
**Charakterisierung des
Pyrophosphatmetabolismus
bei Pseudoxanthoma elasticum**

Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

**Fakultät für Chemie
Universität Bielefeld**

vorgelegt von

Mareike Dabisch-Ruthe

Bielefeld / Bad Oeynhausen

Februar 2014

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von
Prof. Dr. med. Cornelius Knabbe
am Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin
Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen
Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum
in Bad Oeynhausen
in der Zeit von November 2010 bis Februar 2014.

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Uwe Manthe
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Cornelius Knabbe
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Sewald
Zusätzlicher Prüfer: Dr. rer. nat. Regina Brockhinke

Tag der Disputation: 10.04.2014

DANKSAGUNG

Viele Personen haben mich auf dem Weg zum Gelingen dieser Arbeit unterstützt, ihnen allen möchte ich für ihre Unterstützung danken und einige hier namentlich erwähnen.

Herrn Prof. Dr. med. Cornelius Knabbe danke ich für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Norbert Sewald möchte ich für die Bereitschaft danken, diese Dissertation als Gutachter zu betreuen und zu beurteilen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Doris Hendig für die Betreuung während der gesamten Doktorarbeit. Ihre Kompetenz, Hilfs- und Diskussionsbereitschaft haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Darüber hinaus danke ich der Selbsthilfegruppe für PXE-Erkrankte Deutschlands 1999 e.V. für die Bereitstellung des Probenmaterials zur Forschung im Rahmen dieser Arbeit. Insbesondere möchte ich mich bei Peter Hof und Lars Bauschke für ihr Engagement bedanken.

Meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen Dr. Dr. Ingvild Birschmann, Dr. Jens Dreier, Jessika Dumke, Marlen Ewald, Isabel Faust, Imke Grimm, Dr. Dennis Hinse, Dr. Joachim Kuhn, Patricia Kuzaj, Christoph Lichtenberg, Dr. Christian Prante, Dr. Christina Roch, Anne-Kathrin Vollmer, Dr. Tanja Vollmer und Dr. Jan Weile danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, viele gute Ideen und die gute Arbeitsatmosphäre. Ein ganz besonderes Dankeschön gilt Melanie Weinstock für ihre Freundschaft, ohne die diese Arbeit sicher nicht zum Abschluss gekommen wäre.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meiner ehemaligen Masterstudentin Kim-Kristin Prior sowie bei meinem ehemaligen Forschungspraktikanten Christian Bollmann.

An dieser Stelle möchte ich auch bei Frau Prof. Dr. Barbara Becker bedanken, die mein Interesse an der naturwissenschaftlichen Forschung geweckt und gefördert hat.

Die moralische Unterstützung, das Verständnis, die unendliche Geduld und die tatkräftige Unterstützung sowie die Begeisterung für meine Arbeit, die mir meine Familie und meine Freunde während meiner Promotionszeit entgegenbrachten, waren und sind nicht selbstverständlich. Darum geht an dieser Stelle ein besonders herzlicher Dank an meinen Mann Matthias Ruthe, meine Eltern Margret und Bernd Dabisch, meine Geschwister Christina und Matthias Dabisch, sowie an meine Schwiegereltern Annemarie und Gerhard Ruthe. Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

ZUSAMMENFASSUNG

Pseudoxanthoma elasticum (PXE) ist eine autosomal rezessive Erkrankung des Bindegewebes, welche durch progressive Kalzifizierung und Fragmentierung der elastischen Fasern in der Haut, der Bruchmembran des Auges sowie der Gefäßwände charakterisiert ist. Ursächlich für PXE sind Mutationen im ATP-Bindungskassettentransporter-Protein 6 (*ABCC6*). Ein Zusammenhang zwischen *ABCC6* und der Matrixkalzifizierung konnte bis heute nicht hergestellt werden. Insbesondere ist die Bedeutung von Pyrophosphat (PP_i) als wichtigster lokaler Regulator des Kalzifizierungsprozesses und die der PP_i -metabolisierenden Enzyme im Kalzifizierungsprozess bei PXE unklar.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden ausgewählte Sequenzvarianten in Genen PP_i -metabolisierender Enzyme auf eine mögliche Assoziation in einer PXE-Patienten- und einer Kontrollkohorte (jeweils $n = 190$) untersucht. Die Einzelnukleotidvarianten c.1190-65C>A im Gen der *Alkalischen Phosphatase*, c.313+9G>T im Gen der *Ektonukleotidpyrophosphatase 1* (*ENPP1*) und c.294C>T im *Ankylosis*-Gen kamen bei PXE signifikant häufiger vor. Für das krankheitsassoziierte Allel c.313+9T konnte eine hoch signifikante *Odds Ratio* von 27,96 (1,66-472,30; $P=0,0008$) detektiert werden, weshalb von einem starken Risikofaktor für PXE ausgegangen werden kann.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurde der Kalzifizierungsprozess dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten und gesunden Kontrollen unter dem Einfluss verschiedener Kalzifizierungsinduktoren untersucht. Dabei konnten erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentrationen in PXE-Fibroblasten detektiert werden, welche auf eine gestörte zelluläre Kalziumhomöostase hindeuten. Zum ersten Mal wurde gezeigt, dass die Regulation der kalzifizierungsinhibitorischen Proteine vom eingesetzten Kalzifizierungsinduktor abhängig ist. Des Weiteren konnte ein geeignetes Modellsystem für die Untersuchung der *in vitro*-Kalzifizierung bei PXE ohne den Einsatz von Phosphaten oder Kalzium zur Kalzifizierungsinduktion etabliert werden. In kalzifizierten PXE-Fibroblasten konnten erstmalig stark verminderte extrazelluläre Matrixmolekülexpressionen in Kombination mit hohen Expressionen der *Matrixmetalloproteinase 2* und *12* detektiert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die pathologische Kalzifizierung eine wichtige Rolle in der PXE-Pathogenese spielt.

Der Hauptaspekt dieser Arbeit war die Untersuchung der PP_i -Homöostase bei PXE. Erstmals konnte eine Beteiligung von *ABCC6* an der zellulären PP_i -Homöostase gezeigt werden. Dabei korrelierte eine signifikant erhöhte Matrixkalzifizierung mit signifikant reduzierter *ENPP1*-Expression und -Aktivität. Verglichen mit Kontrollzellen wurden in PXE-Fibroblasten signifikant reduzierte extra- (e) und intrazelluläre (i) PP_i -Konzentrationen detektiert. Die PXE-Fibroblasten kalzifizierten unter geringen PP_i -Konzentrationen im Medium, während die Kontrollzellen die reduzierten e PP_i -Konzentrationen mit der Generierung und dem Transport von i PP_i ausgleichen und so eine Kalzifizierung verhindern konnten. Diese Ergebnisse weisen auf eine Funktionsstörung in der PP_i -Bereitstellung aufgrund von PP_i -Transportdefekten und reduzierter *ENPP1*-Aktivität in PXE-Fibroblasten hin.

In einem letzten Teil dieser Arbeit wurde die Eigenschaft von PP_i als potentieller Kalzifizierungsinhibitor bei PXE untersucht. Eine Supplementation von PP_i führte im Zellkulturmodell zu einer signifikant reduzierten Kalzifizierung und deutet auf eine mögliche Kompensation der gestörten PP_i -Bereitstellung in PXE-Fibroblasten hin. Diese Ergebnisse liefern Hinweise auf eine potentielle Therapieoption für PXE-Patienten.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit PP_i erstmalig als Schlüsselmetabolit der PXE-Pathogenese und als Inhibitor der pathologischen Kalzifizierung bei PXE in einem neu etablierten Modellsystem, welches ohne Kalzifizierungsinduktor auskommt, beschrieben.

SUMMARY

Pseudoxanthoma elasticum (PXE) is a rare heritable disorder characterized by progressive calcification and fragmentation of elastic fibers in the extracellular matrix (ECM) of the skin, Bruch's membrane in the retina and the cardiovascular system. PXE is caused by mutations in the *ATP-binding cassette transporter gene 6* (*ABCC6*). Until today a link between *ABCC6* and matrix calcification has not been shown. In particular, the relevance of pyrophosphate (PP_i), an important inhibitor of basic calcium phosphate crystal growth in the ECM, and of PP_i metabolizing enzymes in the calcification process of PXE has not yet been studied.

In the first part of this study, functional single nucleotide variants (SNV) in candidate genes to be thought of as potential modifier genes associated with PXE were genotyped in PXE patient samples and controls (n=190 each). The results showed a significant association of the SNVs c.1190-65C>A in the *alkaline phosphatase* gene, c.313+9G>T in the *ectonucleotide pyrophosphatase 1* gene (*ENPP1*) and c.294C>T (p.A98A) in *ankylosis* gene with PXE. For the disease-related allele c.313+9T (*ENPP1*) a highly significant odds ratio of 27.96 (1.66-472.30; *P*=0.0008) was detected, which shows this allele to be a strong risk factor for PXE. Therefore, SNVs in PP_i metabolizing enzymes were identified as important cofactors for PXE.

The second part deals with analysis of the calcification process of dermal fibroblasts, isolated from skin biopsies taken from healthy controls and PXE patients, under the influence of different calcification inductors. In PXE fibroblasts significantly increased intracellular calcium levels were observed which point to an unbalanced cellular calcium homeostasis. The regulation of calcification-inhibiting proteins depends on the trigger used to induce calcification, which could be shown for the first time. Furthermore, an appropriate model system allowing *in vitro* calcification for PXE studies without the addition of phosphate or calcium to trigger calcification was established. In calcified PXE fibroblasts strongly diminished gene expression of ECM molecules combined with altered *matrix metalloproteinase 2* and *12* expression was proven. These results indicate that pathological calcification plays an important role in modified elastic fiber synthesis and assembly, which are suspected to be associated with PXE pathogenesis.

A major aspect of this work was to characterize PP_i homeostasis in PXE. For the first time an involvement of *ABCC6* in cellular PP_i homeostasis was shown. Here significantly intensified calcification of ECM structure correlated with significantly lowered *ENPP1* expression and activity. Compared to controls, significantly reduced extra (e) and intra (i) cellular PP_i concentrations were detected in PXE fibroblasts. PXE fibroblasts calcified at low ePP_i concentrations, whereas controls were able to compensate reduced ePP_i levels by generating iPP_i to avoid calcification. In conclusion, these results suggest a dysfunction in PP_i allocation in PXE fibroblasts due to PP_i transport defects and reduced *ENPP1* activity. For this reason, in the last part of this study the features of PP_i as a potential calcification inhibitor for PXE were analyzed. A supplementation of PP_i in the cell culture model led to significantly reduced calcification and suggests potential compensation of the disturbed PP_i generation in PXE fibroblasts. These findings present supplementation of PP_i as a promising drug to inhibit pathological calcification in PXE.

In summary, the results of this study describe PP_i as a key metabolite in the PXE pathogenesis and as an inhibitor of pathological calcification in PXE in a newly developed model system which does not require any calcification inductors.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Pseudoxanthoma elasticum (PXE)	1
1.1.1	Klinische Manifestation von PXE	1
1.1.2	Histopathologie von PXE	3
1.1.4	Das <i>ABCC6</i> -Gen und Protein	6
1.3	Biologische Kalzifizierung bei PXE	10
1.4	Die Bedeutung der extrazellulären Matrix für die Kalzifizierung bei PXE	11
1.5	Zielsetzung der Arbeit	13
2	MATERIAL	14
2.1	PXE-Patienten- und Kontrollkohorte	14
2.2	Humane Zelllinien	15
2.3	Medien und Reagenzien für die Zellkultur	16
2.4	Chemikalien und Reagenzien	16
2.5	Lösungen und Puffer	17
2.6	Enzyme	18
2.7	Reaktionssysteme	18
2.8	Längen- und Größenstandard	19
2.9	Oligonukleotide	19
2.9.1	Oligonukleotide für die relative mRNA-Quantifizierung	19
2.9.2	Oligonukleotide für die genetische Analyse von Sequenzvariationen	21
2.10	Sonstige Materialien	22
2.11	Software und Datenbanken	22
2.12	Geräte	23
3	METHODEN	24
3.1	Zellbiologische Methoden	24
3.1.1	Kultivierung von adhärent wachsenden, eukaryotischen Zellen	24
3.1.2	Passagieren von adhärent wachsenden, eukaryotischen Zellen	24
3.1.3	Bestimmung von Zellzahl und Vitalität	24
3.1.4	Kryokonservierung und Revitalisierung von eukaryotischen Zellen	25
3.1.5	Zellkultivierung unter kalzifizierenden Bedingungen	25
3.1.6	Ernte von adhärent wachsenden, eukaryotischen Zellen	25
3.1.7	Histochemische Alizarin-Rot-S-Färbung und Quantifizierung	26

3.2	Molekularbiologische Methoden	27
3.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllysaten	27
3.2.2	Isolierung von Gesamt-DNA aus Zelllysaten und aus EDTA-Blut	27
3.2.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	28
3.2.4	Bestimmung der RNA-Integrität	28
3.2.5	cDNA-Synthese aus isolierter Gesamt-RNA (reverse Transkription)	29
3.2.6	Amplifikation von DNA	29
3.2.6.1	Standard-Polymerase-Kettenreaktion	30
3.2.6.2	Temperatur-Gradienten-PCR	30
3.2.6.3	Relative quantitative <i>real-time</i> PCR	31
3.2.7	Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen	33
3.2.8	Nachweis von Einzelnukleotidvarianten mittels Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen-Analyse	34
3.2.9	Nachweis von Einzelnukleotidvarianten mittels allelspezifischer PCR	35
3.2.10	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	36
3.2.11	Sequenzierung von DNA-Fragmenten	36
3.2.11.1	Aufreinigung des Sequenzierreaktionsansatzes über Sephadex-Säulen	37
3.2.11.2	Analyse der DNA-Sequenzierungsprodukte mittels Kapillarelektrophorese	37
3.3	Proteinchemische Methoden	38
3.3.1	Bestimmung von Phosphat- und Gesamtproteingehalt	38
3.3.2	Messung von extra- und intrazellulären Kalzium	38
3.3.3	Bestimmung von extra- und intrazellulären Pyrophosphatkonzentrationen	38
3.3.4	Bestimmung von Matrix-Gla-Protein im Zellkulturüberstand	39
3.3.5	Bestimmung von Osteopontin im Zellkulturüberstand	40
3.3.6	Bestimmung der ALP-Aktivität	40
3.3.7	Bestimmung der ENPP1-Aktivität	41
3.3.8	Bestimmung der ABCC6-Proteinexpressionen	41
4	ERGEBNISSE	43
4.1	Identifizierung von PP_i -metabolisierenden genetischen Kofaktoren für PXE	43
4.2	Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Kalzifizierungsinduktoren auf die ektopische Kalzifizierung bei PXE	51
4.2.1	β -Glycerophosphat als Kalzifizierungsinduktor	51
4.2.2	Dinatriumhydrogenphosphat und Kalziumchlorid als Kalzifizierungsinduktoren	52
4.3	Untersuchungen zur Matrixkalzifizierung bei PXE	63
4.4	Untersuchung der Pyrophosphat-Homöostase bei PXE	66
4.5	Einfluss verschiedener Seren auf die Kalzifizierung bei PXE	72
4.6	Einfluss der Pyrophosphate auf die Matrixkalzifizierung bei PXE	77
5	DISKUSSION	80
5.1	Identifizierung von PP_i -metabolisierenden genetischen Kofaktoren für PXE	80
5.2	Einfluss verschiedener Kalzifizierungsinduktoren auf die ektopische Kalzifizierung bei PXE	83
5.3	Matrixkalzifikation bei PXE	88
5.4	Pyrophosphat-Homöostase bei PXE	90

5.5	Einfluss verschiedener Seren auf die Kalzifizierung bei PXE	92
5.6	Pyrophosphat als Kalzifizierungsinhibitor bei PXE	94
5.7	Ausblick	96
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
7	LITERATURVERZEICHNIS	X
8	PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN	XX
8.1	Publikationen in <i>peer-review</i> Zeitschriften	XX
8.2	Kongressvorträge	XX
8.3	Kongressbeiträge und Posterpräsentationen	XXI
9	ERKLÄRUNG	XXIII

1 EINLEITUNG

1.1 Pseudoxanthoma elasticum (PXE)

Pseudoxanthoma elasticum (PXE, Groenblad-Strandberg-Syndrom, OMIM 264800) ist eine autosomal, rezessiv vererbare Erkrankung des elastischen Bindegewebes, welche durch progressive Kalzifizierung und Fragmentierung der elastischen Fasern charakterisiert ist (Neldner und Struk 2002). PXE manifestiert sich in Haut- und Augenhintergrundsveränderungen sowie im kardiovaskulärem System (Plomp *et al.* 2010). Die geschätzte Prävalenz von PXE liegt weltweit zwischen 1:25.000 und 1:70.000, allerdings wird aufgrund der schwierigen Diagnostik eine Vielzahl unentdeckter Fälle vermutet (Chassaing *et al.* 2005; Plomp *et al.* 2010). Unter den PXE-Patienten überwiegt der Anteil der Frauen (Verhältnis 2:1), der Grund hierfür ist allerdings bis heute ungeklärt (Neldner und Struk 2002; Chassaing *et al.* 2005). 1881 wurden die typischen Hautveränderungen von PXE von dem französischen Dermatologen Rigal beschrieben (Rigal 1881). Darier benannte diese Hauterkrankung 1896 erstmals „Pseudoxanthoma elasticum“ (Darier 1896). Die schwedische Ophthalmologin Groenblad und der Dermatologe Strandberg entdeckten 1926 einen Zusammenhang zwischen den Haut- und Augenhintergrundsveränderungen, weshalb die Erkrankung auch unter dem Synonym Groenblad-Strandberg-Syndrom bekannt ist (Groenblad 1929; Strandberg 1929). Nach der Identifizierung des Genlocus auf Chromosom 16 im Jahr 1997 wurden im Jahr 2000 Mutationen im ATP-Bindungskassettentransporterprotein 6 der Subfamilie C (ABCC6) als ursächlich für PXE identifiziert (Bergen *et al.* 2000; Le Saux *et al.* 2000).

1.1.1 Klinische Manifestation von PXE

PXE manifestiert sich in pathologischen Veränderungen der elastischen Fasern in der extrazellulären Matrix (ECM) der Haut, der Bruchmembran in der Retina des Auges und der Gefäßwände. Die charakteristischen Hautveränderungen werden meist in der zweiten Lebensdekade als gelblich-orangefarbene Papeln (Xanthoma) an flexiblen Körperbereichen wie Hals und Achsel diagnostiziert (Abb. 1.1 A). Die kleinen Hautveränderungen breiten sich pflasterartig aus, bilden größere Plaques an unelastischer Haut (Abb. 1.1 B) und es kommt letztendlich zu einer starken Faltenbildung (Abb. 1.1 C) (Neldner und Struk 2002; Plomp *et al.* 2010). In den meisten Fällen sind die Hautläsionen asymptomatisch und daher ein kosmetisches Problem. Für die Schwere der Erkrankung sind Veränderungen des Augenhintergrundes und des vaskulären Systems ursächlich.



Abb. 1.1: Hautveränderungen bei PXE-Patienten. Gezeigt sind Papeln am Hals eines 10 Jahre alten Mädchens (A), Plaques am Hals einer 36-jährigen Frau (B), Papeln, Plaques und verminderte Hautelastizität bei einer 50 Jahre alten Frau (C) bearbeitet nach Plomp *et al.* (Plomp *et al.* 2010).

Die Veränderungen des Augenhintergrunds beginnen bei den meisten Patienten mit der sogenannten *Peau d'orange* der Retina (Orangenhaut), welche eine Hyperpigmentierung des Augenhintergrundes darstellt (Abb. 1.2 A). Später kommt es durch die Mineralisierung der elastischen Lamina der Bruchmembran und der damit verbundenen Trennung der Retina von der *Chorioidea*, zu angioiden Streifen im Auge. Angioide Streifen sind irreguläre, unregelmäßige und verzweigte pigmentierte Linien, die wie die Hautläsionen asymptomatisch sind und dauerhaft bleiben (Abb. 1.2 B). Im Verlaufe der Erkrankung reagiert die Aderhaut mit subretinaler Neovaskularisation bis hin zu Makulardegeneration und subretinalen Blutungen (Abb. 1.2 C). Dies kann zur Beeinträchtigung des Sehvermögens und letztendlich zum Sehverlust führen (Finger *et al.* 2009; Plomp *et al.* 2010).

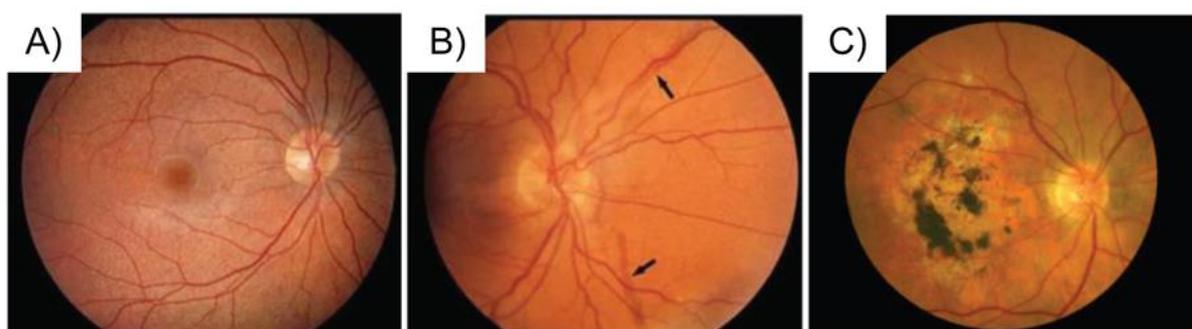


Abb. 1.2: Augenhintergrundveränderungen bei PXE-Patienten. Gezeigt sind die *Peau d'orange* der Retina (A), angioid Streifen (B, Pfeile) und Makulardegeneration (C) bearbeitet nach Plomp *et al.* (Plomp *et al.* 2010).

Des Weiteren manifestiert sich PXE im vaskulären System durch Arteriosklerose, Hypertonie, *Angina pectoris*, Myokardinfarkt und Schlaganfall. Fast 30 % aller PXE-Patienten leiden schon im Alter von 30 Jahren an der sogenannten Schaufenstererkrankung, der *Claudicatio intermittens* der unteren Extremitäten (Neldner 1988). Eine eindeutige Diagnose wird oft erschwert durch die beobachtete Heterogenität im Krankheitsbild, die sich in einer hohen Variabilität im Erkrankungsalter, Verlauf und Schwere der Symptomatik, selbst innerhalb von Familien, äußert (Hu *et al.* 2003). Eine verminderte Lebenserwartung der Patienten konnte bisher nicht beobachtet werden (Neldner und Struk 2002).

1.1.2 Histopathologie von PXE

In Hautbiopsien von PXE-Patienten zeigen sich verklumpte und fragmentierte Fasern vor allem in der mittleren Dermis und darüber hinaus im Kern der elastischen Fasern. Mittels Von-Kossa-Färbung lässt sich nachweisen, dass es sich hierbei vorwiegend um Kalzium-Phosphat-Ablagerungen (Hydroxylapatit, Abb. 1.3) handelt (Otkjaer-Nielsen *et al.* 1977).

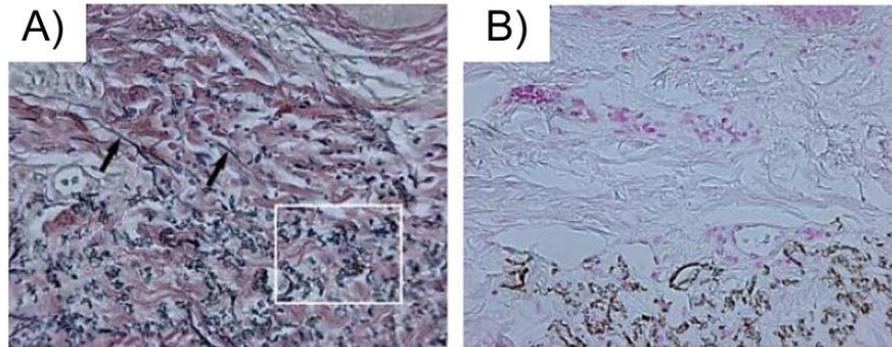


Abb. 1.3: Histologischer Schnitt einer Hautbiopsie eines PXE-Patienten. Gezeigt ist die Verhoeff-van Gieson-Färbung der elastischen Fasern (A) und die Von-Kossa-Färbung der Kalzium-Phosphat-Ablagerungen (B) einer betroffenen Hautregion modifiziert nach Plomp *et al.* (Plomp *et al.* 2010).

Die Kalzium-Phosphat-Ablagerungen sind vorwiegend in den elastischen Fasern zu finden, die sich neben der Dermis auch in der Bruch-Membran der Retina und dem vaskulären System befinden. Die Lokalisation der Veränderungen legt die Vermutung nahe, dass Fibroblasten in die Pathogenese der Erkrankung involviert sind. Bisher ist unklar, ob die Kalzifizierung der elastischen Fasern sekundär die Fragmentierung oder ob primär die Fragmentierung die Kalzifizierung bedingt. Neben der abnormalen Synthese der elastischen Fasern kommt es bei PXE auch zu einer vermehrten Ansammlung von ECM-Molekülen, u. a. von Proteoglykanen (Pasquali-Ronchetti *et al.* 1981; Contri *et al.* 1988; Götting *et al.* 2005; Hendig *et al.* 2008b). Unregelmäßigkeiten in Struktur und Zusammensetzung zeigen sich auch in den Kollagenfasern, die vor allem in einer abnormalen Anordnung der Fibrillen begründet ist (Pasquali-Ronchetti *et al.* 1981). In der unmittelbaren Umgebung der kalzifizierten elastischen Fasern von PXE-Patienten konnten Proteine, wie Osteopontin (OPN), Alkalische Phosphatase (ALP) und Fibronektion (FN) detektiert werden, die mit Ausnahme von OPN in der gesunden Dermis nicht auftreten (Contri *et al.* 1996).

1.1.3 Pathophysiologie von PXE

Die Entdeckung des *ABCC6*-Gens als genetische Ursache der PXE-Erkrankung war überraschend, da *ABCC6* hauptsächlich in der Leber und nur zu sehr geringen Teilen in den betroffenen Geweben exprimiert wird und zuvor eine Assoziation von PXE mit Genen aus der ECM vermutet wurde (Belinsky und Kruh 1999; Scheffer *et al.* 2002). Seither wird eine Verbindung zwischen dem *ABCC6*-Defekt und der Umstrukturierung der ECM, die bei PXE-Patienten scheinbar in Folge des *ABCC6*-Defektes auftritt, gesucht. Als Erklärung wurden zwei Hypothesen aufgestellt, die sich nicht notwendigerweise ausschließen müssen.

Die „metabolische Hypothese“ beschreibt PXE als eine Stoffwechselerkrankung und postuliert einen gestörten Efflux eines noch unbekanntes Substrates aus der Leber, wodurch es zu einem Mangel in der Peripherie kommt (Uitto *et al.* 2001). Dieses unbekanntes Substrat scheint eine wichtige Rolle in der Kalzifizierungsinhibition des Bindegewebes zu spielen (Abb. 1.4). Eine Studie mit Hauttransplantaten an Wildtyp- (*Abcc6^{+/+}*) und *Abcc6^{-/-}*-Mäusen untermauert diese Vermutung (Jiang *et al.* 2008). Es konnte gezeigt werden, dass ein Serumfaktor von Wildtyp-Mäusen die Kalzifizierung in Transplantaten der *Abcc6^{-/-}*-Mäuse verhindert. Umgekehrt kam es durch ein Hauttransplantat der Wildtyp-Maus in der *Abcc6^{-/-}*-Maus zur Kalzifizierung der ECM. Die metabolische Hypothese wird ebenso von Experimenten von Le Saux *et al.* unterstützt, in denen kultivierte Fibroblasten von PXE-Patienten und Kontrollpersonen mit Serum von PXE-Patienten und gesunden Kontrollpersonen behandelt wurden (Le Saux *et al.* 2006). Die Behandlung mit PXE-Serum führte sowohl in den Kontrollzellen als auch in den PXE-Zellen zu abnormen Aggregaten, während sich in Anwesenheit von Kontrollserum die Struktur der von PXE-Fibroblasten gebildeten elastischen Fasern normal ausbildete. Die Natur des möglichen Substrates ist allerdings bis heute nicht aufgeklärt. In einigen Studien konnte ein Mangel an kalzifizierungsinhibitorischen Proteinen in der Zirkulation und eine dadurch veränderte Kalzium-Phosphat-Homöostase, die zu einer pathologischen Veränderung der ECM führte, beobachtet werden (Uitto *et al.* 2001; Hendig *et al.* 2006, 2008c; Gheduzzi *et al.* 2007; Jiang *et al.* 2007; LaRusso *et al.* 2008). In den letzten Jahren wurden Vitamin K und Adenosin als mögliche Substrate für *ABCC6* diskutiert (Li *et al.* 2007, 2009b; Borst *et al.* 2008; Markello *et al.* 2011; Nitschke und Rutsch 2012). Vitamin K wird durch das vom *γ-Glutamylcarboxylase*-Gen (*GGCX*) carboxylierte Matrix-Gla-Protein (MGP) aktiviert, welches im Serum von PXE-Patienten und *Abcc6^{-/-}*-Mäusen vermehrt untercarboxyliert und somit inaktiv vorliegt (Gheduzzi *et al.* 2007; Li *et al.* 2007). Vitamin K-Supplementationen allerdings zeigten, dass Vitamin K nicht der ECM-Mineralisierung in PXE entgegenwirken und somit nicht das gesuchte Substrat sein kann (Brampton *et al.* 2011; Gorgels *et al.* 2011; Jiang *et al.* 2011). In *in vitro*-Experimenten von Szabó *et al.* konnte nachgewiesen werden, dass *ABCC6* auch kein Adenosin transportiert (Szabó *et al.* 2011). So konnte das Substrat für *ABCC6* bislang nicht identifiziert werden.

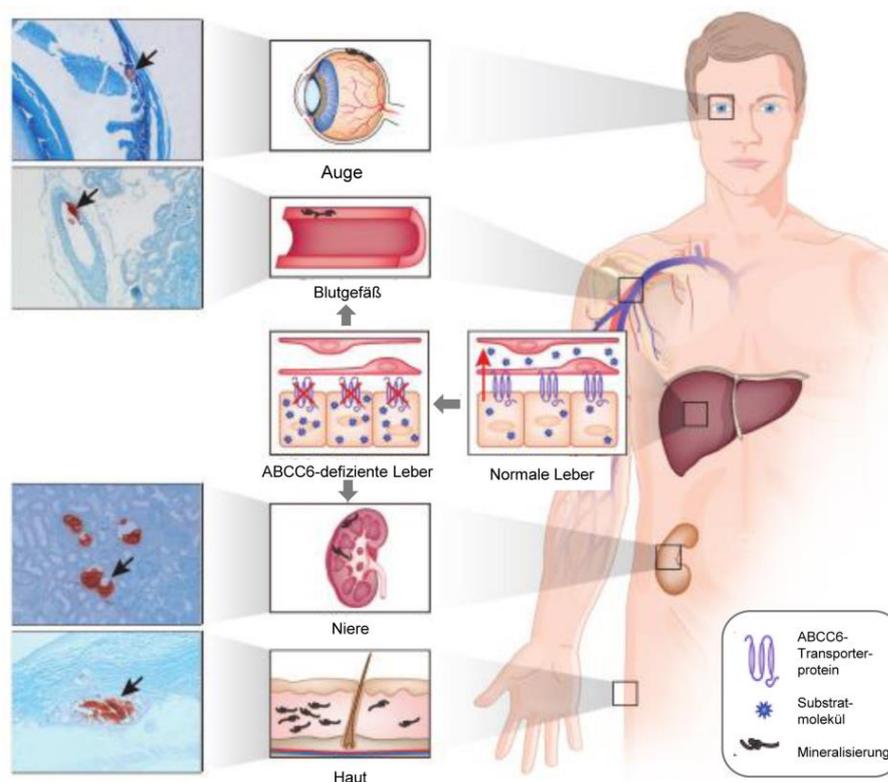


Abb. 1.4: Illustration der „metabolischen Hypothese“ der PXE-Pathogenese. Unter physiologischen Bedingungen wird das ABCC6-Transporterprotein in großen Mengen auf der basolateralen Seite der Hepatozyten exprimiert. Als Effluxpumpe sorgt es für den Transport eines noch unbekanntes Metaboliten in die Peripherie (rechte Seite). Der Verlust der Transporteraktivität bei PXE führt zu reduzierten Substratkonzentrationen, was wiederum in Kalzifizierungen der Blutgefäße, Augen, Nieren und der Haut resultiert (Mitte). Die Mineralisierung dieser Organe wurde in *Abcc6*-defizienten Mäusen mittels Alizarin-Rot-Färbung nachgewiesen (linke Seite). Die Abbildung wurde modifiziert nach Uitto *et al.* (Uitto *et al.* 2009).

Die zweite Hypothese, die sogenannte „PXE-Zell-Hypothese“, postuliert eine, durch das Fehlen der *ABCC6*-Expression bedingte, Metabolismusalteration in Zellen des betroffenen Gewebes (Bergen *et al.* 2007; Uitto *et al.* 2009). Für diese Annahme spricht, dass bei PXE-Fibroblasten trotz einer geringen Expression von *ABCC6* in diesen Zellen über mehrere Passagen ein charakteristischer Phänotyp nachgewiesen werden konnte (Boraldi *et al.* 2003; Quaglino *et al.* 2005; Hendig *et al.* 2008b; Ronchetti *et al.* 2013). Veränderungen im Expressionsprofil, der Proliferationsrate sowie Zell- und der Zell-Matrix-Interaktionen zeigten sich ebenfalls in dermalen PXE-Fibroblasten (Quaglino *et al.* 2000, 2005). Des Weiteren weisen die elastischen Strukturen in der Haut von PXE-Patienten schon vor dem Auftreten der Kalzifizierung Anomalitäten auf, die möglicherweise die Entstehung der mineralischen Ablagerungen fördern bzw. überhaupt erst ermöglichen (Sakuraoka *et al.* 1994; Contri *et al.* 1996; Gheduzzi *et al.* 2003). Wie genau diese Veränderungen bewirkt werden, ist bislang unklar und lässt sich durch eine ausschließliche systemische Ursache nur schwer erklären.

1.1.4 Das *ABCC6*-Gen und Protein

Im Jahr 2000 wurden Mutationen im *ABCC6*-Gen als ursächlich für PXE identifiziert (Bergen *et al.* 2000; Le Saux *et al.* 2000). Bis heute sind über 300 verschiedene Mutationen im *ABCC6*-Gen bei PXE-Patienten bekannt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/lovd/status.php>). Darunter sind *Nonsense*- und *Missense*-Mutationen, Spleißstellenalterationen, Insertionen und Deletionen, teilweise des kompletten Gens. Die am Häufigsten auftretenden Mutationen bei PXE-Patienten sind die *Nonsense*-Mutation p.R1141X (c.3421C>T, rs72653706) in Exon 24 mit einer Prävalenz von etwa 25 % in europäischen Patienten sowie eine Deletion der Exons 23 bis 29 (c.2996_4208del), die bei etwa 25 % der US-amerikanischen Patienten auf mindestens einem Allel vorliegt (Pfundner *et al.* 2007).

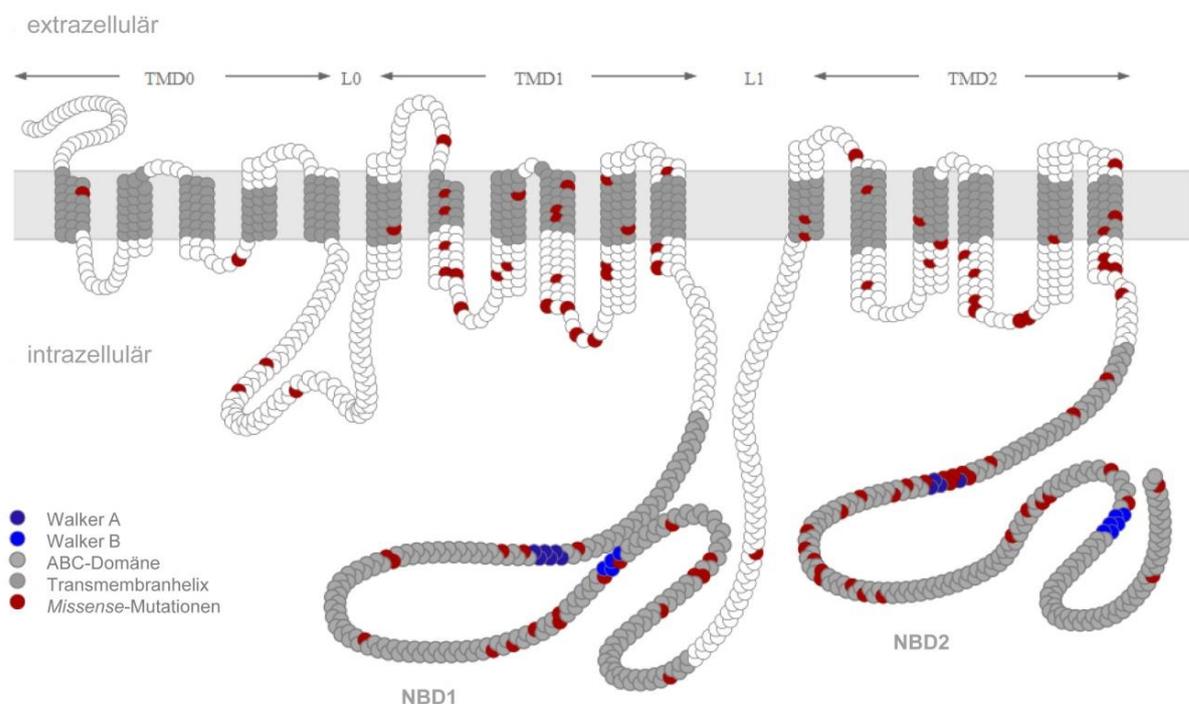


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des *ABCC6*-Proteins. *ABCC6* besteht aus drei Transmembrandomänen (TMD0, -1, -2), die jeweils 5 bzw. 6 Transmembranhelices (im Schema dunkel grau dargestellt) umfassen. Die beiden intrazellulären Nukleotidbindungsdomänen (NBD1, -2) enthalten mehrere Walker-Motive (dunkelblau). Als rote Punkte sind die *Missense*-Mutationen aufgetragen, die bei den PXE-Patienten gefunden wurden. Die Abbildung wurde modifiziert nach http://www.enzim.hu/~varadi/abcc6_topmod.html.

Das humane *ABCC6*-Gen besteht aus 31 Exons und umfasst eine Region von etwa 75 kb auf Chromosom 16p13.1. Diese Region enthält auch zwei eng verwandte, aber nicht funktionelle Pseudogene (*ABCC6-Ψ1* und *ABCC6-Ψ2*), die den Exons eins bis neun bzw. eins bis vier des Gens entsprechen (Pulkkinen *et al.* 2001). Die hohe Homologie von über 99 % zwischen dem kodierenden Gen und den beiden Pseudogenen erschwert die Mutationsdetektion am 5'-Ende des Gens (Pfundner *et al.* 2007). Das *ABCC6*-Gen kodiert für den *ABCC6*-Transporter, welcher hauptsächlich in der Leber und der Niere exprimiert wird (Bergen *et al.* 2000; Le Saux *et al.* 2000; Chassaing *et al.* 2005; Li *et al.* 2009a).

Das 165 kDa große, membranständige ABCC6-Protein besteht aus drei hydrophoben Transmembran-Domänen, die jeweils fünf bzw. sechs Transmembranhelices umfassen (Abb. 1.5). ABCC6 enthält zwei hochkonservierte, intrazelluläre Nukleotidbindestellen, die an der Bindung und Hydrolyse von ATP beteiligt sind.

Die physiologische Funktion von ABCC6 ist bislang noch unbekannt. Der ABCC6-Transporter wird hauptsächlich auf der basolateralen Seite von Leber- und Nierenzellen exprimiert. Im klinisch betroffenen Gewebe der PXE-Patienten hingegen konnten nur geringe Mengen des ABCC6-Transporters detektiert werden (Belinsky und Kruh 1999). Es wird postuliert, dass ein gestörter Efflux eines noch unbekanntes Substrates aus der Leber zu einem Mangel in der Peripherie führt und somit zu den pathologischen Veränderungen bei PXE führt (Uitto *et al.* 2001). Der genaue Zusammenhang zwischen dem ABCC6-Transporter und der klinischen Symptomatik ist allerdings noch ungeklärt.

1.1.5 Genetische Kofaktoren von PXE

Die klinische Ausprägung von PXE ist im Hinblick auf das Diagnosealter, die Anzahl der betroffenen Organe und die Ausprägung der Symptome bei gleichen *ABCC6*-Mutationen sehr variabel (Plomp *et al.* 2010). Um diese Variabilität zu erklären, wurde spekuliert, dass neben Umweltfaktoren und den offensichtlich PXE-auslösenden *ABCC6*-Mutationen auch andere Gene, sogenannte *Modifier*-Gene, einen Einfluss auf die Ausprägung und Variabilität von PXE haben könnten. *Modifier*-Gene weisen Nukleotidveränderungen auf, welche alleine keine Krankheit auslösen, sich aber in Verbindung mit anderen Mutationen verstärkend oder mildernd auswirken können. Dabei wird angenommen, dass diese Gene in die pathologischen Prozesse involviert sind und Sequenzvariationen in diesen Einfluss auf die Aktivität der betreffenden Proteine haben, die schlussendlich zu den beobachteten klinischen Merkmalen von PXE führen. Somit hänge die Ausprägung des Phänotyps maßgeblich vom gesamten genetischen Hintergrund des jeweiligen Individuums ab. In den letzten Jahren konnte die Relevanz dieser Hypothese durch die Identifizierung von *Modifier*-Genen für PXE bestätigt werden (Schön *et al.* 2006; Hendig *et al.* 2007; Zarbock *et al.* 2007, 2009, 2010). Dabei handelt es sich um Gene, die in der Biosynthese von Glykosaminoglykanen (*Xylosyltransferase 2*), bei der Regulation der biologischen Kalzifizierung (*OPN*, *Fetuin A*), des ECM-Umbaus (*Matrixmetalloproteinase 2*) sowie in der Antwort auf oxidativen Stress (*Katalase*, *Superoxiddismutase 2*) involviert sind. Alle diese Prozesse scheinen eine Rolle in der PXE-Pathogenese zu spielen. Des Weiteren konnten Variationen im vaskulären endothelialen Wachstumsfaktorgen (*vascular endothelial growth factor*, *VEGF*) mit dem Schweregrad der mit PXE regelmäßig einhergehenden Retinopathie assoziiert werden.

1.2 Die Regulation der biologischen Kalzifizierung

Ein Ungleichgewicht im Kalzium-Phosphat-Gehalt ist meist ursächlich für die biologische Kalzifizierung der ECM. Ursprünglich wurde vermutet, dass es sich bei der Kalzifizierung um einen passiven Prozess handelt, der aus einer Anreicherung von Kalzium und Phosphat resultiert, welches zur Bildung von Hydroxylapatitkristallen ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) und zu einem vermehrten Ausfall anderer Kalziumpräzipitate (CaCO_3 und CaPO_4) in der ECM führt (Terkeltaub 2001). Gegenwärtig belegen eine Vielzahl von Studien, dass sowohl die Regulation des Kalzium-Phosphat-Haushaltes als auch die Mineralisierung von Geweben ein aktiv regulierter Prozess verschiedener Proteine, Enzyme und Metaboliten ist. Kalzium dient als zellulärer Transmitter und ist für viele Zellfunktionen, wie u. a. die Signaltransduktion, Genexpression, Zellproliferation und Apoptose, essentiell (Shanahan *et al.* 2011). Nahezu der gesamte Energiestoffwechsel beruht auf Phosphatverbindungen, so dass auch das anorganische Phosphat von Bedeutung ist. Darüber hinaus spielt dieses eine wichtige Rolle beim Membranaufbau, der Regulation der Aktivität von Proteinen sowie als biologischer Puffer (Shanahan *et al.* 2011). Für diese Funktionen müssen extrazellulär ausreichend hohe Konzentrationen an Kalzium und Phosphat zur Verfügung stehen. Zu hohe Konzentrationen allerdings führen zur pathologischen Kalzifizierung.

Eine Reihe von Faktoren spielen bei der Begünstigung oder Inhibierung der pathologischen Kalzifizierung eine Rolle (Abb. 1.6). Hierbei kann zwischen systemischen und lokalen Kalzifizierungsregulatoren unterschieden werden. Zu den systemischen Kalzifizierungsinhibitoren zählen das MGP, OPN und Fetuin A, welche eine entscheidende Rolle in der Regulation der Kalzium-Phosphat-Homöostase einnehmen. MGP und Fetuin A bilden mit den Hydroxylapatiten *Calciprotein*-Partikel und verhindern somit das Wachstum der Kristalle (Harmey *et al.* 2004; Jahnen-Dechent *et al.* 2011). Das hauptsächlich von vaskulären glatten Muskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) und Chondrozyten synthetisierte MGP inhibiert die Kalzifizierung in Gegenwart von Kalzium durch Komplexbildung mit dem knochenmorphogenetischen Protein 2 (*bone morphogenetic protein 2*, BMP2), einem starken Induktor der vaskulären Kalzifizierung, wobei der bekannte BMP2-Effekt als Promoter der Chondrogenese und der Knochen neutralisiert wird (Wallin *et al.* 2000; Zebboudj *et al.* 2002; Sweatt *et al.* 2003; Johnson *et al.* 2006; Cai *et al.* 2012). Fetuin-A, OPN und MGP werden über ihren Phosphorylierungsstatus reguliert (Harmey *et al.* 2004; Schurgers *et al.* 2007; Jahnen-Dechent *et al.* 2011). MGP wird zudem durch die Vitamin K-abhängige γ -Carboxylierung an einem Glutamatrest aktiviert, wodurch es in der Lage ist, Kalzium und Apatit zu binden (Schurgers *et al.* 2008). Durch erhöhte Phosphatkonzentrationen induziert der Transkriptionsfaktor *Runx2* (*Runt-ähnlicher Transkriptionsfaktor 2*) die Expression von *OPN* (Shanahan *et al.* 2011) und die Kalzifizierung durch Förderung der Differenzierung von VSMC zu einem osteoblasten-ähnlichem Phänotyp (Kendrick und Chonchol 2011). *Runx2* spielt eine wichtige

Rolle in der Regulation der *OPN*-Expression in der kardiovaskulären Kalzifizierung (Sowa *et al.* 2013). Exogenes *OPN* inhibiert die Kalzifizierung, wohingegen eine Dephosphorylierung von *OPN* durch eine alkalische Phosphatase diesen Effekt reversiert (Addison *et al.* 2007).

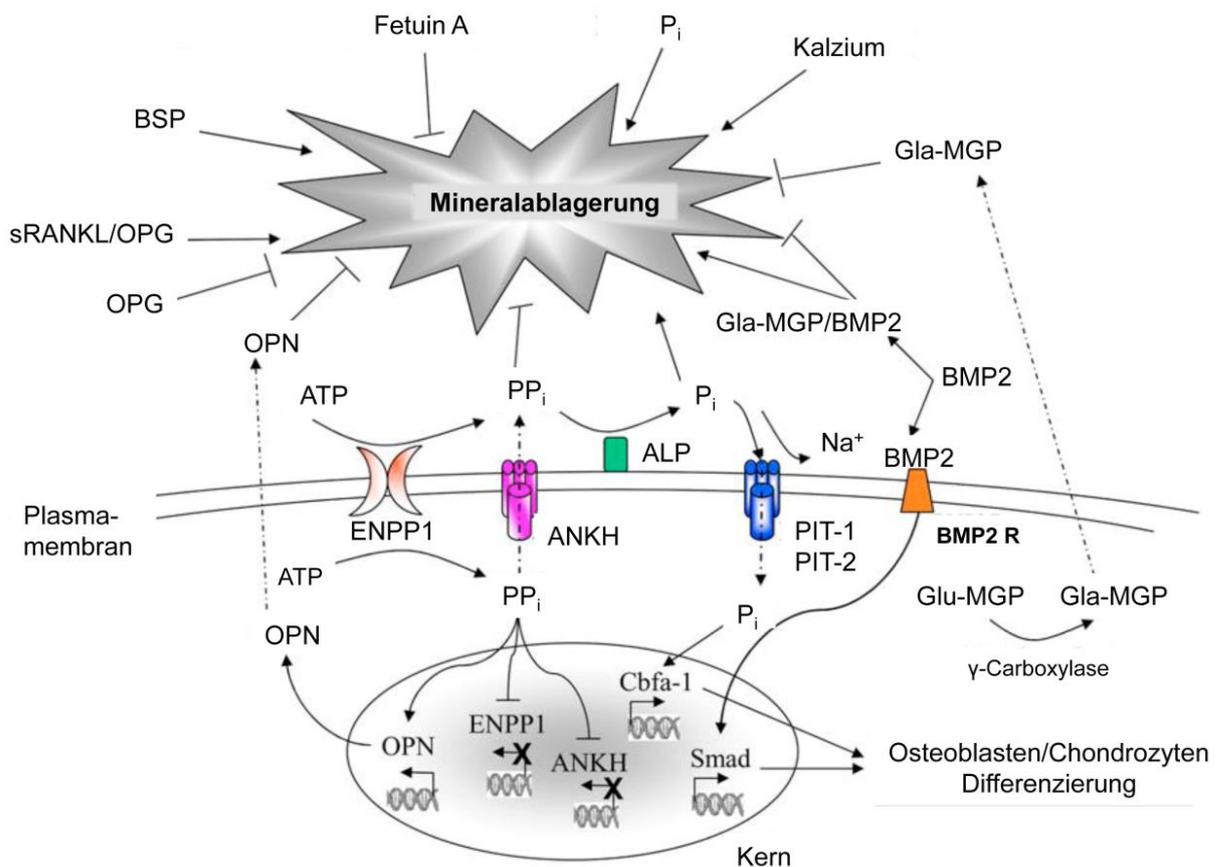


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Hauptregulationsfaktoren des Kalzifizierungsprozesses. Diese Abbildung wurde modifiziert nach Ronchetti *et al.* (Ronchetti *et al.* 2013).

Neben der systemischen Regulation von Kalzifizierungsprozessen ist auch die lokale Homöostase von Kalzium und Phosphat zwischen Zelle und ECM geregelt. Das anorganische Pyrophosphat (PP_i) ist der wichtigste lokale Regulator des Kalzifizierungsprozesses und agiert als Inhibitor des Kalziumkristallwachstums in der ECM (Terkeltaub 2001). PP_i ist ein Ester von zwei Phosphationen und fällt als Nebenprodukt vieler Stoffwechselprozesse, wie z. B. dem Cholesterinabbau, an (Goldstein *et al.* 1990; Buhaescu und Izzedine 2007). Es wird angenommen, dass ein substantieller Anteil der extrazellulären, zirkulierenden PP_i von der Leber ausgeschieden wird (Rachow und Ryan 1988). Ein Ungleichgewicht zwischen intra- und extrazellulären PP_i -Konzentration induziert eine ektopische Kalzifizierung in der ECM. Da PP_i im Körper schnell hydrolysiert und transportiert wird, sind einige Enzyme nötig, um die PP_i -Konzentration aktiv zu beeinflussen. Die extrazellulären Konzentrationen des PP_i werden eng von der transmembranen Ektonukleotidpyrophosphatase 1 (ENPP1) reguliert, welche Nucleosidtriphosphate, wie ATP, GTP, CTP, TTP und UTP durch Freisetzung von PP_i und Diadenosinpolyphosphat in ihre korrespondierenden Monophosphate hydrolysiert. Durch den PP_i -Kanal Ankylosis (ANKH) gelangt PP_i vorwiegend aus der Zelle in den extrazellulären

Raum, wodurch ANKH indirekt inhibierend auf die Bildung von Kalzium- phosphatkristallen einwirkt (Terkeltaub 2001; Harmey *et al.* 2004; Rutsch *et al.* 2011). Die gewebeunspezifische membranständige alkalische Phosphatase (ALP) spaltet PP_i und phosphoryliert OPN, wobei beide Kalzifizierungsinhibitoren inaktiviert werden und Phosphat (P_i) freigesetzt wird. Darüber hinaus induziert PP_i die Expression von OPN über den Erk1/2- und den p38-MAPKinase-Signalweg (Addison *et al.* 2007). P_i ist ein wichtiger Induktor der Ablagerung von Kalziumkristallen und der ECM-Mineralisierung (Shanahan *et al.* 2011). Die Na/ P_i -Kotransporter PIT-1 und PIT-2 regulieren zeit- und konzentrationsabhängig die zytosolische P_i -Konzentration, in dem sie P_i in den intrazellulären Raum transportieren (Shanahan *et al.* 2011).

1.3 Biologische Kalzifizierung bei PXE

Die pathologische Kalzifizierung ist ein gängiges Merkmal des Alterungsprozesses und ist ebenfalls häufig assoziiert mit einer Reihe verbreiteter Erkrankungen, wie Arteriosklerose, Diabetes und chronischer Nierenerkrankung (*chronic kidney diseases*, CKD), ebenso wie mit einigen seltenen Erkrankungen (z. B. PXE und das Keutelsyndrom (Giachelli 1999; van Varik *et al.* 2012; Zhu *et al.* 2012)). Die physiologische Funktion von ABCC6 und dessen Einfluss auf den Kalzifizierungsprozess in PXE sind bis heute unbekannt. Entgegen der Kenntnisse aus anderen Kalzifizierungserkrankungen (Hyperphosphatämie oder Hyperkalzämie) konnte in den Kalzium- und Phosphatserumkonzentrationen von PXE-Patienten im Vergleich zu den nichtbetroffenen Verwandten und gesunden Kontrollpersonen kein Unterschied festgestellt werden (Hendig *et al.* 2006; Boraldi *et al.* 2012). Studien aus den letzten Jahren berichteten von veränderten Expressionen systemischer und lokaler kalzifizierungsinhibitorischer Proteine als Ergebnis der ABCC6-Defizienz in PXE-Patienten und *Abcc6-Knockout*-Mäusen (Hendig *et al.* 2006, 2008c; Gheduzzi *et al.* 2007; Jiang *et al.* 2007, 2010; Boraldi *et al.* 2012). Die Beteiligung von MGP und OPN im Pathomechanismus von PXE konnte bereits nachgewiesen werden. Verglichen mit gesunden Kontrollpersonen wurden im Blut von PXE-Patienten und in *Abcc6*^{-/-}-Mäusen signifikant geringere MGP-Konzentrationen detektiert (Gheduzzi *et al.* 2007; Jiang *et al.* 2007; Hendig *et al.* 2008c). In Hautbiopsien betroffener Regionen von PXE-Patienten wurden höhere OPN-Expressionen als in Proben gesunder Individuen nachgewiesen (Contri *et al.* 1996). OPN konnte ebenfalls als *Modifier*-Gen für PXE identifiziert werden (Hendig *et al.* 2007). In der *Dyscalc-1*-Maus wurde eine positive Korrelation der ABCC6-Defizienz und einer erhöhten OPN-Expression beobachtet (Aherrahrou *et al.* 2008; Sowa *et al.* 2013). Eine Beteiligung von BMP2 oder Runx2 hingegen konnte in der PXE-Pathogenese bisher noch nicht beschrieben werden. Erniedrigte Serumkonzentrationen des systemischen Kalzifizierungsinhibitors Fetuin A konnten in Trägern von

ABCC6-Mutationen nachgewiesen werden (Hendig *et al.* 2006; Jiang *et al.* 2010). Eine Fetuin-A-Defizienz steht in Assoziation mit verminderter Elastizität der Gefäßwände (Jahnen-Dechent *et al.* 2011). PXE-Patienten leiden im Verlauf der Erkrankung häufig an Gefäßwandveränderungen, bei denen sich vor allem Ablagerungen in der Intima sowie der Media-Schicht zeigen (Kornet *et al.* 2004).

Die Identifizierung von *ABCC6*-Mutationen bei einer weiteren seltenen Erberkrankung bekannt als generelle arterielle Kalzifizierung bei Säuglingen (*generalized arterial calcification of infancy*, GACI, OMIM 208000), welche hauptsächlich durch Mutationen im *ENPP1*-Gen verursacht wird, suggeriert, dass gleiche Stoffwechselwege bei PXE und GACI betroffen sein könnten. GACI ist durch progressive Kalzifizierung der elastischen Lamina, der fibrotischen myointimalen Proliferation von Zellen der muskulären Arterien und einer daraus resultierenden Stenose in der neonatalen Phase charakterisiert (Iravathy Goud Kalal *et al.* 2012). Eine *ENPP1*-Defizienz resultiert in geringeren PP_i -Konzentrationen, was bei Patienten mit GACI zu pathologischer Kalzifizierung führt (Le Boulanger *et al.* 2009; Nitschke *et al.* 2012).

Die Entdeckung erhöhter ALP-Aktivitätswerte bei PXE-Patienten und PXE-Fibroblasten und die Vermutung, dass das im Blut nachgewiesene PP_i hauptsächlich aus der Leber stammt, weisen auf eine mögliche Beteiligung des PP_i und der PP_i -metabolisierenden Enzyme an der PXE-Pathogenese hin (Neldner 1988; Neldner und Struk 2002; Boraldi *et al.* 2012). Eine kürzlich erschienene Studie unterstützen diese Vermutungen, liefert aber keine eindeutigen Beweise oder Erklärungen (Jansen *et al.* 2013). Jansen *et al.* zeigten, dass die Überexpression von *ABCC6* in HEK293-Zellen die ATP-Sekretion und die extrazelluläre PP_i -Akkumulation induziert und beschrieb, dass plättchenfreies Plasma von *Abcc6-Knockout*-Mäusen signifikant reduzierte PP_i -Konzentrationen aufweist (Jansen *et al.* 2013). Eine systematische Untersuchung des Kalzifizierungsprozesses in PXE-Fibroblasten zur Aufklärung des Pathomechanismus wurde allerdings bis heute nicht durchgeführt.

1.4 Die Bedeutung der extrazellulären Matrix für die Kalzifizierung bei PXE

Die histopathologischen Kennzeichen von PXE sind eine progressive Kalzifizierung und extensive Veränderung der ECM in verschiedensten Geweben. Die ECM ist ein komplexes Netzwerk verschiedener Strukturproteine mit unterschiedlichen Funktionen und einer komplexen Regulation mit vielen Schritten und Mediatoren. Kalziumhaltige Ablagerungen, welche bei der PXE-Kalzifizierung vorhanden zu sein scheinen, können verschiedene Rollen bei der Zellteilung und bei der Matrixmetalloproteinase-Synthese und -Aktivierung einnehmen sowie auch als Aktivator von Signaltransduktionswegen oder als nukleäre Transkrip-

tionsfaktoren dienen (Cheung *et al.* 1984; Cheung 2000). Die ECM ist kein starres Gewebe, sondern befindet sich in einem permanenten Abbau- und Umbauprozess, wobei die Matrixmetalloproteinasen (MMP) eine zentrale Rolle spielen. In PXE-Fibroblasten konnten erhöhte mRNA-Expressionen und Proteinkonzentrationen der Matrixmetalloproteinase 2 (MMP2) nachgewiesen werden (Quaglino *et al.* 2005). Zusätzlich wurden erhöhte MMP2- und MMP9-Serumkonzentrationen in PXE-Patienten und eine *MMP2*-Sequenzvariante als genetischer Kofaktor für PXE identifiziert (Diekmann *et al.* 2009; Zarbock *et al.* 2010). MMP gelten als Schlüsselenzyme, welche die Degradation von Elastin (ELN) und Kollagen (COL) verursachen und somit die Voraussetzung für die Ablagerung von Kalziumphosphaten in der ECM schaffen (Galis und Khatri 2002; Basalyga *et al.* 2004; Lee *et al.* 2006). ELN und COL als Hauptbestandteile der ECM verleihen ihr Struktur, Zugfestigkeit, Flexibilität und Elastizität. Studien konnten zeigen, dass die Desorganisation von Kollagenfasern und die Elastin-degradation als Kalzifizierungsinduktoren dienen (Basalyga *et al.* 2004; Shindyapina *et al.* 2013). Fragmentierung und Mineralisierung der elastischen Fasern scheinen eng miteinander verbunden zu sein. In PXE-Fibroblasten konnten erhöhte Syntheseraten von ELN und COL sowie gesteigerte Mengen von Proteoglykanen nachgewiesen werden (Götting *et al.* 2005; Quaglino *et al.* 2005; Le Saux *et al.* 2006; Hendig *et al.* 2008a).

Die ECM hat nicht nur passive Strukturfunktionen, sondern reguliert eine Reihe von biologischen Prozessen, wie die Zelladhäsion und Migration, die Differenzierung, Entwicklung und Apoptose. Diese Funktionen werden durch die Interaktion von Adhäsionsproteinen wie FN und Lamin, welche simultan an mehrere verschiedene Matrixkomponenten binden, ermöglicht. Zusätzlich ist die ECM ein Reservoir für Wachstumsfaktoren und Zytokine. Ein Defekt oder das Fehlen einer Komponente der ECM führt zu einer veränderten oder gestörten Struktur sowie einer veränderten Regulation der biologischen Prozesse. Viele Erkrankungen beruhen auf Defekten von ECM-Komponenten. Eine defekte Lysyloxidase (LOX) z. B. resultiert in einer gestörten Quervernetzung der Kollagene (Ehlers-Danlos-Syndrom), während Mutationen im *Fibrillin-1*-Gen (*FBN1*), welches essentiell für die Bildung elastischer Fasern ist, zum Marfan-Syndrom führt (Pinnell 1982; Dietz *et al.* 2005).

Die elastischen Fasern in der Dermis der PXE-Patienten liegen als kurze, fragmentierte, aggregierte und kalzifizierte Fasern vor (Plomp *et al.* 2010). Bis heute konnten die Ursachen hierfür nicht aufgeklärt werden. Gründe könnten eine fehlerhafte Synthese, eine erhöhte Degradation der elastischen Fasern oder eine Kombination aus beidem sein. Bis heute sind die Expression von Struktur- und Regulatorproteinen der ECM und die Regulation der biologischen Prozesse unter progressiver Kalzifizierung in PXE-Fibroblasten unbekannt.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

PXE ist charakterisiert durch eine progressive Kalzifizierung und Fragmentierung der elastischen Fasern in der ECM der Haut, der Bruchmembran in der Retina des Auges und der Gefäßwände. Einigen kalzifizierungsinibitorischen Proteinen, wie z. B. MGP und OPN, konnten in der PXE-Pathogenese schon eine Bedeutung zugeschrieben werden. PP_i als der wichtigste lokale Regulator des Kalzifizierungsprozesses und Inhibitor des Kalziumkristallwachstums in der ECM wurde in seiner Bedeutung und die der PP_i -metabolisierenden Enzyme im Kalzifizierungsprozess bei PXE bis heute nicht untersucht.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollen ausgewählte Sequenzvariationen in Genen von PP_i -metabolisierenden Enzymen (*ALP*, *ANKH* und *ENPP1*) als potentielle *Modifier*-Gene auf eine Assoziation mit PXE oder einem PXE-Phänotyp hin analysiert werden, um die hohe Variabilität des PXE-Phänotyps weiter aufzuklären. Im zweiten Teil der Arbeit soll der Kalzifizierungsprozess dermalen Fibroblasten aus Hautbiopsien von PXE-Patienten und gesunden Kontrollpersonen näher untersucht und charakterisiert werden. Hierzu soll im ersten Schritt der Einfluss verschiedener Kalzifizierungsinduktoren (β GlyPO₄, Na₂HPO₄, CaCl₂) auf die Kalzifizierung bei PXE beobachtet werden. Anschließend soll die Kalzifizierung mittels histochemischer Färbung identifiziert sowie anhand der relativen Genexpression und Proteinexpression ausgewählter kalzifizierungsinibitorischer Proteine und durch die Bestimmung von intra- und extrazellulären Kalziumkonzentrationen analysiert werden. Auf Grundlage dieser Untersuchungen soll ein geeignetes Modellsystem für Kalzifizierungsstudien an PXE, welches dem beobachteten PXE-Phänotyp entspricht, entwickelt werden und im Weiteren eingesetzt werden. Bis heute sind die Expression von Struktur- und Regulatorproteinen der ECM und die Regulation der biologischen Prozesse unter progressiver Kalzifizierung von PXE-Fibroblasten unbekannt. Deshalb soll in dieser Arbeit die Expression von für die Synthese und Assemblierung der elastischen Fasern im Kalzifizierungsprozess dermalen Fibroblasten wichtiger Enzyme und Komponenten untersucht werden.

Einen weiteren Aspekt stellt die Untersuchung der PP_i -Homöostase bei PXE dar, die die Konzentrationsbestimmung von extra- und intrazellulärem PP_i sowie die Gen- und Aktivitätsbestimmung ausgewählter PP_i -metabolisierender Enzyme zu verschiedenen Zeitpunkten des Kalzifizierungsprozesses umfassen soll. Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse sollen im letzten Teilprojekt im Hinblick auf den Einsatz von PP_i als Kalzifizierungsinhibitor für PXE eingebunden werden. Dabei sollen folgende Fragestellungen im Fokus der Arbeit stehen: Ist eine Reduzierung des Kalzifizierungsgrades bei PXE durch eine Supplementierung von PP_i möglich? Welche Effekte hat eine PP_i -Supplementation auf die Expression und Aktivität der PP_i -metabolisierenden Enzyme im Kalzifizierungsprozess?

2 MATERIAL

2.1 PXE-Patienten- und Kontrollkohorte

Für die genetische Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit standen EDTA-Blutproben und genomische DNA einer PXE-Patientenkohorte sowie einer Kontrollkohorte von gesunden Blutspendern aus Nordrhein-Westfalen zur Verfügung. Die Anamnese-Befragung, Diagnose und die Blutentnahme der PXE-Patienten wurden von 2001 bis 2008 in der PXE-Ambulanz der Dermatologischen Klinik am Krankenhaus Bethesda in Freudenberg nach publizierten Konsensus-Kriterien durchgeführt (Lebwohl *et al.* 1994). Die *ABCC6*-Genotypisierung erfolgte am Herz- und Diabeteszentrum NRW in Bad Oeynhausen. Die häufigste Mutation c.3421C>T wurde mittels direkter Sequenzierung analysiert (Götting *et al.* 2003; Schulz *et al.* 2006). Eine Multiplex-PCR wurde eingesetzt um die häufig vorkommende 16 kb-Deletion c.EX23_EX29del zu detektieren (Hu *et al.* 2004). Zum Aufspüren weiterer *ABCC6*-Deletionen bzw. Insertionen, welche mittels direkter Sequenzierung übersehen werden könnten, wurde eine *Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification* (MLPA) angewendet um unvollständige *ABCC6*-Genotypen zu vervollständigen (Costrop *et al.* 2010). Diese Studie wurde von der Ethikkommission genehmigt und alle Patienten gaben ihr Einverständnis. Insgesamt stand eine Kohorte von 526 PXE-Patienten und Angehörigen zur Verfügung. Hiervon wurden 190 Patientenproben für die Untersuchung von Einzelnukleotidsequenzvarianten im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Jedem PXE-Patienten wurde ein entsprechender gesunder, anonymisierter Blutspender zugeordnet. Hierzu wurden sowohl das Geschlecht als auch das Alter berücksichtigt (Tab. 2.1). Die Bereitstellung der Blutproben erfolgte durch den Blutspendedienst OWL des Herz- und Diabeteszentrums NRW.

Tab. 2.1: Klinische Charakteristika der PXE-Patienten und der Kontrollkohorte.

Angegeben sind das Geschlecht, das Alter, das Diagnosealter und die Organbeteiligung.

Charakteristik	PXE-Patienten (n = 190)	Kontrollkohorte (n = 190)
Geschlecht männlich/weiblich, n	56/134	56/134
Alter in Jahren	46,9 (15,1)	46,9 (15,1)
Diagnosealter in Jahren	31,8 (16,4)	n. z.
Organbeteiligung		
Haut, n	169 (89 %)	n. z.
Augen, n	157 (83 %)	n. z.
Kardiovaskuläres System, n	79 (42 %)	n. z.
Bluthochdruck, n	58 (31 %)	n. z.
Herz, n	29 (15 %)	n. z.
Gastrointestinaltrakt, n	28 (15 %)	n. z.

n. z., nicht zutreffend, da Personen der Kontrollkohorte keine typischen PXE-Symptome aufwiesen.

2.2 Humane Zelllinien

Dermale Fibroblasten von vier PXE-Patienten wurden aus Hautbiopsien wie von Hendig *et al.* beschrieben expandiert (Hendig *et al.* 2008b). Die Entnahme der Hautbiopsien, die Erstellung der PXE-Diagnose, weitere Untersuchungen und die Befragung der Probanden hinsichtlich ihrer Anamnese erfolgten durch die PXE-Ambulanz der Dermatologischen Klinik am Krankenhaus Bethesda in Freudenberg. Diese Studie wurde von der Ethikkommission genehmigt und alle Patienten gaben ihr Einverständnis. Die dermalen Fibroblasten von vier gesunden Kontrollpersonen wurden bei den Firmen Cambrex (Walkersville, USA), Coriell (Camden, USA) und Genlantis (San Diego, USA) kommerziell erworben. Alle Zellen wurden auf fibroblastenspezifische Expressionsmarker (Thy-1, CD90) mittels Antikörper-markierter Immunfluoreszenz überprüft (Dianova, Germany). Die Hauptcharakteristika der Kontroll- und PXE-Fibroblasten sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Tab. 2.2: Verwendete humane Zelllinien.

Angegeben sind das Geschlecht, das Alter, die Entnahmeregion und der entsprechende, mittels Sequenzierung bestimmte, *ABCC6*-Genotyp. Bei den Kontrollzellen ist zudem die vertreibende Firma angegeben.

Zelllinie	Geschlecht	Alter ¹	Entnahmeregion	<i>ABCC6</i> -Genotyp ²		Status ³
PXE-Patientenzellen						
P128M	männlich	51	Hals	c.3769_3770insC (p.L1259fsX1277)	c.3769_3770insC (p.L1259fsX1277)	hm
P255F	weiblich	48	Unterarm	c.3421C>T (p.R1141X)	c.2787+1G>T	cht
P265F	weiblich	62	Hals	c.1132C>T (p.Q378X)	c.3421C>T (p.R1141X)	cht
P308M	männlich	42	n. s.	c.3421C>T (p.R1141X)	c.-90ins14	cht
Gesunde Kontrollzellen						
F42A	weiblich	42	Abdomen (Cambrex)	-	-	wt
F50UA	weiblich	50	Abdomen (Coriell)	-	-	wt
M45D	männlich	45	Gesicht (Genlantis)	-	-	wt
M56D	männlich	56	Gesicht (Genlantis)	-	-	wt

¹Alter in Jahren.

²Nukleotidennummerierung basiert auf der cDNA-Sequenz mit A als erster Nukleinsäure im ATG-Translationsstart +1 (*GenBank-Accessionnummer* NM_001171.2).

³Genotypstatus: hm = homozygot, cht = compound-heterozygot, wt = Wildtyp. n. s., nicht spezifiziert.

2.3 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Antibiotika/Antimykotika-Lösung (AB/AM 10 x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
DMEM (1 x <i>high glucose</i>)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
DPBS (1 x)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Einfriermedium	40 % (v/v) DMEM 40 % (v/v) FCS 20 % (v/v) DMSO
FCS (fötales Kälberserum)	Biochrom, Berlin Gibco, Invitrogen, Karlsruhe PAA Laboratories, Pasching, Österreich PAN Biotech, Aidenbach
Kalzifizierungsmedien	1) DMEM + 10 % FCS + 1 % AB/AM + 10 µM β GlyPO ₄ + 50 µg/mL AA + 5 % DPBS 2) DMEM + 10 % FCS + 1 % AB/AM + 2,5 µM Na ₂ HPO ₄ + 5 % DPBS 3) DMEM + 10 % FCS + 1 % AB/AM + 8 µM CaCl ₂ + 5 % DPBS
Trypsin-EDTA-Lösung (10 x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

2.4 Chemikalien und Reagenzien

<i>Adenosine 5'-phosphosulfate sodium salt</i> (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate</i> (FLAAS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth, Karlsruhe
Alizarin Rot S (ARS)	Fluka, Buchs, Schweiz
Ammoniak (32 %)	Roth, Karlsruhe
Anti-ABCC6 (<i>rabbit monoclonal antibody</i>)	Abcam, UK
Ascorbinsäure (AA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
β -Glycerophosphat-Dinatriumhydrat (β GlyPO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
BSA (100 µg/mL)	New England BioLabs, Frankfurt
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Calcein-AM solution</i>	MoBiTec GmbH, Göttingen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogensulfat (Na ₂ HSO ₄)	Merck, Darmstadt

dNTP (100 mM)	Solis BioDyne, Tartu, Estland
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, San Diego, USA
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol (99,9 %)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (500 µg/mL)	Roth, Karlsruhe
Farnesylpyrophosphat (FPP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Firefly-luciferase-assay-ATP-mix</i> (FLAAM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
IgG- H+L (<i>rabbit polyclonal antibody</i> , HRP)	Abcam, UK
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Oligo dT-Primer	Biomers, Ulm
Oligonukleotide (Primer)	Biomers, Ulm
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Sephadex G50/G150	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Thymidine 5'-monophosphat p-nitrophenylester sodium salt</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasser (Rotisolv HPLC-Gradient-Grade)	Roth, Karlsruhe
Wasser (Aqua B. Braun)	Braun, Melsungen
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Zoledronsäure (ZOL)	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.5 Lösungen und Puffer

0,5 % Ammoniumhydroxid	Ammoniak (32 %) in dest. H ₂ O
Alizarin-Rot-S-Färbelösung	100 mL dest. H ₂ O 1 g Alizarin Rot S mit 0,5 %iger Ammoniumhydroxid-Lösung pH auf 4,1 - 6,0 einstellen
Auftragspuffer	50,0 mM EDTA 60,0 % (w/v) Saccharose 1,4 % (w/v) Xylencyanol 1,4 % (w/v) Bromphenolblau mit 50 mL dest. H ₂ O auffüllen und steril filtrieren

SDS-Laufpuffer	100 mL 10 × Tris-Glycin SDS Laufpuffer 900 mL H ₂ O
TBE-Puffer (pH 8,3)	100 mM Tris-HCl 90 mM Borsäure 1 mM EDTA mit dest. H ₂ O auf 1 L auffüllen
TBS-T-Puffer	150 mM NaCl 50 mM Tris/HCl (pH 7,6) 0,1 % Tween-20 mit dest. H ₂ O auf 1 L auffüllen
Transferpuffer	430 mL H ₂ O 20 mL Tris-Glycin Transfer Puffer (25 ×) 50 mL MeOH

2.6 Enzyme

ATP-Sulfurylase	New England BioLabs, Frankfurt
BseAI	New England BioLabs, Frankfurt
BsmAI	New England BioLabs, Frankfurt
BsMFI	New England BioLabs, Frankfurt
BstNI	Thermo Scientific, Schwerte
Eco47I	Thermo Scientific, Schwerte
Exonuklease I	New England BioLabs, Frankfurt
HaeIII	New England BioLabs, Frankfurt
HpyCH4III	Thermo Scientific, Schwerte
MspI	New England BioLabs, Frankfurt
NlaIII	New England BioLabs, Frankfurt
Platinum Taq DNA-Polymerase	Invitrogen, San Diego, USA
Sau3AI	New England BioLabs, Frankfurt
Sgel	Thermo Scientific, Schwerte
Shrimp Alkaline Phosphatase	USB, Cleveland, USA

2.7 Reaktionssysteme

<i>Agilent RNA 6000 Nano Kit</i>	Agilent Technologies, Waldbronn
<i>BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit</i>	ABI, Foster City, USA

<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit (MGP)</i>	Uscn Life Science, Hubei, USA
<i>Human Osteopontin Assay Kit</i>	IBL, Minneapolis, USA
<i>MSB Spin PCRapace</i>	Invitex, Berlin
<i>NucleoSpin Blood Kit</i>	Machery-Nagel, Düren
<i>NucleoSpin RNA II</i>	Machery-Nagel, Düren
<i>Platinum SYBR Green qPCR Super-Mix-UDG</i>	Invitrogen, San Diego, USA
<i>Superscript II Reverse Transcriptase Kit</i>	Invitrogen, San Diego, USA

2.8 Längen- und Größenstandard

<i>pUC19/MspI DNA-Ladder</i>	MABL, Bielefeld
<i>RNA 600 Nano Ladder</i>	Agilent Technologies, Waldbronn

2.9 Oligonukleotide

2.9.1 Oligonukleotide für die relative mRNA-Quantifizierung

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers GmbH (Ulm) bezogen.

Tab. 2.3: Primer für die relative mRNA-Quantifizierung der Haushaltsgene mittels *real-time* PCR. Aufgelistet sind die Primer für die Quantifizierung der Haushaltsgene und die entsprechenden PCR-Bedingungen.

Zielgen	Sequenz 5'-3'	Referenzsequenz ¹	Größe [bp]	T _A ² [°C]	T _S ³ [°C]
<i>hβ2M</i>	TGTGCTCGCGCTACTCTCTCTT CGGATGGATGAAACCCAGACA	NM_004048	137	61,0	82,9
<i>hGAPDH</i>	AGGTCGGAGTCAACGGAT TCCTGGAAGATGGTGATG	NM_002046	223	59,6	83,0
<i>hHPRT1</i>	GCTGACCTGCTGGATTAC TGCGACCTTGACCATCTT	NM_000194	258	59,6	79,3

¹Referenzsequenz wurde aus der Datenbank *GenBank* entnommen.

²T_A: *Annealing*-Temperatur

³T_S: Schmelztemperatur

Tab. 2.4: Primer für die relative mRNA-Quantifizierung kalzifizierungsassoziierter Proteine mittels *real-time* PCR. Aufgelistet sind die Primer für die Quantifizierung kalzifizierungsassoziierter Proteine und die entsprechenden PCR-Bedingungen.

Zielgen	Sequenz 5'-3'	Referenz-sequenz ¹	Größe [bp]	T _A ² [°C]	T _S ³ [°C]
<i>hABCC6</i>	CCTGCTGATGTACGCCTT ACGCGAGCATTGTTCTGA	NM_001171	267	59,6	88,7
<i>hALP</i>	AACTCCTGACTTGACC AATTCTGCCTTTCCAC	NM_000478	188	58,0	87,0
<i>hANKH</i>	AGAATAACCCCAGCAACA AAGGCAAAGTCCACTCC	NM_054027	166	58,0	85,0
<i>hBMP2</i>	CCAGCCGAGCCAACA CAGTCCACCGCATCACAG	NM_001200	345	60,8	83,6
<i>hENPP1</i>	AATGCCCTTTGGACATC CCCGTAACTCACTTTGGT	NM_006208	151	59,6	79,8
<i>hMGP</i>	AGCGGTAGTAACCTTTGTG GTGGACAGGCTTAGAG	NM_000900	160	57,0	81,0
<i>hOPN</i>	TGATGACCATGTGGACAG ACCATTCAACTCCTCGCT	NM_000582	322	59,6	81,5
<i>hRunx2</i>	CCGCCTCAGTGATTTAG TCAGGTAGGAGGGGTAAG	NM_004348	191	60,8	86,5
<i>hPIT-1</i>	GGTTTGGGAAGAAGAG GCCAACAGACACAACAG	NM_005415	172	56,0	83,8
<i>hPIT-2</i>	CCTTCCTGAGGCTTCCAATC GCAGCATAGAATACTGGGAGTG	NM_006749	243	59,0	84,3

¹Referenzsequenz wurde aus der Datenbank *GenBank* entnommen.

²T_A: *Annealing*-Temperatur

³T_S: Schmelztemperatur

Tab. 2.5: Primer für die relative mRNA-Quantifizierung von ECM-Proteinen mittels *real-time* PCR. Aufgelistet sind die Primer für die Quantifizierung von ECM-Proteinen und die entsprechenden PCR-Bedingungen.

Zielgen	Sequenz 5'-3'	Referenz-sequenz ¹	Größe [bp]	T _A ² [°C]	T _S ³ [°C]
<i>hCol1A1</i>	GATGTGCCACTCTGACT GGTTCTTGCTGATG	NM_000088	151	58,0	87,0
<i>hCol3A1</i>	GGGGTCTCTGGGTTAC GTGGTAGCCCTGGTGAGA	NM_000090	298	58,0	89,1
<i>hELN</i>	CCGCTAAGGCAGCCAAGTATGGA AGCTCCAACCCGTAAGTAGGAAT	NM_000501	275	57,0	89,0
<i>hFN</i>	CCCAGGGAAGATGTAGA CTCTTCCCGAACCTTATG	NM_212482	291	57,0	84,6
<i>hFBN1</i>	TCCCGTGGGATATGTGCTCAG ACAGCCTTCTCCATCAGGTCTC	NM_000138	172	61,0	83,0
<i>hLOX</i>	GGGCAGATGTCAGAGATT GCCTGTGGTAGCCATAG	NM_002317	258	58,0	84,5
<i>hMMP2</i>	GAGCACTCCCAAGACCCT AGTCCGCCAAATGAACC	NM_004530	255	57,0	88,0
<i>hMMP12</i>	CACATTCAGGAGGCACAAAC ATTTCCACGGTAGTGACAG	NM_002426	275	58,0	84,5
<i>hTGFB1</i>	GCGATACCTCAGCAACC ACGCAGCAGTTCTTCTCC	NM_000660	331	58,0	90,2

¹Referenzsequenz wurde aus der Datenbank *GenBank* entnommen.

²T_A: *Annealing*-Temperatur

³T_S: Schmelztemperatur

2.9.2 Oligonukleotide für die genetische Analyse von Sequenzvariationen

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers GmbH (Ulm) bezogen.

Tab. 2.6: Primer und ihre entsprechenden PCR-Reaktionsbedingungen für die Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP)-Analyse von Einzelnukleotidvarianten (SNV).

SNV	Ref. SNV	Sequenz 5'-3'	Größe [bp]	T _A ² [°C]
ALP (NG_008940) ¹				
c.330C>T	rs1780316	AGGAAGCAGGCAGCTAGGTAG CCTTCACCCCACACAGGTAG	253	60,0
c.787T>C	rs3200254	CGGCCTGGACCTCGTTGACAC GCCCCGCCAGGTGCCTACATA	346	62,0
c.876A>G	rs3200255	CGTCCCTCCTCAGGTCTCTTCG GTCCCTACCTTCCACCAGCAA	155	60,0
c.1190-65C>A	rs1780329	AAGCCACCAAGGAGCCTGAT TAGCCAGGCCATTGCCATAC	158	59,0
ANKH (NG_008273) ¹				
c.-978delC	Zhang <i>et al.</i> (2005)	CCACGTTTCTTTGCCCCCTC CTGGCGGCGGGCGGGGACTG	119	63,0
c.-4G>A	Zhang <i>et al.</i> (2005)	CTGGCCTCCCCGCAGAGTCC GAGCAGGTGACTCCCCTCCG	248	66,0
c.294C>T	rs17251667	TGCAGTGGTCAGGTATCTC CCTCACCTATCAGTGTGTGAAAGACG/T	444	56,0
c.963A>G	rs2288474	CCAGAATAACCCCAGCAACAA GGCCTCCTTGAATAACAATCG	276	56,0
ENPP1 (NG_008206) ¹				
c.511A>C	rs1805101	TTCAGAGTGGCCATGGTAGTG CAACGAGCACCTGACCTTGA	303	62,0
c.313+9G>T	rs7773477	GTGCCAAAGAAGGTAATCAG TGGAGTACCCATAGGAATAG	128	54,0
c.517A>C	rs1044498	GTGGCAGATTCTGTGAGTGAC CATGAGAGGGTGGTGGCA	560	61,0
c.2101-14delT	rs1799774	GACATGAGCTGACAGCTAGA AGAGAACTGTCCGAAGAACGACA	132	61,0

¹Referenzsequenz wurde aus der Datenbank *GenBank* entnommen.

²T_A: *Annealing*-Temperatur

2.10 Sonstige Materialien

Klebefolie für 96er PCR-Platten	Eppendorf, Hamburg
<i>heat-sealing</i> Folie	Eppendorf, Hamburg
Kryostaten-Röhrchen	Roth, Karlsruhe
Neubauerzählkammer	Fleischhacker, Meckenheim
PCR-Platten	Abgene, Epsom, UK
Zellkulturschalen (100 x 20)	Greiner, Solingen
Zellkulturschalen (60 x 15)	BD, Franklin Lakes, USA
Zellkulturschalen (mit 12 Kavitäten)	Greiner, Solingen

Es wurden sterile Einwegreaktionsgefäße, Pipetten, Pipetten-Spitzen, Zellkulturschalen und Glasgefäße der folgenden Firmen verwendet: Greiner, BD, Sartorius, ABgene, Roth, Vivascience, Invitrogen.

2.11 Software und Datenbanken

<i>ABI Prism Sequenz Analysis 5.4</i>	Perkin Elmer, Foster City, USA
<i>Bioanalyzer 2100 Expert Software</i>	Agilent Technologies, Waldbronn
<i>Clone Manager 9</i>	Scientific & Educational Software, Cary, USA
<i>DNASIS MAX</i>	Hitachi Software Engineering Co., Ltd.
<i>Entrez (PubMed/GenBank)</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
<i>geNORM</i>	http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/ genorm/
<i>G*Power 3.1.9</i>	http://www.gpower.hhu.de/
<i>GraphPad Prism 5.01</i>	GraphPad Software, San Diego, USA
<i>Haploview</i>	Broad Institute, Cambridge, USA
<i>Multifactor Dimensionality Reduction 3.0.2</i>	<a href="http://www.multifactor dimensionality
reduction.org/">http://www.multifactor dimensionality reduction.org/
<i>Nanodrop 2000/200c</i>	Thermo Scientific, Wilmington, USA
<i>NEBCutter 2.0</i>	<a href="http://tools.neb.com/NEBCutter2
index.php">http://tools.neb.com/NEBCutter2 index.php
Realplex 1.5	Eppendorf, Hamburg

2.12 Geräte

<i>ABI Prism 310 Genetic Analyzer</i>	Applied Biosystems, Darmstadt
<i>ABI 3730 DNA Analyzer</i>	Applied Biosystems, Darmstadt
Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
ARCHITECT ci8200	Abbott Laboratories, Chicago, USA
<i>Bioanalyzer 2100</i>	Agilent Technologies
Biofuge 13 Heraeus sepatech	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammer XCell	Invitrogen, San Diego, USA
Epics XL Durchflusszytometer	Beckman Coulter, Krefeld
Fusion SL	Peqlab, Erlangen
<i>Heat Sealer</i>	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Mastercycler ep Realplex	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop Nikon Eclipse TE2000-S	Nikon, Düsseldorf
Mikrowelle	AEG, Nürnberg
Nanodrop 2000 Spektralphotometer	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
pH-Meter 766	Knick, Berlin
Spannungsgerät PS 3002	Gibco BRL, Eggenstein
Sterilbank Variolab W90 (Klasse II)	Waldner electronics, Wangen
Stickstofftank 500 series (-150 °C)	MVE, Cleveland, USA
<i>Tecan infinite m200pro</i>	Tecan, Schweiz
<i>Thermocycler TGradient 96</i>	Biometra GmbH, Göttingen
Zentrifugen 5417C, 5417 und 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 6-10, Rotor 11160	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zentrifuge Rotaxa / RP, Rotor 5096	Hettich, Tuttlingen

3 METHODEN

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von adhärent wachsenden, eukaryotischen Zellen

Eukaryotische Zellen (Fibroblasten) werden bei 37 °C und einer CO₂-Atmosphäre von 5 % kultiviert. Alle Arbeiten mit Zellen erfolgen unter sterilen Bedingungen. Das Kulturmedium (DMEM) wird mit 1 % Antibiotika/Antimykotika und 10 % FCS versetzt (2.3). Ein Medienwechsel erfolgt alle drei bis vier Tage.

3.1.2 Passagieren von adhärent wachsenden, eukaryotischen Zellen

Die adhärent wachsenden Zellen werden bei einer Konfluenz von 80 bis 100 % passagiert, um weiteres Wachstum zu ermöglichen. Dazu wird das Medium aus der Kulturschale entfernt und die Zellen mit 1 x DPBS (2.3) gewaschen. Anschließend erfolgt die Ablösung mittels Trypsin-EDTA-Lösung (1 x, 2.3) und einer Inkubation bei 37 °C für etwa sieben Minuten. Das erfolgreiche Ablösen der Zellen wird unter dem Mikroskop verifiziert. Die Inhibierung der Proteaseaktivität wird durch Zugabe von FCS-haltigem Medium erzielt. Die Zellen werden anschließend für fünf Minuten bei 1000 x g pelletiert und in Komplett-medium resuspendiert. Die Zellsuspension wird direkt ausgesät oder für die Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer eingesetzt.

3.1.3 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Die suspendierten Zellen (3.1.2) werden in einer Zählkammer nach Neubauer ausgezählt. Das Raster der Zählkammer ist in neun Quadrate unterteilt. Die vier Eckquadrate haben jeweils eine Fläche von 0,1 mm² und ein Volumen von 10⁻⁴ mL und sind wiederum in 16 kleinere Quadrate unterteilt. Es wird ein Aliquot der Zellsuspension entnommen und je nach zu erwartender Zellzahl im Rahmen von 1:1 bis 1:5 mit Trypanblaulösung verdünnt. 20 µL der Suspension werden in die Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Zellen innerhalb der vier Eckquadrate der Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Abgestorbene Zellen erscheinen blau, vitale Zellen sind hingegen farblos, da der Farbstoff nicht über die Membran eindringen kann. Die Anzahl an Zellen in einem Milliliter Zellsuspension errechnet sich aus dem mit dem Verdünnungsfaktor sowie mit 10⁴ multiplizierten Mittelwert an Zellen in einem Eckquadrat der Zählkammer.

3.1.4 Kryokonservierung und Revitalisierung von eukaryotischen Zellen

Eukaryotische Zellen können in flüssigem Stickstoff über einen längeren Zeitraum gesichert werden. Hierzu werden die einzufrierenden Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 80 bis 100 % kultiviert, wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben. Nach Trypsinierung und Zentrifugation (5 min, 1000 × g) wird das Zellpellet in 1000 µL Einfriermedium (40 % DMEM, 40 % FCS, 20 % DMSO) resuspendiert und in ein Kryogefäß überführt. Um einen schonenderen Einfrierprozess zu gewährleisten werden die Kryokulturen zunächst über Nacht bei -80 °C in einen vorgekühlten Aluminiumblock eingefroren und am nächsten Tag zur langfristigen Sicherung in flüssigen Stickstoff umgelagert.

Für die Revitalisierung eukaryotischer Zellen werden die aufzutauenden Zellen aus dem Stickstofftank sofort auf Eis gelagert. Umgehend nach dem Auftauen der Zellen werden diese in 37 °C warmes Komplettmedium überführt. Am nächsten Tag erfolgt ein Mediumwechsel, um das zellschädigende DMSO aus dem Einfriermedium zu entfernen.

3.1.5 Zellkultivierung unter kalzifizierenden Bedingungen

Zur Untersuchung des Kalzifizierungsprozesses im Zellkulturmodell werden primäre, humane Fibroblasten über einen Zeitraum von 6, 12 oder 21 Tagen in einem Kalzifizierungsmedium kultiviert (2.3). Hierzu werden die Zellen trypsinisiert (3.1.2), die Zellzahl bestimmt (3.1.3) und mit einer Zellzahl von $9,5 \times 10^4$ Zellen/cm² in kleine Zellkulturschalen (60 x 15 mm) für die spätere relative Quantifizierung ausgesät. Für eine spätere histochemische Färbung (3.1.7), sowie zur Bestimmung des Kalziumgehaltes werden $3,2 \times 10^4$ Zellen/cm² in einer 12-Kavitäten-Zellkulturschale ausgesät. Die Zellen adhären über Nacht bei 37 °C und einer CO₂-Atmosphäre von 5 %. Am nächsten Tag wird das Komplettmedium durch das Kalzifizierungsmedium ersetzt. Das Medium wird alle drei Tage erneuert.

3.1.6 Ernte von adhären wachsenden, eukaryotischen Zellen

Für weitere molekularbiologische und proteinchemische Untersuchungen der Zellen und des Überstandes werden die Zellen nach folgendem Protokoll geerntet. Der Zellkulturüberstand (ZKÜ) wird in 2 mL große Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert. Die Zellen werden mit 1 × DPBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (2.3) für sieben Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgt durch Zugabe des der Trypsinmenge entsprechenden Volumens an Medium. Anschließend werden die abgelösten Zellen bei 1000 × g für fünf Minuten pelletiert. Der

Überstand wird verworfen, das Pellet mit 1 mL DPBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das gereinigte Zellpellet wird in 350 μ L Lysepuffer (*NucleoSpin RNA II*, Machery-Nagel), welches mit 1 % β -Mercaptoethanol versetzt wird, resuspendiert. Bis zur RNA-Isolierung (3.2.1) wird das Lysat bei -80 °C gelagert.

3.1.7 Histochemische Alizarin-Rot-S-Färbung und Quantifizierung

Kalzium bildet zusammen mit Alizarin Rot S (ARS) einen Komplex, welcher durch eine intensive rote Färbung charakterisiert ist. Somit ist ein histochemischer Nachweis von Kalziumpräzipitaten in der ECM möglich. Diese Kristalle bilden sich im Rahmen des Kalzifizierungsprozesses bei Fibroblasten aus.

Für die Färbung wird zunächst der ZKÜ abgenommen, die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und für 30 s mit 70 %igem Ethanol fixiert. Verbleibendes Ethanol wird durch zügiges, zweimaliges Waschen mit entionisiertem Wasser entfernt. Zur Färbung wird eine frisch angesetzte 1 %ige ARS-Färbelösung (2.5) verwendet. Hiervon werden 2 mL vorsichtig auf die Zellen gegeben und für 5 min inkubiert. Durch gründliches Spülen mit Wasser wird der überschüssige Farbstoff entfernt. Zur mikroskopischen Untersuchung werden die Zellen mit Wasser überschichtet.

Zur Quantifizierung der rotgefärbten Kalziumpräzipitate werden 800 μ L 10 %ige Essigsäure auf die Zellen gegeben und bei Raumtemperatur unter schütteln 30 min inkubiert. Die Zellen werden anschließend mit einem *Zellscraper* von der Oberfläche abgelöst, in ein 1,5-mL Reaktionsgefäß überführt und 30 s gevortext. Anschließend wird die Zellsuspension bei 85 °C für 10 min erhitzt und dann 5 min auf Eis abkühlen gelassen. Danach wird die Zellsuspension bei 20000 \times g für 10 min pelletiert. 500 μ L des Überstandes werden in einem neuen Reaktionsgefäß mit 200 μ L 10 %igem Ammoniumhydroxid neutralisiert. Ein Aliquot (150 μ L) des Überstandes wird in Triplikaten bei 405 nm im Tecan infinite m200pro (Tecan, Schweiz) bestimmt (Gregory *et al.* 2004).

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllysaten

Die Isolierung und Aufreinigung der Gesamt-RNA aus den geernteten, lysierten Zellen zur Quantifizierung der Expression verschiedener Gene wird mit dem *NucleoSpin RNA II Kit* (Macherey-Nagel) durchgeführt. Die Durchführung erfolgt nach Herstellerprotokoll und reinigt die RNA nach dem Prinzip der Säulenaffinitätschromatographie auf.

Die Zellen werden wie unter 3.1.6 geerntet und mit RA1-Puffer (mit 1 % β -Mercaptoethanol) lysiert. Das Lysat wird auf die *NucleoSpin*-Filtersäule überführt und 1 min bei 11000 \times g zentrifugiert. Ein Aliquot von 50 μ L des Eluats wird für eine spätere DNA-Quantifizierung entnommen (3.2.2). Anschließend wird das Eluat mit 350 μ L Ethanol versetzt und durch mehrfaches pipettieren homogenisiert. Zur Bindung der RNA an die Säulenmatrix wird das homogenisierte Lysat auf die *NucleoSpin RNA II*-Säule gegeben und 1 min bei 11000 \times g zentrifugiert. Es werden 350 μ L MDB (*Membrane Desalting Buffer*), zum Entfernen störender Salze auf die Säule gegeben und erneut 1 min bei 11000 \times g zentrifugiert. Im nächsten Schritt erfolgt der Verdau der DNA. 95 μ L einer vorbereiteten DNase-Reaktionslösung (10 μ L rDNase, 90 μ L DNase Reaktionspuffer) werden auf die Säule gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss erfolgen mehrere Waschschrte (mit 200 μ L RA2, 600 μ L RA3 und 250 μ L RA3). Die ersten zwei Waschschrte werden bei 11000 \times g für 1 min zentrifugiert. Der finale Waschschrte wird zum Entfernen der Puffer 2 min zentrifugiert. Zur vollständigen Trocknung ist es möglich, den letzten Schritt ohne Zugabe von Puffer zu wiederholen. Um die gereinigte RNA von der *NucleoSpin RNA II* Säule zu eluieren werden 30 μ L RNase-freies Wasser zugegeben, 1 min inkubiert und 1 min bei 11 000 \times g zentrifugiert. Die RNA wird bei -80 °C gelagert und kann nach anschließender Konzentrationsbestimmung (3.2.3) und Bestimmung der RNA-Integrität (3.2.4) für die cDNA-Synthese (3.2.5) verwendet werden.

3.2.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus Zelllysaten und aus EDTA-Blut

Die Gesamt-DNA aus Zelllysaten und aus EDTA-Blut wird mit dem *NucleoSpin Blood Kit* (Macherey-Nagel) nach Anweisungen des Herstellers isoliert. Im ersten Schritt werden 200 μ L EDTA-Blut mit 25 μ L Proteinase K und 200 μ L Puffer B3 bei 70 °C für 15 min lysiert. Für die Isolierung der DNA aus den Zelllysaten entfällt an dieser Stelle der Lyseschrte, da die Zellen bereits im ersten Schritt der RNA-Isolierung lysiert wurden (3.2.1). Zum bei der RNA-Isolation entnommenen Aliquot werden 75 und zum lysierten EDTA-Blut 210 μ L Ethanol hinzugefügt, um die Bindung der DNA während eines Zentrifugationsschrtes (1 min, 11000 \times g)

an die Silikamembran einer Säule zu ermöglichen. Die Bindung ist reversibel und wird nach zwei Waschschriften aufgehoben, indem nach dem Trocknen der Membran durch Zentrifugation (1 min, 11000 × g) bei niedriger Ionenstärke in einen leicht alkalischen Puffer eluiert wird. Der Elutionspuffer wird zuvor auf 70 °C vorgewärmt, direkt auf die Membran pipettiert und für 3 min inkubiert. Durch Zentrifugation (1 min, 11000 × g) wird die aufgereinigte DNA gewonnen.

3.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration und der Reinheit isolierter Nukleinsäuren erfolgt mit dem Nanodrop 2000 Spektralphotometer bei den Wellenlängen 260, 280 und 320 nm. Nukleinsäuren weisen aufgrund der aromatischen Ringe ein Absorptionsmaximum bei 260 nm auf. Die Konzentration wird mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

A: Absorption
 ε : Extinktion [$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$]
 c: Konzentration [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$]
 d: Schichtdicke der Küvette [mm]

Durch eine zusätzliche Messung der Absorption bei 280 nm kann die Verunreinigung durch Proteine bestimmt werden. Eine Absorption bei 320 nm deutet auf eine erhöhte Menge an Salzen hin. Die Reinheit der Probe lässt sich aus dem Quotienten der Extinktionen bestimmen. Je reiner die DNA-Probe ist, desto näher liegt der Quotient bei 1,8. Für die RNA-Probe gilt, je reiner desto näher liegt der Quotient bei 2,0. Für die Messung wird je 1 μL der Probe aufgetragen und gegen den Puffer gemessen, der als Lösungsmittel dient.

3.2.4 Bestimmung der RNA-Integrität

RNA ist eine sehr instabile Nukleinsäure, welche bereits in der Zelle einem stetigen Auf- und Abbau unterliegt. Durch ubiquitäre RNasen kommt es zur Degradierung der RNA. Für die spätere relative Quantifizierung der mRNA (3.2.6.3) ist es deswegen essentiell, deren Qualität zu bestimmen. Die Integrität der RNA wird mittels Kapillargelelektrophorese im *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies) bestimmt. 1 μL der isolierten RNA (3.2.1) wird nach Herstellerangaben des *Agilent RNA 6000 Nano Kit* in den *RNA 6000 Nano Chip* pipettiert und direkt gemessen. Das Gel wird zuvor frisch angesetzt und mit dem *RNA Nano Dye* versetzt. Als Marker wird auf jedem *Chip* die *RNA 600 Nano Ladder* mitgeführt. Die *Bioanalyzer 2100 Expert Software* ermittelt auf der Basis der ribosomalen Untereinheiten 28S- und 18S-rRNA und deren Abbauprodukten die so genannte RNA-Integritätsnummer (RIN). Der Wert liegt für eine vollständig intakte RNA bei 10 und für eine komplett degradierte RNA bei 1.

3.2.5 cDNA-Synthese aus isolierter Gesamt-RNA (reverse Transkription)

Die aufgereinigte RNA (3.2.1) wird mit Hilfe einer retroviralen RNA-abhängigen DNA-Transkriptase, auch reverse Transkriptase, in komplementäre DNA (*complementary* DNA, cDNA) umgeschrieben. Die cDNA-Synthese erfolgt nach Herstelleranweisungen mittels des *SuperScript II Reverse Transkriptase*-Reaktionssystems (Invitrogen). Die Konzentration der RNA-Lösung wird bestimmt und das einer Menge von 2 µg RNA entsprechende Volumen mit 2 µL Oligo-dT-Primern sowie 2 µL dNTPs versetzt. Es werden Oligo-dT-Primer aus 12 bis 18 Thymidinen, die an den Poly-A-Schwanz von mRNAs binden, verwendet, sodass nur polyadenylierte RNA revers transkribiert wird. Mit RNase-freiem Wasser wird jeder Ansatz auf ein Gesamtvolumen von 24 µL aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wird gut gemischt und für 5 min bei 65 °C inkubiert. Die Reaktionsgefäße werden direkt auf Eis abgekühlt. Es folgt die Zugabe von 8 µL 5 × *First-Strand-Buffer* und 4 µL DTT. Nach einer Inkubation von 2 min bei 42 °C werden 2 µL *Super-Script II RT* hinzugegeben, gemischt und der Reaktionsansatz für 5 min bei 25 °C sowie für 50 min bei 42 °C inkubiert. Die Denaturierung der reversen Transkriptase erfolgt bei 70 °C für 15 min. Bis zur weiteren Verwendung wird die cDNA bei -20 °C gelagert.

3.2.6 Amplifikation von DNA

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR), welche 1987 von Kary B. Mullis erdacht und 1988 von Saiki *et al.* zum ersten Mal veröffentlicht wurde, ermöglicht eine *in-vitro*-Vervielfältigung von sehr geringen Nukleinsäuremengen (Saiki *et al.* 1988). Das der Reaktion zugrunde liegende Prinzip basiert auf drei zyklischen Schritten: Der Denaturierung des DNA-Doppelstranges, der Anlagerung von spezifischen Primern an den zu amplifizierenden Sequenzbereich (*Annealing*) und der Verlängerung der Primer (*Elongation*). Diese Schritte werden mehrfach wiederholt.

Der erste Schritt ist eine Hitzedenaturierung zur Trennung des DNA-Doppelstranges in zwei Einzelstränge. Dieser Schritt wird bei 95 °C durchgeführt und macht eine thermostabile Polymerase, wie die *Taq*-Polymerase, nötig. Bei einer spezifischen *Annealing*-Temperatur hybridisieren die Primer mit der Matrix/*Template*-DNA. Um die spezifische *Annealing*-Temperatur zu bestimmen wird zuvor eine Temperatur-Gradienten-PCR (3.2.6.2) durchgeführt. Nach Anlagerung der Primer verlängert die Polymerase die hybridisierten Oligonukleotide in 5'-3'-Richtung indem es den komplementären DNA-Strang als Matrix nutzt. Diese Reaktion erfolgt im Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase bei 72 °C. Durch erneute Hitzedenaturierung trennen sich der Matrizenstrang und der neu gebildete Strang. Ein neuer Syntheszyklus kann beginnen.

3.2.6.1 Standard-Polymerase-Kettenreaktion

Für konventionelle PCRs wird ein wie in Tabelle 3.1 dargestellter Reaktionsansatz verwendet. Entsprechend der Anzahl der Proben wird ein *Mastermix* hergestellt, welcher alle nötigen Komponenten mit Ausnahme der Proben-DNA enthält. Anschließend werden 5 µL der DNA zugegeben und gemischt. Zudem wird eine Negativkontrolle mit Wasser anstatt der DNA angesetzt. Der Deckel des *Thermocycler* wird konstant auf 105 °C beheizt, so dass keine Feuchtigkeit kondensieren kann. Das Temperaturprogramm wird wie in Tabelle 3.2 durchlaufen. Im Anschluss wird zur Kontrolle der Amplifikation eine elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel durchgeführt (3.2.7).

Tab. 3.1: Standardprotokoll für eine PCR im Block-Thermocycler.

Reagenz	Konzentration	1 × Volumen
H ₂ O		12,95 µL
Reaktionspuffer	10,0 ×	2,50 µL
MgCl ₂	2,5 mM	3,50 µL
Forward Primer	25,0 µM	0,25 µL
Reverse Primer	25,0 µM	0,25 µL
dNTPs (incl. dUTP)	2,5 mM	0,25 µL
Taq-DNA Polymerase	5,0 U/µL	0,30 µL
DNA-Template		5,00 µL
Summe		25,00 µL

Tab. 3.2: Standardprogramm am Block-Thermocycler für alle Primersysteme.

Denaturierung (1 ×)	Amplifikation (35 ×)			Terminale Elongation (1 ×)
	Denaturierung	Annealing	Elongation	
95 °C, 120 s	95 °C, 60 s	T _A , 60 s	74 °C, 120 s	72 °C, 300 s

T_A: *Annealing*-Temperatur

3.2.6.2 Temperatur-Gradienten-PCR

Die Etablierung eines neuen PCR Primerpaares erfordert die Bestimmung der spezifischen *Annealing*-Temperatur dieser Primer. Zudem wird die Spezifität der Primer anhand der Produktgröße und etwaigen Nebenprodukten charakterisiert. Hierzu wird ein Temperatur-Gradient zwischen 50 °C und 70 °C für den *Annealing*-Schritt gewählt und eine PCR nach dem Standard-PCR-Protokoll (3.2.6.1) angesetzt. Die PCR-Produkte der verschiedenen *Annealing*-Temperaturen werden in einem 1,5 %igem Agarosegel (3.2.7) aufgetrennt und die Bandenstärken wie die Spezifität vergleichend ausgewertet. Die stärkste Bande zeigt das Optimum für die T_A an, da sich hier am meisten Amplifikat gebildet hat. Im Folgenden wird die bestimmte *Annealing*-Temperatur für diese PCR verwendet.

3.2.6.3 Relative quantitative *real-time* PCR

Für die relative, quantitative Bestimmung eines Expressionsniveaus bestimmter mRNA-Transkripte wird die reverse Transkription (3.2.5) mit anschließender *real-time* PCR eingesetzt. Das verwendete *SYBR-Green* Fluorophor interkaliert nur in doppelsträngige DNA und seine Fluoreszenz ist proportional zu der gebildeten Menge an Amplifikat. Die Detektion der gebildeten PCR-Produkte kann in Echtzeit (*real-time*) bereits während der laufenden Amplifikation erfolgen. Die Kinetik der Reaktion ermöglicht die Quantifizierung der eingesetzten Menge an cDNA. Zu Beginn der Reaktion bleiben das Amplifikat und somit die Fluoreszenz nahezu konstant. Erst ab einer gewissen Konzentration gelangt die Reaktion in ihre exponentielle Phase. Nur zu Beginn der exponentiellen Phase ist eine zuverlässige Quantifizierung möglich. Der Beginn wird durch den so genannten C_T -Wert (*cycle threshold*) festgelegt. Hier ist ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau erreicht. Anhand dieser Kinetik und dem Zyklus in welchem der C_T -Wert erreicht wird, können Rückschlüsse auf die Ausgangskonzentration gezogen werden. Je früher der Schwellwert überschritten wird, desto höher ist die entsprechende cDNA-Konzentration respektive mRNA-Startmenge (Bustin *et al.* 2009).

Ein typischer Ansatz für die *real-time* PCR ist in Tabelle 3.3 dargestellt. Als *DNA-Template* dient cDNA in einer 1:10 Verdünnung (0,2 µg) bzw. einer 1:5 Verdünnung (0,4 µg) für das *ABCC6*-Zielgen. Jede Probe wird in drei technischen Replikaten analysiert. In der *SYBR-Green*-Lösung sind bereits Mg^{2+} -Ionen, dNTPs, Stabilisatoren und die *Platinum Taq* DNA-Polymerase enthalten. Die Polymerase liegt dabei in einem inaktiven Komplex mit einem monoklonalen Antikörper vor. Des Weiteren beinhaltet die *SYBR-Green*-Lösung eine Uracil-DNA-Glykosidase (UDG) und Desoxyuridintriphosphate (dUTPs) zur Vermeidung von Kontaminationen. Ein UDG-Verdau zu Beginn der PCR baut jegliche Uracil-enthaltenden Nukleotidkontaminationen ab. Dies gewährleistet die alleinige Amplifikation der Zielsequenz. Die abschließende Schmelzkurven-Analytik dient zur Bestimmung der Produktspezifität und zum Ausschluss von Kontaminationen. Außerdem sind alle Primerpaare Intron-überspannend gewählt, so dass nur cDNA aus zuvor gespleißter mRNA in die Messungen eingeht und mögliche DNA-Kontaminationen die Ergebnisse nicht beeinflussen können.

Tab. 3.3: Protokoll für eine *real-time* PCR-Reaktion.

Reagenz	Konzentration	1 × Volumen
H ₂ O		2,00 µL
Forward Primer	25,0 µM	0,25 µL
Reverse Primer	25,0 µM	0,25 µL
<i>SYBR-Green</i>		5,00 µL
DNA-Template		2,50 µL
Summe		10,00 µL

Der Ansatz wird in eine weiße 96-Kavitäten Platte pipettiert, mit einer optischen *heat-sealing* Folie (Eppendorf) verschweißt und 1 min bei 700 × g zentrifugiert. Die *real-time* PCR wird nach folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

Tab. 3.4: Temperaturprofil für eine *real-time* PCR-Reaktion.

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
<i>Uracil-N-Glykosidase</i> Verdau	120 s	50 °C	1
Aktivierung der <i>Platinum Taq</i> DNA Polymerase	120 s	95 °C	1
Denaturierung	10 s	95 °C	45
<i>Annealing</i>	15 s	T _A	
Elongation	20 s	72 °C	
Detektion	∞	72 °C	
Schmelzkurve	15 s	95 °C	1
	900 s	60 °C	
Kühlen	15 s	95 °C	1
	10 s	30 °C	

T_A: *Annealing*-Temperatur

Die Quantifizierung der Expression erfolgt mit Hilfe des C_T-Wertes des Zielgen-Transkripts in Relation zu denen der Haushaltsgene (*housekeeping gene*; HKG). Dies sind nicht regulierte Gene, welche unabhängig vom Zellstadium oder der Behandlung exprimiert werden. Als Referenz dienen im Rahmen dieser Arbeit die drei Haushaltsgene Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*), beta-2-Mikroglobulin (*β2M*) und Hypoxanthin-phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*), welche sich in einer Vergleichsanalyse von acht verschiedenen Genen mittels geNORM als die stabilsten Haushaltsgene erwiesen haben (Vandesompele *et al.* 2002). Die *Software* geNORM analysiert paarweise Korrelationen zwischen den einzelnen Haushaltsgenen und berechnet daraus das Stabilitätsmaß M, anhand dessen sich die getesteten Gene nach der Stabilität ihrer Expression ordnen lassen. Die stabilsten Haushaltsgene, d. h. die mit dem niedrigsten Wert von M, werden dann zu einem Index verknüpft, indem der geometrische Mittelwert berechnet wird. Die angewendete effizienzkorrigierte relative Quantifizierung beruht auf der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Zur Kompensation von Schwankungen der Expression der HKGs, wird ein so genannter HKG-Index gebildet und zu Normalisierung genutzt. Der kalkulierte Normalisierungsfaktor beruht auf dem geometrischen Mittel der ΔC_T -Werte aller Haushaltsgene. Dieser Normalisierungsfaktor wird zur Bildung des $\Delta\Delta C_T$ -Wertes genutzt und zur Quantifizierung der mRNA-Expression des Zielgen-Transkripts genutzt (Vandesompele *et al.* 2002).

Für die effizienzkorrigierte relative Quantifizierung der mRNA ist es nötig die Amplifikations-effizienz der entsprechenden PCR zu kennen. Hierzu wird eine Standardkurve mit jeweils drei technischen Replikaten von unterschiedlichen cDNA-Verdünnungen (1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500) erstellt. Aus der Steigung des logarithmisch-linearen Bereiches der Kurve wird die PCR Effizienz nach folgender Formel errechnet:

$$E = 10^{-\frac{1}{m}}$$

E: Effizienz der PCR; m: Steigung

Das theoretische Maximum der Effizienz liegt bei 2, da sich hier die Menge an Produkt pro Zyklus verdoppelt.

3.2.7 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Negativ geladene DNA-Fragmente lassen sich in einer Gelmatrix aus Agarose im elektrischen Feld ihrer Größe entsprechend auftrennen. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente von ihrer Größe und Eigenladung ab. Die Dichte der Gelmatrix wird durch die Agarosekonzentration bestimmt. Im Allgemeinen werden Agarosekonzentrationen zwischen 0,8 % und 3 % Agarose verwendet, wobei Gele mit niedriger Agarosekonzentration für große Fragmente und Gele mit höherer Agarosekonzentration für kleinere Fragmente benutzt werden. Mit steigender Konzentration steigt das Auftrennungsvermögen. Die Detektion der DNA geschieht mittels Ethidiumbromid-Färbung. Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen der Nukleinsäuren im Doppelstrang und erzeugt auf einem UV-Transilluminator eine Fluoreszenz im sichtbaren Bereich.

Für Fragmentlängen von etwa 1000 bp bis 110 bp abwärts werden 1,5 %ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung eines 1,5 %igen Gels werden 15 g/L Agarose durch Aufkochen in 0,5 % TBE-Puffer gelöst. Pro 100 mL flüssiger Agaroselösung werden 4 µL einer Ethidiumbromid-Stammlösung (37,5 mg/L Ethidiumbromid) dazugegeben. Das Gel wird in die Gelkammern gegossen, Gelkämme zur Erzeugung von Taschen im Gel werden in den Halterungen der Gelkammern platziert und nach Polymerisation der Gele vorsichtig entfernt.

Zur Elektrophorese wird das Gel in der Elektrophoresekammer mit 0,5 % TBE-Puffer überschichtet. Es werden 10 µL Probe mit 4 µL Auftragspuffer vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Anschließend erfolgt die elektrophoretische Auftrennung bei 100 V und 60 mA. Die Auftrennungsdauer beträgt 0,7 h.

Um die Länge von DNA-Fragmenten in Basenpaaren zu ermitteln, wird parallel zur Probe bei der Agarose-Gelelektrophorese ein DNA-Längenstandard (pUC19/MspI DNA-Ladder, MBL, Bielefeld) mit aufgetragen. Der DNA-Längenstandard besteht aus DNA-Fragmenten mit bekannter Größe. Anhand des Bandenmusters lässt sich die Größe der Probenfragmente näherungsweise bestimmen.

3.2.8 Nachweis von Einzelnukleotidvarianten mittels Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen-Analyse

Um Einzelnukleotidvarianten (SNV, *single nucleotide variants*) über eine Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP)-Analyse zu detektieren, wird das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit einer Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease durch die Mutation genutzt. Die hydrolytische Spaltung zur Analyse erfolgt nach Amplifikation eines DNA-Fragments, welches die SNV beinhaltet. Wenn keine natürlich vorkommenden Restriktionsschnittstellen für die Analyse der SNV vorhanden sind, kann bei Amplifikation des DNA-Fragmentes über einen der SNV naheliegenden Primer, welcher eine Mutation einer Base am 3'-Ende trägt, eine Restriktionsstelle für eine bestimmte Endonuklease eingeführt werden.

Tab. 3.5: Die untersuchten SNV mit den verwendeten Restriktionsenzymen, den entsprechenden Parametern und dem resultierenden heterozygoten (ht) Fragmentmuster.

SNV	Ref. SNV	Restriktionsenzym (Puffer) ²	T _R ³ [°C]	Erkennungssequenz ⁴	Fragmentmuster (ht)
ALP (NG_008940)¹					
c.330C>T	rs1780316	HpyCH4III (NEB1)	65	5'...ACN↓GT...3' 3'...TG↑NCA...5'	253 bp 215 bp 38 bp
c.787T>C	rs3200254	BsmAI (NEB2)	55	5'...GTCTCN↓...3' 3'...CAGAG(N) ₅ ↑...5'	346 bp 302 bp 43 bp
c.876A>G	rs3200255	MspI (NEB2)	37	5'...C↓CGG...3' 3'...GGC↑C...5'	155 bp 130 bp 25 bp
c.1190-65C>A	rs1780329	Sau3AI (NEB4)	37	5'... ↓GATC...3' 3'...CTAG↑...5'	158 bp 141 bp 17 bp
ANKH (NG_008273)¹					
c.-978delC	Zhang <i>et al.</i> (2005)	BseAI (Tango)	55	5'... T↓CCGGA...3' 3'...AGGCC↑T...5'	119 bp 105 bp 4 bp
c.-4G>A	Zhang <i>et al.</i> (2005)	BsMFI (Tango)	37	5'...GGGAC(N) ₁₀ ↓...3' 3'...CCCTG(N) ₁₄ ↑...5'	248 bp 182 bp 66 bp
c.963A>G	rs2288474	HaeIII (NEB4)	37	5'...GG↓CC...3' 3'...CC↑GG...5'	276 bp 225 bp 51 bp
ENPP1 (NG_008206)¹					
c.511A>C	rs1805101	BstNI (Puffer R)	37	5'...CC↓WGG...3' 3'...GGW↑CC...5'	304 bp 240 bp 60 bp
c.313+9G>T	rs7773477	SgeI (Puffer SgeI)	37	5'...CNNG (N) ₉ ↓...3' 3'...GNNC(N) ₁₃ ↑...5'	128 bp 97 bp 31 bp
c.517A>C	rs1044498	Eco47I (Puffer R)	37	5'...G↓GWCC...3' 3'...CCWG↑G...5'	560 bp 330 bp 230 bp
c.2101-14delT	rs1799774	NlaIII (NEB4+BSA)	37	5'...CATG↓...3' 3'...↑GTAC...5'	132 bp 110 bp 22 bp

¹Referenzsequenz wurde aus der Datenbank *GenBank* entnommen.

²Puffer: NEB - *New England Biolabs*; Tango-Puffer, Puffer R, Puffer SgeI: Fermentas.

³T_R: Restriktionstemperatur

⁴↓ kennzeichnet die Spaltstelle in der Erkennungssequenz; N = A, C, G oder T; Y = A oder G; R = C oder T

Im Rahmen dieser Arbeit wurden elf unterschiedliche SNV in drei PP_i-metabolisierenden Genen mittels RFLP untersucht. Die entsprechenden verwendeten Primer sind in Tabelle 2.6 aufgelistet. In Tabelle 3.5 sind die SNV mit dem entsprechenden Restriktionsenzym, dessen Temperaturoptimum (Restriktionstemperatur; T_R), der Erkennungssequenz mit der entsprechenden Spaltstelle und den daraus resultierenden Restriktionsfragmentgrößen aufgelistet.

Die Spaltungsreaktionen (Tab. 3.6) werden über Nacht bei der in Tabelle 3.5 angegebenen Temperatur inkubiert und anschließend über Agarose-Gelelektrophorese (3.2.7) im direkten Vergleich mit Kontrollen (homozygot-Wildtyp; heterozygot- und homozygot-mutiert) aufgetrennt.

Tab. 3.6: Ansatz für eine Spaltungsreaktion.

Reagenz	Konzentration	1 × Volumen
H ₂ O		x µL
Puffer	10 ×	2,0 µL
Restriktionsenzym	1-3 U	x µL
BSA (falls erforderlich)	10 ×	0,2 µL
PCR-Produkt		5,0 µL
Summe		20,00 µL

3.2.9 Nachweis von Einzelnukleotidvarianten mittels allelspezifischer PCR

Zur Charakterisierung von bekannten SNV eignet sich die ARMS (*amplification refractory mutation system*)-PCR. Das System erfordert zwei Primer, deren Sequenz den beiden Varianten entspricht, die nachgewiesen werden sollen. Um das Vorhandensein einer der beiden möglichen Varianten nachzuweisen, werden zwei PCRs durchgeführt jeweils mit einem der sequenzspezifischen Primer und einem Gegenprimer. Dabei wird die *Annealing*-Temperatur so gewählt, dass nur dann eine Amplifikation stattfindet, wenn die Sequenzen von Primer und *Template* genau übereinstimmen. Bei einigen Sequenzen lässt sich durch das Einfügen einer Mutation nahe des 3'-Endes des Primers eine bessere Unterscheidung zwischen den Varianten erreichen. Durchgeführte wurde diese Technik für den SNV c.294C>T (rs17251667) im *ANKH*-Gen, da aufgrund des Nukleotidaustausches keine neue Restriktionsschnittstelle entstanden ist.

3.2.10 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die DNA-Fragmente aus PCR-Reaktionen können enzymatisch aufgereinigt werden. Hierzu wird das *ExoSAP*-Verfahren genutzt. 5 µL des Amplifikats werden mit 1 µL *Exonuklease I* (1 U/L) und 1 µL *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) (1 U/L) versetzt. Der Ansatz wird für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Hitzeinaktivierung der Enzyme erfolgt bei 80 °C für 15 min. Abschließend wird auf 4 °C gekühlt.

Die Aufreinigung des *real-time* PCR-Ansatzes erfolgt mit dem *MSB Spin PCRapace Kit* von Invitex. Hierbei wird das Amplifikat mit 250 µL Bindepuffer auf die bereitgestellte Säule überführt und für 3 min bei 10000 × g zentrifugiert. Die Elution erfolgt mit 15 µL HPLC-Wasser bei 1 min und 7000 × g. Das Eluat wird für eine höhere Konzentration an Amplifikat erneut auf die Säule gegeben und eluiert.

3.2.11 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die DNA-Sequenzierung basiert auf dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger (Sanger *et al.* 1977). Bei der Methode der DNA-Sequenzierung wird die doppelsträngige DNA mit Hilfe eines spezifischen Primers und eines Gemisches von dNTPs und Didesoxynukleotidderivaten (ddNTPs) sequenziert. An jedes Didesoxynukleotid sind für die jeweilige Base spezifische Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt. Wird bei der *Elongation* durch die *Taq*-Polymerase ein ddNTP eingebaut, so bewirkt dies einen Kettenabbruch, weil die DNA aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe am 3'-C-Atom der Didesoxyribose nicht mehr verlängert werden kann.

Tab. 3.7: Standard-Sequenzieransatz mit dem *BigDye Terminator Kit*.

Reagenz	Konzentration	1 × Volumen
<i>BigDye</i> v1.1 Prämix		2,00 µL
<i>BigDye</i> Sequenzierpuffer	5 ×	2,00 µL
Primer	2 µM	1,50 µL
H ₂ O		9,50 µL
Aufgereinigtes PCR-Produkt		5,00 µL
Summe		20,00 µL

Entsprechend Tabelle 3.7 wird für jede Probe ein Sequenzieransatz hergestellt und die Sequenzierreaktion mit dem Temperaturprogramm (Tab. 3.8) im Block-Thermocycler durchgeführt.

Tab. 3.8: Temperaturprogramm des Sequenzierungsansatzes.

Denaturierung (1 x)	Sequenzierungsreaktion (30 x)		
	Denaturierung	Annealing	Elongation
95 °C, 120 s	95 °C, 10 s	55 °C, 5 s	60 °C, 240 s

3.2.11.1 Aufreinigung des Sequenzierreaktionsansatzes über Sephadex-Säulen

Nach Ablauf der Sequenzierreaktion erfolgt die Aufreinigung des Sequenzieransatzes mit Hilfe einer Sephadex G50 Gelfiltration nach dem Größenausschluss-Prinzip. In einer Sephadexmatrix können Salze, einzelne Nukleotide und Farbstoffe nach dem Prinzip der Säulenausschlusschromatographie zurückgehalten werden. Kleine Moleküle passieren die Sephadexkügelchen und werden länger in der Matrix zurückgehalten als größere Moleküle, welche die Kügelchen umgehen. Die Porosität der Sephadex-Säule ist zum einen von der molaren Masse des verwendeten Dextrans und zum anderen von der Einführung von Glycerylether-Einheiten, die die Hydroxygruppen der Kohlenhydratketten vernetzen, abhängig. Die Säule wird durch Beladung mit 800 µL Sephadex G50 in 1 x TE-Puffer und einer anschließenden Zentrifugation für 3 min bei 1000 x g equilibriert. Der Reaktionsansatz wird auf die Säule gegeben und anschließend 4 min bei 1000 x g zentrifugiert. Der aufgereinigte Sequenzieransatz wird anschließend mit H₂O *bideest.* 1:1 verdünnt.

3.2.11.2 Analyse der DNA-Sequenzierungsprodukte mittels Kapillarelektrophorese

Die Sequenzierprodukte werden am Kapillarsequenzier ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Darmstadt) aufgetrennt und fluorimetrisch detektiert. Dabei können Einstellungen wie die Laufzeit und die Injektionsspannung sowie die Injektionsdauer variiert werden. Die Injektionsdauer und Spannung hängt von der Ausbeute an Amplifikaten ab.

Tab. 3.9: Standardeinstellungen der Kapillarelektrophorese zur Analyse von Sequenzierprodukten.

Modul	Matrix	Injektion		Elektrophorese		
		Zeit	Spannung	Zeit	Spannung	Temperatur
Seq POP6 Rapid	E	20 s	6 kV	45 min	15 kV	50 °C

In Tab. 3.9 sind die Standardeinstellungen für den Kapillarsequenzier gezeigt. Die von der *ABI Prism 310 Collection Software (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer Software, Applied Biosystems, Darmstadt)* ermittelte DNA-Sequenz wird in einem Fluoreszenz kurvendiagramm dargestellt.

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Bestimmung von Phosphat- und Gesamtproteingehalt

Um den Phosphat- und den Gesamtproteingehalt im Zellkulturüberstand und im Serum zu bestimmen werden Standardmethoden der klinisch-chemischen Analytik genutzt. Alle Messungen erfolgen nach Herstellerangaben im *ARCHITECT ci8200*. Der Phosphatgehalt wird mittels eines heteropolyaziden Komplexes mit Ammonium-Molybdat nachgewiesen. Die Absorption dieses Komplexes kann bei einer Wellenlänge von 340 nm detektiert werden.

3.3.2 Messung von extra- und intrazellulären Kalzium

Für die Messung von extrazellulärem Kalzium im Zellkulturüberstand und im Serum werden Standardmethoden der klinisch-chemischen Analytik genutzt. Alle Messungen erfolgen mit dem Farbstoff Arsenazo-III nach Herstellerangaben im *ARCHITECT ci8200*. Das entstehende Präzipitat kann bei einer Absorption von 660 nm detektiert werden und ist proportional zur Kalziumkonzentration.

Intrazelluläres Kalzium kann über Calcein-Quantifikation bestimmt werden. Dafür werden die Zellen mit 0,1 μM nicht-fluoreszierendem membranpermeablem Calceinacetoxymethylester in serumfreiem DMEM bei 37 °C für 30 min inkubiert (Boraldi *et al.* 2003). Das Acetoxymethylester wird von intrazellulären Esterasen gespalten, wodurch das Fluorochrom Calcein freigesetzt wird. So ist das Calcein in der Lage intrazelluläre Ca^{2+} Ionen zu binden (Takahashi *et al.* 1999; Kim *et al.* 2012). Die Zellen werden mit einem *Zellscraper* von der Oberfläche der Zellkulturschale gelöst. Anschließend werden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und die intrazelluläre Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie (*Epics XL flow cytometer*, Beckman Coulter, Krefeld) detektiert.

3.3.3 Bestimmung von extra- und intrazellulären Pyrophosphatkonzentrationen

Extrazelluläres Pyrophosphat (ePP_i) wird im Zellkulturüberstand mittel enzymgekoppeltem Biolumineszenzassay nach Prosdocimo *et al.* bestimmt (Prosdocimo *et al.* 2009). Im ersten Schritt werden 75 μL Zellkulturüberstand bei 100 °C für 5 min hitzeinaktiviert um eine Hydrolyse des metastabilen PP_i durch enzymatische Restaktivität zu verhindern. Anschließend werden 20 μL Adenosin-5'-Phosphosulfatsodiumsalz (APS, 25 μM) und 4 μL Adenosin-5'-Triphosphatassaymix (FL-AAM) möglichst unter Lichtausschluss hinzugegeben und bei Raumtemperatur (27 °C) für 60 min im Dunkeln in einer weißen 96-Kavitäten-Platte inkubiert.

Der initiale stationäre Zustand der Biolumineszenz, welcher ein Indikator für den ATP-Gehalt der Probe ist, wird bei Raumtemperatur im Tecan infinite m200pro (Tecan, Schweiz) gemessen. Die Geräteeinstellungen können der Tabelle 3.10 entnommen werden. Nach dieser Messung wird 1 μL ATP-Sulfurylase (0,01 U) zu jeder Probe gegeben um die Umsetzung von PP_i zu ATP zu katalysieren. Die Biolumineszenz wird kontinuierlich bis zu einem neuen stationären Zustand alle 2 min detektiert. Zur Bestimmung der PP_i -abhängigen Biolumineszenz werden diese Werte von der basalen ATP-Biolumineszenz subtrahiert. Die Detektion erfolgt in Triplikaten und Kalibrationskurven werden für jedes Experiment mit Adenosin-5'-Triphosphatdisodiumsalzhydrat (FLAAS, 1 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ATP) als Standard bestimmt.

Tab. 3.10: Geräteeinstellungen zur Detektion der Biolumineszenz für den Tecan infinite m200pro (Tecan, Schweiz).

Einstellungen	
Schütteln (Linear) Dauer	2 s
Schütteln (Linear) Amplitude	2 mm
Kinetik Dauer	2 h
Intervallzeit	2 min
Modus	Lumineszenz
Abschwächung	keine
Integrationszeit	1000 ms
Ruhezeit	0 ms
Temperatur	27 °C

Für die Detektion von intrazellulärem Pyrophosphat (iPP_i) musste das zuvor beschriebene Protokoll angepasst werden. Die Fibroblasten müssen mittels *Zellscrapper* von der Oberfläche der Zellkulturschale in 250 μL DMEM gelöst werden. Zum Aufschluss der Zellen werden diese einem Einfrier-Auftauprozess unterzogen. Nach Hitzeinaktivierung werden die Zellen gevortext und mittels Zentrifugation pelletiert. Das PP_i im Überstand wird nach oben beschriebenem Protokoll detektiert.

3.3.4 Bestimmung von Matrix-Gla-Protein im Zellkulturüberstand

Zur Konzentrationsbestimmung von MGP im Zellkulturüberstand wird das *Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit* von Usbn Life Science nach Herstellerangaben verwendet. Dabei handelt es sich um einen *sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (sandwich-ELISA)*. Die Zellkulturüberstände werden zur MGP-Konzentrationsbestimmung unverdünnt eingesetzt. In jeder Kavität werden 100 μL der Probe bzw. des Standards gegeben. Anschließend wird die Platte mit einer Folie verschlossen und 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird der Überstand entfernt, 100 μL der Arbeitslösung *Detection Reagent A*

zu jeder Probe hinzugegeben und erneut 1 h bei 37 °C inkubiert. Mit Hilfe eines *Autowashers* wird die Flüssigkeit aus jeder Kavität entfernt, 350 µL Waschlösung zugegeben, dieser Vorgang dreimal wiederholt und abschließend die Flüssigkeit vollständig entfernt. Es folgt die Zugabe von 100 µL Arbeitslösung *Detection Reagent B*, das Verschließen der Platte mit einer Folie und die Inkubation für 30 min bei 37 °C. Der obige Waschzyklus wird wiederholt, 90 µL Substrat-Lösung in jede Kavität pipettiert und bei 37 °C im Dunkeln für 10 min inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion werden 50 µL Stopp-Lösung in jeder Kavität pipettiert und die Absorption der Proben auf der Platte innerhalb von 30 min bei 450 nm und 550 nm (Korrektur) am Plattenreader Tecan infinite m200pro (Tecan, Schweiz) gemessen.

3.3.5 Bestimmung von Osteopontin im Zellkulturüberstand

Die Konzentration von Osteopontin (OPN) im Zellkulturüberstand erfolgt mittels eines *sandwich-ELISA* (*Human Osteopontin Assay Kit*, IBL) nach Herstellerangaben. Die Zellkulturüberstände werden unverdünnt eingesetzt. In jeder Kavität werden 100 µL EIA-Puffer vorgelegt und anschließend 100 µL der Probe bzw. des Standards zugegeben. Die ELISA-Platte wird mit einer Folie verschlossen und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird mit Hilfe eines *Autowashers* die Flüssigkeit in jeder Kavität entfernt, 350 µL Waschlösung zugegeben, dieser Vorgang siebenmal wiederholt und abschließend die Flüssigkeit vollständig entfernt. Es folgt die Zugabe von 100 µL gelabelten Antikörpern, das Verschließen der Platte mit einer Folie und die Inkubation für 30 min bei 4 °C. Der obige Waschzyklus wird wiederholt, 100 µL Chromogen-Lösung in jede Kavität pipettiert und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion werden 100 µL Stopp-Lösung in jeder Kavität pipettiert und die Absorption der Proben auf der Platte innerhalb von 30 min bei 450 nm und 550 nm (Korrektur) am *Plattenreader* Tecan infinite m200pro (Tecan, Schweiz) gemessen.

3.3.6 Bestimmung der ALP-Aktivität

Zur Quantifizierung die ALP-Aktivität im Zellkulturüberstand werden Standardmethoden der klinisch-chemischen Analytik genutzt. Alle Messungen erfolgen photometrisch im *ARCHITECT ci8200*. Nach dem modifizierten Verfahren von Bessey *et al.* wird *p*-Nitrophenylphosphat durch die ALP hydrolysiert und es bildet sich *p*-Nitrophenol mit einer Absorption bei 404 nm. Diese Absorption ist proportional zur Aktivität der ALP in der Probe (Bowers und McComb 1966; Bessey *et al.* 2005).

3.3.7 Bestimmung der ENPP1-Aktivität

Die ENPP1-Aktivität wird nach kürzlich beschriebenem Protokoll in dermalen Fibroblasten nach 21 Tagen bestimmt (Lau *et al.* 2013). Als Substrat für ENPP1 wird Thymidin-5'-monophosphat-*p*-Nitrophenylesternatriumsalz (1 mg/mL) gelöst in DMEM zu den Zellen gegeben und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Das gebildete *p*-Nitrophenol kann über Messung der Absorption bei 415 nm im Tecan infinite m200pro (Tecan, Schweiz) quantifiziert werden.

3.3.8 Bestimmung der ABCC6-Proteinexpressionen

Die Bestimmung der ABCC6-Proteinexpressionen erfolgt aus Zelllysaten mittels Western-blot-Analyse. Die Auftrennung der Proteine wird in einem 8 - 16 %igen Tris-Glycin-Gel unter reduzierten Bedingungen durchgeführt. Zur Probenvorbereitung werden 4 µL Probe (10 µg Gesamtprotein), 1 µL reduzierendes Reagenz und 5 µL TrisGlycin-SDS-Probenpuffer (2.5) bei 85 °C für 2 min denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese läuft bei 125 V etwa 1,5 h. Nach der Separation wird das Gel kurz in Transferpuffer (5 % MeOH pro Gel) equilibriert. Die PVDF-Membran (*polyvinylidene difluoride membrane*) wird für 30 s in MeOH aktiviert, mit Wasser abgespült und in Transferpuffer gelagert. Anschließend wird der Blot nach dem Schema aus Abb. 3.1 zusammengesetzt.

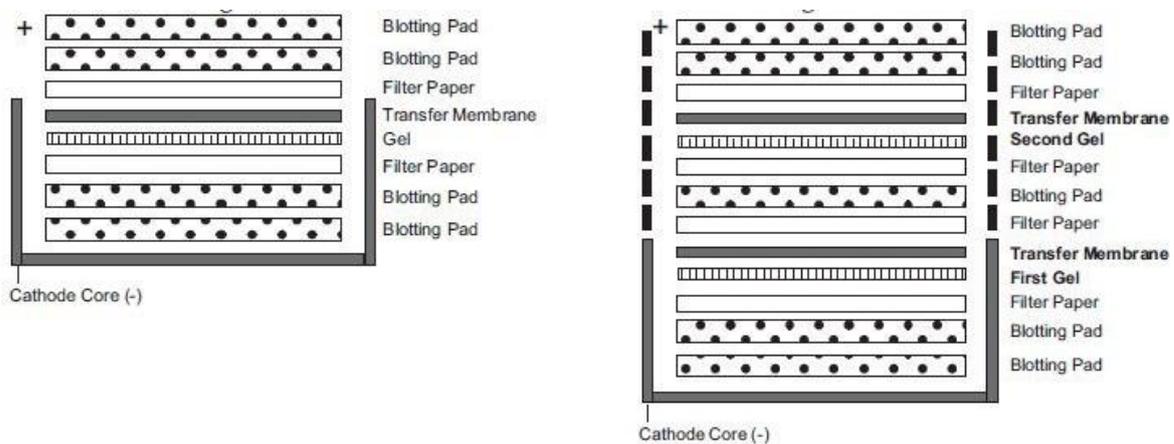


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Westernblotaufbaus für die Bestimmung der ABCC6-Proteinexpressionen.

Der Proteintransfer vom Gel auf die PVDF-Membran findet bei 25 V für mindestens 2 h statt. Im Anschluss an den Transfer werden die Proteine mit einer 3 %igen TCS-Lösung für 3 min auf der PVDF-Membran fixiert und anschließend kurz mit TBS-T-Puffer (2.5) gewaschen. Zur Blockung der freien Bindungsstellen wird die PVDF-Membran für 1 h bei Raumtemperatur in 5 % Milchpulver/TBS-T-Lösung inkubiert. Danach erfolgt die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Anti-ABCC6, *rabbit monoclonal* ERP8342, Abcam, UK), der 1:10.000 in TBS-T-

Puffer verdünnt wird, bei 4 °C über Nacht. Im Anschluss wird die Membran 3 x für je 10 min mit TBS-T-Puffer unter leichtem schütteln gewaschen. Der zweite Antikörper (IgG- H+L, *rabbit polyclonal*, HRP, Abcam, UK) wird 1:2.000 in TBS-T-Puffer verdünnt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Membran erneut mit TBS-T-Puffer gewaschen. Die Luminol/Enhance-Lösung wird im Verhältnis 1:1 mit einem Peroxidase-Puffer gemischt, gleichmäßig auf die Membran verteilt und für 3 min im Dunkeln inkubiert. Die Detektion des Chemilumineszenzsignals erfolgt anschließend mit dem PEQLAB Fusion Dokumentationssystem (Fusion-SL, Peqlab Biotechnologie, Germany). Die Bandenintensität kann mit der BioID-Software (Peqlab Biotechnologie, Germany) quantifiziert werden.

4 ERGEBNISSE

4.1 Identifizierung von PP_i-metabolisierenden genetischen Kofaktoren für PXE

Zur Aufklärung einer möglichen Bedeutung genetischer Kofaktoren bei PXE wurden im Rahmen dieser Arbeit ausgewählte Einzelnukleotidvarianten (SNV) in Kandidatengenen untersucht, die eine Rolle im Kalzifizierungsprozess spielen und somit als mögliche Modifikation für die Manifestation oder Ausprägung in PXE eine Rolle spielen könnten. Die SNV wurden nach den Kriterien, funktionaler Relevanz, Beteiligung in der pathologischen Kalzifizierung und einer beschriebenen 5 %igen Frequenz ausgewählt. Für die genetischen Analysen standen DNA-Proben von 190 PXE-Patienten zur Verfügung. Als gesunde Kontrollkohorte dienten Blutspender, die in Alter und Geschlecht mit den PXE-Patienten übereinstimmten. Es wurde die Häufigkeit von 12 Sequenzvarianten in den drei Kandidatengenen *ALP*, *ANKH* und *ENPP1* bestimmt und verglichen. Der Nachweis erfolgte entweder mittels Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen(RFLP)-Analyse oder mittels allelspezifischer PCR nach dem ARMS-System. Für die RFLP-Analyse wurde ein Fragment der genomischen DNA, welche die zu untersuchende Variante enthielt, durch eine PCR amplifiziert und das gewonnene Produkt im Anschluss einem Restriktionsverdau unterworfen. Der Restriktionsansatz wurde in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und der Genotyp anhand des sich ergebenden Bandenmusters detektiert. Die Identität des PCR-Produkts wurde durch direktes Sequenzieren sichergestellt. Für eine zu untersuchende Variante konnte aufgrund einer fehlenden Restriktionsenzymkennungssequenz kein Restriktionsverdau durchgeführt werden. Daher wurde für die Analyse der entsprechenden Variante eine allelspezifische PCR etabliert, die eine Identifizierung des Genotyps ermöglicht, ohne einen Restriktionsverdau zu erfordern.

Die Auswertung der Allelfrequenzen der 12 untersuchten Varianten im Vergleich zwischen PXE-Patienten und Kontrollkohorte ergab drei Varianten c.1190-65C>A (rs1780329, *ALP*), c.313+9G>T (rs7773477, *ENPP1*) und c.2101-14delT (rs11313870, *ENPP1*), die signifikant häufiger in der PXE-Patientengruppe vorkommen ($P < 0,05$ jeweils, Tab. 4.1). Die Assoziation mit PXE war signifikant für die Allele c.1190-65A (Frequenz in PXE-Patienten vs. Kontrollen: 0,17 vs. 0,11; $P = 0,010$), c.313+9T (0,04 vs. 0; $P = 0,0002$) und c.2101-14delT (0,20 vs. 0,14; $P = 0,042$). Nach Bonferroni-Korrektur für multiples Testen blieb nur der SNV c.313+9G>T (*ENPP1*) signifikant mit PXE assoziiert ($P_{\text{koriert}} = 0,0024$). Das Vorhandensein des krankheitsassoziierten Allels führte zu einem *Odds Ratio* (OR) von 27,96 (1,66-472,30) für das Allel c.313+9T.

Tab. 4.1: Allelfrequenzen der untersuchten Varianten in den Genen *ALP*, *ANKH* und *ENPP1* bei PXE-Patienten und Kontrollen.

SNV ¹		Ref. SNV ²	Allel	PXE ³	Kontrollen ³	OR (95% CI)	P ⁴	P _{korrigiert} ⁵
ALP								
c.330C>T	p.S110S	rs1780316	C	360 (95 %)	357 (94 %)	0,93 (0,50-1,72)	0,876	1,000
			T	20 (5 %)	23 (6 %)			
c.787T>C	p.Y263H	rs3200254	T	338 (89 %)	347 (91 %)	1,31 (0,81-2,11)	0,331	1,000
			C	42 (11 %)	33 (9 %)			
c.876A>G	p.P292P	rs3200255	A	370 (97 %)	377 (99 %)	3,42 (0,93-12,52)	0,055	0,660
			G	10 (3 %)	3 (1 %)			
c.1190-65C>A	Intron	rs1780329	C	313 (83 %)	342 (89 %)	1,78 (1,16-2,75)	0,010	0,120
			A	67 (17 %)	38 (11 %)			
ANKH								
c.-978delC	Promotor	Zhang <i>et al.</i> (2005)	A	230 (61 %)	217 (57 %)	0,87 (0,65-1,16)	0,371	1,000
			C	150 (39 %)	163 (43 %)			
c.-4G>A	5'-UTR	Zhang <i>et al.</i> (2005)	G	355 (93 %)	361 (95 %)	1,34 (0,72-2,48)	0,436	1,000
			A	25 (7 %)	19 (5 %)			
c.294C>T	p.A98A	rs17251667	C	177 (47 %)	188 (49 %)	1,12 (0,84-1,50)	0,467	1,000
			T	203 (53 %)	192 (51 %)			
c.963A>G	p.A321A	rs2288474	A	367 (97 %)	368 (97 %)	1,06 (0,48-2,36)	1,000	1,000
			G	13 (3 %)	12 (3 %)			
ENPP1								
c.511A>C	p.K171Q	rs1805101	A	330 (86 %)	331 (87 %)	1,03 (0,67-1,56)	0,914	1,000
			C	50 (14 %)	49 (13 %)			
c.313+9G>T	Intron	rs7773477	G	368 (97 %)	380 (100 %)	27,96 (1,66-472,30)	0,0002	0,0024
			T	12 (3 %)	0			
c.517A>C	p.K121Q	rs1044498	A	333 (87 %)	326 (86 %)	0,87 (0,57-1,32)	0,523	1,000
			C	47 (13 %)	54 (14 %)			
c.2101-14delT	Intron	rs1799774	T	305 (80 %)	327 (86 %)	1,52 (1,03-2,23)	0,042	0,504
			-	75 (20 %)	53 (14 %)			

¹ Nukleotidnummerierung basiert auf der cDNA-Sequenz mit A als erster Nukleinsäure im ATG-Translationsstart +1 (*GenBank*-Accessionnummer *ALP* NG_008940, *ANKH* NG_008273, *ENPP1* NG_008206). ² Referenz-SNV in *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)-Datenbank, Juni 2013. ³ Allelzahl (Allelfrequenz). ⁴ Allelfrequenz wurde verglichen zwischen PXE-Patienten und Kontrollen mittels zweiseitigen exakten Fisher-Tests. ⁵ P-Werte < 0,05 sind signifikant nach Bonferroni-Korrektur für multiples Testen, $P_{\text{korrigiert}} = p(\alpha) * k$, $k = 12$.

Die Genotypenanalyse ergab die Assoziation des Genotypen TT der Variante c.294C>T im *ANKH*-Gen mit PXE (0,11 vs. 0,02; $P_{\text{koriert}} = 0,0036$; Tab. 4.2), allerdings unterschied sich die *Minor Allele Frequenz* (MAF) nicht zwischen Patienten und Kontrollen (0,53 vs. 0,51; $P = 0,235$). Alle Genotypverteilungen mit Ausnahme von c.876A>G (*ALP*) und c.294C>T (*ANKH*) befanden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Tab. 4.2: Genotypenfrequenzen der untersuchten Varianten in den Genen *ALP*, *ANKH* und *ENPP1* bei PXE-Patienten und Kontrollen.

SNV ¹		Ref. SNV ²	Genotyp	PXE ³	Kontrollen ³	P^4	P_{koriert}^5
<i>ALP</i>							
c.330C>T	p.S110S	rs1780316	CC	171 (90 %)	167 (88 %)	0,526	1,000
			CT	18 (9 %)	23 (22 %)		
			TT	1 (1 %)	0 (0 %)		
c.787T>C	p.Y263H	rs3200254	TT	151 (79 %)	158 (83 %)	0,465	1,000
			TC	36 (19 %)	31 (16 %)		
			CC	3 (2 %)	1 (1 %)		
c.876A>G	p.P292P	rs3200255	AA	182 (96 %)	188 (98 %)	0,133	1,000
			AG	6 (3 %)	1 (1 %)		
			GG	2 (1 %)	1 (1 %)		
c.1190-65C>A	Intron	rs1780329	CC	131 (69 %)	156 (82 %)	0,036	0,432
			CA	51 (27 %)	30 (16 %)		
			AA	8 (4 %)	4 (2 %)		
<i>ANKH</i>							
c.-978delC	Promotor	Zhang <i>et al.</i> (2005)	AA	61 (33 %)	53 (29 %)	0,567	1,000
			AC	108 (57 %)	111 (58 %)		
			CC	21 (11 %)	26 (14 %)		
c.-4G>A	5'-UTR	Zhang <i>et al.</i> (2005)	GG	165 (87 %)	171 (90 %)	0,332	1,000
			AG	25 (13 %)	19 (10 %)		
			AA	0 (0 %)	0 (0 %)		
c.294C>T	p.A98A	rs17251667	CC	8 (4 %)	2 (1 %)	0,0003	0,0036
			CT	161 (85 %)	184 (97 %)		
			TT	21 (11 %)	4 (2 %)		
c.963A>G	p.A321A	rs2288474	AA	178 (94 %)	179 (94 %)	0,985	1,000
			AG	11 (5 %)	10 (5 %)		
			GG	1 (1 %)	1 (1 %)		
<i>ENPP1</i>							
c.511A>C	p.K171Q	rs1805101	AA	142 (74 %)	144 (76 %)	0,577	1,000
			AC	46 (25 %)	43 (22 %)		
			CC	2 (1 %)	3 (2 %)		
c.313+9G>T	Intron	rs7773477	GG	180 (95 %)	188 (99 %)	0,036	0,432
			GT	8 (4 %)	2 (1 %)		
			TT	2 (1 %)	0 (0 %)		
c.517A>C	p.K121Q	rs1044498	AA	145 (76 %)	139 (73 %)	0,785	1,000
			AC	43 (23 %)	48 (25 %)		
			CC	2 (1 %)	3 (2 %)		
c.2101-14delT	Intron	rs1799774	TT	121 (64 %)	143 (75 %)	0,039	0,468
			T-	63 (33 %)	41 (22 %)		
			--	6 (3 %)	6 (3 %)		

¹ Nukleotidnummerierung basiert auf der cDNA-Sequenz mit A als erster Nukleinsäure im ATG-Translationsstart +1 (*GenBank*-Accessionnummer *ALP* NG_008940, *ANKH* NG_008273, *ENPP1* NG_008206). ² Referenz-SNV in *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)-Datenbank, Juni 2013. ³ Genotypanzahl (Genotypfrequenz). ⁴ Genotypenfrequenz wurde verglichen zwischen PXE-Patienten und Kontrollen mittels zweiseitigen exakten Fisher-Tests. ⁵ P -Werte < 0,05 sind signifikant nach Bonferroni-Korrektur für multiples Testen, $P_{\text{koriert}} = p(\alpha) \cdot k$, $k = 12$.

Zur Berechnung der statistischen Signifikanz der Kohortengröße und des genetischen Modells wurde ein Algorithmus von Faul *et al.* angewendet (Faul *et al.* 2007). Die Ergebnisse zeigten, dass die dieser Arbeit zugrunde liegende Kohorte eine ausreichende Größe zur Detektion von Assoziationen hat. Die statistische Wahrscheinlichkeit unter der Annahme eines additiven oder multiplikativen Modells für PXE beträgt 75 bis 93 % mit einem relativen Risiko von $\geq 2,0$ für die häufig frequentierten SNV (MAF 25 - 45 %, Signifikanz $\alpha = 5$ %). Wird ein dominantes oder rezessives Modell angenommen, hat diese Studie eine Aussagekraft von 33 bis 64 % bzw. 19 bis 43 %. Für weniger häufige SNV (MAF < 8 %) hat diese Studie bei der Annahme eines additiven, multiplikativen oder dominanten Modells eine Aussagekraft von 29 bis 47 % bei einem relativen Risiko $\geq 2,0$ bzw. bei Annahme eines rezessiven Modells 5 %.

Die Assoziation der *ENPP1*-Variante c.313+9G>T (rs7773477) mit dem *ABCC6*-Genotyp und dem PXE-Phänotyp ist in Tabelle 4.3 dargestellt. Zwei PXE-Patienten trugen diese *ENPP1*-Variante homozygot, während acht Patienten heterozygote Träger waren. Der SNV konnte in der alters- und geschlechtskorrelierten Kontrollkohorte nicht detektiert werden. Eine Korrelation zwischen *ABCC6*-Genotyp und PXE-Phänotyp wurde nicht gefunden.

Tab. 4.3: Assoziation der *ENPP1*-Variante c.313+9T (rs7773477) mit dem *ABCC6*-Genotyp und dem PXE-Phänotyp.

Nr. ¹	Geschlecht	Genotyp	<i>ABCC6</i> Genotyp-Allel 1	<i>ABCC6</i> Genotyp-Allel 2	Status	Organbeteiligung
143	w	TT	E24: c.3421C>T (p.R1141X)	Keine	ht	Haut, Augen, Herz, Kardiovaskuläres Gewebe, Bluthochdruck, Gastrointestinaltrakt
19	w	TT	E24: c.3421C>T (p.R1141X)	E24: c.3421C>T (p.R1141X)	hm	Haut, Augen, Bluthochdruck
34	w	GT	E16: c.1995delG	i-21: c.2787+1G>T	cht	Haut
66	m	GT	i-26: c.3736-1G>A	E30: c.4209C>A p.S1403R	cht	Haut, Augen, Kardiovaskuläres Gewebe
204	w	GT	E24: c.3421C>T (p.R1141X)	E24: c.3412C>T (p.R1138W)	cht	Haut, Augen, Kardiovaskuläres Gewebe
252	m	GT	E24: c.3421C>T (p.R1141X)	E12: c.1574_1575insG	cht	Augen, Kardiovaskuläres Gewebe, Bluthochdruck
341	m	GT	E12: c. 1552C>T (p.R518X)	Keine	ht	Haut, Augen, Herz, Bluthochdruck
140	m	GT	E24: c.3421C>T (p.R1141X)	Keine	ht	Haut, Augen, Kardiovaskuläres Gewebe, Bluthochdruck, Gastrointestinaltrakt
467	w	GT	E24: c.3421C>T (p.R1141X)	E24: c.3421C>T (p.R1141X)	hm	Haut, Augen, Kardiovaskuläres Gewebe, Bluthochdruck
294	w	GT	E24: c.3490C>T (p.R1164X)	Keine	ht	Haut, Augen

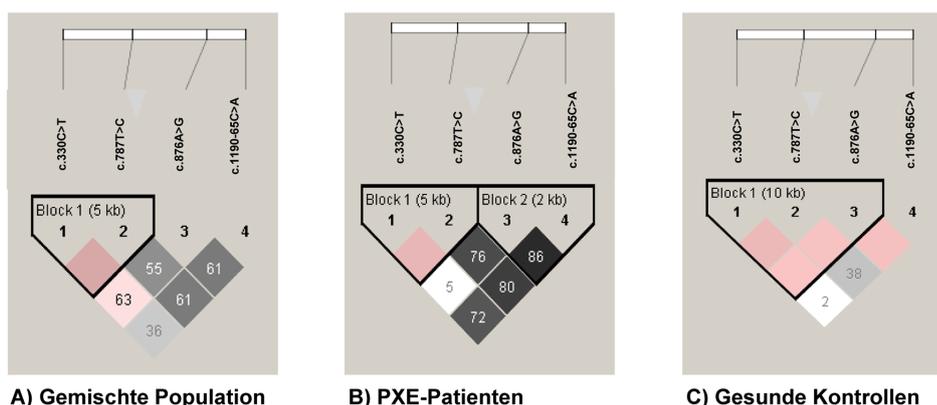
¹ Kollektivnummer, w: weiblich, m: männlich, ht: heterozygot, hm: homozygot, cht: compound heterozygot, wt: Wildtyp

Die Allelfrequenzen der untersuchten SNV in den Genen *ALP*, *ANKH* und *ENPP1* der PXE-Patienten wurden in Subgruppen unterteilt, um eine potentielle Assoziation dieser mit den

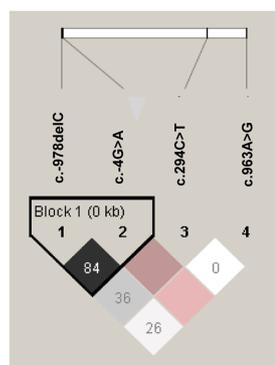
klinischen Charakteristika bei PXE (Tab. 3.1) zu untersuchen. Es konnte keine signifikante Assoziation zwischen den Genotyp- bzw. Allelfrequenzen und dem Alter, dem Diagnosealter, der Anzahl und Art der involvierten Organe festgestellt werden.

Die LD-Struktur und Haplotypenblöcke für jedes untersuchte Gen wurden in den PXE-Patienten und der Kontrollkohorte mittels *Haploview 3.2 Software* (Barrett *et al.* 2005) analysiert. Die Analyse erfolgte gemäß der Einstellung „*spline of LD*“ in der *Haploview-Software*, die auf einem D' -Wert $> 0,8$ für die äußeren Marker jedes Blocks basiert. Die Haplotypenanalyse ergab in jedem untersuchten Gen jeweils einen LD-Block in der gemischten Population, in der Kontrollkohorte und in den PXE-Patienten (Abb. 4.1). Die höchsten paarweisen D' -Werte (0,84 und 0,80) wurden zwischen den Varianten c.978delC und c.-4G>A (*ANKH*), sowie zwischen den *ENPP1*-Varianten c.511A>C (rs1805101) und c.517A>C (rs1044498) ermittelt. Die Haplotypenanalyse des *ALP*-Gens der PXE-Patienten ergab zwei getrennte LD-Blöcke. Der zweite Block konnte in den Gruppen der gesunden Kontrollen und der gemischten Population nicht detektiert werden. Eine signifikante Assoziation der genannten Haplotypen wurde nicht gefunden.

ALP



ANKH



ENPP1

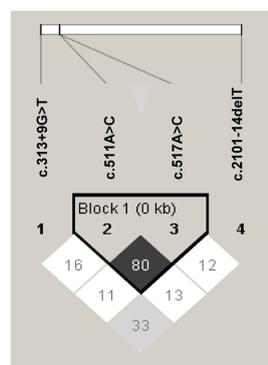


Abb. 4.1: LD-Struktur der SNV in den Genen *ALP*, *ANKH* und *ENPP1*. LD-Struktur der vier untersuchten SNV im *ALP*-Gen in der gemischten Population (A), PXE-Patienten (B) und den gesunden Kontrollen (C). LD-Struktur von jeweils vier SNV in den Genen *ANKH* (D) und *ENPP1* (E). Die Analyse erfolgte gemäß der Einstellung „*spline of LD*“ in der *Haploview-Software*, die auf einem D' -Wert $> 0,8$ für die äußeren Marker jedes Blocks basiert (Barrett *et al.* 2005). Das Standardfarbschema wurde verwendet um die LD-Blöcke darzustellen, mit schwarz für perfektes LD ($\text{LOD} \geq 2$, $D' = 1$), weiß für kein LD ($\text{LOD} < 2$, $D' < 1$), Graustufen ($\text{LOD} \geq 2$, $D' \leq 1$) und Rottöne für dazwischenliegendes LD ($\text{LOD} < 2$, $D' = 1$).

Die Haplotypenanalyse aller drei Kandidatengene gemeinsam ergab vier getrennte LD-Blöcke (Abb. 4.2). Der Haplotyp CCG in Block 2 trat signifikant häufiger in der Kontrollkohorte auf als in der PXE-Patientengruppe ($P = 0,019$; Tab. 4.4). Nach Bonferroni-Korrektur war der Haplotyp allerdings nicht mehr signifikant ($P_{\text{koriert}} = 0,228$). Die Assoziation des Haplotypen AT in Block 3 mit PXE blieb auch nach Bonferroni-Korrektur signifikant ($P_{\text{koriert}} = 0,048$).

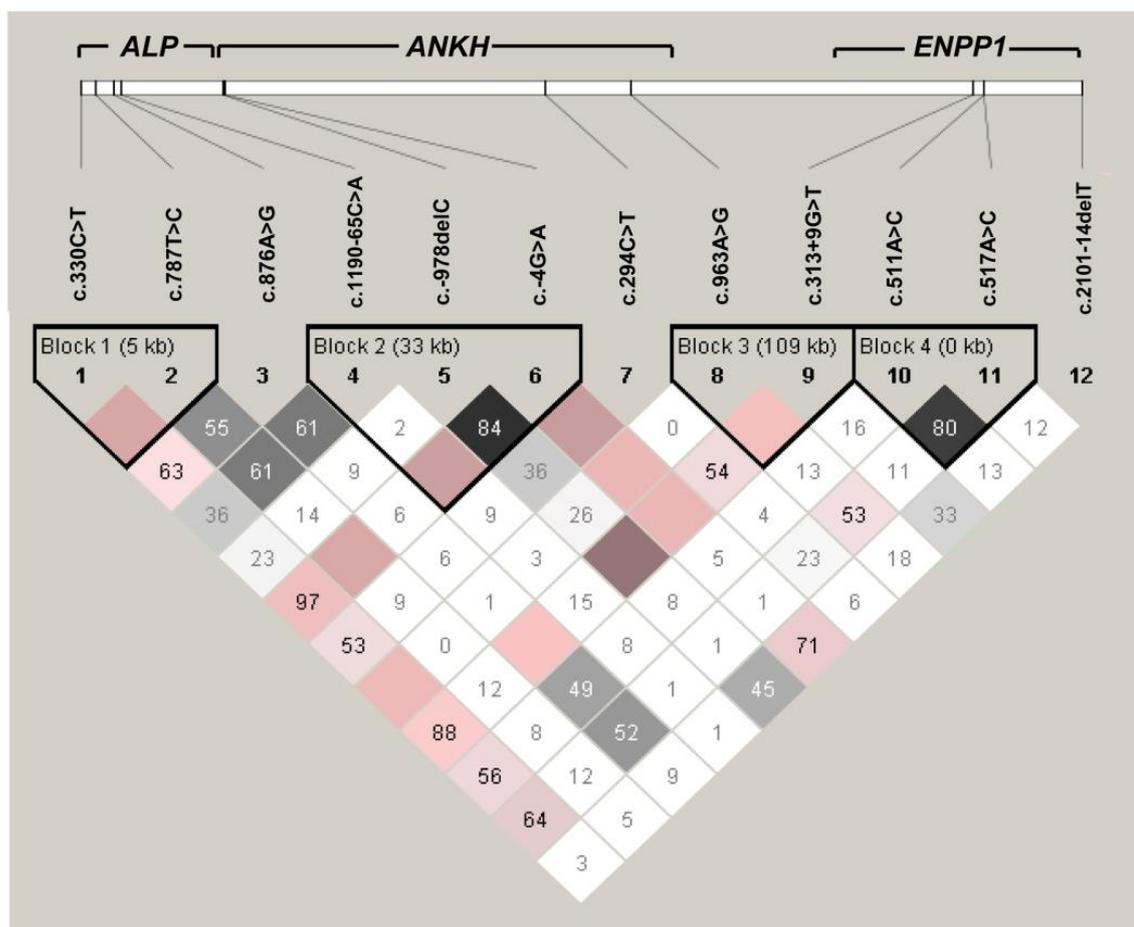


Abb. 4.2: LD-Struktur der 12 untersuchten SNV in den Genen *ALP*, *ANKH* und *ENPP1* in einer Analyse in der gemischten Population. Die Analyse erfolgte gemäß der Einstellung „spline of LD“ in der *Haploview-Software*, die auf einem D' -Wert $> 0,8$ für die äußeren Marker jedes Blocks basiert (Barrett *et al.* 2005). Das Standardfarbschema wurde verwendet um die LD-Blöcke darzustellen, mit schwarz für perfektes LD ($\text{LOD} \geq 2$, $D' = 1$), weiß für kein LD ($\text{LOD} < 2$, $D' < 1$), Graustufen ($\text{LOD} \geq 2$, $D' \leq 1$) und Rottöne für dazwischenliegendes LD ($\text{LOD} < 2$, $D' = 1$).

Tab. 4.4: Detektierte *ALP*-, *ANKH*- und *ENPP1*-Haplotypen in PXE-Patienten und Kontrollen.

Haplotyp	Frequenz	Anzahl PXE, Kontrolle	Frequenz PXE, Kontrolle	OR (95 % CI)	P ¹	P _{korrigiert} ²
Block 1						
CT	0,845	318:62, 325:55	0,836; 0,854	1,15 (0,78-1,71)	0,501	1,000
CC	0,099	42:338, 33:347	0,111; 0,087	0,77 (0,47-1,24)	0,263	1,000
TT	0,056	20:360, 23:357	0,053; 0,059	1,16 (0,63-2,15)	0,694	1,000
Block 2						
CAG	0,495	188:192, 188:192	0,494; 0,496	1,00 (0,75-1,33)	0,972	1,000
CCG	0,295	98:283, 127:253	0,257; 0,334	1,45 (1,06-1,98)	0,019	0,228
AAG	0,080	37:343, 24:356	0,097; 0,062	0,63 (0,37-1,07)	0,072	0,858
CCA	0,065	28:352, 21:359	0,073; 0,056	0,74 (0,41-1,32)	0,357	1,000
ACG	0,060	29:351, 17:363	0,075; 0,044	1,76 (0,95-3,27)	0,066	0,796
Block 3						
AG	0,947	354:26, 366:14	0,931; 0,963	1,92 (0,99-3,74)	0,054	0,653
GG	0,033	13:367, 12:368	0,034; 0,032	1,09 (0,49-2,41)	0,872	1,000
AT	0,020	13:367, 2:378	0,034; 0,005	6,70 (1,50-29,88)	0,004	0,048
Block 4						
AA	0,841	319:57, 316:62	0,848; 0,835	0,91 (0,62-1,35)	0,635	1,000
CC	0,112	42:334, 42:336	0,112; 0,112	1,01 (0,64-1,58)	0,993	1,000
AC	0,024	6:370, 12:366	0,017; 0,031	0,49 (0,18-1,33)	0,221	1,000
CA	0,023	9:367, 8:370	0,023; 0,022	1,13 (0,43-2,97)	0,942	1,000

¹ Allelfrequenzen wurden verglichen zwischen PXE-Patienten und Kontrollen mittels zweiseitigen exakten Fisher-Tests. ² P-Werte < 0,05 sind signifikant nach Bonferroni-Korrektur für multiples Testen, $P_{\text{korrigiert}} = p(\alpha) \cdot k$, $k = 12$.

Gen-Gen- und Gen-Umwelt-Interaktionen wurden mittels der *Multifactor Dimensionality Reduction* (MDR)-Software untersucht. Diese Software reduziert die Dimensionalität der Multilokus-Genotypen-Information, um eine mögliche SNV-Kombination mit dem Krankheitsrisiko zu identifizieren (Hahn *et al.* 2003). Abbildung 4.3 zeigt ein Baumdiagramm, welches die Interaktionen der Genotypen (12 SNV) mit dem Phänotyp der kardiovaskulären Beteiligung darstellt. Blaue und grüne Linien repräsentieren eine synergetische Interaktion mit unterschiedlicher Intensität, blaue Interaktionen sind stärker als grüne. Rote und orange Linien beschreiben antagonistische Interaktionseffekte, wobei rote Interaktionen stärker sind als orange. Das Farbschema im Diagramm zeigt einen starken synergetischen Effekt zwischen der Variante c.294C>T (rs17251667) im *ANKH*-Gen und der kardiovaskulären Beteiligung. Schwächere synergetische Effekte konnten zwischen den Varianten c.1190-65C>A (*ALP*), c.2101-14delT (*ENPP1*), c.294C>T (*ANKH*) und der kardiovaskulären Beteiligung, zwischen c.-978delC, c.-4G>A (beide *ANKH*) und c.313+9G>T (*ENPP1*), ebenso wie zwischen c.787T>C und c.876A>G (beide *ALP*) beobachtet werden.

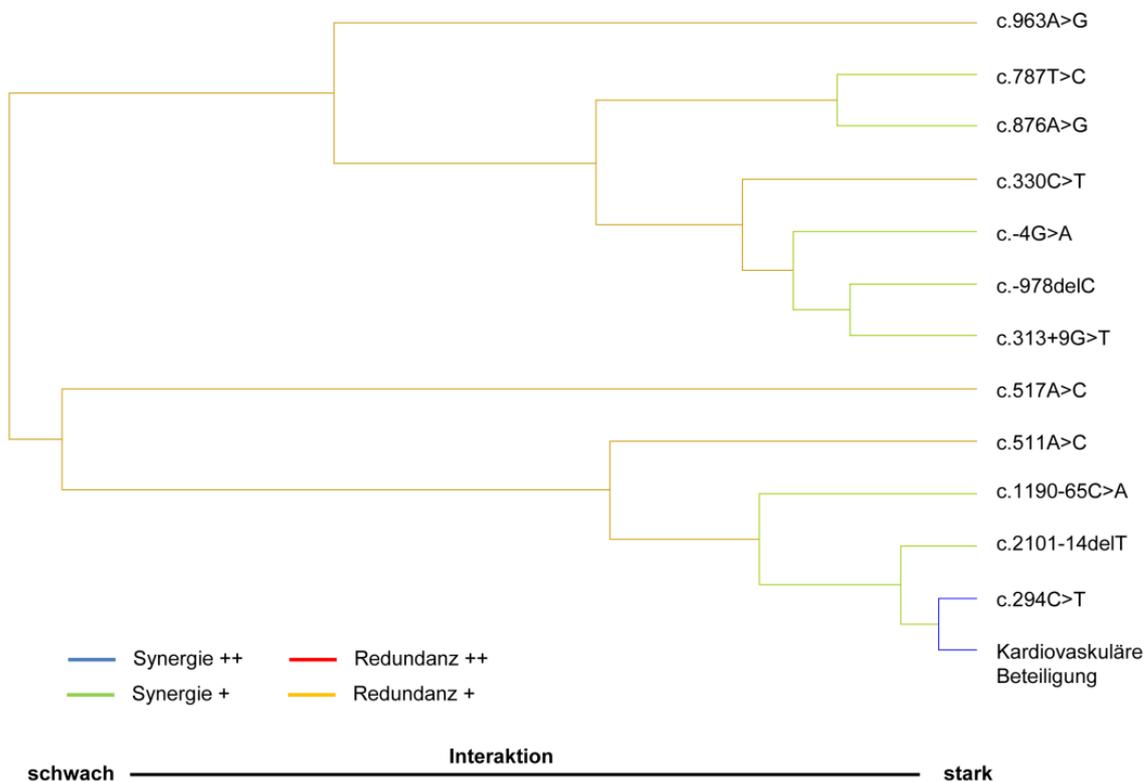


Abb. 4.3: Baumdiagramm der Interaktionen zwischen den untersuchten 12 SNV und der kardiovaskulären Beteiligung in PXE mittels MDR-Analyse. Blaue und grüne Linien repräsentieren eine synergetische Interaktion mit unterschiedlicher Intensität, blaue Interaktionen sind stärker als grüne. Rote und orange Linien beschreiben antagonistische Interaktionseffekte, während rote Interaktionen stärker sind als orange.

4.2 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Kalzifizierungsinduktoren auf die ektopische Kalzifizierung bei PXE

Aufgrund der ektopen Mineralisierung des Bindegewebes bei PXE ist die Untersuchung dieses Kalzifizierungsprozesses für die Aufklärung des PXE-Pathomechanismus essentiell. Zur Untersuchung des Kalzifizierungsprozesses stehen heute zwei Mausmodelle und ein Zebrafischmodell zur Verfügung (Jiang *et al.* 2007; Li *et al.* 2010; Gorgels *et al.* 2012). Diese Modelle allerdings eignen sich nicht für Untersuchungen des Kalzifizierungsprozesses in der Dermis, da sich Aufbau und Zusammensetzung stark von der Humanen unterscheiden. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Kalzifizierungsprozess in dermalen Fibroblasten, welche aus Hautbiopsien von PXE-Patienten und gesunden Kontrollpersonen stammen, untersucht. Eine Induktion der Kalzifizierung ist in *in vitro*-Modellen im Gegensatz zu der Kalzifizierungsfähigkeit der Zellen *in vivo* notwendig, da FCS-Bestandteile wie z. B. Fetuin A oder MGP die Kalzifizierung hemmen. Aufgrund dessen wurden im Folgenden verschiedene Kalzifizierungsinduktoren und ihr Einfluss auf den beobachteten PXE-Phänotyp im Zellkulturmodell untersucht. Im Folgenden wurde der Einfluss drei verschiedener Kalzifizierungsinduktoren auf die Kalzifizierung in PXE mittels dermalen Fibroblasten untersucht. β -Glycerophosphat und Dinatriumhydrogenphosphat sowie Kalziumchlorid kamen als Induktoren zum Einsatz.

4.2.1 β -Glycerophosphat als Kalzifizierungsinduktor

Viele *in vitro*-Studien nutzen β -Glycerophosphat (β GlyPO₄) als Induktor für die Kalzifizierung in humanen und tierischen Zellen. Die Inkubation mit β GlyPO₄ induziert *in vitro* die Ablagerung von Kalziumphosphatkristallen in der ECM, indem es als anorganische Phosphatquelle dient. Im Rahmen dieser Arbeit wurden jeweils vier dermale Fibroblastenzelllinien von PXE-Patienten und gesunden Kontrollen über 21 Tage im Standardmedium (DMEM + 10 % FCS + 10 % DPBS + 1 % AB/AM + 5 % DPBS) oder in Kalzifizierungsmedium mit β GlyPO₄ als Induktor (DMEM + 10 % FCS + 10 mmol/L β GlyPO₄ + 50 μ g/mL Ascorbinsäure + 1 % AB/AM + 5 % DPBS) kultiviert. Die Konzentrationen wurden in Anlehnung an andere *in vitro*-Kalzifizierungsstudien gewählt (Boraldi *et al.* 2012). Das Medium wurde alle drei Tage erneuert. Nach 21 Tagen Kultivierung wurde der Kalzifizierungsstatus mittels ARS-Färbung anhand der sich bei erfolgreicher Kalzifizierungsinduktion bildenden roten kalziumreichen Kristalle überprüft. Unter den beschriebenen Kulturbedingungen konnte nach 21 Tagen histochemisch keine Kalzifizierung nachgewiesen werden (Abb. 4.4).

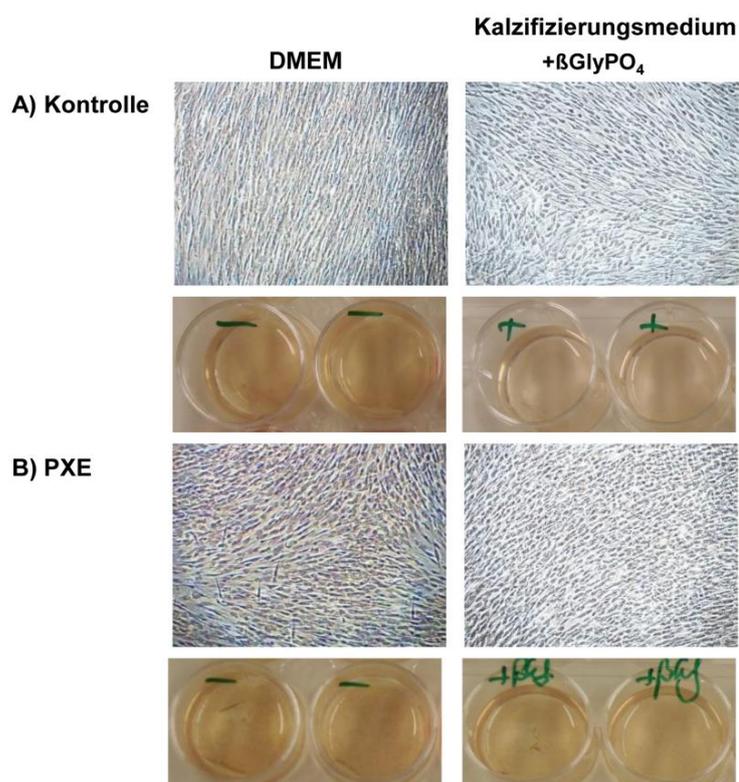


Abb. 4.4: Bestimmung des Kalzifizierungsstatus nach 21-tägiger Behandlung mit β GlyPO₄ mittels Alizarin-Rot-S-(ARS)-Färbung. Kontroll- (A) und PXE-Fibroblasten (B) wurden in Standardmedium (DMEM) oder in Kalzifizierungsmedium supplementiert mit β -Glycerophosphat (β GlyPO₄, 10 mmol/L β GlyPO₄ und 50 μ g/mL AA) für 21 Tage kultiviert. Eine Kalzifizierung konnte nach 21 Tagen mittels Mikroskopie histochemisch nicht nachgewiesen werden.

4.2.2 Dinatriumhydrogenphosphat und Kalziumchlorid als Kalzifizierungsinduktoren

Im nächsten Schritt wurden zwei weitere mögliche Kalzifizierungsinduktoren auf ihre Fähigkeit, eine histochemische Kalzifizierung *in vitro* zu induzieren getestet. Hierbei kamen ein weiteres Phosphat, das Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) und Kalzium in Form des Kalziumchlorids (CaCl_2) zum Einsatz. Jeweils vier dermale Fibroblastenzelllinien von PXE-Patienten und gesunden Kontrollen wurden über 21 Tage im Standardmedium (DMEM + 10 % FCS + 10 % DPBS + 1 % AB/AM + 5 % DPBS) oder im Kalzifizierungsmedium mit Na_2HPO_4 oder CaCl_2 als Induktor (DMEM + 10 % FCS + 2,5 mmol/L Na_2HPO_4 oder 8 mmol/L CaCl_2 + 1 % AB/AM + 5 % DPBS) kultiviert. Die Konzentrationen wurden in Anlehnung an andere *in vitro*-Kalzifizierungsstudien gewählt (Trion *et al.* 2008). Das Medium wurde alle drei Tage erneuert. Nach 21 Tagen der Kalzifizierungsbehandlung wurde der Status der Kalzifizierung mittels ARS-Färbung überprüft. Sowohl Na_2HPO_4 als auch CaCl_2 konnten die Kalzifizierung in den Kontroll- sowie in den PXE-Zellen nach 21 Tagen induzieren (Abb. 4.5 A+B). Anhand der Färbung kann die Intensität der Kalzifizierung allerdings nur abgeschätzt werden. Deshalb wurden im nächsten Schritt die roten kalziumreichen Kristalle quantifiziert. Die Quantifizierung ergab eine verstärkte Kalzifizierung in den PXE-Fibroblasten unabhängig vom eingesetzten Kalzifizierungsmedium im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 4.5 C). Die stärkste Kalzifizierung konnte nach CaCl_2 -Induktion beobachtet werden.

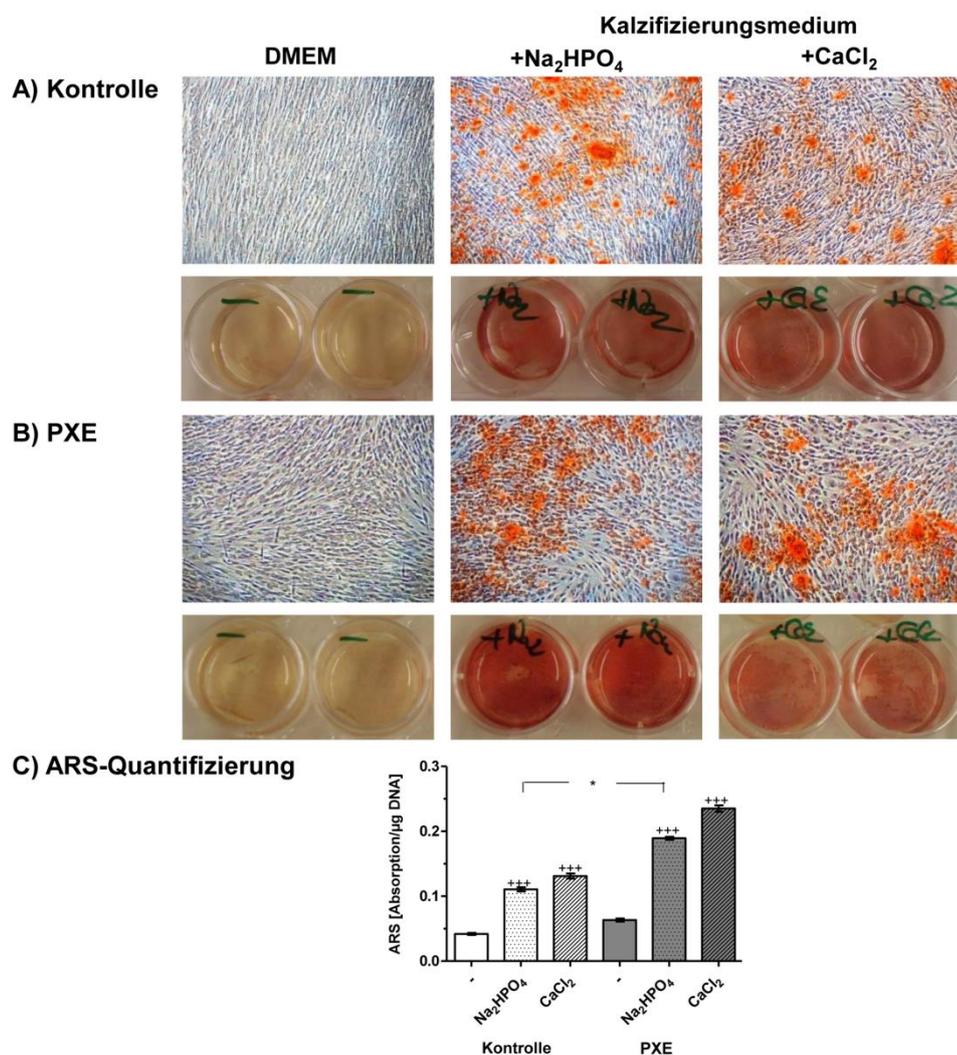


Abb. 4.5: Bestimmung des Kalzifizierungsstatus nach 21-tägiger Behandlung mit Na₂PO₄ und CaCl₂ mittels Alizarin-Rot-S-(ARS)-Färbung und -Quantifizierung. Kontroll- (A) und PXE-Fibroblasten (B) wurden in Standardmedium (DMEM) oder in Kalzifizierungsmedium supplementiert mit Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄, 2,5 mmol/L) oder Kalziumchlorid (CaCl₂, 8 mmol/L) für 21 Tage kultiviert. Die Kalzifizierung konnte nach 21 Tagen mittels Mikroskopie durch rote kalziumreiche Kristalle beurteilt werden. Die Mittelwerte der ARS-Quantifizierung (C) sind als Absorption bei 405 nm/μg DNA mit korrespondierendem Standardfehler dargestellt. Kontrollzellen (n = 4) sind als weiße Balken gezeigt und PXE-Zellen (n = 4) als graue Balken. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt und abgebildet als Kontrolle vs. PXE (* P < 0,05; ** P < 0,005; *** P < 0,0005) und als unbehandelte vs. behandelte Zellen (+ P < 0,05; ++ P < 0,005; +++ P < 0,0005).

Die erfolgreiche Induktion der Kalzifizierung mittels Na₂HPO₄ und CaCl₂ ermöglichte die Untersuchung des Kalzifizierungsprozesses in PXE. Hierzu wurden die Zellen unter den oben beschriebenen Bedingungen 6, 12 und 21 Tage lang kultiviert. Die Zwischenzeitpunkte wurden gewählt, um nicht eine reine Endpunktanalyse des Kalzifizierungsprozesses durchzuführen, sondern auch mögliche Regulationen im frühen Stadium zu entdecken. Intra- und extrazelluläre Kalziumkonzentration wurden zusätzlich zu den genannten Zeitpunkten noch bei Versuchsstart (Tag 0) in Zellysaten und Zellkulturüberständen bestimmt. Bei Versuchsstart waren die intrazellulären Kalziumkonzentrationen in den PXE-Fibroblasten signifikant höher als in den Kontrollzellen (Abb. 4.6 A). Die kalzifizierten Kontrollzellen wiesen nach 21-tägiger Behandlung mit Na₂HPO₄ signifikant erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen und den PXE-Fibroblasten auf (Abb. 4.6 D).

Die CaCl_2 -Behandlung führte zu einer Sättigung der Kalziumkonzentration in der intra- und extrazellulären Umgebung. Aufgrund der hohen Kalziumkonzentrationen konnten keine Unterschiede zwischen Kontroll- und PXE-Zellen detektiert werden (Kontrollzellen 1,85 mmol/L/ μg DNA vs. PXE-Zellen 1,74 mmol/L/ μg DNA). Die extrazellulären Kalziumkonzentrationen waren an Tag 6 in den mit Na_2HPO_4 -behandelten PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollen reduziert (Abb. 4.6 B). An Tag 12 konnte keine Veränderung der Kalziumkonzentrationen zwischen den beiden Kohorten beobachtet werden (Abb. 4.6 C). Nach 21-tägiger Kultivierung wiesen die PXE-Zellen erhöhte und die kalzifizierten Kontrollzellen erniedrigte extrazelluläre Kalziumkonzentrationen auf (Abb. 4.6 D).

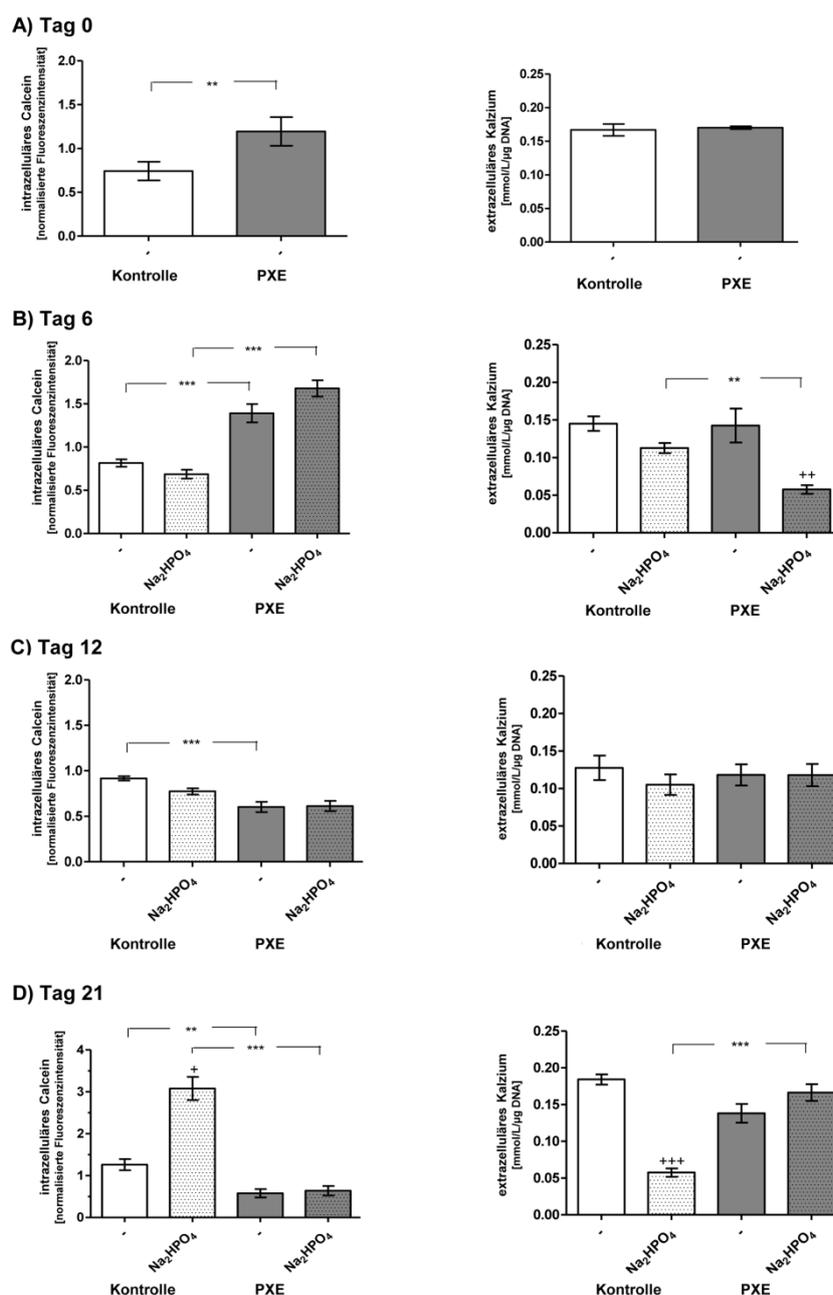


Abb. 4.6: Analyse der intra- und extrazellulären Kalziumkonzentrationen. Gezeigt sind die Kontrollfibroblasten (n = 4) unterteilt als weiße Balken und die PXE-Fibroblasten (n = 4) als graue Balken. Die Messungen erfolgten nach 0 (A), 6 (B), 12 (C) und 21 (D)-tägiger Behandlung mit Na_2HPO_4 . Intrazelluläre Kalziumkonzentrationen sind auf der linken und extrazelluläre Werte auf der rechten Seite dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt und abgebildet als Kontrolle vs. PXE (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$) und als unbehandelte vs. behandelte Zellen (+ $P < 0,05$; ++ $P < 0,005$; +++ $P < 0,0005$).

Die Genexpressionsprofile der kalzifizierungsassoziierten Gene *BMP2*, *Runx2*, *MGP* und *OPN* wurden in den unbehandelten und behandelten Kontroll- und PXE-Zellen nach 6, 12 und 21 Tagen bestimmt. Die Zellen wurden mit dem entsprechenden Kontroll- oder Kalzifizierungsmedium kultiviert, geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Anschließend erfolgte exemplarisch die Bestimmung der RNA-Integrität zur Überprüfung der mRNA-Qualität. 2 µg der jeweiligen RNA wurden revers transkribiert und die cDNA für die Quantifizierung 1:10 verdünnt. Zur Minimierung der Streuung wurden von jedem biologischen Replikat drei technische Replikate analysiert. Die relative Quantifizierung der mRNA-Genexpression erfolgte mittels *real-time* PCR. Für die Vergleichbarkeit der verschiedenen Messungen wurde ein cDNA-Kalibrator in jedem PCR-Ansatz mitgeführt. Zudem wurde jeweils eine Negativkontrolle quantifiziert um potentielle Verunreinigungen auszuschließen. Die Rohdaten jeder Genexpression wurden auf den Index der konstant exprimierten Haushaltsgene *GAPDH*, *β2M* und *HPRT1* normalisiert. Die angewendete effizienzkorrigierte relative Quantifizierung beruht auf der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Vandesompele *et al.* 2002). Alle relativen Genexpressionen wurden auf eine geschlechts-adjustierte, unbehandelte Probe reskaliert. Der entsprechende Wert für die nicht behandelte Kontrolle lag somit bei eins und ist in jeder Abbildung durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet.

Die Kalzifizierungsinduktion mit Na_2HPO_4 und CaCl_2 führte mit Ausnahme der weiblichen PXE-Zellen zu einem signifikanten 2-fachen Anstieg der *BMP2*-Genexpression in allen behandelten Zellen nach 6 Tagen der Kultivierung (Abb. 4.7 A). Nach 21 Tagen konnten niedrigere *BMP2*-Transkriptlevel in allen unbehandelten weiblichen Fibroblasten im Vergleich zu den männlichen beobachtet werden (Abb. 4.9 A). Die Na_2HPO_4 -Behandlung führte zu einem bis zu 10-fachen Anstieg der *BMP2*-Level in den männlichen Kontrollzellen, während die Behandlung auf alle anderen eingesetzten Zelllinien keinen Einfluss hatte (Abb. 4.9 A). Die CaCl_2 -Behandlung hingegen führte zusätzlich zum Anstieg in den männlichen Kontrollzellen auch in den weiblichen Kontrollzellen zu einem 2-fachen Anstieg der *BMP2*-Genexpression. Unabhängig vom eingesetzten Kalzifizierungsinduktor konnte weder in den männlichen noch in den weiblichen PXE-Fibroblasten die Genexpression von *BMP2* induziert werden (Abb. 4.9 A).

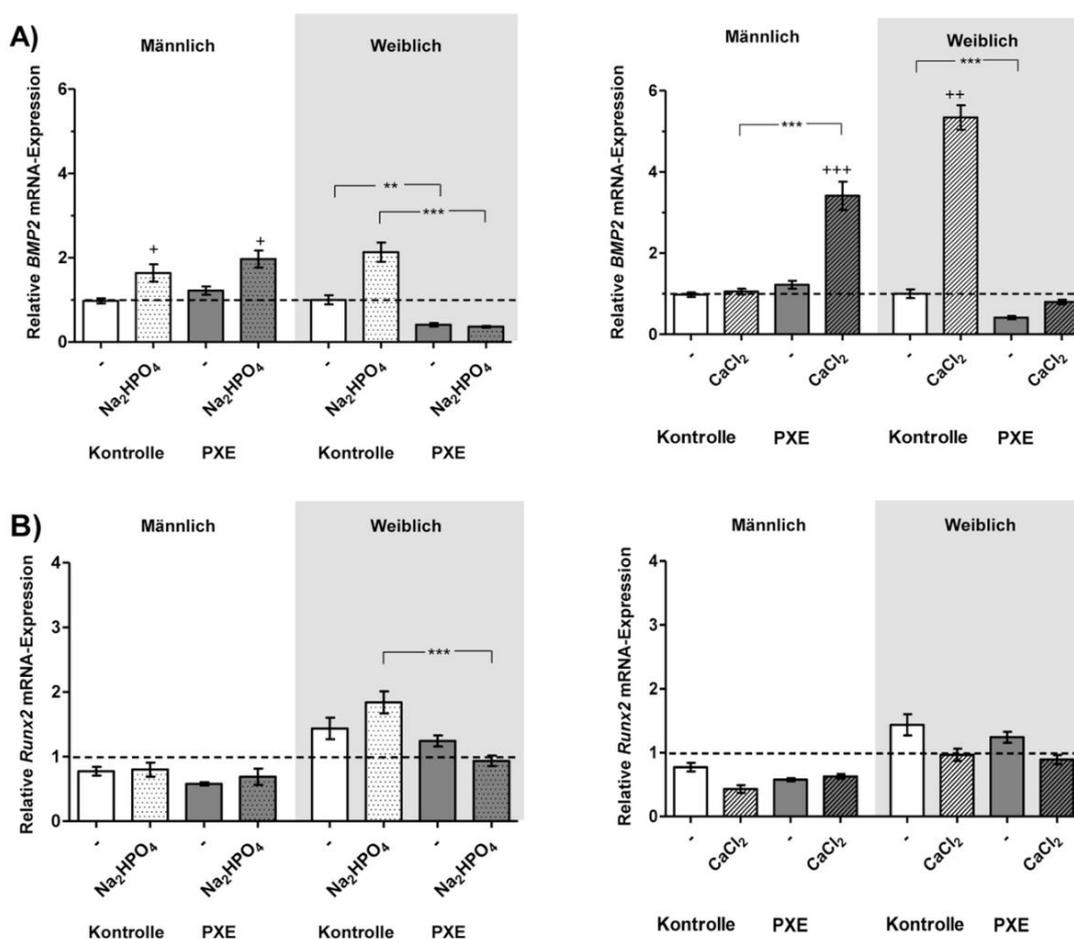


Abb. 4.7: Relative *BMP2*- (A) und *Runx2*- (B) mRNA-Expression von Kontroll- und PXE-Fibroblasten nach 6-tägiger Inkubation mit Na₂HPO₄ und CaCl₂. Gezeigt sind die normalisierten Genexpressionen der Kontrollfibroblasten unterteilt in männliche und weibliche Zellen (jeweils n = 2) als weiße Balken und die der PXE-Fibroblasten ebenfalls unterteilt in männliche und weibliche Zellen (jeweils n = 2) als graue Balken. Die relativen Transkriptraten sind als Mittelwerte mit korrespondierendem Standardfehler dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt und abgebildet als Kontrolle vs. PXE (* *P* < 0,05; ** *P* < 0,005; *** *P* < 0,0005) und als unbehandelte vs. behandelte Zellen (+ *P* < 0,05; ++ *P* < 0,005; +++ *P* < 0,0005). Die gestrichelte Linie repräsentiert die geschlechtsspezifische Normalisierung jeweils auf die unbehandelten Kontrollfibroblasten F42A und M45D.

In den frühen Tagen des Kalzifizierungsprozesses konnte eine Regulation der *Runx2*-Transkriptlevel nur in den weiblichen Fibroblasten beobachtet werden. Dort resultierte eine Behandlung mit Na₂HPO₄ oder CaCl₂ zu einer bis zu 1,5-fachen Erhöhung der *Runx2*-Genexpression in weiblichen Kontrollfibroblasten am Tag 6 (Abb. 4.7 B). Dieser Effekt wurde bis zum 12. Tag der Kultivierung bis zu einer 2,5-fachen Erhöhung intensiviert (Abb. 4.8 B). In den männlichen Fibroblasten konnte eine Erhöhung der *Runx2*-Genexpression nicht vor dem 21. Tag detektiert werden. Im Gegensatz zur Expression in den weiblichen Zellen konnte in den männlichen Kontrollzellen (2,5-fach) ein stärkerer Anstieg als in den männlichen PXE-Zellen (0,5-fach) gemessen werden (Abb. 4.9 B). Die CaCl₂-Behandlung induzierte eine moderate Inhibierung der *Runx2*-mRNA-Expression in PXE-Fibroblasten nach 21-tägiger Kultivierung (Abb. 4.9 B).

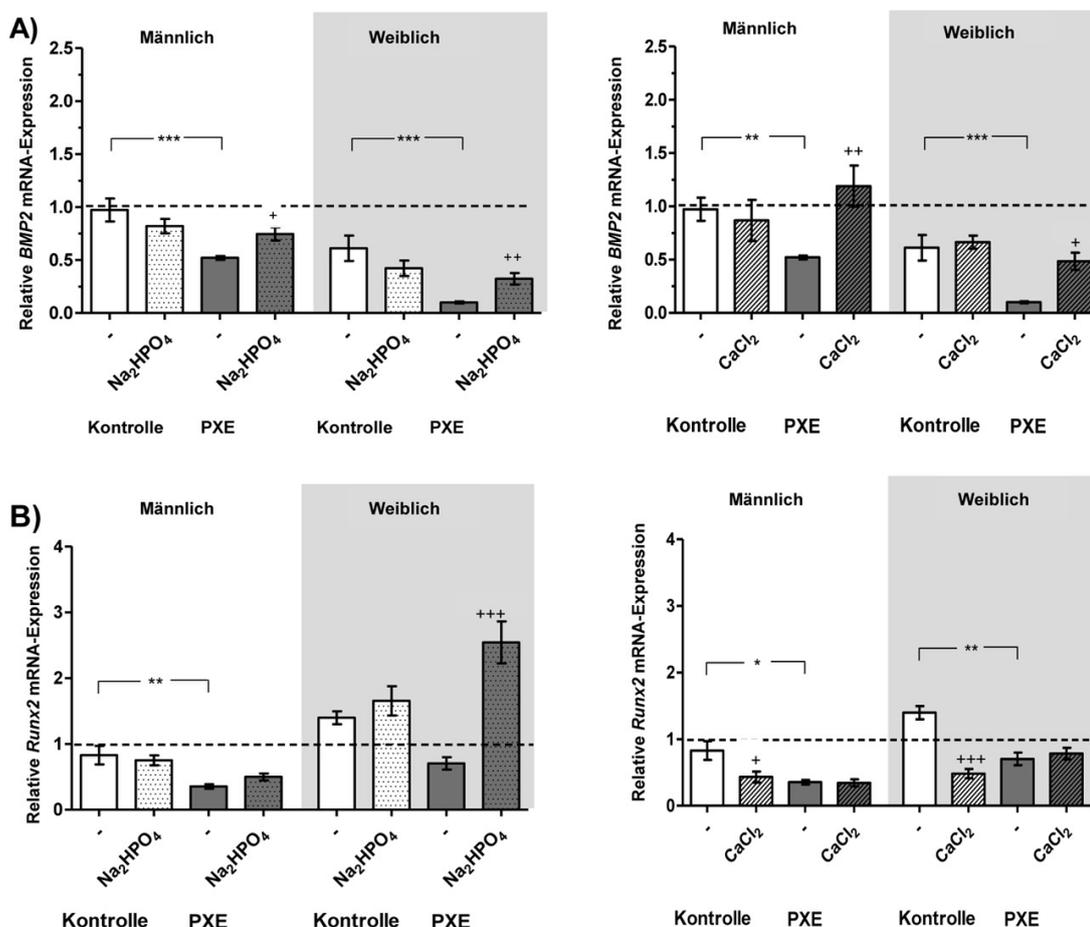


Abb. 4.8: Relative BMP2- (A) und Runx2- (B) mRNA-Expression von Kontroll- und PXE-Fibroblasten nach 12-tägiger Inkubation mit Na₂HPO₄ und CaCl₂. Gezeigt sind die normalisierten Genexpressionen der Kontrollfibroblasten unterteilt in männliche und weibliche Zellen (jeweils n = 2) als weiße Balken und die der PXE-Fibroblasten ebenfalls unterteilt in männliche und weibliche Zellen (jeweils n = 2) als graue Balken. Die relativen Transkriptraten sind als Mittelwerte mit korrespondierendem Standardfehler dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt und abgebildet als Kontrolle vs. PXE (* P < 0,05; ** P < 0,005; *** P < 0,0005) und als unbehandelte vs. behandelte Zellen (+ P < 0,05; ++ P < 0,005; +++ P < 0,0005). Die gestrichelte Linie repräsentiert die geschlechtsspezifische Normalisierung jeweils auf die unbehandelten Kontrollfibroblasten F42A und M45D.

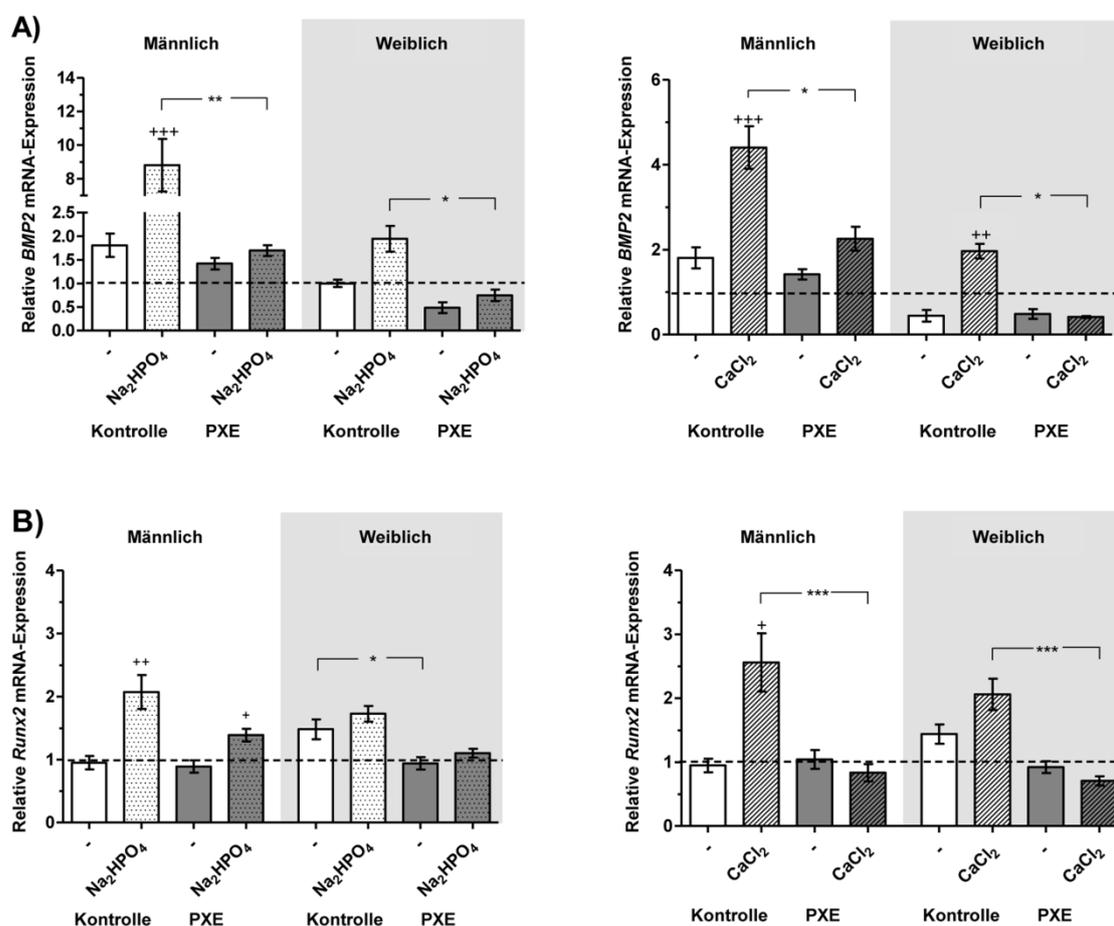


Abb. 4.9: Relative BMP2- (A) und Runx2- (B) mRNA-Expression von Kontroll- und PXE-Fibroblasten nach 21-tägiger Inkubation mit Na₂HPO₄ und CaCl₂. Gezeigt sind die normalisierten Genexpressionen der Kontrollfibroblasten unterteilt in männliche und weibliche Zellen (jeweils n = 2) als weiße Balken und die der PXE-Fibroblasten ebenfalls unterteilt in männliche und weibliche Zellen (jeweils n = 2) als graue Balken. Die relativen Transkriptraten sind als Mittelwerte mit korrespondierendem Standardfehler dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt und abgebildet als Kontrolle vs. PXE (* P < 0,05; ** P < 0,005; *** P < 0,0005) und als unbehandelte vs. behandelte Zellen (+ P < 0,05; ++ P < 0,005; +++ P < 0,0005). Die gestrichelte Linie repräsentiert die geschlechtsspezifische Normalisierung jeweils auf die unbehandelten Kontrollfibroblasten F42A und M45D.

Die Analyse der *MGP*-Transkriptlevel in den männlichen und weiblichen PXE-Fibroblasten ergab in den frühen Tagen des Kalzifizierungsprozesses niedrigere Level verglichen mit denen der Kontroll-Fibroblasten (Abb. 4.10 A). Die Behandlung mit dem Kalzifizierungsmedium führte zu einer 0,5-fach erhöhten *MGP*-Genexpression in den männlichen Fibroblasten an Tag 12 (Abb. 4.11 A). Im Gegensatz dazu konnte eine Erhöhung der *MGP*-Level in den weiblichen Zellen nicht vor dem 21. Tag detektiert werden. In den unbehandelten Zellen konnten in den männlichen Kontroll- und in den weiblichen PXE-Zellen erhöhte *MGP*-Transkriptlevel im Gegensatz zu reduzierten *MGP*-Expressionen in weiblichen Kontroll- und in männlichen PXE-Fibroblasten beobachtet werden (Abb. 4.12 A). Die Induktion der *MGP*-Genexpression war in kalzifizierten weiblichen PXE-Zellen (bis zu 5-fach) signifikant stärker als in den weiblichen Kontrollzellen (bis zu 2,5-fach). Mit einer bis zu 10-fachen Erhöhung der *MGP*-mRNA-Expression in den männlichen Kontrollzellen verglichen mit der der behandelten PXE-Fibroblasten (bis zu 5-fach) führt die Inkubation mit dem Kalzifizierungsmedium zu einem deutlichen Unterschied (Abb. 4.12 A).

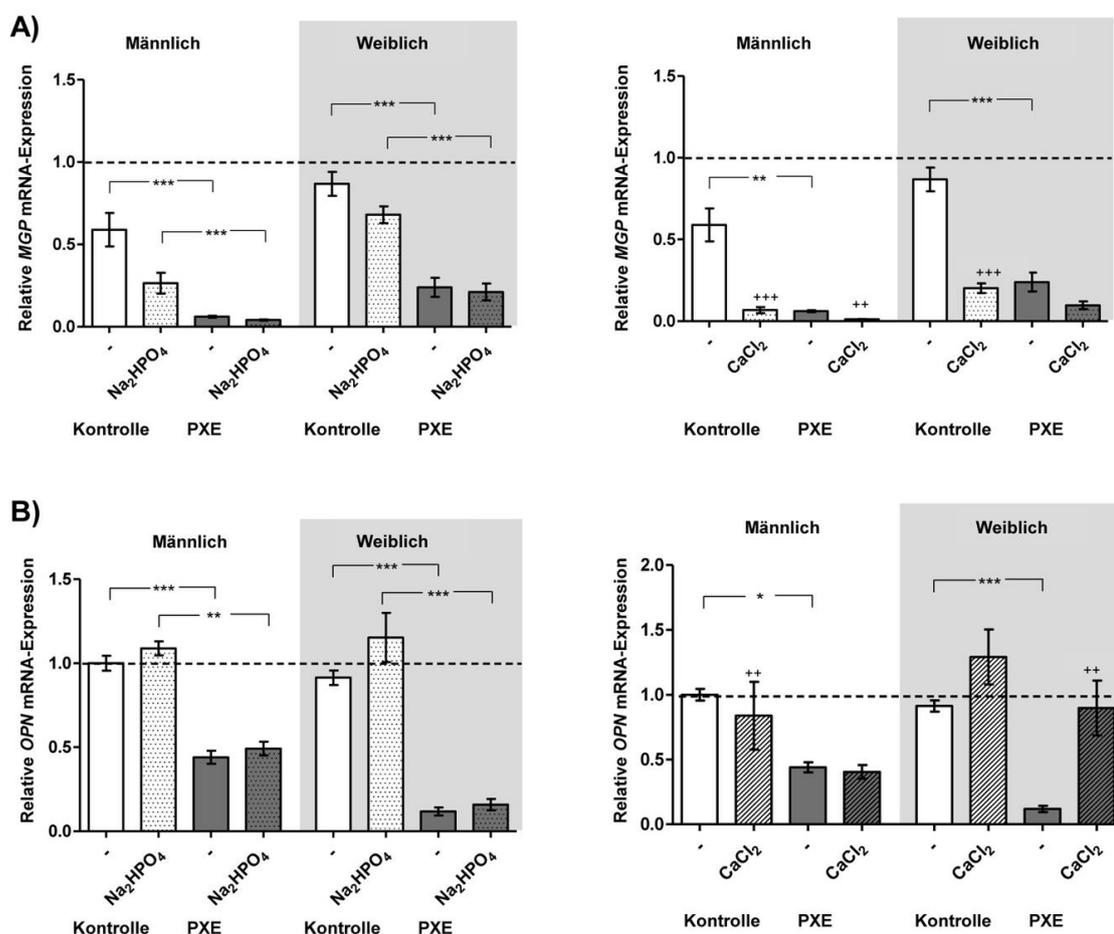


Abb. 4.10: Relative MGP- (A) und OPN- (B) mRNA-Expression von Kontroll- und PXE-Fibroblasten nach 6-tägiger Inkubation mit Na₂HPO₄ und CaCl₂. Gezeigt sind die normalisierten Genexpressionen der Kontrollfibroblasten unterteilt in männliche und weibliche Zellen (jeweils n = 2) als weiße Balken und die der PXE-Fibroblasten ebenfalls unterteilt in männliche und weibliche Zellen (jeweils n = 2) als graue Balken. Die relativen Transkripten sind als Mittelwerte mit korrespondierendem Standardfehler dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt und abgebildet als Kontrolle vs. PXE (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$) und als unbehandelte vs. behandelte Zellen (+ $P < 0,05$; ++ $P < 0,005$; +++ $P < 0,0005$). Die gestrichelte Linie repräsentiert die geschlechtsspezifische Normalisierung jeweils auf die unbehandelten Kontrollfibroblasten F42A und M45D.

Humane MGP-Proteinkonzentrationen konnten im Zellkulturüberstand aufgrund der Nachweisgrenze der verfügbaren Testsysteme erst nach 21-tägiger Kultivierung nachgewiesen werden. Korrespondierend zu den Genexpressionsergebnissen zeigten die Messungen der MGP-Proteinkonzentration in männlichen PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den unbehandelten männlichen Kontrollzellen signifikant erniedrigte Werte (Abb. 4.12 B). Bei den unbehandelten weiblichen Kontroll- und PXE-Fibroblasten fanden sich 2-fach höhere MGP-Proteinexpressionen als die männlichen Zellen. Die Na₂HPO₄-Kalzifizierungsbehandlung führte zu einem Anstieg der MGP-Proteinkonzentrationen in männlichen PXE-Fibroblasten. Dieser Anstieg konnte in männlichen PXE-Fibroblasten nach CaCl₂-Behandlung nicht detektiert werden. Die Kalzifizierungsbehandlung mit beiden Reagenzien resultierte in signifikant geringeren MGP-Proteinkonzentrationen in männlichen und weiblichen Kontrollen sowie in weiblichen PXE-Fibroblasten (Abb. 4.12 B).

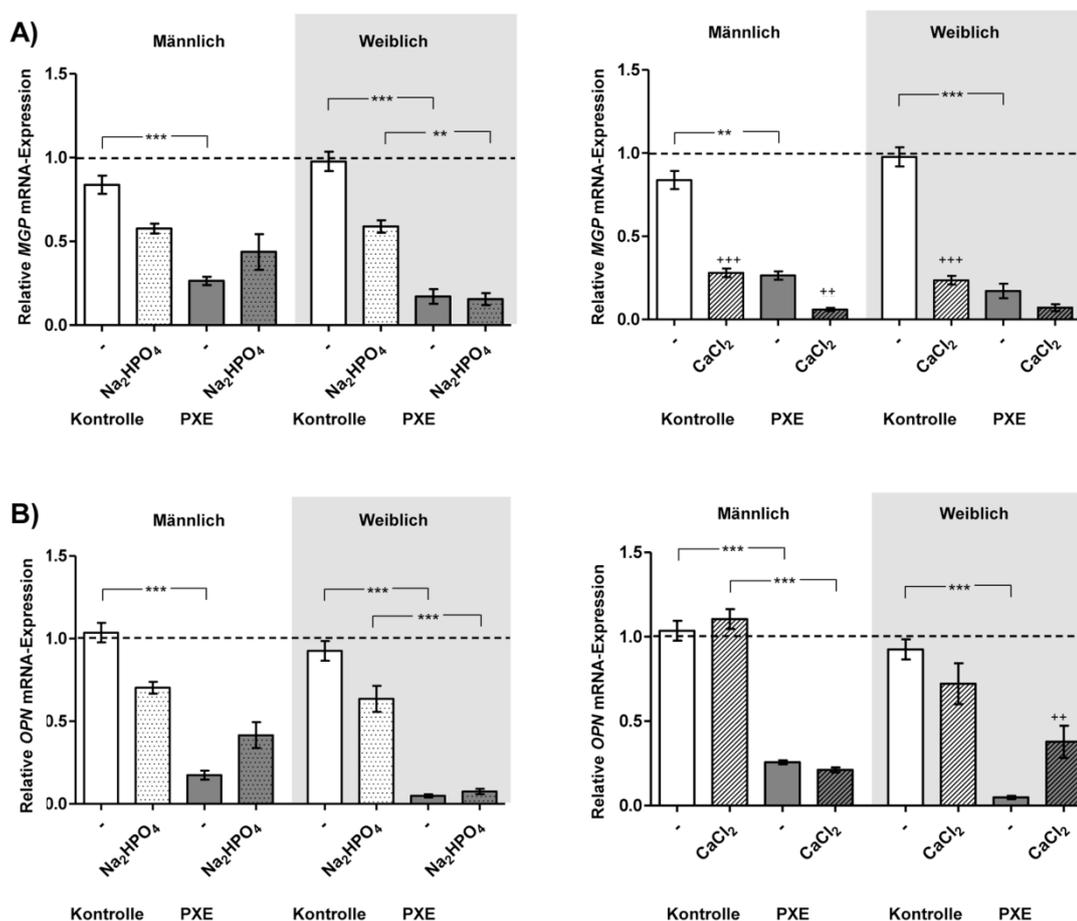


Abb. 4.11: Relative MGP- (A) und OPN- (B) mRNA-Expression von Kontroll- und PXE-Fibroblasten nach 12-tägiger Inkubation mit Na₂HPO₄ und CaCl₂. Gezeigt sind die normalisierten Genexpressionen der Kontrollfibroblasten unterteilt in männliche und weibliche Zellen (jeweils n = 2) als weiße Balken und die der PXE-Fibroblasten ebenfalls unterteilt in männliche und weibliche Zellen (jeweils n = 2) als graue Balken. Die relativen Transkriptraten sind als Mittelwerte mit korrespondierendem Standardfehler dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt und abgebildet als Kontrolle vs. PXE (* P < 0,05; ** P < 0,005; *** P < 0,0005) und als unbehandelte vs. behandelte Zellen (+ P < 0,05; ++ P < 0,005; +++ P < 0,0005). Die gestrichelte Linie repräsentiert die geschlechtsspezifische Normalisierung jeweils auf die unbehandelten Kontrollfibroblasten F42A und M45D.

In den frühen Tagen des Kalzifizierungsprozesses wiesen die PXE-Fibroblasten, verglichen mit den Kontrollzellen, stark reduzierte *OPN*-Transkriptlevel auf (Abb. 4.10 B). An Tag 12 konnte ein moderater Anstieg der *OPN*-Genexpression in den männlichen PXE-Zellen beobachtet werden, welcher sich bis zum 21. Tag der Kalzifizierungsbehandlung intensivierte (bis zu 6-fach, Abb. 4.11 B, Abb. 4.12 C). Der gleiche Trend, jedoch mit geringerer Intensität (2-fach) konnte für die männlichen und weiblichen Kontrollzellen nach Na₂HPO₄-Induktion detektiert werden. Die gleiche Behandlung führte in den weiblichen PXE-Fibroblasten zu reduzierten *OPN*-Genexpressionsleveln, während die Kalzifizierungsbehandlung mit CaCl₂ zu einem signifikanten Anstieg (bis zu 4-fach) in allen Zelllinien führte. Die *OPN*-mRNA-Transkriptlevel in den unbehandelten weiblichen PXE-Zellen waren im Vergleich zu den weiblichen Kontrollen deutlich reduziert, während die Expression in den männlichen Zellen der Kontrollen und der PXE-Patienten vergleichbar war (Abb. 4.12 C).

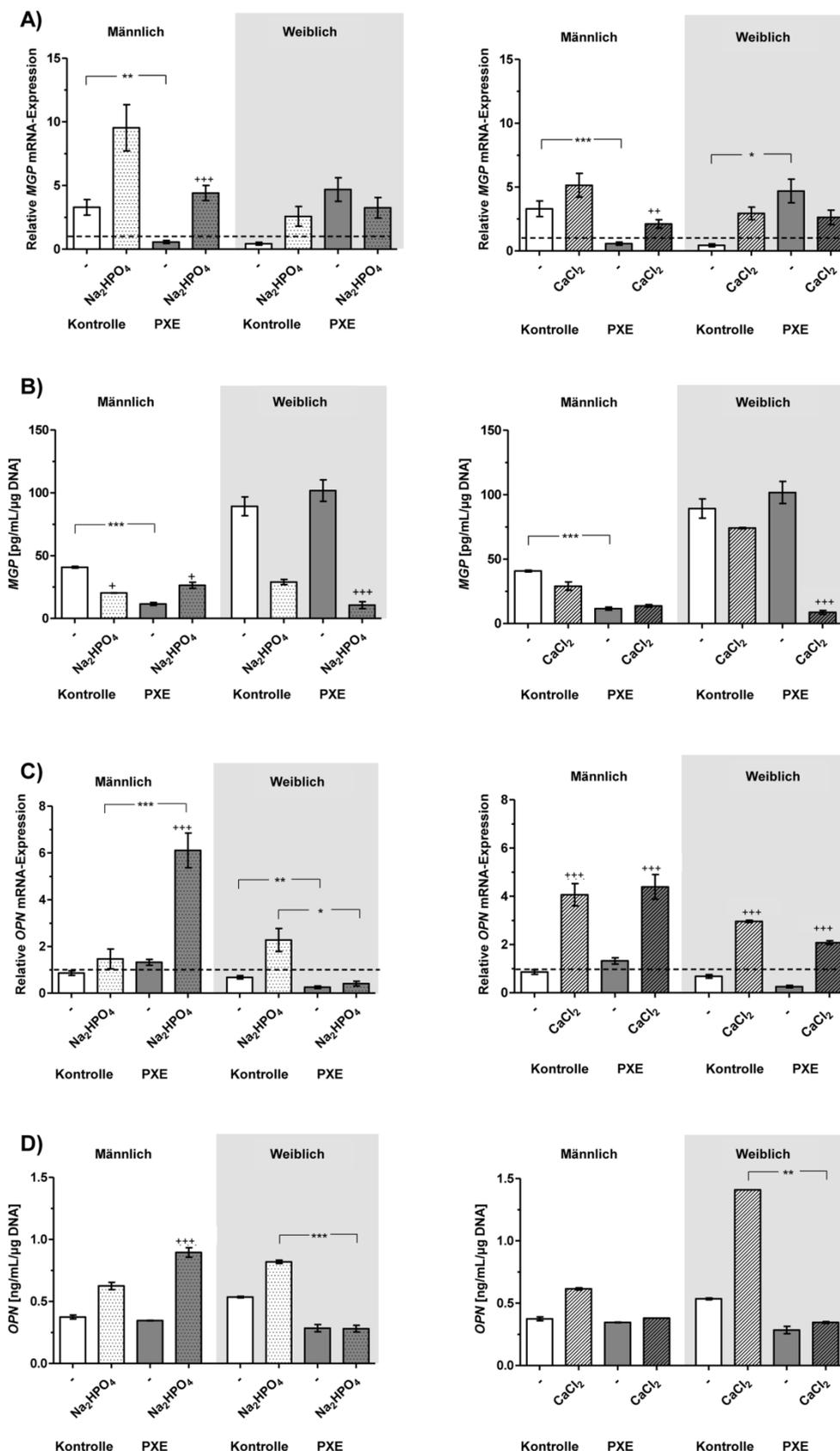


Abb. 4.12: Analyse von MGP- und OPN-Transkript- und Proteinlevel nach 21-tägiger Inkubation mit Na₂HPO₄ und CaCl₂. Gezeigt sind die normalisierten Genexpressionen der Kontrollfibroblasten unterteilt in männliche und weibliche Zellen (jeweils n = 2) als weiße Balken und die der PXE-Fibroblasten ebenfalls unterteilt in männliche und weibliche Zellen (jeweils n = 2) als graue Balken. Die relativen Transkriptraten sind als Mittelwerte mit korrespondierendem Standardfehler dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt und abgebildet als Kontrolle vs. PXE (* P < 0,05; ** P < 0,005; *** P < 0,0005) und als unbehandelte vs. behandelte Zellen (+ P < 0,05; ++ P < 0,005; +++ P < 0,0005). Die gestrichelte Linie repräsentiert die geschlechtsspezifische Normalisierung jeweils auf die unbehandelten Kontrollfibroblasten F42A und M45D.

Die Ergebnisse der Na_2HPO_4 -Behandlung konnten auf Proteinebene mittels Messung der OPN-Konzentration im Zellkulturüberstand verifiziert werden (Abb. 4.12 D). Im Gegensatz dazu konnte der Anstieg der OPN-Expression nach der Kalzifizierungsinduktion mit CaCl_2 nur in den Kontrollzelllinien beobachtet werden. Eine Erhöhung der OPN-Proteinkonzentration nach CaCl_2 -Behandlung im Zellkulturüberstand konnte in den PXE-Fibroblasten an Tag 21 nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.12 D).

Die lineare Regressionsanalyse wurde zur Analyse potentieller Korrelationen zwischen *ENPP1*- und *OPN*-, zwischen *Runx2*-, *OPN*- und *BMP2*-Expressionen eingesetzt. In den Kontroll- und den unbehandelten PXE-Zellen konnten keine Korrelationen gefunden werden. Die *ENPP1*- und *OPN*-Genexpressionslevel korrelierten in den behandelten PXE-Fibroblasten an jedem überprüften Zeitpunkt im Kalzifizierungsprozess. Die höchste Korrelation wurde zwischen *ENPP1* und *OPN* nach 21-tägiger CaCl_2 -Behandlung detektiert ($R = 0,49$; $P = 0,0001$; Abb. 4.13 A). Zwischen *Runx2* und *OPN* konnte eine Korrelation nur an Tag 21 nach Behandlung mit Na_2HPO_4 beobachtet werden ($P = 0,03$; $R = 0,15$; Abb. 4.13 B), während die Korrelationen zwischen *Runx2* und *BMP2* nach beiden Behandlungen an Tag 21 nachweisbar waren (Na_2HPO_4 : $P = 0,0001$; $R = 0,68$. CaCl_2 : $P = 0,0002$; $R = 0,44$; Abb. 4.13 C).

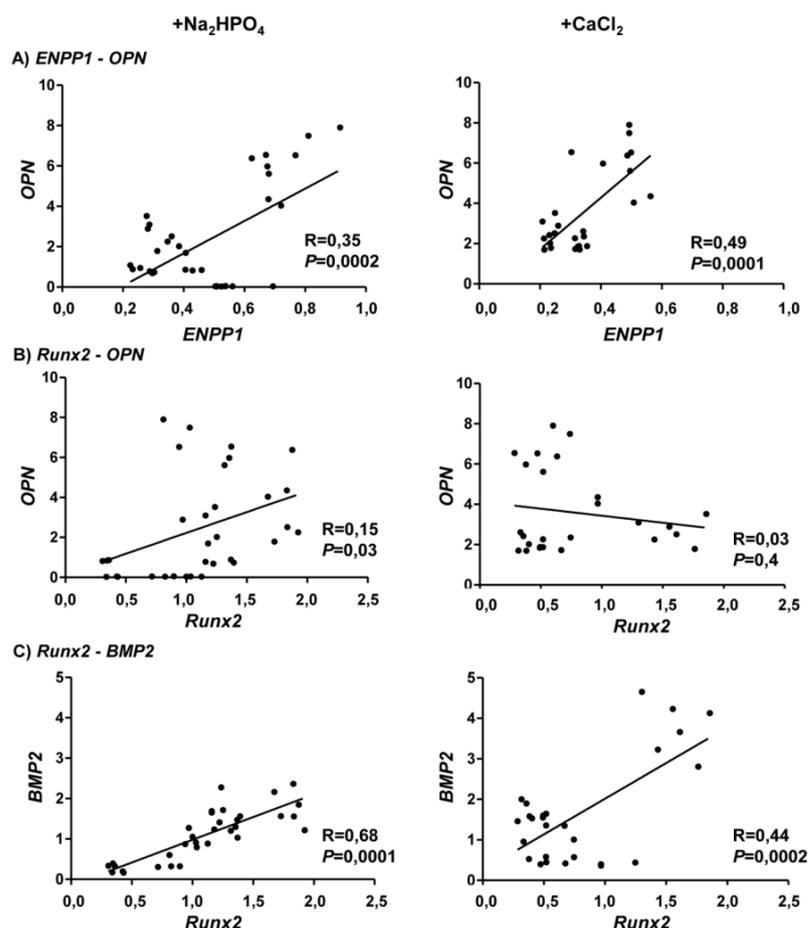


Abb. 4.13: Korrelationen von *ENPP1* - *OPN*, *Runx2* - *OPN* und *Runx2* - *BMP2* mRNA-Expressionen in behandelten PXE-Zellen ($n = 4$) nach 21-tägiger Inkubation mit Na_2HPO_4 und CaCl_2 . Die lineare Regressionsanalyse zeigt positive Korrelationen zwischen den Genexpressionen von *ENPP1* und *OPN* (A), zwischen *Runx2* und *OPN* (B) und zwischen *Runx2* und *BMP2* (C) in behandelten PXE-Fibroblasten.

4.3 Untersuchungen zur Matrixkalzifizierung bei PXE

Die Genexpression von Struktur- und Regulatorproteinen der ECM wurde nach 21 Tagen Kultivierungszeit mittels CaCl_2 als Kalzifizierungsinduktor in Kontroll- und PXE-Fibroblasten untersucht. Eine Kalzifizierung konnte mittels ARS-Färbung sowohl in Kontroll- als auch in PXE-Fibroblasten nach 21 Tagen sichtbar gemacht werden (Abb. 4.5). Eine signifikante, bis zu 2,5-fache Erhöhung der Transkriptlevel der *MMP2* konnte in kalzifizierten PXE-Fibroblasten detektiert werden (Abb. 4.14 A). Der gleiche Trend, allerdings mit signifikant geringeren Werten (1,5-fach) konnte in den kalzifizierten Kontrollfibroblasten beobachtet werden. Die Kalzifizierungsbehandlung führte in den PXE-Zellen zu einem 6,5-fachen, signifikanten Anstieg der *MMP12*-Genexpression (Abb. 4.14 B). Dieser Anstieg konnte in den behandelten Kontrollfibroblasten nicht beobachtet werden.

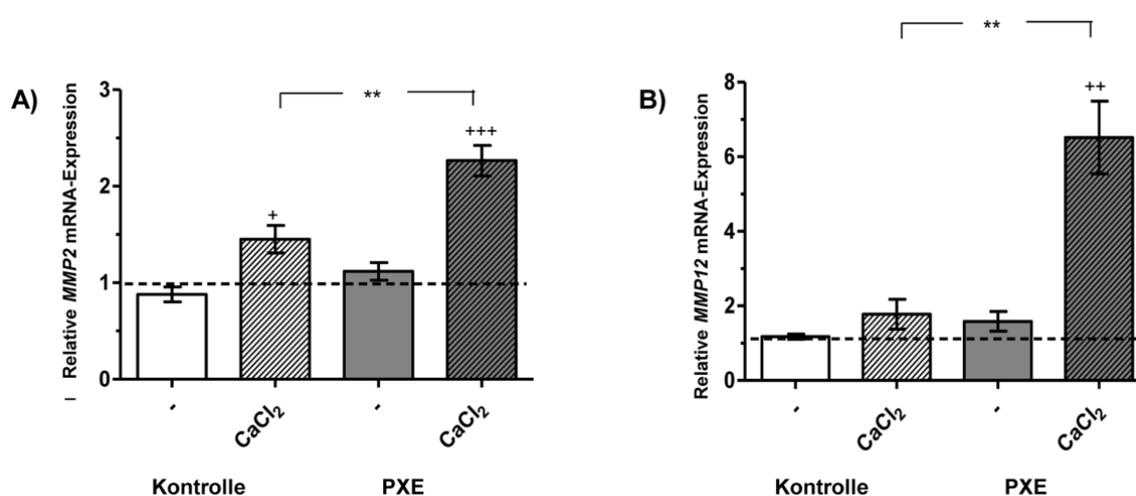


Abb. 4.14: Relative *MMP2*- (A) und *MMP12*- (B) mRNA-Expression von Kontroll- und PXE-Fibroblasten nach 21 Tagen. Gezeigt sind die normalisierten Genexpressionen der Kontrollfibroblasten (n = 4) als weiße Balken und die der PXE-Fibroblasten (n = 4) als graue Balken. Die relativen Transkriptraten sind als Mittelwerte mit korrespondierendem Standardfehler dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt und abgebildet als Kontrolle vs. PXE (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$) und als unbehandelte vs. behandelte Zellen (+ $P < 0,05$; ++ $P < 0,005$; +++ $P < 0,0005$). Die gestrichelte Linie repräsentiert die geschlechtsspezifische Normalisierung jeweils auf die unbehandelten Kontrollfibroblasten F42A und M45D.

Die mRNA-Transkriptraten der *Kollagene 1A1* (*COL1A1*) und *3A1* (*COL3A1*) zeigten sowohl in Kontroll- als auch in PXE-Fibroblasten eine 50 %ige Reduzierung nach der 21-tägigen Kalzifizierungsbehandlung (Abb. 4.15 A+B). Die unbehandelten PXE-Fibroblasten hingegen wiesen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollfibroblasten eine 50 %ig geringere *COL1A1*- und *COL3A1*-Expression auf. Die *ELN*-Transkriptlevel in PXE-Fibroblasten waren signifikant reduziert. Die Kalzifizierungsbehandlung induzierte eine starke Deregulation der *ELN*-Genexpression in allen kalzifizierten Fibroblasten (Abb. 4.15 C).

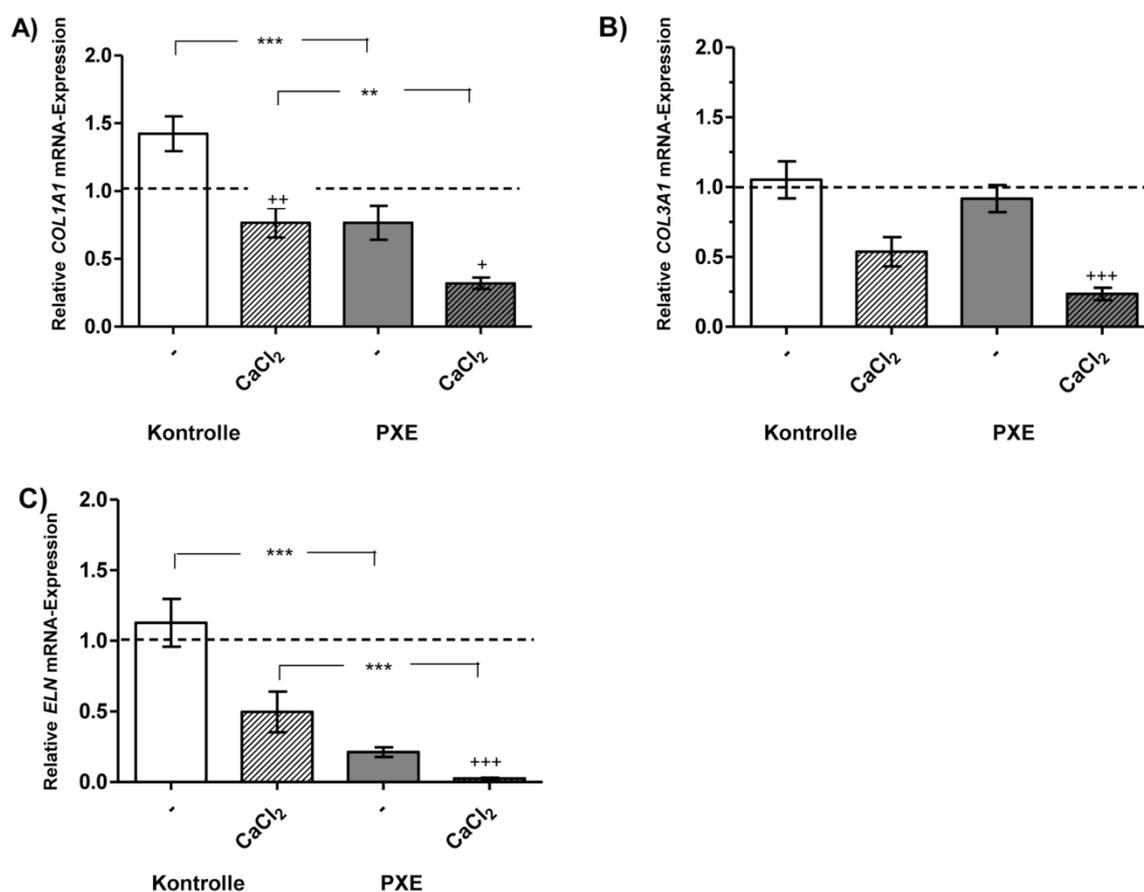


Abb. 4.15: Relative COL1A1- (A), COL3A1- (B) und ELN- (C) mRNA-Expression von Kontroll- und PXE-Fibroblasten nach 21 Tagen. Gezeigt sind die normalisierten Genexpressionen der Kontrollfibroblasten (n = 4) als weiße Balken und die der PXE-Fibroblasten (n = 4) als graue Balken. Die relativen Transkriptraten sind als Mittelwerte mit korrespondierendem Standardfehler dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt und abgebildet als Kontrolle vs. PXE (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$) und als unbehandelte vs. behandelte Zellen (+ $P < 0,05$; ++ $P < 0,005$; +++ $P < 0,0005$). Die gestrichelte Linie repräsentiert die geschlechtsspezifische Normalisierung jeweils auf die unbehandelten Kontrollfibroblasten F42A und M45D.

In den Kontrollzellen konnte keine Regulation der *FN*-mRNA-Mengen detektiert werden, während die *FN*-Expression in PXE-Fibroblasten eine 60 %ige Reduktion im Vergleich zu den Kontrollzellen aufwies (Abb. 4.16 A). Die *FBN1*- und *LOX*-Transkriptraten waren in kalzifizierten Kontroll- und PXE-Zellen signifikant reduziert. Im Vergleich zu den Kontrollen konnte in den PXE-Zellen eine 50 %ige Reduktion der *FBN1*- und *LOX*-Expression nachgewiesen werden (Abb. 4.16 B+C). Nach 21-tägiger Inkubation mit CaCl₂ konnte eine Erhöhung der *TGFB1*-Expression in den Kontrollzellen festgestellt werden, während in kalzifizierten PXE-Fibroblasten eine deutliche Erniedrigung der *TGFB1*-Expressionslevel beobachtet wurde (Abb. 4.16 D).

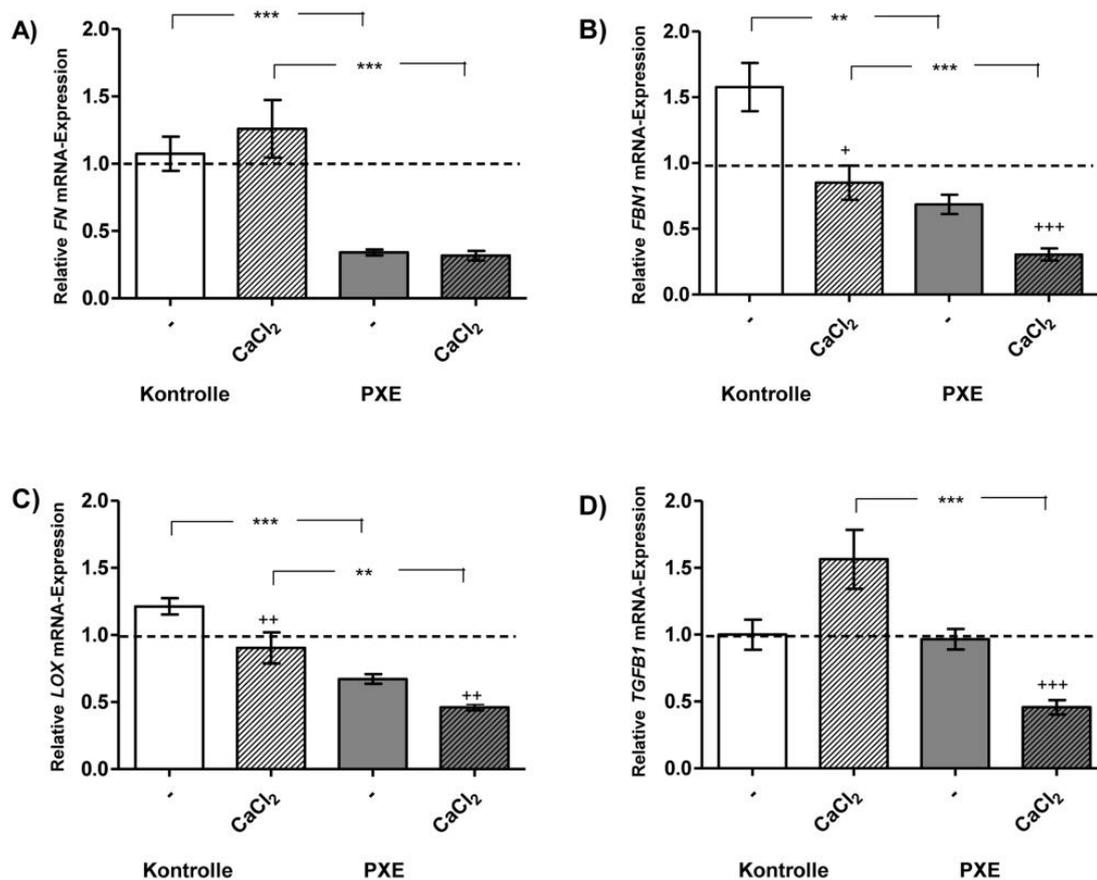


Abb. 4.16: Relative FN- (A), FBN1- (B) LOX- (C) und TGFB1- (D) mRNA-Expression von Kontroll- und PXE-Fibroblasten nach 21 Tagen. Gezeigt sind die normalisierten Genexpressionen der Kontrollfibroblasten (n = 4) als weiße Balken und die der PXE-Fibroblasten (n = 4) als graue Balken. Die relativen Transkriptraten sind als Mittelwerte mit korrespondierendem Standardfehler dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt und abgebildet als Kontrolle vs. PXE (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$) und als unbehandelte vs. behandelte Zellen (+ $P < 0,05$; ++ $P < 0,005$; +++ $P < 0,0005$). Die gestrichelte Linie repräsentiert die geschlechtsspezifische Normalisierung jeweils auf die unbehandelten Kontrollfibroblasten F42A und M45D.

4.4 Untersuchung der Pyrophosphat-Homöostase bei PXE

Des Weiteren wurde die Pyrophosphat-Homöostase in kalzifizierten Kontroll- und PXE-Fibroblasten mittels CaCl_2 als Kalzifizierungsinduktor untersucht. Dazu wurden die Genexpressionen der PP_i -regulierenden Genen *ALP*, *ANKH*, *ENPP1*, *PIT-1* und *PIT-2*, sowie die extra- und intrazellulären PP_i -Konzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten im Kalzifizierungsprozess (nach 6-, 12- und 21-tägiger Kultivierung) bestimmt. Eine histochemische Kalzifizierung konnte mittels ARS-Färbung sowohl in Kontroll- als auch in PXE-Fibroblasten nach 21 Tagen sichtbar gemacht werden (Abb. 4.5). Die *ALP*-Transkriptlevel in den Kontrollfibroblasten waren nach 21-tägiger Behandlung mit Kalzifizierungsmedium signifikant bis zu 4-fach erhöht, während CaCl_2 in den PXE-Zellen zu einer signifikanten Reduzierung der Genexpression führte (Abb. 4.17 A). Eine signifikante 2-fache *ANKH*-Expressionserhöhung konnte sowohl in den behandelten Kontroll- sowie in den PXE-Zellen beobachtet werden (Abb. 4.17 B). Die Kontrollfibroblasten wiesen nach 21-tägiger CaCl_2 -Behandlung eine um 20 % reduzierte *ENPP1*-mRNA-Expression auf, während die *ENPP1*-Transkriptlevel in den PXE-Fibroblasten hoch signifikant auf 50 % reduziert vorlagen ($P = 0,0005$; Abb. 4.17 C). Die Kalzifizierungsbehandlung führte zu einer signifikanten Erhöhung der Genexpression des Na/P_i -Kotransporters *PIT-1* in den Kontroll- und PXE-Zellen (Abb. 4.18 A). Die Transkriptlevel des Transporters *PIT-2* zeigten leicht verminderte Werte in den behandelten PXE-Fibroblasten. Ein Unterschied in den Kontrollzellen konnte nicht detektiert werden (Abb. 4.18 B).

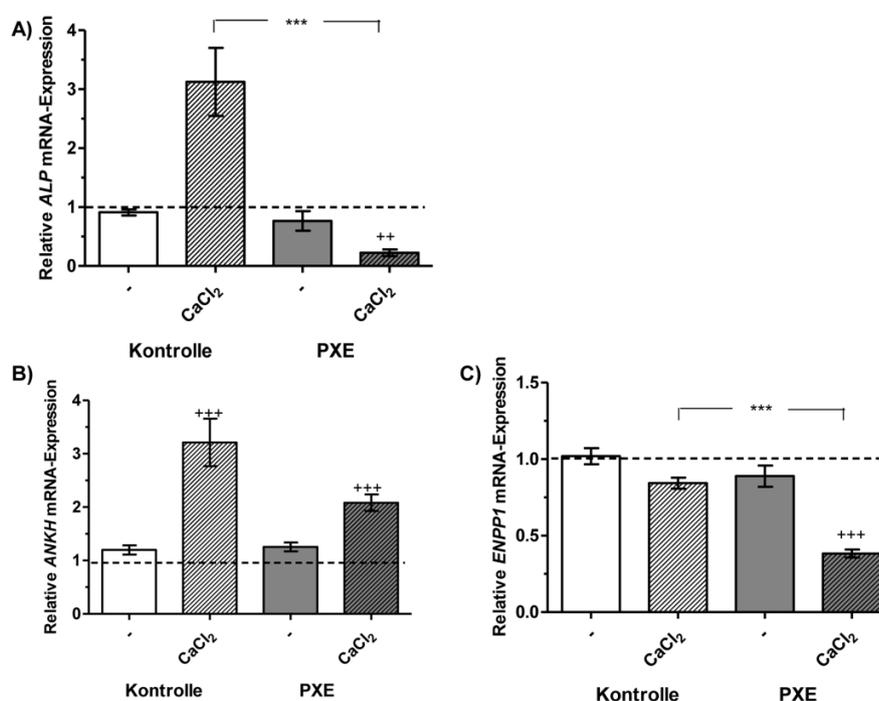


Abb. 4.17: Relative *ALP*- (A), *ANKH*- (B) und *ENPP1*- (C) mRNA-Expression von Kontroll- und PXE-Fibroblasten nach 21 Tagen. Gezeigt sind die normalisierten Genexpressionen der Kontrollfibroblasten ($n = 4$) als weiße Balken und die der PXE-Fibroblasten ($n = 4$) als graue Balken. Die relativen Transkriptraten sind als Mittelwerte mit korrespondierendem Standardfehler dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt und abgebildet als Kontrolle vs. PXE (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$) und als unbehandelte vs. behandelte Zellen (+ $P < 0,05$; ++ $P < 0,005$; +++ $P < 0,0005$). Die gestrichelte Linie repräsentiert die geschlechtsspezifische Normalisierung jeweils auf die unbehandelten Kontrollfibroblasten F42A und M45D.

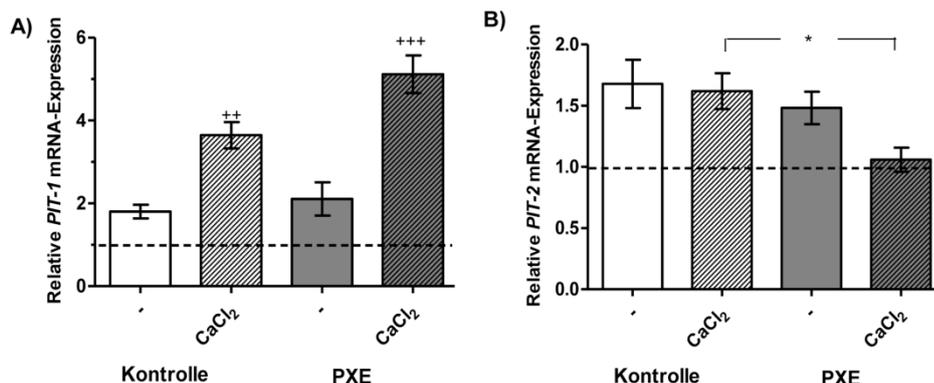


Abb. 4.18: Relative PIT-1- (A) und PIT-2- (B) mRNA-Expression von Kontroll- und PXE-Fibroblasten nach 21 Tagen. Gezeigt sind die normalisierten Genexpressionen der Kontrollfibroblasten (n = 4) als weiße Balken und die der PXE-Fibroblasten (n = 4) als graue Balken. Die relativen Transkriptraten sind als Mittelwerte mit korrespondierendem Standardfehler dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt und abgebildet als Kontrolle vs. PXE (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$) und als unbehandelte vs. behandelte Zellen (+ $P < 0,05$; ++ $P < 0,005$; +++ $P < 0,0005$). Die gestrichelte Linie repräsentiert die geschlechtsspezifische Normalisierung jeweils auf die unbehandelten Kontrollfibroblasten F42A und M45D.

Die ENPP1-Aktivität wurde in den Fibroblasten nach 21-tägiger Kalzifizierungsbehandlung bestimmt (Abb. 4.19). In den kalzifizierten Fibroblasten wurde eine niedrigere Aktivität als in den unbehandelten Zellen gemessen, welche in den kalzifizierten PXE-Fibroblasten signifikant geringer war.

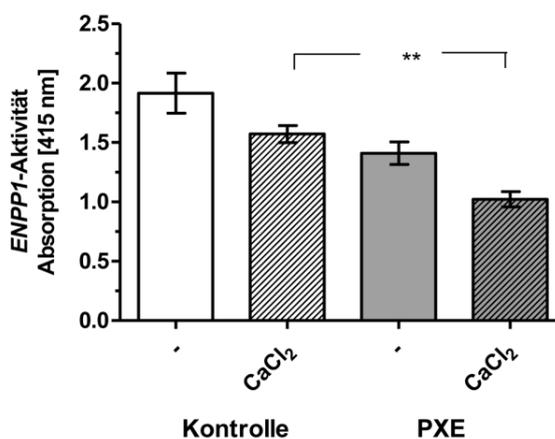


Abb. 4.19: Bestimmung der ENPP1-Aktivität in Kontroll- und PXE-Fibroblasten nach 21-tägiger Kultivierung. Die Kontrollfibroblasten (n = 4) sind als weiße Balken und die PXE-Fibroblasten (n = 4) als graue Balken dargestellt. Die Konzentrationen sind als Mittelwerte der ENPP1-Aktivität normalisiert auf μg DNA-Gehalt der Zellen mit ihrem korrespondierenden Standardfehler abgebildet. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt und abgebildet als Kontrolle vs. PXE (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$) und als unbehandelte vs. behandelte Zellen (+ $P < 0,05$; ++ $P < 0,005$; +++ $P < 0,0005$).

Die detektierten Genexpressionen der PP_i regulierenden Genen *ALP*, *ANKH*, *ENPP1*, *PIT-1* und *PIT-2* in den frühen Tagen des Kalzifizierungsprozesses nach 6 und 12 Tagen Kultivierung sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst. In den Kontrollzellen konnten keine Unterschiede in den *ALP*-, *ANKH*- und *ENPP1*-Transkriptlevel abhängig von der Kalzifizierungsbehandlung festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wiesen die PXE-Fibroblasten stark reduzierte *ALP*-Genexpressionen auf. Die Kalzifizierungsbehandlung führte über die Kultivierungszeit zu signifikant reduzierten *ENPP1*-mRNA-Expressionen, während in den Kontrollzellen eine

leichte Abnahme der *ENPP1*-Expressionen erst an Tag 12 detektiert werden konnte. Die *PIT-1*-Genexpression wird schon in den frühen Tagen des Kalzifizierungsprozesses durch die CaCl_2 -Behandlung induziert, während die *PIT-2*-Expression abnahm.

Tab. 4.5: Relative *ALP*-, *ANKH*-, *ENPP1*-, *PIT-1*- und *PIT-2*-mRNA-Expression von Kontroll- und PXE-Fibroblasten nach 6 und 12 Tagen.

	DMEM	Kalzifizierungsmedium +CaCl ₂
Tag 6		
ALP		
Kontrolle	1,09 ± 0,07	0,82 ± 0,15
PXE	0,47 ± 0,06	0,02 ± 0,002 *** +++
ENPP1		
Kontrolle	1,47 ± 0,20	1,46 ± 0,15
PXE	0,90 ± 0,04	0,67 ± 0,05 **
ANKH		
Kontrolle	1,05 ± 0,08	1,21 ± 0,07
PXE	0,69 ± 0,03 **	1,08 ± 0,05 ** +++
PIT-1		
Kontrolle	1,27 ± 0,15	1,53 ± 0,15
PXE	0,70 ± 0,06 *	1,21 ± 0,11 ++
PIT-2		
Kontrolle	1,18 ± 0,08	0,91 ± 0,06
PXE	1,19 ± 0,08	0,94 ± 0,04
Tag 12		
ALP		
Kontrolle	0,93 ± 0,12	0,78 ± 0,16
PXE	0,28 ± 0,03	0,04 ± 0,009 *** +++
ENPP1		
Kontrolle	0,98 ± 0,09	0,78 ± 0,07
PXE	0,50 ± 0,02 ***	0,36 ± 0,04 ***
ANKH		
Kontrolle	0,99 ± 0,08	0,79 ± 0,05
PXE	0,44 ± 0,03 ***	0,76 ± 0,06 +++
PIT-1		
Kontrolle	1,39 ± 0,12	1,64 ± 0,16
PXE	0,56 ± 0,05 ***	1,34 ± 0,16 ++
PIT-2		
Kontrolle	0,89 ± 0,08	0,42 ± 0,06 ***
PXE	0,40 ± 0,04 ***	0,27 ± 0,03

Die relativen Transkriptraten sind als Mittelwerte mit korrespondierendem Standardfehler dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt und abgebildet als Kontrolle vs. PXE (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$) und als unbehandelte vs. behandelte Zellen (+ $P < 0,05$; ++ $P < 0,005$; +++ $P < 0,0005$). Die gestrichelte Linie repräsentiert die geschlechtsspezifische Normalisierung jeweils auf die unbehandelten Kontrollfibroblasten F42A und M45D.

Extra- (e) und intrazelluläre (i) PP_i -Konzentrationen wurden in den kultivierten dermalen Fibroblasten nach 6, 12 und 21 Tagen bestimmt (Abb. 4.20). In allen Proben konnten generell 5- bis 10-fach höhere e PP_i -Konzentrationen als i PP_i -Level detektiert werden. Zudem lagen die PP_i -Konzentrationen in den Kontrollzellen signifikant höher als in den PXE-Zellen. Nach 6-tägiger Kalzifizierungsbehandlung zeigten die Kontrollfibroblasten eine signifikante Erhöhung der e PP_i -Konzentrationen (1,5-fach) im Vergleich zu den PXE-Zellen (Abb. 4.19 A). An Tag 12 konnte eine Regulierung der i PP_i -Level mit einer Erhöhung der Konzentrationen in den behandelten Kontrollzellen ($P = 0,0005$) beobachtet werden, während die i PP_i -Level in den PXE-Zellen weiter sanken (Abb. 4.20 B). Die i PP_i -

Konzentrationen gingen in den PXE-Fibroblasten während der Mineralisierung bis zum Tag 21 bis zu einem Drittel (5,8 ng/L/ μ g DNA \pm 0,7) zurück (Abb. 4.20 C). Die ePP_i-Konzentrationen im Zellkulturüberstand sanken mit Zunahme der Kultivierungszeit. Dieser Trend war signifikant stärker in den kalzifizierten PXE-Zellen zu beobachten (Kontrolle 59,7 ng/L/ μ g DNA \pm 7,5; PXE 24,2 ng/L/ μ g DNA \pm 2,5). Die eingesetzte Methode erlaubte eine initiale Messung der ATP-Konzentrationen. Hierbei konnten zwischen den Kontroll- und PXE-Fibroblasten keine Unterschiede in den extra- und intrazellulären ATP-Konzentrationen gemessen werden (Abb. 4.21).

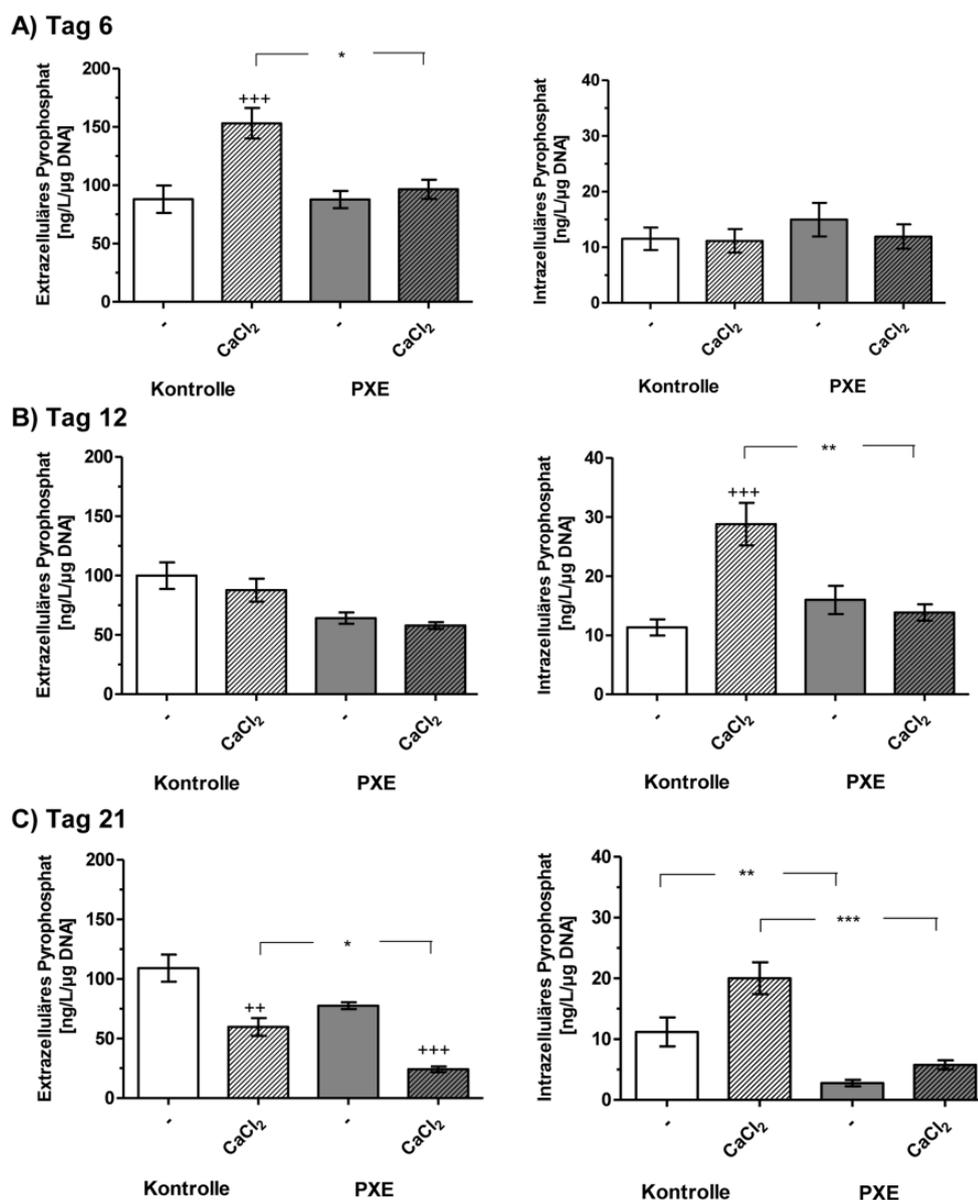
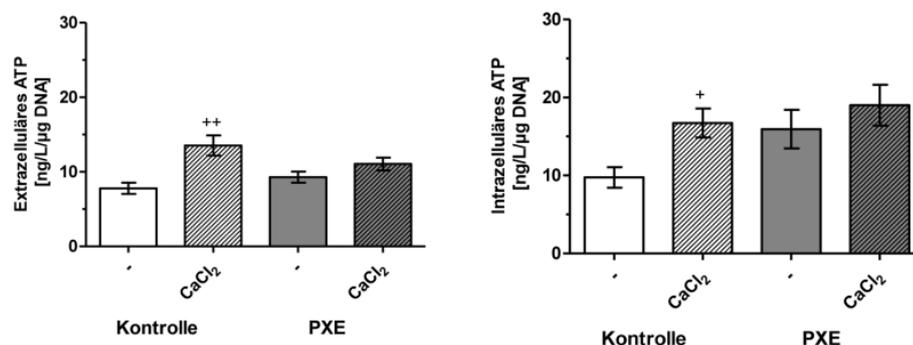
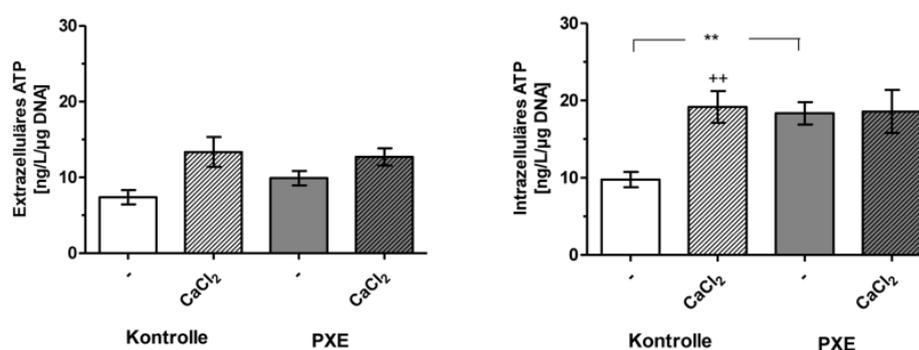


Abb. 4.20: Bestimmung der extra- und intrazellulären PP_i-Konzentrationen in Kontroll- und PXE-Fibroblasten nach 6-, 12-, und 21-tägiger Kultivierung. Die Kontrollfibroblasten (n = 4) sind als weiße Balken und die PXE-Fibroblasten (n = 4) als graue Balken dargestellt. Die Konzentrationen sind als Mittelwerte in ng/L/ μ g DNA mit ihrem korrespondierenden Standardfehler abgebildet. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt und abgebildet als Kontrolle vs. PXE (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$) und als unbehandelte vs. behandelte Zellen (+ $P < 0,05$; ++ $P < 0,005$; +++ $P < 0,0005$).

A) Tag 6



B) Tag 12



C) Tag 21

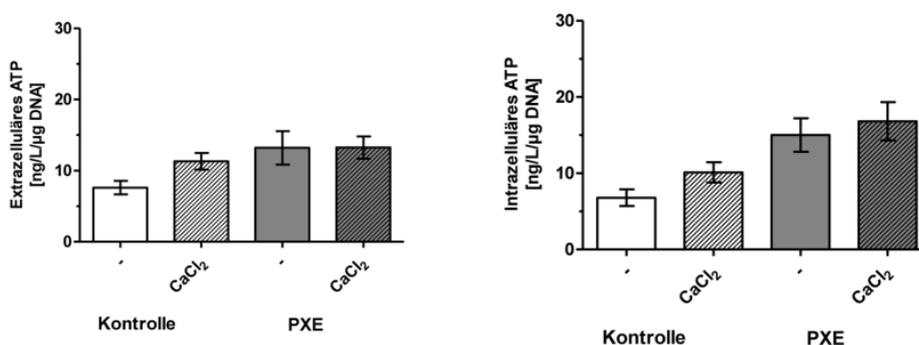


Abb. 4.21: Bestimmung der extra- und intrazellulären ATP-Konzentrationen in Kontroll- und PXE-Fibroblasten nach 6-, 12-, und 21-tägiger Kultivierung. Die Kontrollfibroblasten (n = 4) sind als weiße Balken und die PXE-Fibroblasten (n = 4) als graue Balken dargestellt. Die Konzentrationen sind als Mittelwerte in ng/L/μg DNA mit ihrem korrespondierenden Standardfehler abgebildet. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt und abgebildet als Kontrolle vs. PXE (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$) und als unbehandelte vs. behandelte Zellen (+ $P < 0,05$; ++ $P < 0,005$; +++ $P < 0,0005$).

Die *ABCC6*-Transkriptlevel wurden in den Kontrollzellen nach 6-, 12- und 21-tägiger CaCl_2 -Behandlung ermittelt (Abb. 4.22 A). Die Kalzifizierungsbehandlung induzierte während der Kultivierungszeit eine leichte Erhöhung der *ABCC6*-Genexpression in den Kontrollfibroblasten. Die *ABCC6*-Transkript- und Proteinexpressionen konnten in den PXE-Fibroblasten P128M und P255F aufgrund von *Nonsense*-vermitteltem Abbau durch irreguläre Stoppkodons nicht detektiert werden. Die beiden anderen PXE-Fibroblasten P265F und P308M offenbarten geringe *ABCC6*-Transkriptlevel, welche unabhängig von Behandlung und Kultivierungszeit waren (Daten nicht gezeigt). *ABCC6*-Proteinexpressionen konnten in diesen beiden PXE-Fibroblasten nicht nachgewiesen werden. Die Westernblot-Analyse ergab 80 % höhere Expressionen des *ABCC6*-Proteins in Hepatozyten (HepG2) und

in humanen embryonalen Nierenzellen (Hek293) als in unbehandelten Kontrollfibroblasten (Abb. 4.22 B). Diese geringen ABCC6-Proteinexpressionen machten eine Quantifizierung einer nur geringen Erhöhung der *ABCC6*-Genexpression auf Proteinebene unmöglich. Die Westernblot-Analyse wurde auch mit Zellkulturüberständen als negative Kontrolle durchgeführt um die unspezifische Bindung von Antikörpern, z. B. gegen Serumproteine, auszuschließen.

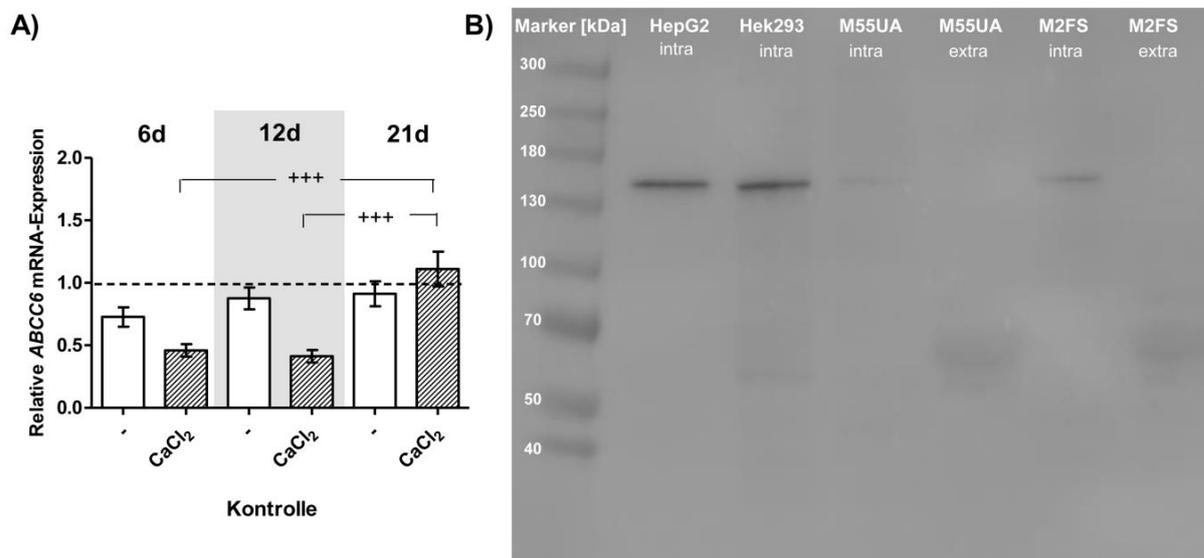


Abb. 4.22: A) *ABCC6*-Genexpressionsprofil in den Kontrollfibroblasten nach 6, 12 und 21 Tagen Kultivierung. Die relativen Transkriptraten sind als Mittelwerte mit korrespondierendem Standardfehler dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt und abgebildet als unbehandelte vs. behandelte Zellen (+ $P < 0,05$; ++ $P < 0,005$; +++ $P < 0,0005$). Die gestrichelte Linie repräsentiert die geschlechtsspezifische Normalisierung jeweils auf die unbehandelten Kontrollfibroblasten F42A und M45D. **B) Bestimmung der *ABCC6*-Proteinexpressionen.** *ABCC6*-Proteinexpressionen wurden in verschiedenen Zelllinien in Zelllysaten und Zellkulturüberständen mittels Westernblot analysiert, Auftragung von links nach rechts: Marker (PepLab Proteinmarker VII, 43-300 kDa), Hepatozyten (HepG2), humane embryonale Nierenzellen (Hek293), M55UA (NHDF) und M2FS (NHDF).

4.5 Einfluss verschiedener Seren auf die Kalzifizierung bei PXE

Bei der Durchführung der oben beschriebenen Experimente konnte beobachtet werden, dass die Initiation der Matrixkalzifizierung nicht alleine vom Kalzifizierungsinduktor, sondern auch von der eingesetzten FCS-Charge abhängig ist. Zur Bestätigung dieser Annahme wurden 16 verschiedener Seren von Rindern mehrerer Hersteller (Biochrom, Berlin; Gibco, Invitrogen, Karlsruhe; PAA Laboratories, Pasching, Österreich; PAN Biotech, Aidenbach) sowie vom Menschen (gepoolte Seren von gesunden Kontrollpersonen und PXE-Patienten) auf kultivierte dermale Fibroblasten ohne Einsatz eines Kalzifizierungsinduktors analysiert (Tab. 4.6). In den Kontrollzellen konnte nach 21-tägiger Kultivierung unter dem Einfluss 16 verschiedener Seren keine Kalzifizierung induziert werden, während in den PXE-Zellen nach 21-tägiger Kultivierung in den FCS-Chargen 4, 10, 11 und 12 eine Matrixkalzifizierung mittels ARS-Färbung detektiert werden konnte. Allerdings führte die ARS-Färbung in den PXE-Fibroblasten, kultiviert in den Seren 10, 11 und 12, nur in zwei der vier eingesetzten Zelllinien zu nachweisbaren Kalziumkristallen. Allein die Kultivierung im FCS der Charge 4 führte zu einer Induktion der Matrixkalzifizierung in allen vier untersuchten PXE-Zelllinien, jedoch nicht in den Kontrollzellen. Auch die ARS-Quantifizierung bestätigte einen signifikant höheren Kalzifizierungsgrad in den im FCS 4 kultivierten PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 4.23).

Tab. 4.6: Nachweis einer Matrixkalzifizierung mittels Alizarin-Rot-Färbung in PXE- und Kontrollzellen nach 21-tägiger Kultivierung und Quantifizierung von Kalzium-, P_i -, ALP-, PP_i -, ATP- und Gesamtproteingehalte in 16 verschiedenen Seren.

Serum	Matrixkalzifizierung nach 21 Tagen		Kalzium [mmol/L]	P_i [mg/L]	ALP [U/L]	PP_i [ng/L]	ATP [ng/L]	Gesamtprotein [g/L]
	Kontrolle	PXE						
1	nein (0/4)	nein (0/4)	3,57	91,1	425	6,20	0,47	37,7
2	nein (0/4)	nein (0/4)	3,57	93,1	427	0,20	0,27	37,5
3	nein (0/4)	nein (0/4)	3,56	88,4	479	10,92	0,35	38,0
4	nein (0/4)	ja (4/4)	3,49	86,0	471	0,06	0,37	37,4
5	nein (0/4)	nein (0/4)	3,22	77,7	368	2,01	0,63	31,8
6	nein (0/4)	nein (0/4)	2,68	77,4	288	3,82	0,60	37,3
7	nein (0/4)	nein (0/4)	3,08	100,9	180	1,65	0,53	37,7
8	nein (0/4)	nein (0/4)	3,72	113,3	214	1,93	0,43	37,2
9	nein (0/4)	nein (0/4)	3,67	113,5	216	1,12	0,50	36,7
10	nein (0/4)	ja (2/4)	3,55	90,8	400	0,51	0,36	39,0
11	nein (0/4)	ja (2/4)	3,51	89,6	403	0,50	0,31	39,0
12	nein (0/4)	ja (2/4)	3,14	76,0	356	0,70	0,29	33,9
13	nein (0/4)	nein (0/4)	2,85	92,4	177	1,76	0,37	34,3
14	nein (0/4)	nein (0/4)	1,53	28,3	n. n.	29,4	0,90	10,5
Pool Kontrolle	nein (0/4)	nein (0/4)	2,53	40,3	115	3,52	0,48	75
Pool PXE	nein (0/4)	nein (0/4)	2,36	37,8	89	2,01	0,62	64

n. d.: nicht nachweisbar

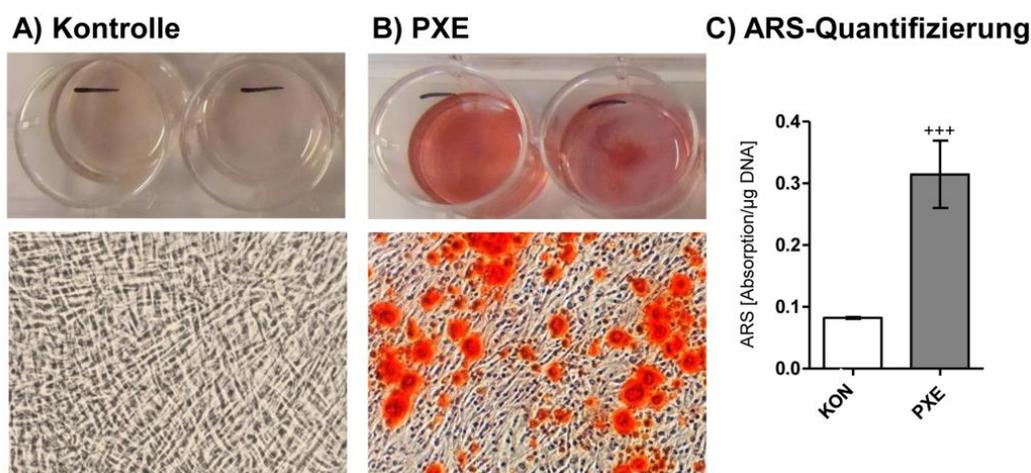


Abb. 4.23: Bestimmung des Kalzifizierungsstatus nach 21-tägiger Kultivierung mit FCS der Charge 4 mittels Alizarin-Rot-S-(ARS)-Färbung und -Quantifizierung. Kontroll- (A) und PXE-Fibroblasten (B) wurden in Standardmedium (DMEM) supplementiert mit FCS 4 für 21 Tage kultiviert. Die Kalzifizierung konnte nach 21 Tagen mittels Mikroskopie durch den Nachweis roter kalziumreicher Kristalle beurteilt werden. Die Mittelwerte der ARS-Quantifizierung (C) sind als Absorption/µg DNA mit korrespondierendem Standardfehler dargestellt. Kontrollzellen ($n = 4$) sind als weiße Balken gezeigt und PXE-Zellen ($n = 4$) als graue Balken. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt und abgebildet als unbehandelte vs. behandelte Zellen (+ $P < 0,05$; ++ $P < 0,005$; +++ $P < 0,0005$).

Die Konzentrationen von Kalzium, P_i , PP_i und ATP sowie der Gesamtproteingehalt und die ALP-Aktivität wurden in allen 16 Seren bestimmt (Tab. 4.6). Kalzium-, P_i - und Gesamtproteingehalt differieren zwischen den kommerziellen FCS-Seren (1-14), aber lagen, mit Ausnahme des FCS 14, in den empfohlenen Referenzbereichen. Serum Nr. 14 ist ein chemisch definiertes Serum für den Einsatz in der Zellkultur, welches nicht den Chargenvarianzen aus tierischem Ursprung unterliegt. Die ALP-Aktivität reicht von unter der Nachweisgrenze in FCS 14 bis hin zu 479 U/L in FCS 3. Die PP_i -Konzentrationen variieren von 0,06 ng/L in FCS 4 bis zu 29,4 ng/L in FCS 14. In der Abb. 4.24 wurden die ermittelten PP_i -Konzentrationen der 14 Seren, unterteilt in die Seren in denen die PXE-Zellen kalzifizierten und in denen sie nicht kalzifizierten, dargestellt. Die FCS-Chargen, in denen Kalziumkristalle detektiert werden konnten, wiesen signifikant niedrigere PP_i -Konzentrationen auf ($0,44 \pm 0,14$ ng/L vs. $5,94 \pm 2,8$ ng/L, Abb. 4.23). Die Konzentrationen von Kalzium, P_i , ATP und Gesamtprotein sowie der ALP-Aktivität in den gepoolten Seren der gesunden Kontrollen und PXE-Patienten lagen in den publizierten Referenzbereichen.

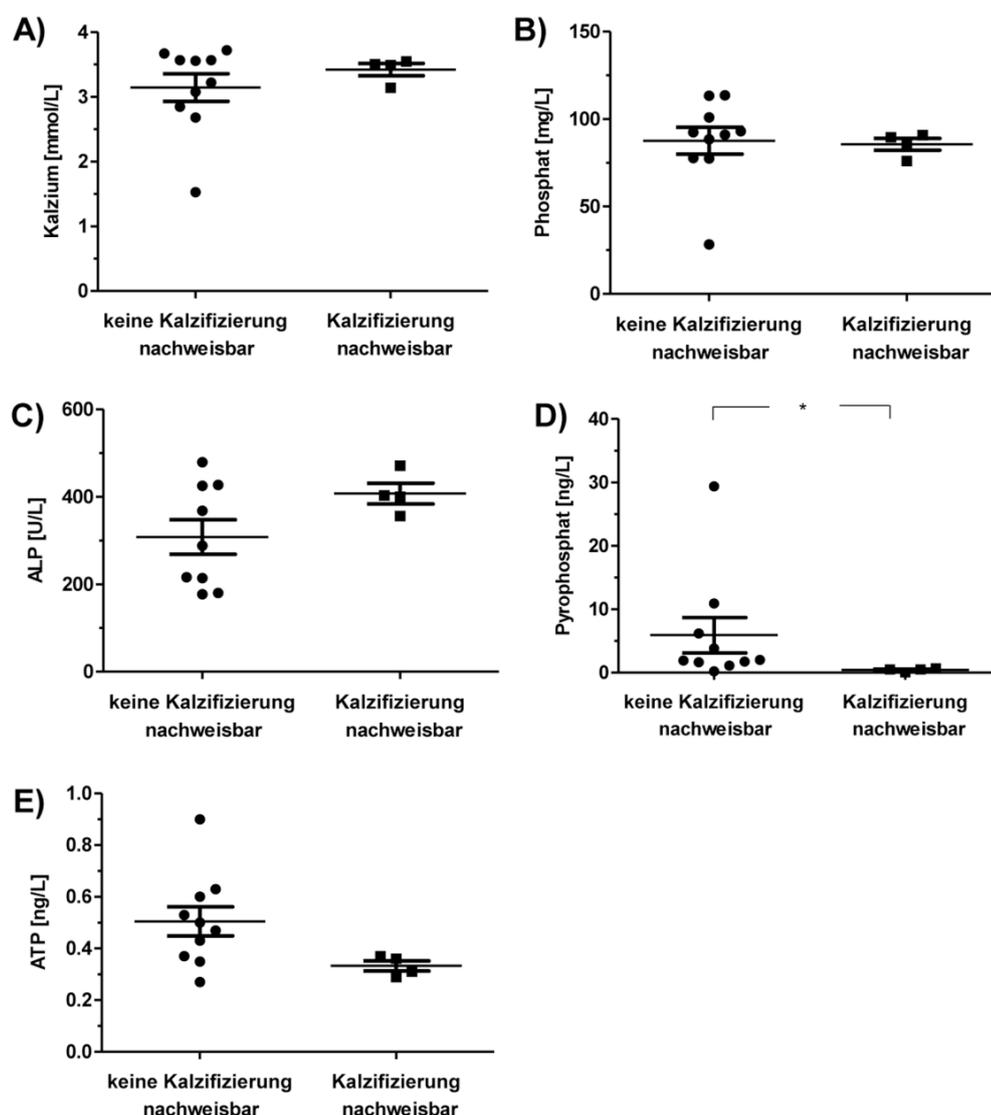


Abb. 4.24: Bestimmung der Kalzium- (A), P_i^- (B), ALP- (C), PP_i^- (D) und ATP-Konzentrationen (E) nach 21-tägiger Inkubation, die zu keiner bzw. deutlich nachweisbarer Matrixkalzifikation in PXE-Fibroblasten führten. Die Konzentrationen sind als Mittelwerte mit korrespondierendem Standardfehler dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-Test ermittelt (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$).

Zur Überprüfung der Ergebnisse aus den vorherigen Versuchsreihen in denen anorganisches Phosphat oder Kalzium zur Induktion der Matrixkalzifizierung eingesetzt wurde, wurden die Versuche nur mit dem FCS der Charge 4 als Zusatz wiederholt. Durch dieses Versuchsdesign sollten die molekularen Mechanismen aufgeklärt werden, die es Kontrollfibroblasten im Gegensatz zu PXE-Fibroblasten ermöglichen, die Matrixkalzifizierung zu inhibieren, da unter diesen Versuchsbedingungen nur die PXE-Fibroblasten histochemisch nachweisbar kalzifizieren (Abb. 4.23). Außerdem sollten die irregulären Zusätze vermieden werden, die das Kalzium-Phosphat-Produkt verändern, welches normalerweise in PXE nicht verändert ist.

Nach 21-tägiger Kultivierung der Kontroll- und PXE-Fibroblasten in DMEM supplementiert mit FCS der Charge 4, wurden die *ALP*-, *OPN*- und *ENPP1*-Genexpression bestimmt (Abb. 4.25). Die *ALP*-mRNA-Expression in den PXE-Zellen wies im Gegensatz zu den Kontrollzellen signifikante bis zu 2-fach erhöhte Werte auf (Abb. 4.25 A). Eine signifikante 3-fache Erhöhung der *OPN*-Expression konnte in den PXE-Fibroblasten detektiert werden (Abb. 4.25 B). Die *ENPP1*-Transkriptlevel in den PXE-Zellen zeigten eine hoch signifikante Reduzierung bis zu 50 % ($P = 0,0005$; Abb. 4.25 C). In den kalzifizierten PXE-Fibroblasten lag die *TGFB1*-Expression um 50 % reduziert vor, während die Genexpression in den Kontrollzellen moderat mit zunehmender Kultivierungszeit anstieg (Abb. 4.25 C).

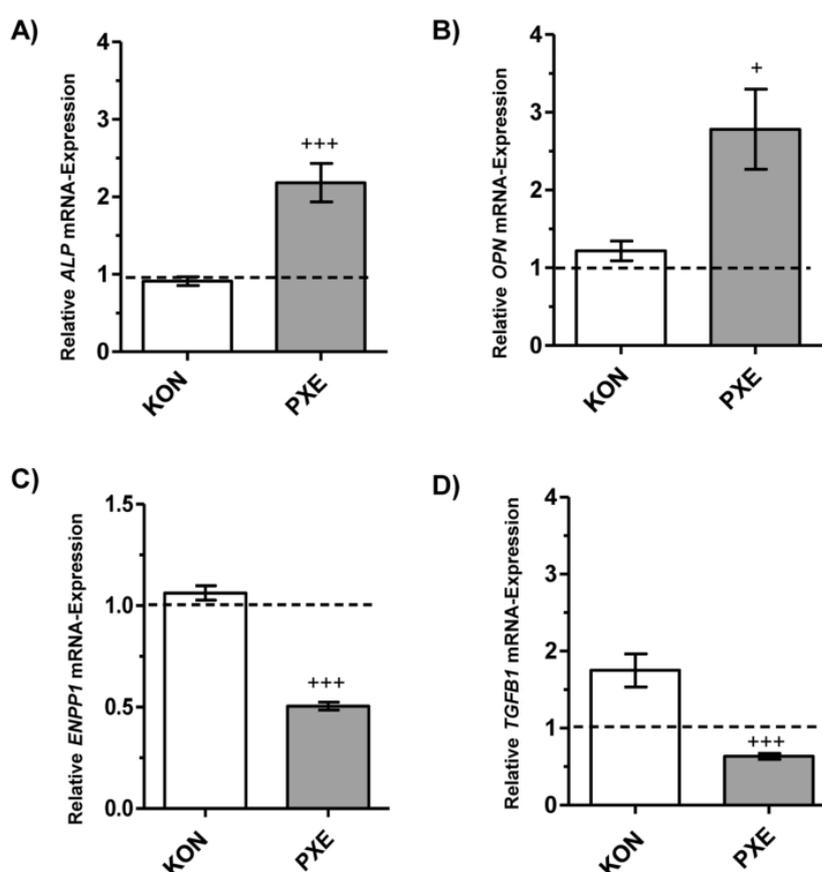


Abb. 4.25: Relative *ALP*- (A), *OPN*- (B), *ENPP1*- (C) und *TGFB1*- (D) mRNA-Expression in Kontroll- und PXE-Fibroblasten nach 21 Tagen. Kontroll- und PXE-Fibroblasten wurden in DMEM supplementiert mit 10 % FCS der Charge 4 kultiviert. Gezeigt sind die normalisierten Genexpressionen der Kontrollfibroblasten ($n = 4$) als weiße Balken und die der PXE-Fibroblasten ($n = 4$) als graue Balken. Die relativen Transkriptraten sind als Mittelwerte mit korrespondierendem Standardfehler dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt und abgebildet als Kontrolle vs. PXE (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$) und als unbehandelte vs. behandelte Zellen (+ $P < 0,05$; ++ $P < 0,005$; +++ $P < 0,0005$). Die gestrichelte Linie repräsentiert die geschlechtsspezifische Normalisierung jeweils auf die unbehandelten Kontrollfibroblasten F42A und M45D.

Die reduzierte *ENPP1*-mRNA-Expression wurde begleitet von einer signifikant reduzierten ENPP1-Aktivität in den kalzifizierten PXE-Fibroblasten verglichen mit den Kontrollzellen (Abb. 4.26 A). Außerdem wurden die intrazellulären (i) und extrazellulären (e) PP_i -Konzentrationen bestimmt (Abb. 4.26 B+C). Die ePP_i -Konzentrationen im Zellkulturüberstand der Kontrollzellen waren im Vergleich zu denen der PXE-Zellen signifikant erhöht (Abb. 4.26 B). Die Messung der iPP_i -Level ergab signifikant reduzierte Konzentrationen in den PXE-Fibroblasten verglichen mit den Kontrollen (Abb. 4.26 C).

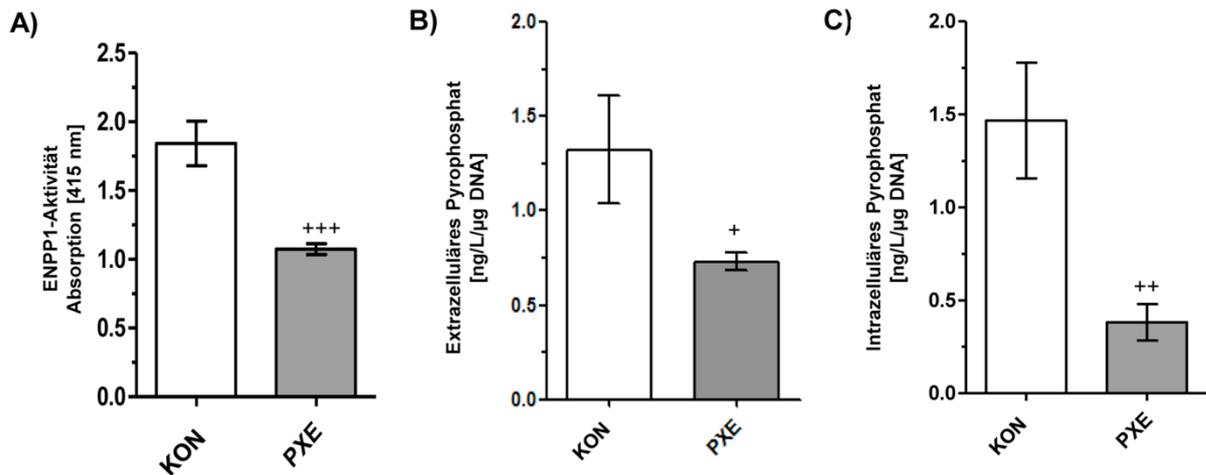


Abb. 4.26: Bestimmung der ENPP1-Aktivität (A) und der extrazellulären (B) und intrazellulären PP_i -Konzentrationen (C) von Kontroll- und PXE-Fibroblasten nach 21 Tagen. Kontroll- und PXE-Fibroblasten wurden in DMEM supplementiert mit 10 % FCS der Charge 4 kultiviert. Gezeigt sind die Konzentrationen in den Kontrollfibroblasten (n = 4) als weiße Balken und die der PXE-Fibroblasten (n = 4) als graue Balken. Die Daten sind als Mittelwerte mit korrespondierendem Standardfehler dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt und abgebildet als Kontrolle vs. PXE (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$) und als unbehandelte vs. behandelte Zellen (+ $P < 0,05$; ++ $P < 0,005$; +++ $P < 0,0005$).

4.6 Einfluss der Pyrophosphate auf die Matrixkalzifizierung bei PXE

Die beobachteten reduzierten PP_i -Konzentrationen in den kalzifizierten PXE-Zellen warfen die Frage auf, ob eine Supplementierung von PP_i im Medium zu einer reduzierten oder inhibierten Matrixkalzifizierung in PXE-Fibroblasten führen könnte. Daher wurden die Kontroll- und PXE-Fibroblasten über 21 Tage in DMEM mit FCS der Charge 4 und dem Zusatz von Zoledronsäure (ZOL, Endkonzentration 1 $\mu\text{g/L}$), Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP, Endkonzentration 400 ng/mL) und Farnesylpyrophosphat (FPP, Endkonzentration 400 ng/mL) kultiviert, um die e PP_i -Konzentrationen zu erhöhen (Hooff *et al.* 2008; Açil *et al.* 2011). Die Matrixkalzifizierung konnte histochemisch nach 21-tägiger Kultivierung in den PXE-Fibroblasten nach PP_i -Supplementierung noch beobachtet werden (Abb. 4.27). Allerdings zeigte die ARS-Quantifizierung einen signifikant höheren Kalzifizierungsgrad in den PXE-Fibroblasten, welche nicht mit zugesetzten PP_i kultiviert wurden. Darüber hinaus führte die Supplementierung von ZOL, GGPP und FPP zu signifikant reduzierter Matrixkalzifizierung (Abb. 4.27 C).

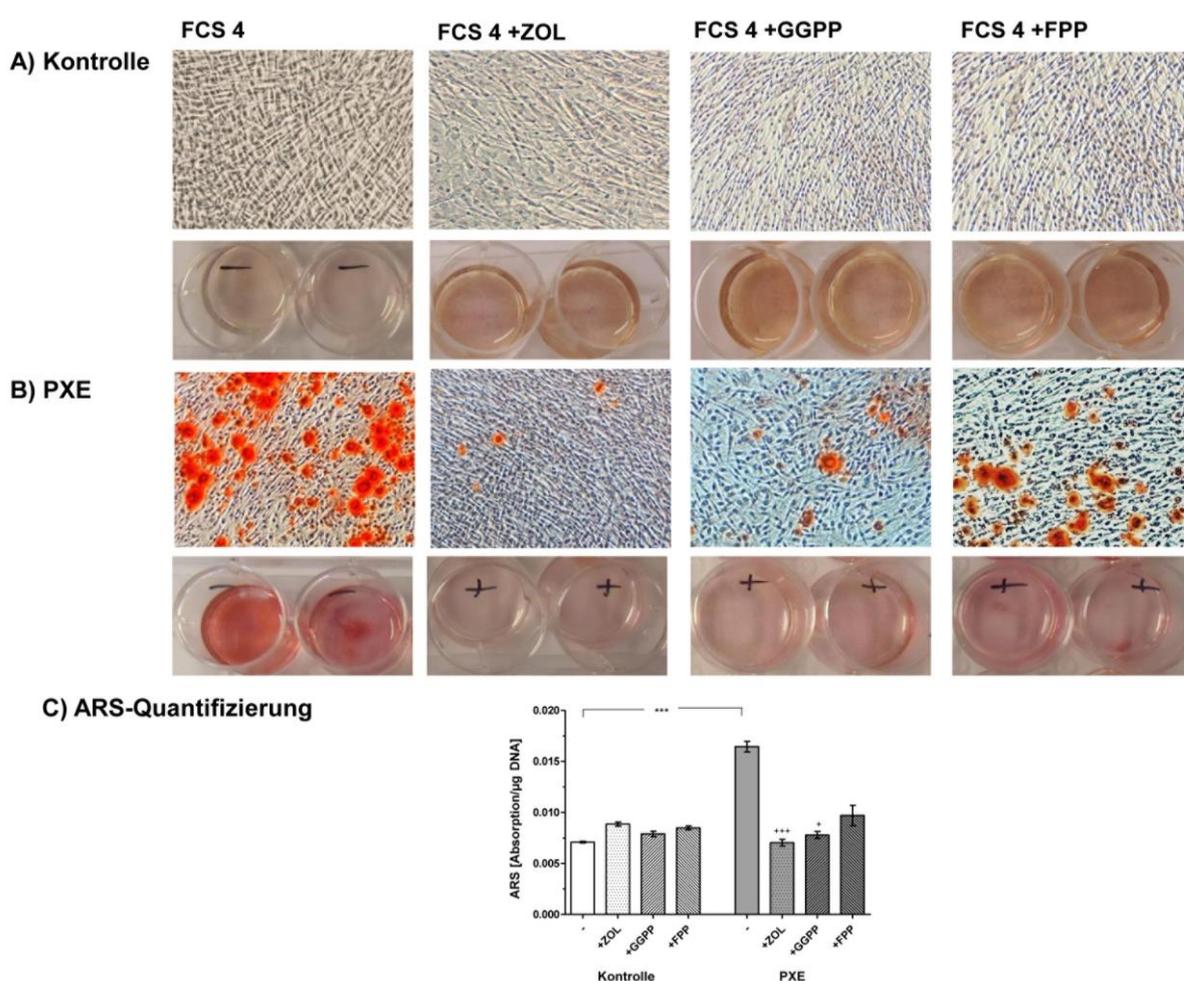


Abb. 4.27: Bestimmung des Kalzifizierungsgrades mittels Alizarin-Rot-S-(ARS)-Färbung und -Quantifizierung nach 21-tägiger Behandlung mit ZOL, GGPP und FPP. Kontroll- (A) und PXE-Fibroblasten (B) wurden in Standardmedium (DMEM) mit 10 % FCS der Charge 4 und Zusatz von ZOL, GGPP und FPP für 21 Tage kultiviert. Kalzifizierung konnte nach 21 Tagen mittels Mikroskopie durch rote kalziumreiche Kristalle beurteilt werden. Die Mittelwerte der ARS-Quantifizierung (C) sind als Absorption/ μg DNA mit korrespondierendem Standardfehler dargestellt. Kontrollzellen ($n = 4$) sind als weiße Balken gezeigt und PXE-Zellen ($n = 4$) als graue Balken. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt und abgebildet als Kontrolle vs. PXE (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$) und als unbehandelte vs. behandelte Zellen (+ $P < 0,05$; ++ $P < 0,005$; +++ $P < 0,0005$).

Die Supplementierung der PP_i -Analoge führte nicht zu einer Veränderung der *ALP*-Transkriptlevel in den Kontrollzellen, während die *ALP*-mRNA-Level in den behandelten PXE-Fibroblasten verglichen mit den unbehandelten PXE-Zellen signifikant reduzierte Level aufwiesen (Abb. 4.28 A). Des Weiteren wurden reduzierte *OPN*-mRNA-Expressionen in allen behandelten Fibroblasten (Kontrollen und PXE) detektiert (Abb. 4.28 B). Eine starke Erhöhung der *ENPP1*-Genexpression konnte in allen behandelten PXE-Zellen beobachtet werden (Abb. 4.28 C). Die *TGFB1*-Genexpression wurde durch die Zugabe von ZOL und FPP in den Kontrollzellen leicht induziert, während die Zugabe in den PXE-Fibroblasten in einer signifikanten Erhöhung resultierte (Abb. 4.28 D).

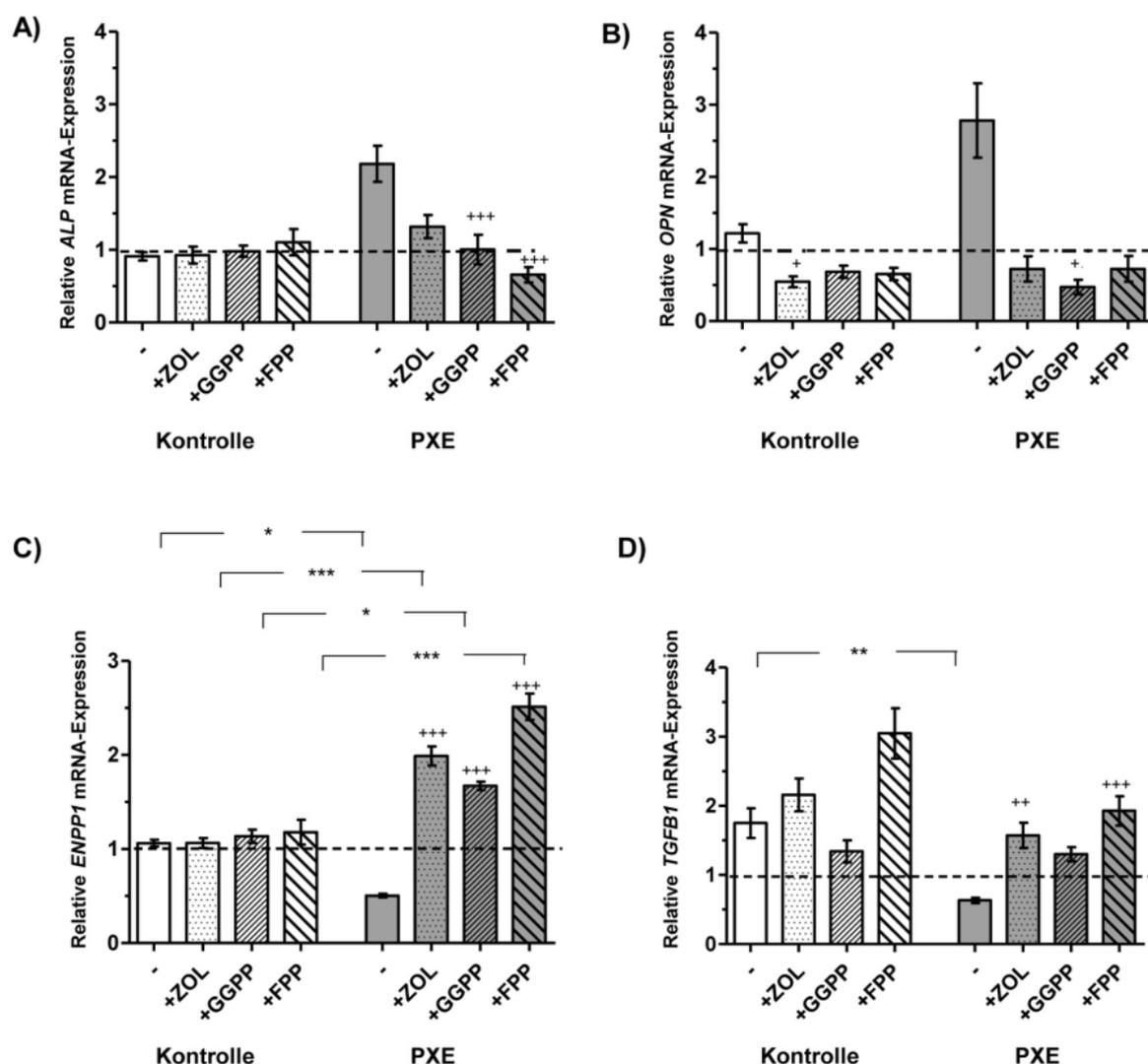


Abb. 4.28: Relative *ALP*- (A), *OPN*- (B), *ENPP1*- (C) und *TGFB1*- (D) mRNA-Expression in Kontroll- und PXE-Fibroblasten nach 21 Tagen. Kontroll- und PXE-Fibroblasten wurden in Standardmedium (DMEM) mit 10 % FCS der Charge 4 und Zusatz von ZOL, GGPP und FPP für 21 Tage kultiviert. Gezeigt sind die normalisierten Genexpressionen der Kontrollfibroblasten (n = 4) als weiße Balken und die der PXE-Fibroblasten (n = 4) als graue Balken. Die relativen Transkripraten sind als Mittelwerte mit korrespondierendem Standardfehler dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt und abgebildet als Kontrolle vs. PXE (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$) und als unbehandelte vs. behandelte Zellen (+ $P < 0,05$; ++ $P < 0,005$; +++ $P < 0,0005$). Die gestrichelte Linie repräsentiert die geschlechtsspezifische Normalisierung jeweils auf die unbehandelten Kontrollfibroblasten F42A und M45D.

Die PP_i -Behandlung induzierte eine Erhöhung der ENPP1-Aktivität in Kontroll- und PXE-Fibroblasten (Abb. 4.29 A). Allerdings war die ENPP1-Aktivität in den kalzifizierten PXE-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen weiterhin reduziert. Die ePP_i -Konzentrationen im Zellkulturüberstand wiesen durch die PP_i -Supplementierung 10-fach erhöhte Werte in den behandelten Fibroblasten verglichen mit den unbehandelten Zellen auf (Abb. 4.29 B). Die iPP_i -Level waren in den Kontrollzellen ebenso erhöht, während die Konzentrationen in den behandelten PXE-Fibroblasten unverändert blieben (Abb. 4.29 C).

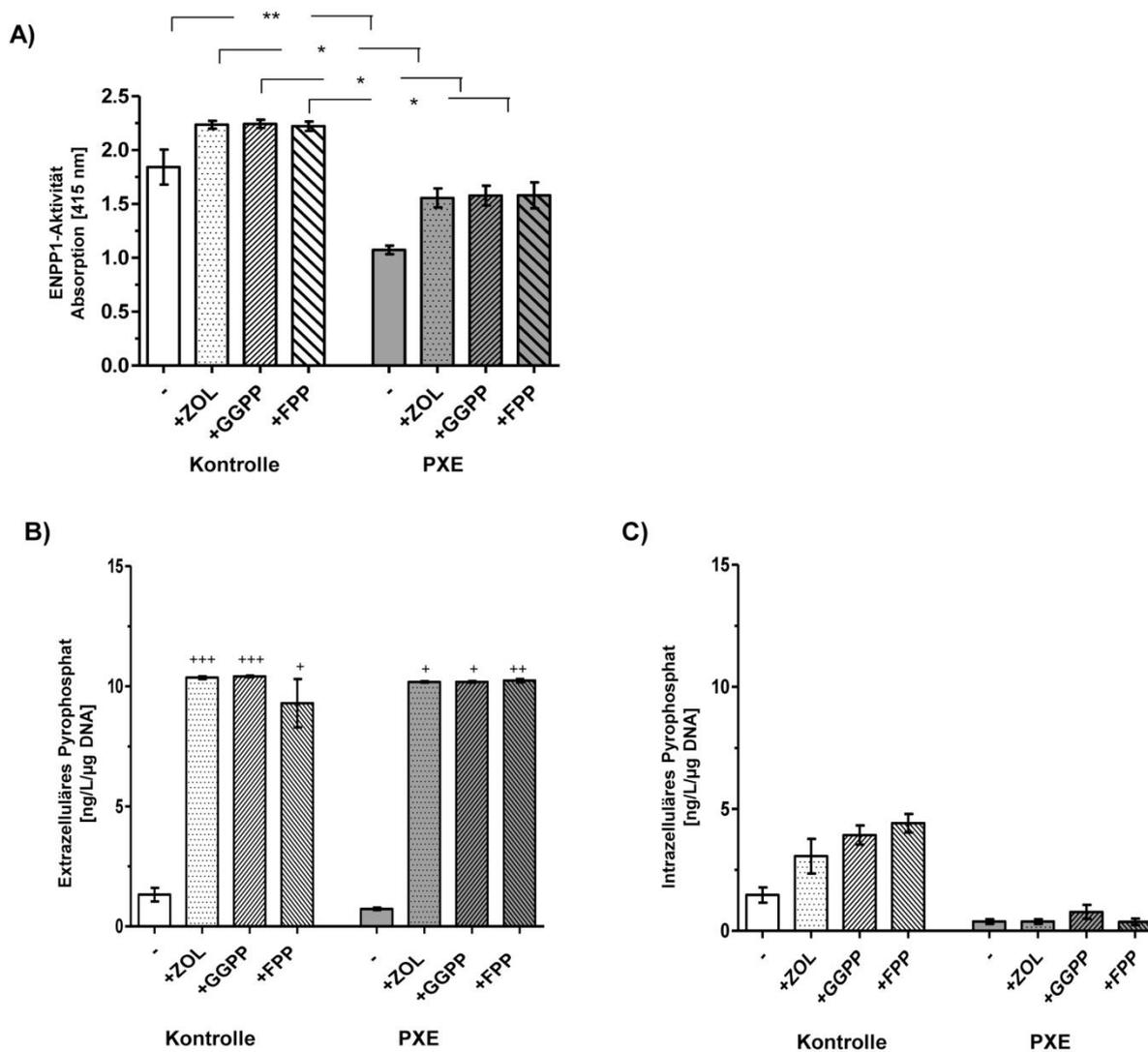


Abb. 4.29: Bestimmung der ENPP1-Aktivität (A) und der extrazellulären (B) und intrazellulären PP_i -Konzentrationen (C) von Kontroll- und PXE-Fibroblasten nach 21 Tagen. Kontroll- und PXE-Fibroblasten wurden in Standardmedium (DMEM) mit 10 % FCS der Charge 4 und Zusatz von ZOL, GGPP und FPP für 21 Tage kultiviert. Gezeigt sind die Konzentrationen der Kontrollfibroblasten (n = 4) als weiße Balken und die der PXE-Fibroblasten (n = 4) als graue Balken. Die Konzentrationen sind als Mittelwerte mit korrespondierendem Standardfehler dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt und abgebildet als Kontrolle vs. PXE (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$) und als unbehandelte vs. behandelte Zellen (+ $P < 0,05$; ++ $P < 0,005$; +++ $P < 0,0005$).

5 DISKUSSION

5.1 Identifizierung von PP_i -metabolisierenden genetischen Kofaktoren für PXE

Eine große Variabilität des Phänotyps, der Ausprägung und des klinischen Verlaufs bei Patienten mit den gleichen oder funktionell ähnlichen *ABCC6*-Mutationen sind charakteristisch für die Erkrankung PXE. Es wird diskutiert, ob einige Gene (z. B. *OPN*, *VEGF*) zur PXE-Manifestation und dem Schweregrad der Erkrankung beitragen könnten. Aufgrund der progressiven Kalzifizierung der elastischen Fasern als Hauptcharakteristikum von PXE und der Tatsache, dass der Kalzifizierungsprozess aktiv reguliert wird, wurden in dieser Arbeit weitere Gene als sogenannte *Modifier*-Gene untersucht, die in der Regulation der biologischen Kalzifizierung involviert sind. Es konnte eine signifikante Assoziation der SNV c.1190-65C>A (Intron) im *ALP*-Gen, der SNV c.313+9G>T (Intron) im *ENPP1*-Gen und der SNV c.294C>T (p.A98A) im *ANKH*-Gen, sowie darüber hinaus die Assoziation des Haplotypen AT, der aus den Varianten c.963A>G (*ANKH*) und c.313+9G>T (*ENPP1*) bestand, mit PXE detektiert werden.

ALP ist ein wichtiger Promoter der Kalzifizierung, da es die Hydrolyse von PP_i katalysiert, dadurch die Konzentrationen dieses Kalzifizierungsinhibitors reduziert und begleitend die P_i -Konzentrationen erhöht. Der SNV c.1190-65C>A ist im Intron 10 des *ALP*-Genes lokalisiert. Der funktionale Effekt der C-zu-A-Transition an dieser Position ist unbekannt. Allerdings konnte ein Haplotyp zwischen den Varianten c.876A>G (p.P292P) und c.1190-65C>A (Intron) in den PXE-Patienten beobachtet werden. Auch die funktionelle Relevanz der Variante c.876A>G (p.P292P) ist bis heute ungeklärt. Aber es kann vermutet werden, dass diese Varianten alleine oder in Kombination die *ALP*-Aktivität verändern könnten. Hohe *ALP*-Aktivitäten, welche die Dephosphorylierung von PP_i und phosphorylierten Proteinen, wie dem *OPN* katalysieren, wurden kürzlich für PXE-Fibroblasten in dieser und einer anderen Arbeit beschrieben (Boraldi *et al.* 2012). Eine familienbasierte Assoziationsstudie in einer kanadischen Population dokumentierte einen *ALP*-Haplotypenmarker bestehend aus den Varianten c.62-1924C/c.787C/c.1190-65A, welcher bei Männern in mehreren betroffenen Familien signifikant mit ankylosierender Spondylitis (AS, auch Morbus Bechterew genannt) assoziiert war (Tsui *et al.* 2007). AS ist eine chronisch-rheumatische Erkrankung, die mit Entzündungen im Bereich der Wirbelsäule und der Kreuzdarmbeinfugen einhergeht und durch Mutationen im *ALP*-Gen hervorgerufen wird.

Studien konnten zeigen, dass eine Defizienz von *ENPP1* oder *ANKH* zur pathologischen Einlagerung von Hydroxylapatitkristallen führt (Okawa *et al.* 1998; Nitschke *et al.* 2011). Die

Defizienz von *ENPP1* ist mit vaskulärer Kalzifizierung bei GACI assoziiert und führt zur Reduktion von extrazellulärem PP_i , während verringertes *ANKH* die enchondrale vaskuläre Kalzifizierung potenziert (Rutsch *et al.* 2003; Harmey *et al.* 2004; Johnson *et al.* 2005). In dieser Arbeit konnten zwei SNV c.313+9G>T und c.2101-14delT im *ENPP1*-Gen detektiert werden, welche signifikant häufiger in der PXE-Patienten-Gruppe auftraten als in der Kontrollkohorte. Die Varianten c.2101-14delT und c.313+9G>T sind in der Intron/Exon-Grenze lokalisiert, daher kann eine Beeinträchtigung der Spleißung der mRNA vermutet werden. Das c.313+9T Allel wurde nur in den PXE-Patienten und nicht in den alters- und geschlechtsübereinstimmenden gesunden Kontrollen gefunden ($P = 0,0008$; OR 27,96). Eine andere Studie beschreibt, dass sowohl PXE als auch GACI entweder durch Mutationen in den Genen *ABCC6* oder *ENPP1* ausgelöst werden können (Nitschke *et al.* 2012). Eine Assoziation zwischen dem *ABCC6*-Genotyp und der *ENPP1*-Variante c.313+9C>T konnte in dieser Arbeit allerdings nicht gefunden werden. Deshalb kann vermutet werden, dass die *ENPP1*-Variante c.313+9C>T keine krankheitsverursachende Mutation, sondern eher ein genetischer Kofaktor für PXE ist. Homozygote sowie heterozygote Träger der *ENPP1*-Variante trugen *ABCC6*-Mutationen in einem *compound*-heterozygoten, heterozygoten oder homozygoten Status. Jedoch konnte keine Korrelation mit der Ausprägung von PXE (z. B. Organbeteiligung, Diagnosealter) identifiziert werden. Ausführliche Untersuchungen des klinischen Phänotyps und *Follow-up* Studien dieser PXE-Patienten wären von großem Interesse, um mögliche Unterschiede in der Ausprägung der Erkrankung zwischen den Patienten, die die *ENPP1*-Variante c.313+9C>T tragen, zu finden. Die in dieser Arbeit beobachtete hoch signifikante Assoziation suggeriert die Nukleotidveränderung c.313+9G>T als starken Risikofaktor und wichtigen genetischen Kofaktor für PXE.

Der Genotyp TT des *ANKH* SNV c.294C>T (p.A98A) wurde in dieser Arbeit als signifikant mit der PXE-Patientengruppe assoziiert detektiert, allerdings konnte beim Vergleich der Allelfrequenzen keine Assoziation beobachtet werden. Der Austausch vom C zum T an der dritten Aminosäureposition führt nicht zu einer Veränderung der Aminosäure, weshalb eine funktionelle Relevanz bislang unklar ist. In anderen Studien konnten Assoziationen von SNV im *ANKH*-Gen mit Chondrokalzinose und einer *ANKH*-Expressionssteigerung gefunden werden, welche in einer Reduzierung der intrazellulären und einer Erhöhung der extrazellulären PP_i -Konzentrationen zur Prävention der Matrixkalzifizierung resultieren (Ho *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2005).

Zwei Sequenzvarianten c.876A>G (*ALP*) und c.294C>T (*ANKH*) wichen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab. Alle anderen Genotypenverteilungen lagen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Bevölkerungsgruppen mit einem geringen genetischen Drift, Selektion oder Krankheitsassoziationen können Diskrepanzen zum Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zu Grunde liegen. Wenn die Populationsprävalenz des Merkmales gering ist und das Vorhan-

densein einer Assoziation z. B. mit einer seltenen Erkrankung vorliegt, kann die Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht erwartet werden. Außerdem muss die Population in diesen Fällen nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht liegen (Salanti *et al.* 2005; Lunetta 2008). Der Genotyp TT des SNV c.294C>T im *ANKH*-Gen war mit PXE assoziiert und das G-Allel der Variante c.876A>G im *ALP*-Gen wies eine annähernde Assoziation mit PXE auf.

Die Haplotypenanalyse aller 12 SNV mit der *Software Haploview* identifizierte einen Block (Block 3), der aus den Varianten c.963A>G (*ANKH*) und c.313+9G>T (*ENPP1*) bestand, welche den Haplotypen AT als signifikant mit PXE assoziiert zeigten. Diese Allelkombination könnte somit eine additive Funktion für das Auftreten von PXE-Symptomen besitzen.

Die MDR-Analyse wurde zur Identifizierung von Gen-Gen-Interaktionen entwickelt, welche Suszeptibilitäten zu häufig auftretenden Erkrankungen, einschließlich Bluthochdruck (Moore und Williams 2002), Blasenkrebs (Andrew *et al.* 2007), Diabetes Typ 2 (Cho *et al.* 2004) und rheumatischer Arthritis (Dervieux *et al.* 2009; Becker *et al.* 2011) aufdecken können. Der größte Vorteil der MDR-Analyse ist die Möglichkeit der simultanen Detektion und Charakterisierung des Einflusses von kombinierten Effekten (Gen- und Umwelteinflüsse) zu multiplen Krankheitsfaktoren (Wu *et al.* 2011). In dieser Arbeit konnten starke Interaktionen zwischen den SNV c.294C>A (*ANKH*), c.2101delT (*ENPP1*), c.1190-65C>A (*ALP*) und der kardiovaskulären Beteiligung beobachtet werden. Die drei identifizierten Varianten waren zu dem signifikant mit PXE assoziiert. Eine Beteiligung von SNV in den Genen *ALP*, *ANKH* und *ENPP1* in kardiovaskulären Erkrankungen ist bereits bekannt (Rutsch *et al.* 2003; Harmeij *et al.* 2004; Johnson *et al.* 2005).

Diese Studie weist einige Limitationen auf. PXE ist eine seltene Erkrankung, aufgrund dessen die Kohortengröße relativ klein und damit die statistische Aussagekraft limitiert ist. Die Berechnung der statistischen Signifikanz der Kohortengröße ergab, dass diese ausreichend und zuverlässig zur Detektion von Assoziationen der untersuchten SNV und der Suszeptibilität von PXE war. Zur Reduzierung von falsch-positiven Ergebnissen aufgrund von multiplen Tests wurden die strikten Kriterien der Bonferroni-Korrektur angewendet. Diese konservative Korrektur setzt die Unabhängigkeit zwischen den einzelnen Markern voraus und tendiert zu unterschätzten Assoziationen, so dass die Assoziationen der einzelnen SNV-Marker und Haplotypen, die in dieser Arbeit gefunden wurden, unwahrscheinlich alleine durch den Zufall entstanden sind. Dennoch ist eine weitere Studie in einer anderen Kohorte notwendig um die Ergebnisse dieser Arbeit zu bestätigen.

Schlussendlich wurden in dieser Studie weitere regulatorische Varianten in PP_i -metabolisierenden Genen (*ALP*, *ANKH*, *ENPP1*) identifiziert, die wahrscheinlich zur Suszeptibilität von PXE beitragen.

5.2 Einfluss verschiedener Kalzifizierungsinduktoren auf die ektopische Kalzifizierung bei PXE

Pathologische Kalzifizierung ist ein bedeutendes Merkmal verbreiteter Erkrankungen wie z. B. der Arteriosklerose. Eine Deregulierung des zellulären Kalzium- und Phosphatmetabolismus kann zu ektopischer Kalzifizierung führen. PXE kann als Modellerkrankung für Kalzifizierungserkrankungen in Weichteilgeweben angesehen werden, da die seltene Erkrankung durch progressive Kalzifizierung und Fragmentierung von elastischen Fasern charakterisiert ist. Darüber hinaus konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass PXE begleitet wird von einem Ungleichgewicht von positiven und negativen regulatorischen Faktoren. Die meisten PXE-Patienten leiden mit Beginn des 30. Lebensjahres an progressiver Makulardegeneration und *Claudicatio intermittens* als Ergebnis der Arterienkalzifizierung (Lefthériotis *et al.* 2011). Ein kürzlich erschienenes *Review* von Fowkes *et al.* schätzt *Claudicatio intermittens*, nach Herzkrankheiten und Rauchen, als dritte führende Ursache von arteriosklerotischer kardiovaskulärer Morbidität ein (Fowkes *et al.* 2013). Folglich stellt PXE ein Modell für das bessere Verständnis des der Weichteilkalzifizierung unterliegenden Pathomechanismus in peripheren Arterienerkrankungen dar.

Bis heute wird in vielen Kalzifizierungsstudien Phosphat als Hauptinduktor zur Kalzifizierungsinduktion eingesetzt. Der zelluläre Kalziumhaushalt ist streng reguliert, welches ein Grund sein könnte, warum Kalzium als Risikofaktor für die Kalzifizierung nicht beachtet wurde (Shanahan *et al.* 2011). Zur Untersuchung möglicher Unterschiede zwischen der kalzium- und phosphatinduzierten Kalzifizierung wurde in dieser Arbeit die Kalzifizierung von dermalen Fibroblasten von gesunden Kontrollpersonen und PXE-Patienten nach Induktion mit βGlyPO_4 , Na_2HPO_4 und CaCl_2 *in vitro* analysiert.

Unabhängig von der Fähigkeit der Kalzifizierungsinduktion *in vivo* sind Zellen unter normalen Zellkulturbedingungen aufgrund der Gegenwart von FCS-Bestandteilen wie Fetuin-A oder MGP, die als Kalzifizierungsinhibitoren agieren, *in vitro* nicht in der Lage zu kalzifizieren. Deshalb wurden die Fibroblasten in dieser Arbeit in einem speziellen Kalzifizierungsmedium mit dem Zusatz von βGlyPO_4 , Na_2HPO_4 oder CaCl_2 kultiviert. Mittels βGlyPO_4 als Kalzifizierungsinduktor konnte, im Gegensatz zu anderen Studien, in dieser Arbeit keine histochemisch detektierbare Kalzifizierung erzielt werden (Zhu *et al.* 2011; Kircelli *et al.* 2012; Ronchetti *et al.* 2013). Der Kalzifizierungsprozess wird von vielen Proteinen und Metaboliten aktiv reguliert, weshalb viele Faktoren, wie die Konzentration des βGlyPO_4 und anderer Medienbestandteile (z. B. das FCS), die Kultivierungsdauer oder die Detektionsmethode ursächlich hierfür sein können. Der Zusatz von Na_2HPO_4 oder CaCl_2 hingegen führte *in vitro* nach 21-tägiger Kultivierung in den Kontroll- und PXE-Fibroblasten zu ausgeprägten histochemischen Kalzifizierung der Matrix. Frühere Studien zeigten bereits, dass *ABCC6*-

defiziente Fibroblasten *in vitro* kalzifizieren können, aber Unterschiede zwischen den PXE- und Kontrollzellen wurden bisher noch nicht beobachtet (Jiang *et al.* 2010; Boraldi *et al.* 2012). In dieser Arbeit konnten in den PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant mehr Hydroxylapatitkristalle und damit ein höherer Kalzifizierungsgrad festgestellt werden. In den kalzifizierten Kontrollzellen wurden hohe intrazelluläre Kalziumkonzentrationen gemessen, während die extrazellulären Konzentrationen reduziert vorlagen. Diese Beobachtungen korrelieren mit einer früheren Studie, die diese Beobachtungen in kalzifizierten VSMCs machte (Wada *et al.* 1999). Zwei Studien der letzten Jahre beschreiben die Freisetzung von intrazellulärem Kalzium aus den Lysosomen als Kalzifizierungspromotor (Ewence *et al.* 2008; Sage *et al.* 2010). Im Gegensatz dazu konnten in der vorliegenden Arbeit verschiedene Relationen der extra- und intrazellulären Kalziumkonzentrationen zwischen den Kontroll- und PXE-Fibroblasten detektiert werden. Beim Start des Experimentes wurden in den PXE-Zellen hohe intrazelluläre und geringe extrazelluläre Kalziumkonzentrationen verzeichnet. Mit zunehmender Kultivierungszeit sank der intrazelluläre Kalziumgehalt, während die extrazellulären Konzentrationen in den PXE-Fibroblasten anstiegen. Diese Veränderungen in der Kalziumhomöostase konnten nur in der phosphatinduzierten Kalzifizierung beobachtet werden. Die Behandlung mit hohen Kalziumkonzentrationen führte, wie schon von anderen beschrieben, zu einer intra- und extrazellulären Kalziumsättigung (Shanahan *et al.* 2011). Die veränderte Kalziumhomöostase in PXE scheint vergleichbar mit den Beobachtungen bei CKD-Patienten zu sein (Shanahan *et al.* 2011). In CKD-Patienten konnte gezeigt werden, dass die Gefäßwände hohe Kalziumkonzentrationen aufweisen und dass die Kalziumablagerungen in der ECM umgeben von VSMC als Nanokristalle die Kalzifizierung fördern. In elastischen Gewebeschäden konnte Kalzium als Hauptablagerungsbestandteil detektiert werden (Pugashetti *et al.* 2011), welches sich ähnlich in der beobachteten veränderten ECM in PXE-Fibroblasten zeigte (Federico *et al.* 2008). Erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentrationen können die Aktivierung von MMPs fördern. In PXE-Patienten wurden signifikant erhöhte MMP2-Serumlevel gefunden (Diekmann *et al.* 2009). Erhöhte *MMP2*-Expressionen in PXE-Fibroblasten konnten in dieser Arbeit und von Quaglini *et al.* nachgewiesen werden (Quaglini *et al.* 2005).

MGP ist ein Kalzifizierungsinhibitor, der an Hydroxylapatitkristalle bindet und hauptsächlich von VSMC und Chondrozyten synthetisiert wird. Einige Studien konnten die Bedeutung von *MGP* in der Prävention vor pathologischer Kalzifizierung zeigen und wiesen auf eine Beteiligung im Pathomechanismus von PXE hin (Luo *et al.* 1997; Gheduzzi *et al.* 2007; Jiang *et al.* 2007; Hendig *et al.* 2008c; Cancela *et al.* 2012). In dieser Studie konnten in den frühen Tagen des Kalzifizierungsprozesses reduzierte *MGP*-Transkriptlevel in PXE-Fibroblasten detektiert werden. Diese Ergebnisse korrelierten mit geringen *MGP*-Serumkonzentrationen in PXE-Patienten und *Abcc6*-defizienten Mäusen (Jiang *et al.* 2007; Hendig *et al.* 2008c). Am Ende des Kalzifizierungsprozesses stieg die *MGP*-Genexpression in den kalzifizierten PXE-

Fibroblasten an, während die MGP-Proteinkonzentration der Kontrollzellen signifikant reduziert vorlag. Entsprechend dieser Beobachtungen konnten Gheduzzi *et al.* geringe Konzentrationen carboxylierten MGPs, welches von PXE-Hautfibroblasten *in vitro* produziert wird, messen (Gheduzzi *et al.* 2007). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die lokale Synthese des reifen Proteins eine entscheidende Bedeutung zur Prävention vor der Kalzifizierung der elastischen Fasern hat und dass Fibroblasten wahrscheinlich in der lokalen Sekretion dieses wichtigen antikalzifizierendem Proteins beteiligt sind (Ronchetti *et al.* 2013). Die intrazelluläre Akkumulation eines bisher unbekanntem Faktors resultierend aus dem ABCC6-Transportdefekt könnte zu einer Repression der MGP-Expression in PXE-Fibroblasten führen. Darüber hinaus scheint die angenommene Akkumulation unterschiedliche Effekte auf männliche und weibliche Fibroblasten zu haben.

Das lokal produzierte MGP inhibiert die Kalzifizierung in Gegenwart von Kalzium durch Komplexbildung mit BMP2, wobei der bekannte BMP2-Effekt als Promoter der Chondrogenese und der Knochen neutralisiert wird (Wallin *et al.* 2000; Zebboudj *et al.* 2002; Sweatt *et al.* 2003). Die 6-tägige Kalzifizierungsbehandlung verursachte eine signifikante Zunahme der BMP2-Genexpression in allen behandelten Zellen mit Ausnahme der weiblichen PXE-Fibroblasten, während die MGP-Transkriptlevel reduziert vorlagen. Diese Korrelation wurde für andere Zelltypen bereits beschrieben (Zebboudj *et al.* 2002; Sweatt *et al.* 2003). Geringe MGP-Konzentrationen im Vergleich zu BMP2-Expressionen resultieren in einer Steigerung der Osteoinduktion, während hohe Konzentrationen zu einer starken Inhibition des BMP2-Osteoinduktiveffekts führen (Zebboudj *et al.* 2002). An Tag 21 konnte in dieser Arbeit eine deutliche Zunahme der BMP2- und MGP-Genexpression beobachtet werden. Außerdem wurde eine positive Korrelation zwischen den zwei kalzifizierungsstimulierenden Proteinen BMP2 und Runx2 in allen behandelten PXE-Fibroblasten an Tag 21 detektiert. Zwei kürzlich erschienene Studien betätigen diese Ergebnisse: BMP2 induzierte die Runx2-Expression (Lee *et al.* 2003) und hohe ALP-Aktivitäten resultierten in hohen BMP2- und Runx2-mRNA-Expressionen (Ma *et al.* 2011). Auch in PXE-Fibroblasten konnten sowohl in dieser Arbeit als auch von anderen höhere ALP-Aktivitäten als in Kontrollzellen beschrieben werden (Boraldi *et al.* 2012). Unabhängig von der Art des eingesetzten Kalzifizierungsmediums schienen die männlichen und weiblichen PXE-Fibroblasten nicht in der Lage zu sein, die Genexpression von Runx2 und BMP2 zu induzieren. Interessanterweise zeigten sich diese Beobachtungen deutlich verstärkt in den weiblichen PXE-Fibroblasten.

Erhöhte Phosphatkonzentrationen führten zu einer Induktion der Runx2-Expression in behandelten Kontroll- und PXE-Fibroblasten (diese Arbeit) sowie in VSMC (Schurgers *et al.* 2013). Runx2 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von OPN induziert (Shanahan *et al.* 2011). In dieser Arbeit konnte nach 21-tägiger Na₂HPO₄-Behandlung eine positive Korrelation von Runx2- und OPN-mRNA-Transkripten in behandelten PXE-Fibroblasten

beobachtet werden. Diese Ergebnisse bestätigen Vermutungen, *Runx2* habe eine Schlüsselrolle in der Regulation von *OPN* im Zusammenhang mit kardiovaskulärer Kalzifizierung (Sowa *et al.* 2013). In den frühen Tagen des Kalzifizierungsprozesses lagen die *OPN*-Transkript- und -Proteinlevel in den PXE-Zellen stark reduziert vor. Demgegenüber führte die Kalzifizierungsbehandlung mit CaCl_2 als Induktor zu einer signifikanten Erhöhung der *OPN*-Transkriptlevel, während die *OPN*-Proteinkonzentrationen in den PXE-Fibroblasten unverändert blieben. Diese Beobachtungen stützen die Hypothese einer potenziellen Korrelation zwischen *ABCC6*-Defizienz und erhöhter *OPN*-Expression (Aherrahrou *et al.* 2008; Sowa *et al.* 2013) und bestätigen die gefundene Überexpression von *OPN* in Hauptbiopsien aus betroffenen Regionen von PXE-Patienten (Contri *et al.* 1996). *OPN* ist primär ein Matrixprotein, allerdings wurden die *OPN*-Proteinkonzentrationen in Zellkulturüberständen bestimmt, was die reduzierten Konzentrationen in den PXE-Fibroblasten erklären könnte. Überraschenderweise wurden in dieser Arbeit nach 21-tägiger Na_2HPO_4 -Behandlung reduzierte *OPN*-Expressionen in den weiblichen PXE-Zelllinien detektiert, während die CaCl_2 -Behandlung zu einer starken Induktion der *OPN*-Genexpression führte. Die Gründe für diese Beobachtungen sind noch unklar. Die Phosphat- und Kalziumlevel im Serum von PXE-Patienten (Hendig *et al.* 2008c; Boraldi *et al.* 2012) und *Abcc6*-Knockout-Mäusen (Ivantic *et al.* 2001) wiesen normale Konzentrationen auf. Der Einsatz von CaCl_2 zur Kalzifizierungsinduktion führte zu einem ähnlichem Expressionsprofil, wie es bereits im Kalzifizierungsprozess *Abcc6*-defizienter Mäuse beobachtet werden konnte (Ivantic *et al.* 2001; Sowa *et al.* 2013). Es konnten jedoch keine Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Proben bestimmt werden, während Na_2HPO_4 als Kalzifizierungsinduktor zu einer veränderten Regulation der kalzifizierungsinhibitorischen Proteine zwischen männlichen und weiblichen Zellen führte. Diese *in vitro*-Experimente deuten auf eine hohe Relevanz der Wahl der geeigneten experimentellen Bedingungen zur Untersuchung des Pathomechanismus von PXE in Zellkulturexperimenten hin. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind von hohem Interesse, da PXE mit einer höheren Frequenz in Frauen festgestellt wurde (Neldner und Struk 2002). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass reduzierte *OPN*-Expression in ektopischer Kalzifizierung resultiert. Eine veränderte geschlechtsspezifische Kalzifizierung konnte schon von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben werden (Aksu *et al.* 2008). Bis heute sind die Gründe für eine höhere PXE-Prävalenz bei Frauen (2:1) unbekannt. Ein möglicher Grund für diese höhere Prävalenz könnten die geringeren Expressionen von kalzifizierungsinhibitorischen Proteinen (*MGP*, *OPN*) in weiblichen PXE-Fibroblasten im Vergleich zu denen in männlichen PXE-Fibroblasten sein. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das Geschlecht die regulatorischen zellulären Mechanismen beeinflusst. Weitere Studien sind notwendig, um bessere Einblicke in die zugrundeliegenden molekularen Mechanismus zu erlangen.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit an jedem überprüften Zeitpunkt des Kalzifizierungsprozesses eine positive Korrelation zwischen *OPN*- und *ENPP1*-Genexpression in

behandelten PXE-Fibroblasten beobachtet werden. Eine solche Korrelation wurde bereits in kalzifizierten Halsschlagaderatheromen beschrieben (Nitschke *et al.* 2011). Unter normalen Bedingungen trägt *ENPP1* zur Hemmung der Kalzifizierung bei, indem es PP_i generiert und dabei die *OPN*-Expression fördert. In dieser Arbeit konnten reduzierte *ENPP1*-Genexpressionen detektiert werden, welche gekoppelt mit reduzierter PP_i -Generierung und inhibierter *OPN*-Expression in erhöhter Kalzifizierung von Na_2HPO_4 -behandelten weiblichen PXE-Fibroblasten resultierte.

Zusammenfassend konnten erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentrationen in den PXE-Fibroblasten detektiert werden, welche auf eine gestörte zelluläre Kalziumhomöostase hindeuten. Darüber hinaus führte der Einsatz von $CaCl_2$ als Induktor zu einem Expressionsprofil, welches dem Kalzifizierungsprozess in *Abcc6*-defizienten Mäusen ähnelte (Ivancic *et al.* 2001; Sowa *et al.* 2013). Außerdem konnten keine Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Zellen beobachtet werden. Der Einsatz von Phosphat als Kalzifizierungsinduktor führte zu Unterschieden in den Expressionsmustern in männlichen und weiblichen Zelllinien. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass weibliche PXE-Fibroblasten nicht imstande waren, die *MGP*- und *OPN*-Expression zu induzieren, was zu einer geringeren Kalzifizierungsinhibitionskapazität führte. Diese Ergebnisse könnten ein erster Schritt zur Erklärung der hohen Prävalenz von PXE bei Frauen sein. Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass die Regulation der kalzifizierungsinhibitorischen Proteine abhängig vom eingesetzten Kalzifizierungsinduktor ist. Schlussendlich zeigen die generierten Daten die hohe Relevanz der Wahl eines geeigneten Modellsystems für Kalzifizierungsstudien, im Besonderen zur Untersuchung des Pathomechanismus verbreiteter und seltener kalzifizierungsassoziierter Erkrankungen, wie den peripheren Arterienerkrankungen und PXE.

5.3 Matrixkalzifikation bei PXE

Progressive Kalzifizierung und extensive Veränderungen der elastischen Fasern in der ECM der Haut, der Bruchmembran in der Retina des Auges und der Gefäßwände sind histopathologische Kennzeichen von PXE. Bis heute sind die ECM-Struktur und die Regulation der biologischen Prozesse unter progressiver Kalzifizierung in PXE-Fibroblasten unbekannt. Deshalb wurden in dieser Arbeit die Expression von für die Synthese und Assemblierung der elastischen Fasern im Kalzifizierungsprozess dermalen Fibroblasten gesunder Kontrollen und PXE-Patienten wichtiger Enzyme und Komponenten, untersucht.

Die bei PXE beobachtete Matrixkalzifizierung kann verschiedene Auswirkungen bei der Zellteilung und bei der *MMP*-Synthese und -Aktivierung, einnehmen, sowie auch als Aktivator von Signaltransduktionswegen oder als nukleäre Transkriptionsfaktoren dienen (Cheung *et al.* 1984; Cheung 2000). In dieser Arbeit konnten verglichen mit den Kontrollzellen signifikant höhere *MMP2*- und *MMP12*-Genexpressionen in den kalzifizierten PXE-Fibroblasten detektiert werden. Die erhöhte *MMP2*-Expression in PXE-Fibroblasten und erhöhte *MMP2*- und *MMP9*-Serumkonzentrationen bei PXE-Patienten wurde bereits beschrieben (Quaglino *et al.* 2005; Diekmann *et al.* 2009). Eine Steigerung der *MMP*-Expression kann zum Teil auch von genetischen Variationen verursacht werden. Es konnte gezeigt werden, dass Variationen im *MMP2*-Gen genetische Kofaktoren für PXE darstellen (Zarbock *et al.* 2010). Unter den experimentellen kalzifizierenden Bedingungen in dieser Studie konnte die *MMP9*-mRNA-Expression in dermalen Fibroblasten sowohl in den Kontroll- als auch in den PXE-Zellen nicht detektiert werden, was auch schon Quaglino *et al.* feststellten (Quaglino *et al.* 2005). In dieser Arbeit konnte jedoch zum ersten Mal eine erhöhte *MMP12*-Expression in Assoziation mit ECM-Umbau und Kalzifizierung in PXE beobachtet werden. *MMP12* weist eine breite Substratspezifität auf, die ECM-Proteine wie ELN, FN, Laminin, Vitronektion, COLIV und Heparansulfat einschließt (Chandler *et al.* 1996; Gronski *et al.* 1997). Erhöhte *MMP2*- und *MMP12*-Expressionen, wie in dieser Arbeit detektiert, können die Degradation von ELN initiieren, was eine Voraussetzung für die Ablagerung von Kalzium in der ECM darstellt (Qin *et al.* 2006; Sakamoto *et al.* 2009) und somit eine mögliche Kalzifizierungsinduktion begünstigt (Shindyapina *et al.* 2013). In einem subdermalen Rattenmodell konnte eine *MMP*-vermittelte Elastindegradation als initialer Schritt für die Elastinkalzifizierung identifiziert werden. Außerdem wurde gezeigt, dass die Inhibition der *MMP*-Aktivität zur signifikanten Kalzifizierungsreduktion führte (Lee *et al.* 2006). *MMP*-defiziente Mäuse waren resistent gegen CaCl_2 -vermittelte aortale Verletzungen und entwickelten keine Elastindegradation und -Kalzifizierung (Basalyga *et al.* 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden in kalzifizierten PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den kalzifizierten Kontrollzellen signifikant reduzierte mRNA-Level der Gene *ELN*, *COL1A1* und *COL3A1*, *FN*, *FBN1* und *LOX* in Kombination mit hohen *MMP*-Expressionen detektiert. In früheren Studien wurde allerdings von erhöhter

ELN-, *COL1A1*-, *FN*-, *FBN1*- und *LOX*-Genexpression in PXE-Fibroblasten berichtet und suggeriert, dass PXE-Fibroblasten aufgrund ihres unerwarteten Genexpressionsprofils nur eine untergeordnete Rolle beim beobachteten elastischen Faser-Defekt in PXE-Patienten spielen (Le Saux *et al.* 2006; Hendig *et al.* 2008b). Im Gegensatz dazu zeigten die PXE-Fibroblasten in dieser Studie stark reduzierte Expressionen der ECM-Moleküle als Konsequenz des erhöhten Matrixumbaus bei PXE. Die Diskrepanzen zwischen den Studien lassen sich mit dem Einsatz eines Kalzifizierungsmediums und der unterschiedlichen Kultivierungszeit (7-10 vs. 21 Tage) erklären. PXE ist eine Erkrankung, welche durch progressive Kalzifizierung und Fragmentierung von elastischen Fasern, sowie einem in den meisten Fällen späten Krankheitsbeginn, charakterisiert ist (Plomp *et al.* 2010). Elastindegredation, Kalzifizierung und Alterung sind Prozesse, die stark miteinander verbunden sind. Eine Korrelation zwischen Elastindegredation und Kalzifizierung konnte in einem klinisch relevanten aortalen Verletzungsmodell gezeigt werden (Basalyga *et al.* 2004). Außerdem kalzifiziert die Bruchmembran in *Abcc6*^{-/-}-Mäusen mit zunehmendem Alter (Gorgels *et al.* 2012).

FBN1 ist essentiell für die Bildung der elastischen Fasern. Mutationen in diesem Gen führen zum Marfan-Syndrom, welches eine variable, autosomal dominante Erkrankung des Bindegewebes ist (Dietz *et al.* 2005). In den kalzifizierten Kontroll- und PXE-Fibroblasten dieser Studie wurde eine verringerte *FBN1*-Genexpression bestimmt, wobei die *FBN1*-Herunterregulierung in den PXE-Zellen deutlich stärker ausfiel. Unbehandelte PXE-Fibroblasten zeigten nach 21-tägiger Kultivierungszeit eine vergleichbare verringerte Expression wie die kalzifizierten Kontrollzellen. Diese Ergebnisse suggerieren eine Deformation der elastischen Fasern und eine gestörte ECM-Entwicklung. *FBN1* bindet an *TGFB1*, welches ein wichtiger Faktor und Regulator der ECM-Entwicklung, der Kollagenexpression und der Elastinsynthese ist (Akhurst und Hata 2012). *TGFB1*-Transkripte zeigten in den kalzifizierten PXE-Zellen verringerte Werte. Beim Marfan-Syndrom konnte durch veränderte Zell-Matrix-Interaktionen und deregulierter *TGFB1*-Signalisierung eine kritische Beteiligung der *FBN1*-Defizienz im Krankheitsverlauf ermittelt werden (Dietz *et al.* 2005).

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit stark verminderte ECM-Molekül-Expressionen in Kombination mit hohen *MMP*-Expressionen in kalzifizierten PXE-Fibroblasten gezeigt werden. Zum ersten Mal konnten erhöhte *MMP12*-Expressionen in Verbindung mit ECM-Umbau und Kalzifizierung bei PXE beschrieben werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die pathologische Kalzifizierung eine wichtige Rolle in der veränderten elastischen Fasersynthese und im -Aufbau spielt, die für die PXE-Pathogenese vermutet wird.

5.4 Pyrophosphat-Homöostase bei PXE

Die Zielsetzung weiterer Untersuchungen war die Analyse der regulatorischen Mechanismen der biologischen Kalzifizierung in kalzifizierten Kontroll- und PXE-Fibroblasten mittels CaCl_2 als Kalzifizierungsinduktor. Im vorangegangenen Teil der Arbeit konnte die Relevanz eines geeigneten Modellsystems gezeigt werden, in dem sich CaCl_2 als geeigneter Induktor erwies. Im Fokus der Untersuchungen standen die Pyrophosphat-Homöostase und die beteiligten regulierenden Gene, *ALP*, *ANKH*, *ENPP1*, sowie *PIT-1* und *-2*.

ALP ist ein wichtiger Promoter der Kalzifizierung, da es die Hydrolyse von PP_i katalysiert und dadurch die Konzentration von PP_i reduziert und begleitend die P_i -Level erhöht. Nach 21-tägiger Kultivierung konnten in den kalzifizierten Kontrollzellen erhöhte *ALP*-Transkriptlevel beobachtet werden. Diese *ALP*-Genexpressions- und -Aktivitätserhöhung war verstärkt in kalzifizierten PXE-Fibroblasten detektierbar, wenn ein Phosphat als Kalzifizierungsinduktor genutzt wurde, so wie es schon von Boraldi *et al.* beschrieben wurde (Boraldi *et al.* 2012). Wird allerdings CaCl_2 als Kalzifizierungsinduktor in PXE-Fibroblasten eingesetzt, zeigten kalzifizierte PXE-Fibroblasten deutlich verminderte *ALP*-Expressionen und -Aktivitäten, da hohe CaCl_2 -Konzentrationen die *ALP*-Aktivität inhibieren (Cheng *et al.* 2013). *In vitro*-Studien arterieller Kalzifizierung, die auf einer *CD73*-Defizienz (ACDC; OMIM 211800) beruhen, zeigten in Fibroblasten stark erhöhte *ALP*-Aktivitäten (Markello *et al.* 2011; St. Hilaire *et al.* 2011). *CD73* hat eine 5' Exonukleotidaseaktivität, die AMP zu P_i und Adenosin konvertiert. Letzteres bindet an einen Adenosinrezeptor und induziert eine intrazelluläre Signalkaskade, die in einer Inhibition der *ALP*-Aktivität resultiert (Colgan *et al.* 2006). Einige Studien diskutierten eine Korrelation zwischen Adenosin und *ABCC6* (Markello *et al.* 2011; Nitschke und Rutsch 2012). Szabó *et al.* konnte in *in vitro*-Experimenten zeigen, dass *ABCC6* Adenosin nicht transportiert (Szabó *et al.* 2011). Dennoch suggerieren die Ergebnisse dieser Arbeit eine mögliche regulatorische Interaktion zwischen *ABCC6* und Nukleotidzuckern und deuten auf einen ähnlichen Mechanismus wie in *CD73*-defizienten Zellen hin.

Die Matrixkalzifizierung führte zu einer signifikanten Reduzierung der *ENPP1*-Genexpression und -aktivität in den kalzifizierten PXE-Fibroblasten verglichen mit den gesunden Kontrollzellen. Diese *ENPP1*-Genexpressionsreduktion konnte in den PXE-Zellen, welche mit CaCl_2 behandelt wurden, schon nach 6-tägiger Kultivierung beobachtet werden. Frühere Studien haben gezeigt, dass eine Defizienz von *ENPP1* oder *ANKH* in pathologischer Ablagerung von Hydroxylapatitkristallen resultieren kann (Okawa *et al.* 1998; Nitschke *et al.* 2011). Ein Verlust von *ENPP1* ist assoziiert mit vaskulärer Kalzifizierung bei *GACI* und führt zu einer Reduzierung von ePP_i , während verringerte *ANKH*-Level die endochondrale vaskuläre Kalzifizierung potenzieren (Rutsch *et al.* 2003; Harmey *et al.* 2004; Johnson *et al.* 2005). In

dieser Arbeit konnten erstmalig verringerte ePP_i-Konzentrationen in PXE-Fibroblasten bestimmt werden. Diese Beobachtung geht mit reduzierten *ENPP1*-Transkript- und -Aktivitätsleveln einher, wohin gegen die Genexpression des PP_i-Kanals *ANKH* erhöht war. *ANKH* transportiert PP_i zum Schutz vor Hydroxylapatitablagerungen in der ECM aus der Zelle (Ho *et al.* 2000). Die Kalzifizierungsbehandlung führte während der Kultivierungszeit zu einer Erhöhung der iPP_i-Konzentrationen zur Prävention vor einer Kalzifizierung der Kontrollzellen. Dieses Phänomen wurde schon für primäre Osteoblasten und VSMC beschrieben (Harmey *et al.* 2004; Villa-Bellosta *et al.* 2011). Im Gegensatz dazu konnten signifikant reduzierte iPP_i-Level in den PXE-Fibroblasten beobachtet werden, welche nicht der eben beschriebenen Regulation unterlagen. Hierdurch resultierte eine erhöhte *ANKH*-Genexpression nicht in einer ePP_i-Konzentrationssteigerung bei den PXE-Fibroblasten. Die ePP_i-Konzentrationen bei den kalzifizierten Kontrollfibroblasten sanken ebenfalls, allerdings war die Reduzierung des ePP_i bei *ABCC6*-defizienten Zellen deutlich stärker. Diese Ergebnisse veranschaulichen eine Beteiligung von *ABCC6* in der zellulären PP_i-Homöostase und unterstützen eine Hypothese von Nitschke *et al.* (Nitschke und Rutsch 2012), wonach es einen Zusammenhang zwischen *ENPP1*- und *ABCC6*-Defizienz gibt.

In kalzifizierten Fibroblasten konnten erhöhte Genexpressionlevel des Na/P_i-Kotransporters *PIT-1* bestimmt werden. Eine Assoziation von erhöhter *PIT-1*-Expression mit Kalzifizierung konnte schon von anderen Gruppen beobachtet werden (Jono *et al.* 2000; Yoshiko *et al.* 2007; Shanahan *et al.* 2011; El Hussein *et al.* 2013). Dieses deutet auf einen intensiven P_i-Transport in PXE-Fibroblasten hin (Villa-Bellosta *et al.* 2007).

In dieser Studie konnte eine aktive Regulation des Kalzifizierungsprozesses in dermalen Fibroblasten beobachtet werden. Signifikant höhere Matrixkalzifizierung korrelierte mit signifikant erhöhter *PIT-1*- und *ANKH*-Expression sowie reduzierter *ENPP1*-Expression und -Aktivität. Erstmals konnte eine Beteiligung von *ABCC6* an der zellulären PP_i-Homöostase gezeigt werden. PXE-Fibroblasten schienen nicht in der Lage zu sein, ePP_i für die Kalzifizierungsinhibition bereit zu stellen. Diese Ergebnisse suggerieren eine Funktionsstörung des PP_i-Transports aufgrund von reduzierter *ENPP1*-Aktivität in PXE-Fibroblasten. Weitere Studien sind notwendig um den zugrunde liegenden Pathomechanismus aufzuklären der zu einer Suppression der *ENPP1*-Expression und -Aktivität führt.

5.5 Einfluss verschiedener Seren auf die Kalzifizierung bei PXE

Zur Untersuchung des Kalzifizierungsprozesses *in vitro*, werden in den meisten Studien Reagenzien wie anorganisches/organisches Phosphat oder Kalzium eingesetzt, um eine Matrixkalzifizierung zu induzieren. Allerdings führen diese Zusätze im Zellkulturmedium zu einer veränderten extrazellulären Konzentration des Kalzium-Phosphat-Produktes, welches im Serum von PXE-Patienten (Hendig *et al.* 2006; Boraldi *et al.* 2012) und *Abcc6-Knockout*-Mäusen (Ivandić *et al.* 2001) in den normalen Referenzbereichen liegt. Aufgrund dessen erschienen im weiteren Verlauf dieser Arbeit Kalzifizierungsstudien für PXE unter Einsatz von Kalzifizierungsmedien, welche hohe Phosphat oder Kalziumkonzentrationen enthalten, als unzureichend. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit als auch in denen anderer Gruppen unter den genannten Bedingungen eine Kalzifizierung nicht nur in den PXE-Fibroblasten beobachtet werden, sondern ebenso in den Kontrollzellen (Boraldi *et al.* 2012). Ein Ziel dieser Studie war es, diejenigen Kultivierungsbedingungen zu charakterisieren, bei denen nur die PXE-Fibroblasten kalzifizieren ohne die Phosphat- oder Kalzium-Konzentrationen verändern zu müssen. In den vorangegangenen Versuchen konnte beobachtet werden, dass auch das eingesetzte FCS eine Rolle bei der *in vitro*-Kalzifizierung spielt. Aufgrund dessen wurden die Fibroblasten in 14 verschiedenen FCS-Chargen von verschiedenen Herstellern und in den gepoolten Seren von gesunden Kontrollen und PXE-Patienten für 21 Tage kultiviert. Eine Kalzifizierung konnte ausschließlich in den vier PXE-Fibroblasten-Zelllinien mittels ARS-Färbung bei der Kultivierung im FCS der Charge 4 detektiert werden. Das FCS der Charge 4 unterscheidet sich von den anderen Seren im Wesentlichen durch sehr geringe PP_i -Konzentrationen. In den kalzifizierten PXE-Fibroblasten wurden erhöhte Expressionen der Gene *ALP* und *OPN*, wie schon in früheren Studien gezeigt, im Vergleich zu den Kontrollzellen gemessen (Contri *et al.* 1996; Boraldi *et al.* 2012). Des Weiteren wurden in den kalzifizierten PXE-Zellen signifikant reduzierte *ENPP1*-Expressionen und -Aktivitäten detektiert. Reduzierte ePP_i - und iPP_i -Konzentrationen korrelierten in den PXE-Fibroblasten mit erhöhter *ANKH*-Genexpression und induzierter Matrixkalzifizierung. Im Gegensatz dazu zeigten die Kontrollzellen eine ausgewogene zelluläre PP_i -Homöostase durch die Kompensation der reduzierten ePP_i -Konzentrationen mit Synthese und Sekretion von iPP_i .

Die Relevanz dieser Arbeit und vorangegangener Studien liegt in der Beobachtung, dass iPP_i -Konzentrationen und PP_i -Generierung in PXE-Fibroblasten reduziert vorliegen. Diese Daten werden durch eine kürzlich erschienene Studie von Jansen *et al.* unterstützt, welche zeigte, dass die Überexpression von *ABCC6* in HEK293-Zellen ATP-Sekretion und ePP_i -Akkumulation induziert (Jansen *et al.* 2013). Außerdem wurde beschrieben, dass plättchen-freies Plasma von *Abcc6-Knockout*-Mäusen signifikant reduzierte PP_i -Konzentrationen aufweist. Jedoch ist der zugrundeliegende molekulare Mechanismus immer noch unklar. Da, wie es in den Kontrollzellen beobachtet werden konnte, dezimierte zelluläre PP_i -

Konzentrationen die ENPP1-Aktivität erhöhen sollten, um das Niveau von zytosolischem und extrazellulärem PP_i wieder zu erhöhen, suggerieren diese Ergebnisse eine inhibierte ENPP1-Synthese und -Aktivität in PXE-Fibroblasten. Unter sehr geringen ePP_i -Konzentrationen waren die PXE-Fibroblasten nicht in der Lage, das benötigte ePP_i über die Induktion der iPP_i -Synthese und -Transport zu regulieren. Die iPP_i -Konzentrationen der PXE-Fibroblasten waren deutlich geringer über die gesamte Laufzeit der Experimente. Die Ergebnisse dieser Arbeit können die Frage nicht beantworten, warum die ENPP1-Expression und -Aktivität in PXE-Fibroblasten inhibiert zu sein scheint. Weitere Studien sollten nun folgen um den Mechanismus aufzuklären, der zu einer Inhibition der ENPP1-Aktivität und zu einer Verringerung der zellulären PP_i -Vorräte führt. Die Ergebnisse mehrerer Studien deuten an, dass eine Suppression des TGF β -Signalweges zu einer veränderten Expression von PP_i -produzierenden und metabolisierenden Enzymen wie ENPP1 beiträgt und im Weiteren zu einer Atherogenese führt. In dieser Arbeit konnte eine reduzierte TGF β 1-mRNA-Expression detektiert werden, die auf eine verringerte TGF β -Reaktionsfähigkeit in der Matrixmineralisierung hindeuten. Eine kürzlich erschienene Studie von Xu *et al.* zeigte reduzierte ENPP1-Expressionen aufgrund der Suppression des ERK1/2-Signalweges durch einen siRNA-vermittelten TGF β 1-Knockdown oder den Einsatz von ERK1/2-Inhibitoren (Xu *et al.* 2013). Eine weitere Studie von Chen *et al.* berichtete von einer Suppression des TGF β -Signalweges durch zelluläres Cholesterin, LDL (*low density lipoprotein*) und VLDL (*very low density lipoprotein*) in kultivierten Zellen (Chen *et al.* 2007). Daher könnte eine Inhibition des TGF β -Signalweges eine Ursache für die beschriebene verringerte ENPP1-Expression und -Aktivität in der Matrixkalzifizierung darstellen.

Zusammengefasst konnte ein geeignetes Modellsystem für die Untersuchung von *in vitro*-Kalzifizierung bei PXE ohne den Einsatz von Phosphaten oder Kalzium zur Kalzifizierungsinduktion gefunden werden. Die PXE-Fibroblasten kalzifizierten unter geringen PP_i -Konzentrationen im Medium, während die Kontrollzellen die reduzierten ePP_i -Konzentrationen mit der Generierung und dem Transport von iPP_i ausgleichen konnten und so eine Kalzifizierung verhindert werden konnte.

5.6 Pyrophosphat als Kalzifizierungsinhibitor bei PXE

Die beobachtete PP_i -Degeneration in PXE-Fibroblasten führte zu folgenden neuen Fragestellungen: Ist eine Reduzierung des Kalzifizierungsgrades bei PXE durch eine Supplementation von PP_i möglich? Welche Effekte hat eine PP_i -Supplementation auf die Expression und Aktivität der PP_i -metabolisierenden Enzyme im Kalzifizierungsprozess? Wäre eine PP_i -Supplementation eine potentielle Therapieoption für PXE-Patienten? Um mögliche Antworten für diese Fragen zu finden, wurden die PXE-Fibroblasten unter kalzifizierenden Bedingungen (geringe PP_i -Konzentrationen) supplementiert mit zwei verschiedenen organischen PP_i (GGPP und FPP) und einem nicht hydrolysierbarem PP_i -Analogon, dem Bisphosphonat Zoledronat kultiviert. Bisphosphonate (BP) unterscheiden sich von den PP_i in dem das Sauerstoffatom der P-O-P-Bindung durch ein Kohlenstoffatom (P-C-P) substituiert wurde, an welchen synthetisch verschiedenen Rest angehängt werden können. BP werden weitverbreitet in der Behandlung von übermäßiger Knochenresorption, Hyperkalzämie und Osteoporose eingesetzt (Persy *et al.* 2006; Russell *et al.* 2007). In hohen Dosen inhibieren BP die Kalzifizierung durch Inhibierung der Bildung und Ablagerung der Kalziumphosphatkristalle und blocken die Transformation des nichtkristallinen Kalziumphosphats zu Hydroxylapatiten (Persy *et al.* 2006). Die ARS-Färbung und -Quantifizierung zeigte nach 21-tägiger PP_i - und BP-Behandlung signifikant reduzierte Konzentrationen an kalziumreichen Ablagerungen. Die stärkste Reduktion wurde nach ZOL-Supplementierung festgestellt. Diese Kalzifizierungsinhibition wurde bereits in VSMC beschrieben (Hu *et al.* 2012). Auf Genexpressionsebene für *ALP* und *OPN* konnte die Kalzifizierungsreduktion ebenfalls detektiert werden. Beide Kalzifizierungsmarker, welche in kalzifizierten PXE-Zellen deutlich erhöht waren, wurden durch die PP_i - und BP-Behandlung signifikant reduziert. Die Unterdrückung von induzierten *ALP*- und *OPN*-Expressionen aufgrund von BP-Behandlung konnte schon in früheren Studien gezeigt werden (Vaisman *et al.* 2005; Saito *et al.* 2007). Die Reduktion der *ALP*-induzierten PP_i -Hydrolyse könnte ein potenzieller Mechanismus zur Prävention der Kalzifizierung durch BP sein (Lomashvili *et al.* 2009). Die *ENPP1*-Genexpression und -Aktivität konnte durch die PP_i -Behandlung in den PXE-Fibroblasten gesteigert werden, allerdings war die *ENPP1*-Aktivität in den behandelten PXE-Zellen immer noch niedriger als in den Kontrollzellen. Die Messung des ePP_i enthüllte erhöhte Konzentrationen hauptsächlich aufgrund der PP_i -Supplementation in allen behandelten Zellen. Die PP_i -Behandlung führte zu einer Erhöhung der iPP_i -Konzentration in den Kontrollzellen, welche in den PXE-Fibroblasten nicht beobachtet werden konnte. Die Mechanismen, durch die ePP_i zu einer Aktivierung des iPP_i -Signalweges führt, sind bis heute unbekannt. Bedingt durch sein Größe und Ladung ist PP_i nicht in der Lage, die Zellmembran zu passieren. Ein ATP-ADP-Translokator, welcher PP_i in die Zelle importieren kann, konnte in Prokaryoten, Chloroplasten und Mitochondrien beschrieben werden (Mansurova 1989; Villiotte *et al.* 1991; Lunn und Douce 1993). Ein solcher Transporter oder extrazellulärer Rezeptor für PP_i ist in Säugerzellen nicht bekannt (Terkeltaub 2001). BP

erreichen über einen offenen Connexin-43-Hemikanal den intrazellulären Raum (Plotkin *et al.* 2002).

Eine BP-Behandlung erhöhte bei Patienten mit GACI (Rutsch *et al.* 2008) und bei Säuglingen mit idiopathischer arterieller Kalzifikation die Überlebensrate (Chong und Hutchins 2007). BP inhibierten außerdem die Kalzifizierung in Rattenaortazellen *in vitro* und hielten eine weitere Kalzifizierung auf. Die Kalzifizierung rückgängig zu machen war allerdings nicht möglich (Lomashvili *et al.* 2009). Des Weiteren konnten bei einem GACI-Patienten schwere Knochenresorptionen verursacht durch eine BP-Behandlung beobachtet werden (Otero *et al.* 2013), was die Notwendigkeit weitere Studien zur Überprüfung der Toxizität von BP zeigt. Die Ergebnisse dieser Arbeit suggerieren eine Behandlung mit BP als potentielle Therapieoption für PXE-Patienten zur Kalzifizierungsinhibition in frühen Stadien. Weitere Studien sind notwendig um weitere BP, andere Konzentrationen sowie die Effizienz und Toxizität der BP in anderen Modellsystemen zu testen.

5.7 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine aktive Regulation des Kalzifizierungsprozesses in dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten nachgewiesen werden. Erstmals wurde eine veränderte PP_i -Homöostase im Zusammenhang mit PXE beschrieben. Eine Supplementation von PP_i oder BP führte zu einer signifikant reduzierten Kalzifizierung und suggerierte eine mögliche Kompensation der gestörten PP_i -Generierung und des PP_i -Transports in PXE-Fibroblasten.

Weiterführende Studien sind nun notwendig, um mögliche PP_i -Transportdefekte in Verbindung mit verringerten *ENPP1*-Expressionen und -Aktivitäten bei PXE zu analysieren, die die gestörte PP_i -Homöostase erklären könnten. Des Weiteren muss untersucht werden, ob die PP_i -Deregulation lokal begrenzt vorliegt oder eine systemische Bedeutung für die PXE-Pathogenese aufweist. Vielleicht spielt das PP_i auch eine Rolle im Transport des bisher noch unbekanntes Substrates von ABCC6. PP_i -Konzentrationen sollten im Plasma und im Urin von PXE-Patienten bestimmt werden. Für weitere *in vitro*-Untersuchungen sollte ein geeignetes Zellkulturmodellsystem verwendet werden. Erste Erkenntnisse dafür konnten in der vorliegenden Arbeit gewonnen werden und müssen weiter ausgearbeitet werden. Dazu gehören vergleichbare Kulturbedingungen im Kalzifizierungsprozess ohne die Veränderung des Kalzium-Phosphat-Produktes bei geringen PP_i -Konzentrationen. Die Erkenntnisse dieser Arbeit zu kalzifizierten dermalen Fibroblasten sollten im Hinblick auf die gestörte PP_i -Homöostase in anderen Zelltypen (z. B. in VSMC), die z. B. über stabilen *Genkockdown* generiert wurden, unter kalzifizierenden Bedingungen überprüft werden.

Im PXE-Fibroblastenmodell führte eine BP-Behandlung zu einer Kalzifizierungsreduktion. Weitere BP sollten in anderen Modellsystemen im Hinblick auf ihre Effizienz und Toxizität getestet werden, um diese als potentielle Therapieoption für PXE-Patienten zur Kalzifizierungsinhibition in frühen Stadien weiter in Betracht ziehen zu können.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA	<i>ascorbic acid</i> (Ascorbinsäure)
AB	Antibiotikum
Abb.	Abbildung
ABCC6	<i>ATP-binding cassette transporter subfamily C member 6</i>
ALP	gewebeunspezifische alkalische Phosphatase
AM	Antimykotikum
AMP	Adenosinmonophosphat
ANKH	Pyrophosphatkanal Ankylosis
APS	Adenosin-5'-Phosphosulfatsodiumsalz
ARS	Alizarin Rot S
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
β 2M	β -2-Mikroglobulin
β GlyPO ₄	β -Glycerophosphat
BMP2	<i>bone morphogenetic protein 2</i> (knochenmorphogenetisches Protein 2)
bp	Basenpaar
BP	Bisphosphonat
BSA	bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
cht	compound heterozygot
CKD	<i>chronic kidney diseases</i> (Chronische Nierenerkrankung)
COL	<i>collagen</i> (Kollagen)
C _T	<i>cycle threshold</i> (Schwellenwert-Zyklus)
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
dUTPs	Desoxyuridintriphosphat
dest.	destilliert
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
E	Effizienz
ECM	<i>extracellular matrix</i> (extrazelluläre Matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

ELN	Elastin
ENPP1	Ektonukleotidpyrophosphatase 1
ERK	<i>extracellular-signal-regulated kinase</i> (Extrazellulär-Signal regulierte Kinase)
FBN1	Fibrillin 1
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FLAAS	Adenosin-5'-Triphosphatdisodiumsalzhydrat
FLAMM	<i>Firely-luciferase-assay ATP mix</i>
FN	Fibronektion
FPP	Farnesylpyrophosphat
GACI	<i>generalized arterial calcification of infancy</i> (generelle arterielle Kalzifizierung bei Säuglingen)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GGCX	γ -Glutamylcarboxylase
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
h	human
HKG	<i>housekeeping gene</i> (Haushaltsgen)
hm	homozygot
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HPRT1	Hypoxanthinphosphoribosyltransferase 1
ht	heterozygot
LOX	Lysyloxidase
MGP	Matrix-Gla-Protein
MIQE	<i>minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
NAD(P)H	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NBD	Nukleotidbindungsdomäne
OPN	Osteopontin
OR	<i>Odds Ratio</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
P _i	anorganisches Phosphat
PP _i	anorganisches Pyrophosphat
PIT	Na/P _i -Kotransporter
PXE	<i>Pseudoxanthoma elasticum</i>
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen

RNA	Ribonukleinsäure
Runx	<i>Runt-related transcription factor</i> (Runt-ähnlicher Transkriptionsfaktor)
s.	siehe
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SNV	<i>single nucleotide variant</i> (Einzelnukleotidvariante)
Tab.	Tabelle
TGFB1	<i>transforming growth factor beta 1</i>
TMD	Transmembrandomäne
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell</i> (vaskuläre glatte Muskelzellen)
wt	Wildtyp
ZKÜ	Zellkulturüberstand
ZOL	Zoledronsäure

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Açil, Y, Möller, B, Niehoff, P, *et al.* (2011). The cytotoxic effects of three different bisphosphonates in vitro on human gingival fibroblasts, osteoblasts and osteogenic sarcoma cells. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*.
- Addison, WN, Azari, F, Sørensen, ES, *et al.* (2007). Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity. *Journal of Biological Chemistry* 282: 15872–83.
- Aherrahrou, Z, Doehring, LC, Ehlers, E-M, *et al.* (2008). An alternative splice variant in Abcc6, the gene causing dystrophic calcification, leads to protein deficiency in C3H/He mice. *Journal of Biological Chemistry* 283: 7608–15.
- Akhurst, RJ, Hata, A (2012). Targeting the TGFbeta signalling pathway in disease. *Nature reviews Drug discovery*.
- Aksu, AE, Rubin, JP, Dudas, JR, *et al.* (2008). Role of gender and anatomical region on induction of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Annals of plastic surgery* 60: 306–22.
- Andrew, AS, Karagas, MR, Nelson, HH, *et al.* (2007). DNA repair polymorphisms modify bladder cancer risk: a multi-factor analytic strategy. *Human heredity* 65: 105–18.
- Barrett, J, Fry, B, Maller, J, *et al.* (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21: 263–5.
- Basalyga, DM, Simionescu, DT, Xiong, W, *et al.* (2004). Elastin Degradation and Calcification in an Abdominal Aorta Injury Model Role of Matrix Metalloproteinases. *Circulation* 110: 3480–7.
- Becker, ML, Gaedigk, R, van Haandel, L, *et al.* (2011). The effect of genotype on methotrexate polyglutamate variability in juvenile idiopathic arthritis and association with drug response. *Arthritis & Rheumatism* 63: 276–85.
- Belinsky, M, Kruh, G (1999). MOAT-E (ARA) is a full-length MRP/cMOAT subfamily transporter expressed in kidney and liver. *British journal of cancer* 80: 1342.
- Bergen, AA, Plomp, AS, Hu, X, *et al.* (2007). ABCC6 and pseudoxanthoma elasticum. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 453: 685–91.
- Bergen, AAB, Plomp, AS, Schuurman, EJ, *et al.* (2000). Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *Nature genetics* 25: 228–31.
- Bessey, OA, Lowry, OH, BROOK, MJ (2005). A Method for the rapid determination of Alkaline Phosphatase with five cubic millimeters of serum. *Landmark Papers in Clinical Chemistry* 135.
- Boraldi, F, Annovi, G, Vermeer, C, *et al.* (2012). Matrix Gla Protein and Alkaline Phosphatase Are Differently Modulated in Human Dermal Fibroblasts from PXE Patients and Controls. *Journal of Investigative Dermatology*.
- Boraldi, F, Quaglino, D, Croce, M, *et al.* (2003). Multidrug resistance protein-6 (MRP6) in human dermal fibroblasts. Comparison between cells from normal subjects and from Pseudoxanthoma elasticum patients. *Matrixbiology* 22: 491–500.
- Borst, P, van de Wetering, K, Schlingemann, R (2008). Does the absence of ABCC6 (multidrug resistance protein 6) in patients with Pseudoxanthoma elasticum prevent the liver from providing sufficient vitamin K to the periphery? *Cell Cycle* 7: 1575–9.
- Le Boulanger, G, Labreze, C, Croue, A, *et al.* (2009). An unusual severe vascular case of pseudoxanthoma elasticum presenting as generalized arterial calcification of infancy. *American Journal of Medical Genetics Part A* 152: 118–23.

- Bowers, GN, McComb, RB (1966). A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase. *Clinical Chemistry* 12: 70–89.
- Brampton, C, Yamaguchi, Y, Vanakker, O, *et al.* (2011). Vitamin K does not prevent soft tissue mineralization in a mouse model of pseudoxanthoma elasticum. *Cell Cycle* 10: 1810–20.
- Buhaescu, I, Izzedine, H (2007). Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications. *Clinical biochemistry* 40: 575–84.
- Bustin, SA, Benes, V, Garson, JA, *et al.* (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* 55: 611–22.
- Cai, J, Pardali, E, Sánchez-Duffhues, G, *et al.* (2012). BMP signaling in vascular diseases. *FEBS letters*.
- Cancela, ML, Conceição, N, Laizé, V (2012). Gla-Rich Protein, a New Player in Tissue Calcification? *Advances in Nutrition: An International Review Journal* 3: 174–81.
- Chandler, S, Cossins, J, Lury, J, *et al.* (1996). Macrophage metalloelastase degrades matrix and myelin proteins and processes a tumour necrosis factor-alpha fusion protein. *Biochemical and biophysical research communications* 228: 421–9.
- Chassaing, N, Martin, L, Calvas, P, *et al.* (2005). Pseudoxanthoma elasticum: a clinical, pathophysiological and genetic update including 11 novel ABCC6 mutations. *Journal of medical genetics* 42: 881–92.
- Chen, C-L, Liu, I-H, Fliesler, SJ, *et al.* (2007). Cholesterol suppresses cellular TGF-beta responsiveness: implications in atherogenesis. *Journal of cell science* 120: 3509–21.
- Cheng, S, Wang, W, Lin, Z, *et al.* (2013). Effects of extracellular calcium on viability and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells in vitro. *Human Cell* 1–7.
- Cheung, HS (2000). Calcium crystal effects on the cells of the joint: implications for pathogenesis of disease. *Current opinion in rheumatology* 12: 223–7.
- Cheung, HS, Story, MT, Mccarty, DJ (1984). Mitogenic effects of hydroxyapatite and calcium pyrophosphate dihydrate crystals on cultured mammalian cells. *Arthritis & Rheumatism* 27: 668–74.
- Cho, Y, Ritchie, M, Moore, J, *et al.* (2004). Multifactor-dimensionality reduction shows a two-locus interaction associated with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 47: 549–54.
- Chong, CR, Hutchins, GM (2007). Idiopathic infantile arterial calcification: the spectrum of clinical presentations. *Pediatric and Developmental Pathology* 11: 405–15.
- Colgan, SP, Eltzschig, HK, Eckle, T, *et al.* (2006). Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic signalling* 2: 351–60.
- Contri, MB, Boraldi, F, Taparelli, F, *et al.* (1996). Matrix proteins with high affinity for calcium ions are associated with mineralization within the elastic fibers of pseudoxanthoma elasticum dermis. *The American journal of pathology* 148: 569.
- Contri, MB, Cingi, M, Salvini, R, *et al.* (1988). Pseudoxanthoma Elasticum (PXE): Ultrastructural and Biochemical Study on Proteoglycan and Proteoglycan-Associated Material Produced by Skin Fibroblasts In Vitro. *Collagen and related research* 8: 49–64.
- Costrop, LM, Vanakker, OO, Van Laer, L, *et al.* (2010). Novel deletions causing pseudoxanthoma elasticum underscore the genomic instability of the ABCC6 region. *Journal of human genetics* 55: 112–7.
- Darier, J (1896). *Pseudoxanthoma elasticum*. L. Voss.
- Dervieux, T, Wessels, JA, van der Straaten, T, *et al.* (2009). Gene-gene interactions in folate and adenosine biosynthesis pathways affect methotrexate efficacy and tolerability in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenetics and genomics* 19: 935–44.

- Diekmann, U, Zarbock, R, Hendig, D, *et al.* (2009). Elevated circulating levels of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in pseudoxanthoma elasticum patients. *Journal of molecular medicine* 87: 965–70.
- Dietz, HC, Loeys, B, Carta, L, *et al.* (2005). Recent progress towards a molecular understanding of Marfan syndrome. *In: American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics.* 4–9.
- El Husseini, D, Boulanger, M-C, Fournier, D, *et al.* (2013). High Expression of the Pi-Transporter SLC20A1/Pit1 in Calcific Aortic Valve Disease Promotes Mineralization through Regulation of Akt-1. *PLoS one* 8: e53393.
- Ewence, AE, Bootman, M, Roderick, HL, *et al.* (2008). Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells a potential mechanism in atherosclerotic plaque destabilization. *Circulation research* 103: e28–e34.
- Faul, F, Erdfelder, E, Lang, A-G, *et al.* (2007). G* Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior research methods* 39: 175–91.
- Federico, A, Weinel, S, Fabre, V, *et al.* (2008). Dystrophic calcinosis cutis in pseudoxanthoma elasticum. *Journal of the American Academy of Dermatology* 58: 707–10.
- Finger, RP, Issa, PC, Ladewig, MS, *et al.* (2009). Pseudoxanthoma elasticum: genetics, clinical manifestations and therapeutic approaches. *Survey of ophthalmology* 54: 272–85.
- Fowkes, FGR, Rudan, D, Rudan, I, *et al.* (2013). Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *The Lancet.*
- Galis, ZS, Khatri, JJ (2002). Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis the good, the bad, and the ugly. *Circulation research* 90: 251–62.
- Gheduzzi, D, Boraldi, F, Annovi, G, *et al.* (2007). Matrix Gla protein is involved in elastic fiber calcification in the dermis of pseudoxanthoma elasticum patients. *Laboratory Investigation* 87: 998–1008.
- Gheduzzi, D, Sammarco, R, Quaglino, D, *et al.* (2003). Extracutaneous ultrastructural alterations in pseudoxanthoma elasticum. *Ultrastructural pathology* 27: 375–84.
- Giachelli, CM (1999). Ectopic calcification: gathering hard facts about soft tissue mineralization. *The American journal of pathology* 154: 671.
- Goldstein, JL, Brown, MS, others (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343: 425.
- Gorgels, TG, Teeling, P, Meeldijk, JD, *et al.* (2012). Abcc6 deficiency in the mouse leads to calcification of collagen fibers in Bruch's membrane. *Experimental eye research.*
- Gorgels, TG, Waarsing, JH, Herfs, M, *et al.* (2011). Vitamin K supplementation increases vitamin K tissue levels but fails to counteract ectopic calcification in a mouse model for pseudoxanthoma elasticum. *Journal of molecular medicine* 89: 1125–35.
- Gregory, CA, Grady Gunn, W, Peister, A, *et al.* (2004). An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical biochemistry* 329: 77–84.
- Gronski, TJ, Martin, RL, Kobayashi, DK, *et al.* (1997). Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase. *Journal of Biological Chemistry* 272: 12189–94.
- Grönblad, E (1929). Angioid streaks-pseudoxanthoma elasticum. *Acta Ophthalmologica* 7: 329–329.
- Götting, C, Hendig, D, Adam, A, *et al.* (2005). Elevated xylosyltransferase I activities in pseudoxanthoma elasticum (PXE) patients as a marker of stimulated proteoglycan biosynthesis. *Journal of molecular medicine* 83: 984–92.

- Götting, C, Schulz, V, Hendig, D, *et al.* (2003). 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. *Laboratory investigation* 84: 122–30.
- Hahn, LW, Ritchie, MD, Moore, JH (2003). Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions. *Bioinformatics* 19: 376–82.
- Harmey, D, Hesse, L, Narisawa, S, *et al.* (2004). Concerted Regulation of Inorganic Pyrophosphate and Osteopontin by Akp2, Enpp1, and Ank: An Integrated Model of the Pathogenesis of Mineralization Disorders. *The American journal of pathology* 164: 1199–209.
- Hendig, D, Adam, A, Zarbock, R, *et al.* (2008a). Elevated serum levels of intercellular adhesion molecule ICAM-1 in Pseudoxanthoma elasticum. *Clinica Chimica Acta* 394: 54–8.
- Hendig, D, Arndt, M, Szliska, C, *et al.* (2007). SPP1 promoter polymorphisms: identification of the first modifier gene for pseudoxanthoma elasticum. *Clinical chemistry* 53: 829–36.
- Hendig, D, Langmann, T, Kocken, S, *et al.* (2008b). Gene expression profiling of ABC transporters in dermal fibroblasts of pseudoxanthoma elasticum patients identifies new candidates involved in PXE pathogenesis. *Laboratory Investigation* 88: 1303–15.
- Hendig, D, Schulz, V, Arndt, M, *et al.* (2006). Role of serum fetuin-A, a major inhibitor of systemic calcification, in pseudoxanthoma elasticum. *Clinical chemistry* 52: 227–34.
- Hendig, D, Zarbock, R, Szliska, C, *et al.* (2008c). The local calcification inhibitor matrix Gla protein in pseudoxanthoma elasticum. *Clinical biochemistry* 41: 407–12.
- Ho, AM, Johnson, MD, Kingsley, DM (2000). Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis. *Science* 289: 265–70.
- Hooff, GP, Volmer, DA, Wood, WG, *et al.* (2008). Isoprenoid quantitation in human brain tissue: a validated HPLC-fluorescence detection method for endogenous farnesyl-(FPP) and geranylgeranylpyrophosphate (GGPP). *Analytical and bioanalytical chemistry* 392: 673–80.
- Hu, M, Huang, Y, Zheng, Z, *et al.* (2012). Zoledronate inhibits phosphate and bone morphogenetic protein 2-induced extracellular calcification of vascular smooth muscle cells in vitro. *Experimental and Therapeutic Medicine* 3: 841.
- Hu, X, Plomp, A, Gorgels, T, *et al.* (2004). Efficient molecular diagnostic strategy for ABCC6 in pseudoxanthoma elasticum. *Genetic testing* 8: 292–300.
- Hu, X, Plomp, AS, van Soest, S, *et al.* (2003). Pseudoxanthoma elasticum: a clinical, histopathological, and molecular update. *Survey of ophthalmology* 48: 424–38.
- Iravathy Goud Kalal, DS, Panda, A, Nitschke, Y, *et al.* (2012). Molecular diagnosis of generalized arterial calcification of infancy (GACI). *Journal of cardiovascular disease research* 3: 150.
- Ivandic, B, Utz, H, Kaczmarek, P, *et al.* (2001). New Dyscalc loci for myocardial cell necrosis and calcification (dystrophic cardiac calcinosis) in mice. *Physiological genomics* 6: 137.
- Jahnen-Dechent, W, Heiss, A, Schäfer, C, *et al.* (2011). Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. *Circulation research* 108: 1494–509.
- Jansen, RS, Küçükosmanoglu, A, de Haas, M, *et al.* (2013). ABCC6 prevents ectopic mineralization seen in pseudoxanthoma elasticum by inducing cellular nucleotide release. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 20206–11.
- Jiang, Q, Dibra, F, Lee, MD, *et al.* (2010). Overexpression of Fetuin-A Counteracts Ectopic Mineralization in a Mouse Model of Pseudoxanthoma Elasticum (Abcc6-/-). *Journal of Investigative Dermatology* 130: 1288–96.
- Jiang, Q, Endo, M, Dibra, F, *et al.* (2008). Pseudoxanthoma elasticum is a metabolic disease. *Journal of Investigative Dermatology* 129: 348–54.

- Jiang, Q, Li, Q, Grand-Pierre, AE, *et al.* (2011). Administration of vitamin K does not counteract the ectopic mineralization of connective tissues in Abcc6^{-/-} mice, a model for pseudoxanthoma elasticum. *Cell Cycle* 10: 701–7.
- Jiang, Q, Li, Q, Uitto, J (2007). Aberrant mineralization of connective tissues in a mouse model of pseudoxanthoma elasticum: systemic and local regulatory factors. *Journal of Investigative Dermatology* 127: 1392–402.
- Johnson, K, Polewski, M, van Etten, D, *et al.* (2005). Chondrogenesis mediated by PPi depletion promotes spontaneous aortic calcification in NPP1^{-/-} mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25: 686–91.
- Johnson, RC, Leopold, JA, Loscalzo, J (2006). Vascular calcification pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circulation research* 99: 1044–59.
- Jono, S, McKee, MD, Murry, CE, *et al.* (2000). Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circulation research* 87: e10–e17.
- Kendrick, J, Chonchol, M (2011). The role of phosphorus in the development and progression of vascular calcification. *American Journal of Kidney Diseases* 58: 826–34.
- Kim, J-S, Wang, J-H, Lemasters, JJ (2012). Mitochondrial permeability transition in rat hepatocytes after anoxia/reoxygenation: role of Ca²⁺-dependent mitochondrial formation of reactive oxygen species. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 302: G723–G731.
- Kircelli, F, Peter, ME, Ok, ES, *et al.* (2012). Magnesium reduces calcification in bovine vascular smooth muscle cells in a dose-dependent manner. *Nephrology Dialysis Transplantation* 27: 514–21.
- Kornet, L, Bergen, AA, Hoeks, AP, *et al.* (2004). In patients with pseudoxanthoma elasticum a thicker and more elastic carotid artery is associated with elastin fragmentation and proteoglycans accumulation. *Ultrasound in medicine & biology* 30: 1041–8.
- LaRusso, J, Jiang, Q, Li, Q, *et al.* (2008). Ectopic mineralization of connective tissue in Abcc6^{-/-} mice: effects of dietary modifications and a phosphate binder—a preliminary study. *Experimental dermatology* 17: 203–7.
- Lau, WM, Doucet, M, Stadel, R, *et al.* (2013). Enpp1: A Potential Facilitator of Breast Cancer Bone Metastasis. *PLoS one* 8: e66752.
- Lebwohl, M, Neldner, K, Pope, FM, *et al.* (1994). Classification of pseudoxanthoma elasticum: report of a consensus conference. *Journal of the American Academy of Dermatology* 30: 103.
- Lee, JS, Basalyga, DM, Simionescu, A, *et al.* (2006). Elastin calcification in the rat subdermal model is accompanied by up-regulation of degradative and osteogenic cellular responses. *The American journal of pathology* 168: 490–8.
- Lee, M-H, Kwon, T-G, Park, H-S, *et al.* (2003). BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochemical and biophysical research communications* 309: 689–94.
- Lefthérotis, G, Abraham, P, Le Corre, Y, *et al.* (2011). Relationship between ankle brachial index and arterial remodeling in pseudoxanthoma elasticum. *Journal of Vascular Surgery* 54: 1390–4.
- Li, Q, Frank, M, Thisse, CI, *et al.* (2010). Zebrafish: a model system to study heritable skin diseases. *Journal of Investigative Dermatology* 131: 565–71.
- Li, Q, Jiang, Q, Pfendner, E, *et al.* (2009a). Pseudoxanthoma elasticum: clinical phenotypes, molecular genetics and putative pathomechanisms. *Experimental dermatology* 18: 1–11.
- Li, Q, Jiang, Q, Schurgers, LJ, *et al.* (2007). Pseudoxanthoma elasticum: Reduced gamma-glutamyl carboxylation of matrix gla protein in a mouse model (Abcc6^{-/-}). *Biochemical and biophysical research communications* 364: 208–13.

- Li, Q, Schurgers, LJ, Smith, A, *et al.* (2009b). Co-existent pseudoxanthoma elasticum and vitamin K-dependent coagulation factor deficiency: compound heterozygosity for mutations in the GGCX gene. *The American journal of pathology* 174: 534–40.
- Lomashvili, KA, Monier-Faugere, M-C, Wang, X, *et al.* (2009). Effect of bisphosphonates on vascular calcification and bone metabolism in experimental renal failure. *Kidney international* 75: 617–25.
- Lunetta, KL (2008). Genetic association studies. *Circulation* 118: 96–101.
- Lunn, J, Douce, R (1993). Transport of inorganic pyrophosphate across the spinach chloroplast envelope. *Biochem J* 290: 375–9.
- Luo, G, Ducy, P, McKee, MD, *et al.* (1997). Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein.
- Ma, H-P, Ming, L-G, Ge, B-F, *et al.* (2011). Icariin is more potent than genistein in promoting osteoblast differentiation and mineralization in vitro. *Journal of cellular biochemistry* 112: 916–23.
- Mansurova, SE (1989). Inorganic pyrophosphate in mitochondrial metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 977: 237–47.
- Markello, TC, Pak, LK, St Hilaire, C, *et al.* (2011). Vascular pathology of medial arterial calcifications in NT5E deficiency: Implications for the role of adenosine in pseudoxanthoma elasticum. *Molecular genetics and metabolism* 103: 44–50.
- Moore, JH, Williams, SM (2002). New strategies for identifying gene-gene interactions in hypertension. *Annals of medicine* 34: 88–95.
- Neldner, K, Struk, B (2002). Pseudoxanthoma elasticum. *Connective tissue and its heritable disorders* 561–83.
- Neldner, KH (1988). Pseudoxanthoma elasticum. *International journal of dermatology* 27: 98–100.
- Nitschke, Y, Baujat, G, Botschen, U, *et al.* (2012). Generalized arterial calcification of infancy and pseudoxanthoma elasticum can be caused by mutations in either ENPP1 or ABCC6. *American journal of human genetics* 90: 25.
- Nitschke, Y, Hartmann, S, Torsello, G, *et al.* (2011). Expression of NPP1 is regulated during atherosclerotic plaque calcification. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 15: 220–31.
- Nitschke, Y, Rutsch, F (2012). Genetics in Arterial Calcification: Lessons Learned From Rare Diseases. *Trends in Cardiovascular Medicine* 22: 145–9.
- Okawa, A, Nakamura, I, Goto, S, *et al.* (1998). Mutation in Npps in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nature genetics* 19: 271–3.
- Otero, JE, Gottesman, GS, McAlister, WH, *et al.* (2013). Severe skeletal toxicity from protracted etidronate therapy for generalized arterial calcification of infancy. *Journal of Bone and Mineral Research* 28: 419–30.
- Otkjaer-Nielsen, A, Johnson, E, Hentzer, B, *et al.* (1977). Apatite crystals in pseudoxanthoma elasticum: a combined study using electron microscopy and selected area diffraction analysis. *Journal of Investigative Dermatology* 69: 376–8.
- Pasquali-Ronchetti, I, Volpin, D, Baccarani-Contri, M, *et al.* (1981). Pseudoxanthoma elasticum. *Dermatology* 163: 307–25.
- Persy, V, De Broe, M, Ketteler, M (2006). Bisphosphonates prevent experimental vascular calcification: Treat the bone to cure the vessels? *Kidney international* 70: 1537–8.
- Pfendner, EG, Vanakker, OM, Terry, SF, *et al.* (2007). Mutation detection in the ABCC6 gene and genotype-phenotype analysis in a large international case series affected by pseudoxanthoma elasticum. *Journal of medical genetics* 44: 621–8.

- Pinnell, SR (1982). Molecular defects in the Ehlers-Danlos syndrome. *Journal of Investigative Dermatology* 79: 90–2.
- Plomp, AS, Toonstra, J, Bergen, AAB, *et al.* (2010). Proposal for updating the pseudoxanthoma elasticum classification system and a review of the clinical findings. *American Journal of Medical Genetics Part A* 152: 1049–58.
- Plotkin, LI, Manolagas, SC, Bellido, T (2002). Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *Journal of Biological Chemistry* 277: 8648–57.
- Prosdocimo, DA, Douglas, DC, Romani, AM, *et al.* (2009). Autocrine ATP release coupled to extracellular pyrophosphate accumulation in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 296: C828–C839.
- Pugashetti, R, Shinkai, K, Ruben, BS, *et al.* (2011). Calcium may preferentially deposit in areas of elastic tissue damage. *Journal of the American Academy of Dermatology* 64: 296–301.
- Pulkkinen, L, Nakano, A, Ringpfeil, F, *et al.* (2001). Identification of ABCC6 pseudogenes on human chromosome 16p: implications for mutation detection in pseudoxanthoma elasticum. *Human genetics* 109: 356–65.
- Qin, X, Corriere, MA, Matrisian, LM, *et al.* (2006). Matrix metalloproteinase inhibition attenuates aortic calcification. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26: 1510–6.
- Quaglino, D, Sartor, L, Garbisa, S, *et al.* (2005). Dermal fibroblasts from pseudoxanthoma elasticum patients have raised MMP-2 degradative potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1741: 42–7.
- Quaglino Jr, D, Boraldi, F, Barbieri, D, *et al.* (2000). Abnormal phenotype of in vitro dermal fibroblasts from patients with pseudoxanthoma elasticum (PXE). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1501: 51–62.
- Rachow, JW, Ryan, L (1988). Inorganic pyrophosphate metabolism in arthritis. *Rheumatic diseases clinics of North America* 14: 289.
- Rigal, D (1881). Observation pour servir a l'histoire de la cheloide diffuse xanthelasmique. *Ann Dermatol Syphilol* 2: 491–501.
- Ronchetti, I, Boraldi, F, Annovi, G, *et al.* (2013). Fibroblast involvement in soft connective tissue calcification. *Frontiers in Genetics* 4: 22.
- Russell, RGG, Xia, Z, Dunford, JE, *et al.* (2007). Bisphosphonates. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1117: 209–57.
- Rutsch, F, Böyer, P, Nitschke, Y, *et al.* (2008). Hypophosphatemia, hyperphosphaturia, and bisphosphonate treatment are associated with survival beyond infancy in generalized arterial calcification of infancy. *Circulation: Cardiovascular Genetics* 1: 133–40.
- Rutsch, F, Nitschke, Y, Terkeltaub, R (2011). Genetics in Arterial Calcification Pieces of a Puzzle and Cogs in a Wheel. *Circulation research* 109: 578–92.
- Rutsch, F, Ruf, N, Vaingankar, S, *et al.* (2003). Mutations in ENPP1 are associated with 'idiopathic' infantile arterial calcification. *Nature genetics* 34: 379–81.
- Sage, AP, Lu, J, Tintut, Y, *et al.* (2010). Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro. *Kidney international* 79: 414–22.
- Saiki, RK, Gelfand, DH, Stoffel, S, *et al.* (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487–91.
- Saito, E, Wachi, H, Sato, F, *et al.* (2007). Treatment with vitamin k (2) combined with bisphosphonates synergistically inhibits calcification in cultured smooth muscle cells. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 14: 317–24.

- Sakamoto, A, Weinstein, LS, Plagge, A, *et al.* (2009). GNAS haploinsufficiency leads to subcutaneous tumor formation with collagen and elastin deposition and calcification. *Endocrine research* 34: 1–9.
- Sakuraoka, K, Tajima, S, Nishikawa, T, *et al.* (1994). Biochemical analyses of macromolecular matrix components in patients with pseudoxanthoma elasticum. *The Journal of dermatology* 21: 98.
- Salanti, G, Amountza, G, Ntzani, EE, *et al.* (2005). Hardy-Weinberg equilibrium in genetic association studies: an empirical evaluation of reporting, deviations, and power. *European journal of human genetics* 13: 840–8.
- Sanger, F, Nicklen, S, Coulson, AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74: 5463–7.
- Le Saux, O, Bunda, S, VanWart, CM, *et al.* (2006). Serum factors from pseudoxanthoma elasticum patients alter elastic fiber formation in vitro. *Journal of Investigative Dermatology* 126: 1497–505.
- Le Saux, O, Urban, Z, Tschuch, C, *et al.* (2000). Mutations in a gene encoding an ABC transporter cause pseudoxanthoma elasticum. *Nature genetics* 25: 223–7.
- Scheffer, GL, Hu, X, Pijnenborg, AC, *et al.* (2002). MRP6 (ABCC6) detection in normal human tissues and tumors. *Laboratory investigation* 82: 515–8.
- Schulz, V, Hendig, D, Henjakovic, M, *et al.* (2006). Mutational analysis of the ABCC6 gene and the proximal ABCC6 gene promoter in German patients with pseudoxanthoma elasticum (PXE). *Human mutation* 27: 831–831.
- Schurgers, L, Spronk, H, Skepper, J, *et al.* (2007). Post-translational modifications regulate matrix Gla protein function: importance for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5: 2503–11.
- Schurgers, LJ, Cranenburg, E, Vermeer, C, *et al.* (2008). Matrix Gla-protein: the calcification inhibitor in need of vitamin K. *Thromb Haemost* 100: 593–603.
- Schurgers, LJ, Uitto, J, Reutelingsperger, CP (2013). Vitamin K-dependent carboxylation of matrix Gla-protein: a crucial switch to control ectopic mineralization. *Trends in Molecular Medicine*.
- Schön, S, Schulz, V, Prante, C, *et al.* (2006). Polymorphisms in the xylosyltransferase genes cause higher serum XT-I activity in patients with pseudoxanthoma elasticum (PXE) and are involved in a severe disease course. *Journal of medical genetics* 43: 745–9.
- Shanahan, CM, Crouthamel, MH, Kapustin, A, *et al.* (2011). Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circulation research* 109: 697–711.
- Shindyapina, A, Mkrtychyan, GV, Gneteeva, T, *et al.* (2013). Mineralization of the connective tissue: a complex molecular process leading to age-related loss-of-function. *Rejuvenation research*.
- Sowa, A-K, Kaiser, FJ, Eckhold, J, *et al.* (2013). Functional Interaction of Osteogenic Transcription Factors Runx2 and Vdr in Transcriptional Regulation of Opn during Soft Tissue Calcification. *The American journal of pathology*.
- St. Hilaire, C, Ziegler, SG, Markello, TC, *et al.* (2011). NT5E mutations and arterial calcifications. *New England Journal of Medicine* 364: 432–42.
- Strandberg, J (1929). Pseudoxanthoma elasticum. *Z Haut Geschlechtskr* 31: 689–94.
- Sweatt, A, Sane, D, Hutson, S, *et al.* (2003). Matrix Gla protein (MGP) and bone morphogenetic protein-2 in aortic calcified lesions of aging rats. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 1: 178–85.
- Szabó, Z, Váradi, A, Li, Q, *et al.* (2011). ABCC6 does not transport adenosine-relevance to pathomechanism of pseudoxanthoma elasticum. *Molecular genetics and metabolism* 104: 421–author.
- Takahashi, A, Camacho, P, Lechleiter, JD, *et al.* (1999). Measurement of intracellular calcium. *Physiological reviews* 79: 1089–125.

- Terkeltaub, RA (2001). Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 281: C1–C11.
- Trion, A, Schutte-Bart, C, Bax, WH, *et al.* (2008). Modulation of calcification of vascular smooth muscle cells in culture by calcium antagonists, statins, and their combination. *Molecular and cellular biochemistry* 308: 25–33.
- Tsui, HW, Inman, RD, Reveille, JD, *et al.* (2007). Association of a TNAP haplotype with ankylosing spondylitis. *Arthritis & Rheumatism* 56: 234–43.
- Uitto, J, Li, Q, Jiang, Q (2009). Pseudoxanthoma elasticum: molecular genetics and putative pathomechanisms. *Journal of Investigative Dermatology* 130: 661–70.
- Uitto, J, Pulkkinen, L, Ringpfeil, F (2001). Molecular genetics of pseudoxanthoma elasticum: a metabolic disorder at the environment-genome interface? *Trends in molecular medicine* 7: 13–7.
- Vaisman, DN, McCarthy, AD, Cortizo, AM (2005). Bone-specific alkaline phosphatase activity is inhibited by bisphosphonates. *Biological trace element research* 104: 131–40.
- Vandesompele, J, De Preter, K, Pattyn, F, *et al.* (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3: research0034.
- van Varik, BJ, Rennenberg, RJ, Reutelingsperger, CP, *et al.* (2012). Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases. *Frontiers in genetics* 3.
- Villa-Bellosta, R, Bogaert, YE, Levi, M, *et al.* (2007). Characterization of Phosphate Transport in Rat Vascular Smooth Muscle Cells Implications for Vascular Calcification. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27: 1030–6.
- Villa-Bellosta, R, Wang, X, Millán, JL, *et al.* (2011). Extracellular pyrophosphate metabolism and calcification in vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 301: H61–H68.
- Villiotte, P, Riefsnyder, P, Bloomstone, J, *et al.* (1991). Uptake of inorganic pyrophosphate by *Bacillus megaterium*. *FEMS microbiology letters* 78: 293–6.
- Wada, T, McKee, MD, Steitz, S, *et al.* (1999). Calcification of vascular smooth muscle cell cultures inhibition by osteopontin. *Circulation research* 84: 166–78.
- Wallin, R, Cain, D, Hutson, SM, *et al.* (2000). Modulation of the binding of matrix Gla protein (MGP) to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 84: 1039–44.
- Wu, Y, Zhang, L, Liu, L, *et al.* (2011). A multifactor dimensionality reduction-logistic regression model of gene polymorphisms and an environmental interaction analysis in cancer research. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 12: 2887–92.
- Xu, H, Li, Z, Wang, H, *et al.* (2013). Expression of ectonucleotide pyrophosphatase-1 in end-plate chondrocytes with transforming growth factor beta 1 siRNA interference by cyclic mechanical tension. *Chinese medical journal* 126: 3886–90.
- Yoshiko, Y, Candelieri, GA, Maeda, N, *et al.* (2007). Osteoblast autonomous Pi regulation via Pit1 plays a role in bone mineralization. *Molecular and cellular biology* 27: 4465–74.
- Zarbock, R, Hendig, D, Szliska, C, *et al.* (2007). Pseudoxanthoma elasticum: genetic variations in antioxidant genes are risk factors for early disease onset. *Clinical chemistry* 53: 1734–40.
- Zarbock, R, Hendig, D, Szliska, C, *et al.* (2009). Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms as prognostic markers for ocular manifestations in pseudoxanthoma elasticum. *Human molecular genetics* 18: 3344–51.
- Zarbock, R, Hendig, D, Szliska, C, *et al.* (2010). Analysis of MMP2 promoter polymorphisms in patients with pseudoxanthoma elasticum. *Clinica Chimica Acta* 411: 1487–90.

-
- Zebboudj, AF, Imura, M, Boström, K (2002). Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *Journal of Biological Chemistry* 277: 4388–94.
- Zhang, Y, Johnson, K, Russell, RGG, *et al.* (2005). Association of sporadic chondrocalcinosis with a 4-basepair G-to-A transition in the 5'-untranslated region of ANKH that promotes enhanced expression of ANKH protein and excess generation of extracellular inorganic pyrophosphate. *Arthritis & Rheumatism* 52: 1110–7.
- Zhu, D, Mackenzie, NC, Farquharson, C, *et al.* (2012). Mechanisms and clinical consequences of vascular calcification. *Frontiers in Endocrinology* 3.
- Zhu, D, Mackenzie, NCW, Millán, JL, *et al.* (2011). The appearance and modulation of osteocyte marker expression during calcification of vascular smooth muscle cells. *PLoS One* 6: e19595.

8 PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN

8.1 Publikationen in *peer-review* Zeitschriften

Dabisch-Ruthe, M., Kuzaj, P., Götting, C., Knabbe, C., Hendig, D. (2014): Pyrophosphates as a major inhibitor of matrix calcification in Pseudoxanthoma elasticum. (Manuskript in Revision).

Dabisch-Ruthe, M., Brock, A., Kuzaj, P., Charbel Issa, P., Szliska, C., Knabbe, C., Hendig, D. (2014): Genetic variants in pyrophosphate metabolizing enzymes are associated with susceptibility to Pseudoxanthoma elasticum. (Manuskript in Revision).

Dabisch-Ruthe, M., Kuzaj, P., Knabbe, C., Hendig, D. (2014): Effect of calcium and phosphate supplementation on ectopic mineralization in Pseudoxanthoma elasticum - a model disease for soft tissue calcification. (Manuskript in Revision).

Dabisch-Ruthe, M., Kuzaj, P., Völker, J.M., Knabbe, C., Hendig, D. (2014): Effect of ectopic mineralization on gene expression of extracellular matrix proteins in Pseudoxanthoma elasticum. (Manuskript in Vorbereitung).

Dabisch-Ruthe, M., Vollmer, T., Adams, O., Knabbe, C., Dreier, J. (2012): Comparison of three multiplex PCR assays for the detection of respiratory viral infections: evaluation of xTAG respiratory virus panel fast assay, RespiFinder 19 assay and RespiFinder SMART 22 assay. BMC Infectious Diseases 2012, 12:163

Mormann, S., Dabisch, M., Becker, B. (2010): Effects of technological processes on the tenacity and inactivation of norovirus genogroup II in experimentally contaminated foods. Applied and Environmental Microbiology, 76 (2), pp. 536-45.

8.2 Kongressvorträge

Dabisch-Ruthe, M., Kuzaj, P., Knabbe, C., Hendig, D. (2013): Characterization of cellular pyrophosphate homeostasis as cause of ectopic calcification in Pseudoxanthoma elasticum. Gordon Research Seminar Elastin, Elastic Fibers & Microfibrils, Biddeford, ME, USA, 20.-21.07.2013.

Dabisch-Ruthe, M., Vollmer, T., Knabbe, C., Dreier, J. (2011): Comparison of three multiplex PCR assays for the detection of respiratory tract infections. 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e.V., Essen, 25.-28.09.2011

Dabisch-Ruthe, M., Mormann, S., Becker, B. (2010): Qualitativer und quantitativer Nachweis sowie Untersuchungsergebnisse zur Überdauerung von Norovirus in Lebensmitteln. Symposium Schnellmethoden und Automatisierung in der Lebensmittel-Mikrobiologie, Hochschule Ostwestfalen-Lippe, 30.06.-02.07.2010.

8.3 Kongressbeiträge und Posterpräsentationen

Dabisch-Ruthe, M., Kuzaj, P., Knabbe, C., Hendig, D. (2013): Characterization of cellular pyrophosphate homeostasis in dermal fibroblasts derived from Pseudoxanthoma elasticum (PXE) patients. 10. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Dresden, 23.-26.10.2013.

Dabisch-Ruthe, M., Kuzaj, P., Knabbe, C., Hendig, D. (2013): Pseudoxanthoma elasticum (PXE): Alterations of cellular pyrophosphate homeostasis as cause of ectopic calcification. ABCC6-Meeting, Budapest, Ungarn, 27.-28.09.2013.

Hendig, D., Dabisch-Ruthe, M., Prior, K.-K., Kuzaj, P., Götting, C., Szliska, C., Charbel-Issa, P., Knabbe, C. (2013): New insights into the pathogenesis of pseudoxanthoma elasticum by identifying genetic interactions and modifiers. Gordon Research Conference Elastin, Elastic Fibers & Microfibrils, Biddeford, ME, USA, 21.-26.07.2013.

Dabisch-Ruthe, M., Kuzaj, P., Knabbe, C., Hendig, D. (2013): Characterization of cellular pyrophosphate homeostasis as cause of ectopic calcification in Pseudoxanthoma elasticum. Gordon Research Conference Elastin, Elastic Fibers & Microfibrils, Biddeford, ME, USA, 21.-26.07.2013.

Dabisch-Ruthe, M., Kuzaj, P., Szliska, C., Knabbe, C., Hendig, D. (2012): Genetic variants in calcification inhibitory proteins associated with Pseudoxanthoma elasticum. 9. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Mannheim, 26.-29.09.2012.

Dabisch-Ruthe, M., Prior, K.-K., Kuzaj, P., Knabbe, C., Hendig, D. (2012): Influence of different fetale bovine serum charges on the calcification process of elastic fibers in Pseudoxanthoma elasticum. 7th European Elastin Meeting, Ghent, Belgien, 1.-4.09.2012.

Mormann, S., Dabisch-Ruthe, M., Becker, B. (2012): Norovirus in food: Effects of technological processes on the tenacity and inactivation of human norovirus genogroup II. International Meeting on Norovirus and Other Caliciviruses on the Rise 2012, 20. - 22. März 2012, Lübeck

Dabisch-Ruthe, M., Vollmer, T., Knabbe, C., Dreier, J. (2011): Comparison of two multiplex PCR assays for the detection of respiratory tract infections. IFCC-WorldLab-EuroMedLab Berlin 2011, 15.-19.05.2011. Clin Chem Lab Med 2011; 49, Special Suppl, pp S1 – S874, Mai 2011

Mormann, S., Dabisch, M., Becker, B. (2009): Effects of technological processes on the tenacity and inactivation of norovirus in foodstuff. Current developments in food and environmental virology, Pisa, 09.-11.10.2008.

9 Erklärung

Hiermit erkläre ich, Mareike Dabisch-Ruthe, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst wurde. Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Wörtliche und sinngemäße Zitate wurden durch entsprechende Quellenangaben kenntlich gemacht.

Bad Salzuflen, den 25.02.2014