C., Kleesiek, K. (2003). Pseudoxanthoma elasticum: Allelic frequency of the c.3421C>T mutation in the ABCC6 gene of German PXE patients. Euregio Congress of Clinical Chemistry and Laboratory

- Medicine, Aachen, Oktober 2003. *Clin. Chem. Lab. Med.* **41**, A95.
9. Schön, S., Müller, S., Schöttler, M., Kuhn, J., **Schulz, V.**, Szliska, C., Brinkmann, T., Götting, C., Kleesiek, K. (2003). Identification of polymorphisms and mutations in the human Xylosyltransferase I (XT-I) gene by DHPLC in blood donors and Pseudoxanthoma elasticum (PXE) patients. Euregio Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Aachen, Oktober 2003. *Clin. Chem. Lab. Med.* **41**, A95.
  10. Schön, S., Müller, S., Schöttler, M., Kuhn, J., Prante, C., **Schulz, V.**, Szliska, C., Götting, C., Kleesiek, K. (2003). Detection of genetic variations in the human Xylosyltransferase genes XT-I and XT-II in blood donors and Pseudoxanthoma elasticum (PXE) patients. 14th Joint Meeting of the „Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie“, the „Netherlands Society for Glycobiology“ and the „Groupe Lillois de Glycobiologie“, Lille, Frankreich, November 2003. *Abstractband*, 26.
  11. **Schulz, V.**, Hendig, D., Szliska, C., Götting, C., Kleesiek, K. (2004). Distribution of the c.3421C>T mutation in the ABCC6 gene of German Pseudoxanthoma elasticum (PXE) patients. Annual Meeting of the German Connective Tissue Society, Jena, März 2004. *Abstractband*, 65.
  12. Schön, S., Müller, S., Schöttler, M., Kuhn, J., Prante, C., **Schulz, V.**, Szliska, C., Götting, C., Kleesiek, K. (2004). Detection of genetic variations in the human Xylosyltransferase genes XT-I and XT-II in blood donors and Pseudoxanthoma elasticum (PXE) patients. Annual Meeting of the German Connective Tissue Society, Jena, März 2004. *Abstractband*, 63.
  13. **Schulz, V.**, Hendig, D., Schillinger, M., Götting, C., Kleesiek, K. (2004). Mutational screening of the Pseudoxanthoma elasticum (PXE) candidate gene ABCC6 in abdominal aortic aneurysm (AAA) patients. Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Düsseldorf, November 2004. *Clin. Chem. Lab. Med.* **42**, A143.
  14. Hendig, D., **Schulz, V.**, Eichgrün, J., Szliska, C., Götting, C., Kleesiek, K. (2004). Novel mutations in the ABCC6 gene of German patients with Pseudoxanthoma elasticum. Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Düsseldorf, November 2004. *Clin. Chem. Lab. Med.* **42**, A122-123.

15. **Schulz, V.**, Hendig, D., Schillinger, M., Kleesiek, K., Götting, C. (2005). Absence of mutations in the Pseudoxanthoma elasticum (PXE) candidate gene ABCC6 among patients with abdominal aortic aneurysm (AAA). First Joint Meeting of the French and German Connective Tissue Societies, Köln, März 2005. *Abstractband*, P107.
16. Hendig, D., **Schulz, V.**, Szliska, C., Kleesiek, K., Götting, C. (2005). Analysis of the mutational spectrum of the ABCC6 gene in Pseudoxanthoma elasticum patients from German descent comprises new sequence variations. First Joint Meeting of the French and German Connective Tissue Societies, Köln, März 2005. *Abstractband*, P47.
17. Kleesiek, K., **Schulz, V.**, Hendig, D., Schillinger, M., Götting, C. (2005). Mutational analysis of the ABCC6 gene among patients with abdominal aortic aneurysm (AAA). 16th IFCC - FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Glasgow, Schottland, Großbritannien, Mai 2005. *Clin. Chim. Acta* **355**, S163.
18. Götting, C., Hendig, D., **Schulz, V.**, Szliska, C., Kleesiek, K. (2005). Detection of novel ABCC6 sequence variations in Pseudoxanthoma elasticum patients from German descent. 19th IFCC - AACC International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Orlando, Florida, USA, Juli 2005. (*im Druck*).

## 9 Abkürzungsverzeichnis

### 9.1 Abkürzungen für Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
X	Stop-Kodon

### 9.2 Abkürzungen für Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
N	Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin

### 9.3 Sonstige Abkürzungen

A	Ampère
---	--------

Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
Amp	Ampicillin
ATCC	<i>American Typ Culture Collection</i>
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
c.	cDNA-Sequenz
cDNA	komplementäre ( <i>complementary</i> ) DNA
CHO	<i>Chinese hamster ovary cells</i>
cht	gemischt ( <i>compound</i> ) heterozygot
C <sub>p</sub>	<i>Crossing point</i>
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
dCTP	Desoxycytidintri-phosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtri-phosphat
del	Deletion
dest.	destilliert
dGTP	Desoxyguanosintri-phosphat
DHPLC	denaturierende Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtri-phosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintri-phosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAM	6-Carboxy-Fluoreszein
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FGM	<i>Fibroblast Growth Medium</i>
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde
hm	homozygot

ht	heterozygot
Ig	Immunglobulin
ins	Insertion
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
m	Milli
M	Molar
min	Minute
mRNA	Messenger RNA
MRP	<i>Multidrug resistance-associated protein</i>
MSM	Mikrosatellitenmarker
μ	Mikro
n	Nano
NBF	Nukleotid-bindende Schleife ( <i>nucleotid binding fold</i> )
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
p.	Proteinsequenz
p.A.	<i>pro analysis</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PBST	PBS mit Tween 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PXE	<i>Pseudoxanthoma elasticum</i>
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
sec	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Temperatur
Tab.	Tabelle

---

TBE	Tris-Borat-EDTA
TEAA	Triethylammoniumacetat
TMD	Transmembrandomäne
U	<i>Units</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid