

Analyse zellulärer und molekularer Alterungsprozesse bei Pseudoxanthoma elasticum

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

**Fakultät für Chemie
Universität Bielefeld**

vorgelegt von
Janina Tiemann

Bielefeld/Bad Oeynhausen

August 2020

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 2016 bis August 2020

1. Gutachter:

Prof. Dr. med. Cornelius Knabbe
Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin
Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen
Universitätsklinikum der Ruhr-Universität Bochum
Bad Oeynhausen

2. Gutachter:

apl. Prof. Dr. rer. nat. Torben Lübke
Arbeitsgruppe Biochemie I
Fakultät für Chemie
Universität Bielefeld

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Cornelius Knabbe bedanken, der mir ermöglicht hat meine Doktorarbeit am Herz- und Diabeteszentrum NRW durchzuführen. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch für das entgegengebrachte Vertrauen, die Bereitstellung des interessanten Themas sowie das stetige Interesse an der Entwicklung der Arbeit bedanken.

Ich möchte mich außerdem bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Torben Lübke für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Doris Hendig für die Unterstützung bei der Realisierung dieser Arbeit durch hilfreiche Diskussionen und Anregungen sowie für das entgegengebrachte Vertrauen eigene Ideen einzubringen und umzusetzen.

Ich danke zudem Dr. rer. nat. Isabel Faust, die mich ebenfalls im gesamten Verlauf meiner Arbeit mit Tipps und Anregungen unterstützt hat.

Ein weiterer Dank geht an Dr. rer. nat. Andreas Brodehl, welcher mir vor allem bei Fragen zur Methodik der konfokalen Laserscanmikroskopie mit Rat und Tat zur Seite stand.

Des Weiteren danke ich den Mitgliedern der Selbsthilfegruppe für PXE-Erkrankte Deutschlands 1999 e.V., durch die mir die Wichtigkeit meiner Forschung bei jeder Mitgliederversammlung bewusst wurde und mich motiviert hat.

Außerdem danke ich auch allen aktuellen und ehemaligen Kollegen und Kolleginnen aus Labor 11, meinen Master- sowie Bachelorstudierenden sowie allen weiteren Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, die mich bei meiner Arbeit begleitet und unterstützt haben. Vielen Dank für die kollegiale und freundschaftliche Atmosphäre und Zusammenarbeit durch die viele gute und produktive Gespräche und Ideen entstanden sind.

Abschließend gilt mein größter Dank meinen Freunden und meiner Familie, insbesondere meinen Eltern sowie meinem Freund für die große Unterstützung und unendliche Geduld während meiner Promotionszeit. Danke für die stetige Aufmunterung in schwierigen Phasen sowie die geteilte Freude bei Erfolgen während meiner Arbeit.

Zusammenfassung

Pseudoxanthoma elasticum (PXE) ist eine autosomal-rezessive Erkrankung, welche vorrangig durch Mutationen im Gen, welches für das Adenosintriphosphat-Bindungskassettentransporterprotein 6 der Subfamilie C (ABCC6) kodiert, bedingt ist. PXE äußert sich in einer progressiven Kalzifizierung und Fragmentierung der elastischen Fasern des Bindegewebes. Symptomatisch weisen PXE-Patienten häufig eine frühzeitige Arteriosklerose, Hautveränderungen sowie Veränderungen des Augenhintergrundes auf, welche vor allem an die Charakteristika physiologischer Alterung erinnern. Zusätzlich zeigt PXE molekulare Gemeinsamkeiten mit progeroiden Erkrankungen wie dem Hutchinson-Gilford Progerie Syndrom (HGPS). Nichtsdestotrotz ist über eine mögliche Assoziation einer PXE-Erkrankung mit vorzeitigen Alterungsprozessen wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher verschiedene Faktoren des molekularen Alterungsprozesses bei PXE untersucht. Entsprechend der Konzeptionalisierung des Alterungsprozesses nach López-Otín *et al.* wurden im ersten Teil dieser Arbeit die integrativen Kennzeichen, respektive die Veränderung der Konzentration zirkulierender Faktoren im Serum, welche als Biomarker des Alterns bekannt sind, untersucht. Zusätzlich wurden ausgewählte Faktoren auf zellulärer Ebene analysiert. Es zeigten sich für das Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3 sowie für den Growth Differentiation Factor 11 signifikante Veränderungen der Expression, die vor allem im Zellkulturmodell beobachtet werden konnten. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die zelluläre Seneszenz als bekanntes antagonistisches Kennzeichen der Alterung in PXE-Fibroblasten untersucht. Es zeigten sich hierbei eine Erhöhung der Seneszenz-assoziierten- β -Galaktosidase-Aktivität, der *p21*-Genexpression sowie eine deutlich verstärkte Sekretion proinflammatorischer Faktoren, was die These einer vorzeitigen Alterung bei PXE untermauert. Im dritten Teil dieser Arbeit wurden die primären Kennzeichen der Alterung näher betrachtet, um herauszufinden, welche Faktoren bei der Ausbildung der zellulären Seneszenz bei PXE eine Rolle spielen. Trotz der molekularen Ähnlichkeiten mit HGPS, konnten keine Veränderungen der A-Typ Lamin-Expression sowie der nukleären/nukleolären Organisation festgestellt werden. Es konnten jedoch signifikant längere Telomere in den PXE-Fibroblasten detektiert werden. Zusammengefasst schließt dies die Beteiligung von genomischen Alterationen als primäre Ursache der Seneszenz weitestgehend aus. Es konnten ebenfalls keine grundlegenden Veränderungen der Autophagieleistung bzw. des Cholesterolinflux sowie -efflux bei PXE festgestellt werden, was vor dem Hintergrund einer Induktion der Cholesterinbiosynthese, welche in früheren Studien beobachtet wurde, eher auf metabolisch proteostatische Alterationen als mögliche Ursache der zellulären Seneszenz bei PXE hindeutet. Im letzten Teil dieser Arbeit wurde die Wirkung von Atorvastatin auf verschiedene PXE-assoziierte Faktoren getestet. Es zeigte sich, dass Atorvastatin nicht nur einen signifikanten Einfluss auf direkt beteiligte Faktoren der Cholesterinbiosynthese hat, sondern ebenfalls einen signifikanten Effekt auf z.B. an Prenylierungsprozessen beteiligten Faktoren, wie Lamin B1. Der Einfluss von Atorvastatin auf die Expression proinflammatorischer Faktoren, wie Interleukin 6 sowie auf die kalzifizierungsinhibierenden Faktoren Ektonukleotid-Pyrophosphatase/Phosphodiesterase sowie Osteopontin zeigte sich jedoch limitiert. Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit erstmalig ein Zusammenhang zwischen einer ABCC6-Defizienz und einer vorzeitigen molekularen Alterung bei PXE aufgezeigt werden. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit liefern darüber hinaus weitere pathomechanistische Erklärungen zur bereits beschriebenen erfolgreichen Statin-Behandlung als zusätzliche Therapieoption bei PXE.

Abstract

Pseudoxanthoma elasticum (PXE) is an autosomal recessive heritable disorder which is primarily caused by mutations in the *adenosine triphosphate-binding cassette sub-family C member 6* (*ABCC6*) gene which encodes for the appropriate transporter protein. Clinical manifestations are characterized by a progressive calcification and fragmentation of elastic fibers. Thus, PXE patients show premature arteriosclerosis, loss of skin elasticity as well as visual impairments. These symptoms resemble characteristics often observed for the elderly. Additionally, PXE shows molecular similarities with premature aging syndromes like the Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS). Nevertheless, PXE is just barely discussed against the background of premature aging by now.

In this study, relevant factors known to play a role in molecular aging processes are evaluated in serum and primary human dermal fibroblasts of PXE patients. Therefore, this study was structured in three parts according to the concept of aging postulated by López-Otín *et al.* Finally, in a fourth part, the spectrum efficacy of atorvastatin on PXE fibroblasts was evaluated. In the first part of this study the integrative hallmarks of aging, especially the change in concentration of circulating factors in serum which are known biomarkers of aging were analyzed. Additionally, selected factors were evaluated on a cellular level. Generally, the insulin-like growth factor binding protein 3 as well as the growth differentiation factor 11 showed significant alterations especially on a cellular level. Because of this, the cellular senescence as an antagonistic hallmark of aging was further analyzed in PXE fibroblasts. The results showed a significant increase in senescence-associated β -galactosidase activity and *p21* gene expression as well as a significant induction of secretion of proinflammatory factors which support the theory of premature aging processes for PXE. To further analyze the possible reasons which lead to the senescent phenotype of PXE fibroblasts, the third part of this study deals with the primary hallmarks of aging. Despite the molecular similarities with HGPS no essential changes in the expression of A-type lamins as well as in nuclear/nucleoli organization were detected. Furthermore, significant longer telomeres were measured for PXE fibroblasts which mainly exclude genomic alterations as the primary reasons for the senescent phenotype of PXE fibroblasts. Besides this, no changes in autophagic flux as well as cholesterol influx and - efflux were detected which shows that probably mainly metabolic proteostatic alterations based on the induction of cholesterol biosynthesis are responsible for the senescent phenotype of PXE fibroblasts. In the last part of this study the effect of atorvastatin on different PXE-associated factors was tested to broaden the knowledge of the spectrum efficacy of statins in case of PXE. It was shown that besides the effect on factors directly involved in cholesterol biosynthesis atorvastatin seemed to alter the expression of prenylation factors like lamin B1. The effect of atorvastatin on proinflammatory factors like interleukin 6 or on the anti-calcification factors ectonucleotid-pyrophosphatase/phosphodiesterase as well as osteopontin was shown to be limited. In summary, the results of this study for the first time link an *ABCC6* deficiency of primary human dermal fibroblasts of PXE patients to premature molecular aging. Furthermore, the results support the use of statins as a further therapeutic option for PXE by revealing new pathomechanistic insights.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. <i>Pseudoxanthoma elasticum</i>	1
1.2. Symptome und klinische Manifestation einer PXE-Erkrankung.....	1
1.3. Genetischer Hintergrund einer PXE-Erkrankung.....	3
1.4. Pathophysiologie der PXE-Erkrankung.....	5
1.5. Klinische und molekulare Indikatoren frühzeitiger Alterung.....	7
1.6. Aktuelle Therapien bei einer PXE-Erkrankung.....	12
1.7. Therapeutischer Nutzen einer Statintherapie bei PXE.....	13
1.8. Zielsetzung der Arbeit.....	15
2. Material	17
2.1. PXE- und Kontroll-Kohorte.....	17
2.2. Humane Zelllinien.....	18
2.3. Chemikalien und Reagenzien.....	19
2.4. Puffer und Lösungen.....	21
2.5. Kommerzielle Puffer und Lösungen.....	22
2.6. Zellkulturmedien und –zusätze.....	23
2.7. Proteine und Enzyme.....	23
2.8. Antikörper.....	23
2.9. Kommerzielle Test- und Reaktionssysteme.....	24
2.10. Oligonukleotide.....	24
2.11. Verbrauchsmaterialien.....	28
2.12. Geräte.....	29
2.13. Software.....	30
3. Methoden	32
3.1. Zellbiologische Methoden	32
3.1.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	32
3.1.2. Passagieren adhärenter eukaryotischer Zellen.....	32
3.1.3. Bestimmung der Zellzahl.....	32
3.1.4. Kryokonservierung und Revitalisierung eukaryotischer Zellen.....	32
3.1.5. Aussäen adhärenter eukaryotischer Zellen.....	33
3.1.6. Delipidieren von fetalem Kälberserum.....	33
3.1.7. Zellkultivierung in Lipoprotein-deplidierten Medium.....	33

3.1.8.	Behandlung mit Atorvastatin.....	34
3.1.9.	Ernte adhärenter eukaryotischer Zellen für die DNA - sowie RNA-Isolierung	34
3.2.	Molekularbiologische Methoden	34
3.2.1.	Isolierung von Gesamt- DNA aus Zelllysaten.....	34
3.2.2.	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllysaten.....	35
3.2.3.	Photometrische Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	36
3.2.4.	Reverse Transkription	36
3.2.5.	DNA-Amplifikation	36
3.2.5.1.	Gradienten-PCR	37
3.2.5.2.	Quantitative <i>real-time</i> PCR	38
3.2.5.3.	Hydrolysesondenbasierte qPCR	40
3.2.5.4.	Bestimmung der relativen Telomerlänge mittels qPCR	41
3.2.6.	Agarose-Gelelektrophorese	43
3.2.7.	Aufreinigung von PCR-Produkten für die Sequenzierung	43
3.2.8.	Sanger-Sequenzierung der gereinigten PCR-Produkte.....	44
3.3.	Proteinbiochemische Methoden	45
3.3.1.	Messung des Cholesterolgehalts in FCS und LPDS.....	45
3.3.2.	Bichinonsäure-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration.....	45
3.3.3.	Immunfluoreszenzmikroskopie	46
3.3.4.	Fluorimetrischer Nachweis autophagischer Vakuolen	47
3.3.5.	Bestimmung der Plasma PPI-Konzentration	48
3.3.6.	Qualitativer Seneszenzassay.....	48
3.3.7.	Quantitativer Seneszenzassay.....	50
3.3.8.	Antikörper-Array.....	51
3.3.9.	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	52
3.3.9.1.	Bestimmung der CCL11-Proteinkonzentration mittels ELISA	52
3.3.9.2.	Bestimmung der IGF1-Proteinkonzentration mittels ELISA	53
3.3.9.3.	Bestimmung der IGFBP3-Proteinkonzentration mittels ELISA	53
3.3.9.4.	Bestimmung der GDF11-Proteinkonzentration mittels ELISA.....	53
3.3.9.5.	Bestimmung der MCP1-Proteinkonzentration mittels ELISA	54
3.3.10.	Bestimmung der Proteinkonzentration von IL6 im Zellkulturüberstand.....	54
3.3.11.	Bestimmung des Cholesterolinflux sowie -efflux	55
3.4.	Statistische Analysen	57
4.	Ergebnisse	58

4.1. Bestimmung molekularer und zellulärer Biomarker des Alterns im Serum bzw. Plasma sowie in primären Fibroblasten von PXE-Patienten sowie gesunden Kontrollen zur Analyse integrativer Kennzeichen der Alterung	58
4.1.1. Bestimmung molekularer Biomarker des Alterns im Serum und Plasma von gesunden Kontrollen unterschiedlichen Alters	59
4.1.2. Vergleich von molekularen und zellulären Biomarkern des Alterns im Serum und primären Fibroblasten von PXE-Patienten und gesunden Kontrollen.....	62
4.1.2.1. Quantifizierung der CCL11-Serumkonzentration	62
4.1.2.2. Bestimmung der GDF11-Proteinkonzentration im Serum sowie der <i>GDF11</i> -Genexpression in primären Fibroblasten	63
4.1.2.3. Bestimmung der IGF1- und IGF1BP3-Proteinkonzentration im Serum sowie der <i>IGF1BP3</i> -Genexpression in primären Fibroblasten	64
4.2. Identifizierung und Charakterisierung einer möglichen frühzeitigen zellulären Seneszenz als antagonistisches Kennzeichen der Alterung bei PXE	68
4.2.1. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität sowie der Lamin B1-Gen- und Proteinexpression als Seneszenz-assoziierte Marker	68
4.2.2. Relative Gen- sowie Proteinexpression potenziell relevanter Faktoren des Zellzyklus	73
4.2.3. Analyse von Interleukin 6 (IL6), Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP1) sowie Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM1) als Faktoren des Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps bei PXE.....	76
4.3. Analyse potenzieller primärer Kennzeichen der frühzeitigen Alterung bei PXE.	79
4.3.1. Analyse genomischer Alterationen als primäre Ursache der frühzeitigen Alterung bei PXE.....	79
4.3.1.1. Untersuchung der relativen Gen- und Proteinexpression der A-Typ Lamine, sowie deren prozessierender Enzyme bei PXE.....	79
4.3.1.2. Bestimmung der Gen- sowie Proteinexpression von Nucleolin (NCL)	83
4.3.1.3. Bestimmung der relativen Telomerlänge	85
4.3.2. Analyse metabolisch proteostatischer Alterationen als primäre Ursache der frühzeitigen Alterung bei PXE	86
4.3.2.1. Analyse des Cholesterolinflux sowie –efflux	86
4.3.2.2. Untersuchung der Autophagie	87
4.4. Einfluss einer Atorvastatinbehandlung auf verschiedene PXE-assoziierte Faktoren	91
5. Diskussion	95
5.1. Evaluierung integrativer Kennzeichen der Alterung bei PXE.....	95
5.1.1. Veränderte Konzentration und Genexpression relevanter Biomarker des Alterns im Serum und dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten	95
5.2. Evaluierung antagonistischer Kennzeichen der Alterung bei PXE	101

5.2.1. Ausbildung einer zellulären Seneszenz und eines Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps bei Fibroblasten von PXE-Patienten	101
5.3. Evaluierung primärer Kennzeichen der Alterung bei PXE	107
5.3.1. Metabolische nicht aber genomische Alterationen sind potenziell ursächlich für den seneszenten Phänotypen bei Fibroblasten von PXE-Patienten.....	107
5.4. Multifaktorieller Einfluss von Atorvastatin auf die Genexpression bei PXE..	114
5.5. Hypothetisches Modell molekularer zellulärer Zusammenhänge bei PXE und Ausblick auf zukünftige Arbeiten	121
6. Abkürzungsverzeichnis	125
7. Literatur.....	128
8. Publikationen und Poster	147
9. Lebenslauf.....	148
10. Erklärung.....	149

1. Einleitung

1.1. *Pseudoxanthoma elasticum*

Pseudoxanthoma elasticum (PXE) ist eine autosomal-rezessiv vererbare Erkrankung mit einer Prävalenz zwischen 1:25 000 bis 1:100 000. Frauen sind aus bis heute ungeklärten Gründen häufiger betroffen als Männer. Klinisch manifestiert sich PXE in einer progressiven Kalzifizierung und Fragmentierung der elastischen Fasern des Bindegewebes vor allem der Haut, der Augen sowie des kardiovaskulären Systems. PXE-Patienten zeigen häufig eine frühzeitige Arteriosklerose, Hautveränderungen sowie Veränderungen des Augenhintergrundes. Die Ausprägung sowie der Verlauf der Krankheit sind sehr heterogen, was eine Diagnose erschwert (Chassaing *et al.*, 2005; Germain, 2017; Neldner and Struk, 2002). Die Einordnung und Benennung der Erkrankung als *Pseudoxanthoma elasticum* erfolgte erstmals 1896 von Darrier, um die charakteristischen Hautläsionen von gewöhnlichen Xanthomen zu unterscheiden (Darier J, 1896). Erst über 30 Jahre später erkannten die Ophthalmologin Grönblad und der Dermatologe Strandberg im Jahr 1929 einen Zusammenhang zwischen den Haut- und Augenveränderungen, sodass PXE heute auch unter dem Namen Grönblad-Strandberg Syndrom bekannt ist (Grönblad E, 1929; Strandberg J, 1929). Seit dem Jahr 2000 sind Mutationen im Gen, welches für das Adenosintriphosphat (ATP)-Bindungskassettentransporterprotein 6 der Subfamilie C (ABCC6) kodiert, als Ursache für eine PXE-Erkrankung bekannt (Bergen *et al.*, 2000; Le Saux *et al.*, 2000; Ringpfeil *et al.*, 2000). Seitdem wurden mehr als 300 PXE-assoziierte Mutationen des ABCC6-Gens beschrieben (Germain, 2017). Das Substrat und die genaue Funktion des ABCC6-Transporterproteins sind bis heute unbekannt (Vanakker *et al.*, 2013), was eine Aufklärung der Pathomechanismen, trotz der Kenntnis über die kausativen Mutationen im ABCC6-Gen, weiterhin erschwert.

1.2. Symptome und klinische Manifestation einer PXE-Erkrankung

Abgesehen von der großen Heterogenität der Ausprägung und des Verlaufs einer PXE-Erkrankung wird eine Diagnose häufig zusätzlich durch das späte Auftreten erster klinischer Auffälligkeiten erschwert. Die ersten Symptome einer PXE-Erkrankung zeigen sich im Mittel erst in einem Alter von 13 Jahren (Plomp *et al.*, 2010). Es kommt dann in der Regel zunächst zur Ausbildung kleiner gelblicher Papeln auf der Haut besonders in flexiblen Regionen, wie dem seitlichen Bereich des Nackens sowie in den Armbeugen und Kniekehlen.

Mit der Zeit können sich diese kleinen Hautläsionen ausbreiten und große Plaques ledriger und unelastischer Haut bilden. Es kommt zur starken Faltenbildung, die in einem fortgeschrittenen Stadium auch nicht flexible Areale des Körpers betreffen können. Die beschriebenen Hautläsionen sind aber meist ein kosmetisches Problem (Germain, 2017; Marconi *et al.*, 2015; Uitto *et al.*, 2010).

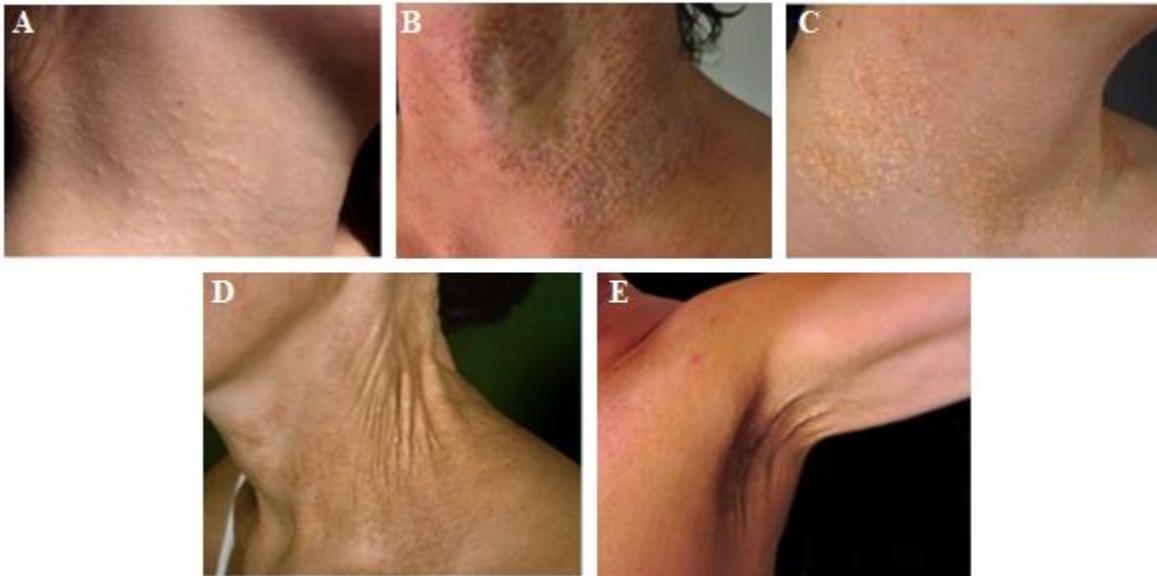


Abbildung 1: Hautveränderungen bei PXE-Patienten. (A) Papeln eines 10-jährigen Mädchens an der rechten Seite des Halses, (B) Plaques eines 31-jährigen Mannes an der linken Seite des Halses, (C) Plaques einer 36-jährigen Frau an der rechten Seite des Halses, (D) Papeln, Plaques und Verlust der Hautelastizität auf der linken Seite des Halses einer 50-jährigen Frau, (E) Falten der Achselhöhle eines 67-jährigen Mannes (Plomp *et al.*, 2010).

Größere Komplikationen zeigen sich bei PXE-Patienten mit der Veränderung des Augenhintergrunds. Diese Veränderungen beginnen mit der Bildung der *Peau d'orange* (Orangenhaut) der Retina, die in den meisten Fällen asymptomatisch ist (Georgalas *et al.*, 2011; Plomp *et al.*, 2010). Im weiteren Verlauf kommt es durch die fortschreitende Mineralisierung der elastischen Lamina der Bruch-Membran zu Brüchen in dieser und dadurch zur Bildung angioide Streifen im Auge (Uitto *et al.*, 2010). Fast 100% aller PXE-Patienten weisen 20 Jahre nach der Erstdiagnose angioide Streifen auf (Plomp *et al.*, 2010). Angioide Streifen selbst bewirken nicht zwangsläufig eine Verschlechterung des Sehvermögens, können jedoch zu einer choroidalen Neovaskularisation (CNV) einhergehend mit Blutungen und Bildung von Narbengewebe bis hin zum Sehverlust beitragen (Gliem *et al.*, 2013).

Vaskuläre Komplikationen treten bei PXE-Patienten meistens nach dem Auftreten von Haut- oder Augenhintergrundveränderungen auf. Dabei leiden die Patienten oft an einer *Claudicatio intermittens* (Schaufensterkrankheit) der oberen sowie unteren Extremitäten (Germain, 2017; Kranenburg *et al.*, 2017). Des Weiteren weisen PXE-Patienten ein erhöhtes

Risiko für Arteriosklerose, *Angina pectoris*, Hypertension sowie für einen Myokardinfarkt oder Schlaganfall auf (Chassaing *et al.*, 2005; Finger *et al.*, 2009; Gliem *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2003; Lefthérotis *et al.*, 2013; Plomp *et al.*, 2010). Durch die Mineralisierung der Blutgefäße der Magen- sowie Darmschleimhaut können diese zudem rupturieren und zu gastrointestinalen Blutungen führen. Die benannten Symptome einer PXE-Erkrankung können, aber müssen nicht immer in den beschriebenen Ausprägungen auftreten. Selbst innerhalb einer Familie kann eine hohe Heterogenität in der Ausprägung sowie im Verlauf beobachtet werden (Uitto *et al.*, 2010). Trotz dieser großen Spanne an möglichen Folgen einer PXE-Erkrankung weisen die Betroffenen jedoch, vor allem bei frühzeitiger Diagnose, keine Beeinträchtigung der Lebenserwartung auf (Laube and Moss, 2005).

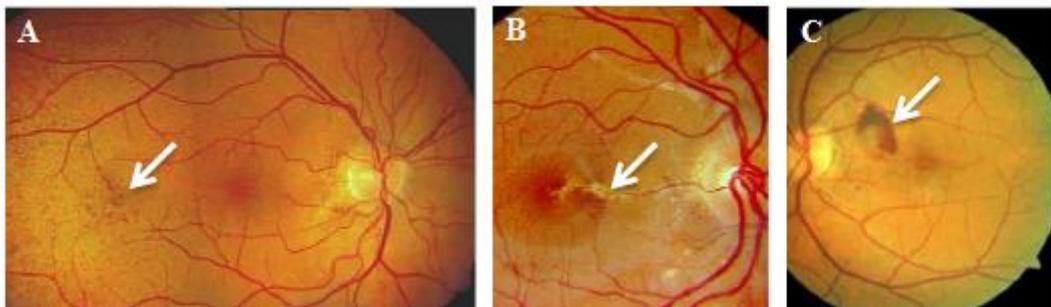


Abbildung 2: Veränderungen des Augenhintergrundes bei PXE-Patienten. (A) *Peau d'orange* (Pigmentunregelmäßigkeiten) der Retina, (B) angioide Streifen, (C) choroidale Neovaskularisation (CNV) (Gliem *et al.*, 2013).

1.3. Genetischer Hintergrund einer PXE-Erkrankung

Da bei einer PXE-Erkrankung vorrangig die elastischen Fasern des Bindegewebes betroffen sind, hat man zugrundeliegende Mutationen erst lange in Genen vermutet, welche mit der Synthese und der Assemblierung der elastischen Fasern assoziiert sind. Hierzu zählten unter anderem Elastin, Fibrillin 1 und Fibrillin 2 sowie die Lysyloxidase (Moitra *et al.*, 2017). Erst seit dem Jahr 2000 ist bekannt, dass Mutationen im Gen, welches für das ABCC6-Transporterprotein kodiert, ursächlich für eine PXE-Erkrankung sind (Bergen *et al.*, 2000; Le Saux *et al.*, 2000; Ringpfeil *et al.*, 2000). Bis heute sind mehr als 300 PXE-assoziierte Mutationen im *ABCC6*-Gen beschrieben worden (Germain, 2017). Das *ABCC6*-Gen selbst liegt auf Chromosom 16p13.1, besteht aus 31 Exons und umfasst damit ~75 kb. Das Spektrum der kausativen Mutationen einer PXE-Erkrankung ist groß und beinhaltet *missense* sowie *nonsense* Mutationen, Spleißstellenalterationen, kleinere Insertionen und Deletionen sowie große Deletionen, die einen Teil oder die gesamte kodierende Region betreffen. Zu den am häufigsten auftretenden Mutationen gehören die *nonsense* Mutation c.3421C>T (p.Arg 1141*) in Exon 24,

welche mit einer Prävalenz von ~30% vor allem in PXE-Patienten europäischer Herkunft vorkommt sowie die Deletion c.2996-1724_4209-478del (p. Ile 1000 Trpfs*60), welche bei etwa 12% der europäischen und 20% der amerikanischen PXE-Patienten auf einem Allel vorliegt (Li *et al.*, 2009; Pfendner *et al.*, 2007; Váradi *et al.*, 2011).

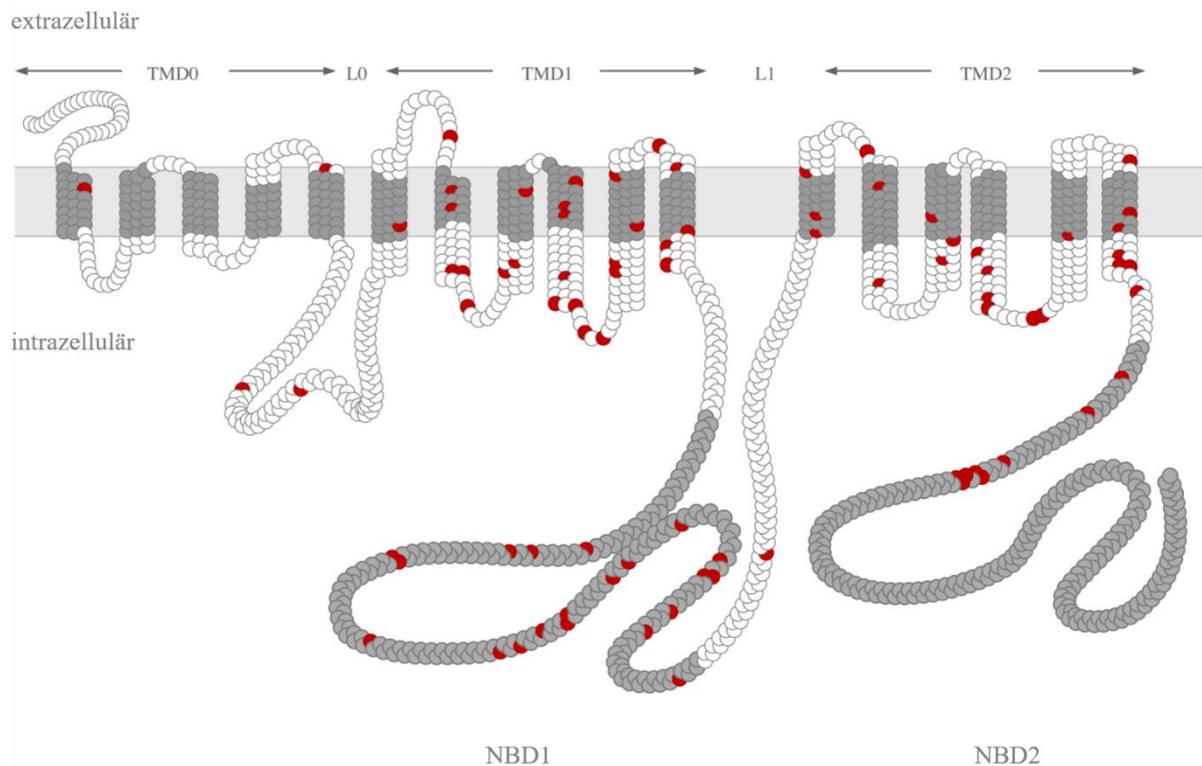


Abbildung 3: Schematischer Aufbau des ABCC6-Proteins. ABCC6 weist drei Transmembrandomänen (TMD0-2) mit je 5-6 Transmembranhelices (dargestellt in grau) auf. Die TMD sind jeweils durch Linkerregionen (L0-1) verbunden. Zusätzlich existieren zwei Nukleotidbindedomänen (NBD1-2). Die roten Punkte zeigen die möglichen bekannten *missense*-Mutationen einer PXE-Erkrankung (geändert nach (Favre *et al.*, 2017)).

Das durch das *ABCC6*-Gen kodierte Transporterprotein ist ein Mitglied der C-Subfamilie der ATP-Bindekassettentransporterproteine. Das ABCC6-Protein ist 165 kDa groß und besteht aus 1503 Aminosäuren. Dabei weist es drei hydrophobe Transmembrandomänen (TMD) bestehend aus 5 bzw. 6 Transmembranhelices auf. Zusätzlich finden sich zwei intrazelluläre Nukleotidbindedomänen (NBD), welche jeweils eine *Walker A* und *B* Sequenz aufweisen, die für die Hydrolyse des ATPs verantwortlich sind. So kommt es durch die Bindung von ATP in den NBD zur Dimerisierung dieser, sodass die *Walker*-Sequenzen eine funktionelle Einheit zur Spaltung des ATPs bilden können (Ran *et al.*, 2018; Uitto *et al.*, 2010). Mutationen in dem Bereich der NBD führen zu strukturellen und in Folge dessen zu funktionellen Beeinträchtigungen des ABCC6-Proteins (Ran *et al.*, 2018).

Eine ABCC6-mRNA- sowie Proteinexpression kann vor allem in der Leber und Niere nachgewiesen werden. In den bei PXE betroffenen Geweben wie der Retina, der Haut sowie dem vaskulären Gewebe zeigen sich nur geringe mRNA-Mengen und kaum bis gar kein detektierbares ABCC6-Protein, was die Ergründung eines Pathomechanismus zusätzlich erschwert (Bergen *et al.*, 2000; Kool *et al.*, 1999; Matsuzaki *et al.*, 2005; Scheffer *et al.*, 2002).

1.4. Pathophysiologie der PXE-Erkrankung

Das physiologische Substrat und damit die genaue Funktion des ABCC6-Transporterproteins ist bis heute unbekannt. Obwohl ABCC6 hauptsächlich in der Leber sowie der Niere exprimiert wird, führt eine ABCC6-Defizienz bei PXE-Patienten zu keinen bzw. geringen pathologischen Veränderungen in diesen Geweben (Finger *et al.*, 2009). Stattdessen sind vor allem periphere Gewebe wie die Retina, die Haut sowie vaskuläre Gewebe betroffen in denen ABCC6 nur in einem geringen Maße exprimiert wird. In der Leber bzw. der Niere ist ABCC6 primär in der basolateralen Membran der Hepatozyten sowie der proximalen Nierentubuli lokalisiert, sodass anzunehmen sein könnte, dass ABCC6 an dem Transport von Biomolekülen aus den Gewebszellen in das Blut beteiligt ist (Bergen *et al.*, 2000; Scheffer *et al.*, 2002). PXE wäre demnach eine metabolische Erkrankung, welche erst sekundär zu einer Kalzifizierung des Bindegewebes im peripheren Gewebe führen würde (Jiang *et al.*, 2009, 2007). Da jedoch vor allem die elastischen Fasern in Bereichen mit einem hohen Vorkommen an Fibroblasten Alterationen aufweisen, ist eine direkte Beteiligung des peripheren Gewebes an der Pathophysiologie einer PXE-Erkrankung nicht auszuschließen (Gheduzzi *et al.*, 2003). Aufgrund dieser und weiterer unklarer Zusammenhänge bezüglich des Pathomechanismus von PXE existieren zwei Hypothesen, die „metabolische Hypothese“ sowie die „zelluläre Hypothese“, welche nicht zwangsläufig im Widerspruch zueinanderstehen, sondern sich durchaus gegenseitig ergänzen können.

Die „metabolische Hypothese“ beschreibt PXE als eine Stoffwechselerkrankung, bei der es durch die ABCC6-Defizienz, vor allem in der Leber, zu einem systemischen Mangel eines oder mehrerer bis heute unbekannter Faktoren im Blut und damit in den peripheren Geweben kommt. Dieser systemische Mangel führt demzufolge letztendlich zur Kalzifizierung des Bindegewebes. Diese Hypothese wird von der Tatsache gestützt, dass sich die klinischen Symptome erst spät zeigen, was auf eine langsame, progressive Kalzifizierung und damit auf eine metabolische Störung hinweist (Uitto *et al.*, 2010). Zudem konnte gezeigt werden, dass Serum von *Abcc6*^{-/-}-Mäusen schlechter in der Lage ist Phosphat-induzierte

Kalzifizierungsprozesse im Zellkulturmodell zu inhibieren als Serum von *Abcc6*^{+/+}-Mäusen (Jiang *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse konnten durch Studien mit Hauttransplantaten sowie durch Parabiose-Experimente verifiziert werden. So zeigten Hauttransplantate von *Abcc6*^{-/-}-Mäusen, wenn sie auf eine *Abcc6*^{+/+}-Maus transplantiert wurden, keine Kalzifizierungen wohingegen Hauttransplantate von *Abcc6*^{+/+}-Mäusen im Fall einer Transplantation auf *Abcc6*^{-/-}-Mäuse Kalzifizierungen aufwiesen. Die Kalzifizierungsprozesse schienen somit maßgeblich abhängig von zirkulierenden Faktoren im Blut bzw. unabhängig vom Genotypen des Transplantats zu sein (Jiang *et al.*, 2009). Parabiose-Experimente zwischen *Abcc6*^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Mäusen zeigten weiterführend, dass sich die Kalzifizierungen in den *Abcc6*^{-/-}-Mäusen durch den gemeinsamen Blutkreislauf mit den Wildtyp-Mäusen reduzieren ließen (Jiang *et al.*, 2010). Eine Inkubation von Fibroblasten gesunder Spender mit Serum von PXE-Patienten führte außerdem zu einer Ablagerung von abnormalen Aggregaten elastischer Fasern (Le Saux *et al.*, 2006). Welche systemischen bzw. zirkulierenden Serumfaktoren zu den aufgeführten Beobachtungen führen bzw. was das physiologische Substrat von ABCC6 ist, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt weitestgehend nicht geklärt. Eine Beteiligung der Kalzifizierungsinhibitoren Fetuin-A sowie des Matrix-Gla-Proteins ist denkbar, da verringerte Konzentrationen dieser Faktoren im Serum von PXE-Patienten gefunden wurden (Hendig *et al.*, 2008c, 2006; Jahn-Dechent *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 1997). Das Matrix-Gla-Protein liegt dabei nicht nur in geringerer Konzentration, sondern ebenfalls häufig vermindert carboxyliert und damit inaktiv im Serum von PXE-Patienten vor, sodass auch Vitamin K als mögliches Substrat von ABCC6 und damit fehlender Serumfaktor diskutiert wurde (Borst *et al.*, 2008; Gheduzzi *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007). Studien zeigten jedoch, dass eine Gabe von Vitamin K einer Kalzifizierung in *Abcc6*^{-/-}-Mäusen nicht entgegenwirken kann, was es damit als Substrat von ABCC6 weitestgehend ausschließt (Gorgels *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2011). ABCC6 wurde zudem eine Rolle in der Freisetzung von Pyrophosphat (PPi) zugesprochen. PPi gilt ebenfalls als Kalzifizierungsinhibitor und liegt nachweislich in verringerter Konzentration im Serum und in dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten vor (Boraldi *et al.*, 2014, 2013; Dabisch-Ruthe *et al.*, 2014; Jansen *et al.*, 2014, 2013; Zhao *et al.*, 2017). Eine Studie von Jansen *et al.* zeigte so, dass infolge einer Überexpression von ABCC6 in *Human Embryonic Kidney* (HEK)293-Zellen ein hoch signifikanter Anstieg der extrazellulären Nukleotridiphosphatkonzentrationen, wie ATP, welche als primäre Quelle zur Bildung von PPi angesehen wird, nachgewiesen werden kann (Jansen *et al.*, 2013). ATP wird jedoch ebenfalls weitestgehend als direktes Substrat von ABCC6 ausgeschlossen (Jansen *et al.*, 2013; Szabó *et al.*, 2011). Einen vielversprechenden Ansatz lieferten Hosen *et al.* durch eine

Molecular Docking-Simulation, bei der über 4600 Metabolite berücksichtigt wurden. Die meisten potenziellen Substrate kamen dabei aus der Klasse der Lipide sowie der Gallensekrete. Die Analyse zeigte zudem, dass viele der wahrscheinlichsten Substrate mit dem Vitamin D-Metabolismus assoziiert sind (Hosen *et al.*, 2014). Dennoch konnten bei ersten Messungen keine eindeutigen Veränderungen der Vitamin D-Konzentration in PXE-Patienten festgestellt werden (Martin *et al.*, 2017).

Die zweite Hypothese, die „zelluläre Hypothese“, postuliert, dass die ABCC6-Defizienz in den Zellen des peripheren Gewebes direkt zu einer Veränderung der Physiologie sowie des Metabolismus dieser führt. So konnte in Fibroblasten von PXE-Patienten, welche unter optimalen Bedingungen *in vitro* kultiviert wurden, über mehrere Passagen hinweg ein charakteristischer Phänotyp nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich vor allem ein verändertes Expressionsprofil mit abnormen Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen, eine abnorme Synthese von Proteoglykanen, eine erhöhte Aktivität der Matrixmetalloproteinase 2 sowie unter anderem veränderte Konzentrationen von Glycerophospholipiden sowie kurzer Peptide (Boraldi *et al.*, 2009; Kuzaj *et al.*, 2014b; Passi *et al.*, 1996; Quaglino *et al.*, 2005, 2000). Zudem zeigte sich, dass zwar viele Organe von PXE-Patienten Alterationen der elastischen Fasern des Bindegewebes aufweisen, aber häufig nicht alle Fasern abnorm sind und nicht alle Organe bei denen Veränderungen der elastischen Fasern nachgewiesen werden konnten, auch klinische Symptome entwickelten. Häufig sind jedoch Alterationen der elastischen Fasern in Bereichen mit einem hohen Vorkommen an Fibroblasten betroffen (Gheduzzi *et al.*, 2003; Quaglino D, Boraldi F, Annovi G, Ronchetti I, 2011). So konnten auch in Hautregionen abnormale elastische Fasern nachgewiesen werden, welche nicht oder noch nicht betroffen waren bzw. keine Kalzifizierung aufwiesen (Lebwohl *et al.*, 1993). Dieses differenzierte Auftreten von Alterationen des Bindegewebes sowie die Tatsache, dass *in vitro* kultivierte Fibroblasten einen charakteristischen Phänotypen über mehrere Passagen hinweg zeigen, weist darauf hin, dass eine ABCC6-Defizienz auch auf lokaler Ebene eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie spielen könnte.

1.5. Klinische und molekulare Indikatoren frühzeitiger Alterung

Aufgrund des begrenzten Wissens über den genauen Pathomechanismus bei PXE werden häufig Vergleiche zu anderen genetischen Erkrankungen gezogen, um daraus mögliche beteiligte Faktoren abzuleiten. In erster Linie wurden und werden bis zum jetzigen Zeitpunkt Informationen aus den teils überlappenden Geno- und Phänotypen von PXE und der

generalisierten infantilen Arterienkalzifikation (GACI) gewonnen. Beide Erkrankungen sind durch ektopische Kalzifizierungen charakterisiert und es konnte gezeigt werden, dass einer GACI-Erkrankung anstatt wie gewöhnlich Mutationen im Gen für die Ektonukleotid-Pyrophosphatase/Phosphodiesterase (ENPP1) auch *ABCC6*-Mutationen zugrunde liegen können. Die phänotypischen und genotypischen Gemeinsamkeiten weisen so darauf hin, dass bei beiden Erkrankungen ähnliche Stoffwechselwege betroffen sein könnten (Li *et al.*, 2014; Nitschke *et al.*, 2012; Nitschke and Rutsch, 2012). Außer bei GACI wurde in verschiedenen anderen Studien ein PXE-ähnlicher Phänotyp, und damit eventuell ähnliche betroffene Stoffwechselwege, auch bei Erkrankungen wie der arteriellen Kalzifizierung bedingt durch eine *CD73*-Defizienz (ACDC) (Markello *et al.*, 2011), der β -Thalassämie (Aessopos *et al.*, 2002), der *cutis laxa* oder bei Mutationen im Gen für die γ -Glutamylcarboxylase (*GGCX*) (Vanakker *et al.*, 2007) diskutiert. Neben diesen bereits diskutierten potenziellen Zusammenhängen, existieren aber auch genetische Erkrankungen, bei denen bis dato trotz eindeutiger klinischer und molekularer Gemeinsamkeiten kaum vergleichende Daten existieren. Dies betrifft vor allem das Hutchinson-Gilford Progerie Syndrom (HGPS), eine genetische Erkrankung, bei der die Betroffenen unter einer Vergreisung im Kindesalter leiden. Klinisch manifestiert sich dies unter anderem in einer starken Faltenbildung der Haut, einem Verlust des subkutanen Fetts sowie frühzeitiger Arteriosklerose. HGPS-Patienten versterben aufgrund der Schwere der Symptome durchschnittlich bereits mit 13 Jahren (Carrero *et al.*, 2016; Gordon *et al.*, 2014; Hennekam, 2006). Neben einzelnen Überschneidungen der klinischen Symptome, wie dem Elastizitätsverlust der Haut, zeigte vor allem eine Studie mit *Lmna*^{G609G/+}-Mäusen, welche die Symptomatiken einer HGPS-Erkrankung aufweisen, eine massive Kalzifizierung der Aorta. Dies war vor allem bedingt durch eine Beeinträchtigung der PPI-Homöostase mit einhergehender erhöhter Alkaline Phosphatase-Aktivität sowie erniedrigten ATP- und PPI-Plasmakonzentrationen (Villa-Bellosta *et al.*, 2013). Diese molekularen Charakteristika lassen sich ebenfalls bei einer PXE-Erkrankung finden (Boraldi *et al.*, 2014, 2013; Dabisch-Ruthe *et al.*, 2014; Jansen *et al.*, 2014, 2013; Zhao *et al.*, 2017). Des Weiteren ergab eine Studie an *Zmpste24*^{-/-}-Mäusen, welche ein weiteres Mausmodell für HGPS darstellt, dass vor allem eine Therapie mit Statinen und Bisphosphonaten die Lebenserwartung dieser Mäuse verlängern kann (Varela *et al.*, 2008). Eine Therapie mit Statinen wird bei PXE diskutiert und Studien wiesen darauf hin, dass eine zusätzliche Gabe von Bisphosphonaten ebenfalls vorteilhaft sein könnte (Guo *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015; Luft, 2013; Pomozi *et al.*, 2017). Aufgrund der klinischen und molekularen Symptomatik ist HGPS vor allem mit einem beschleunigten molekularen Alterungsprozess assoziiert und dient häufig als

Modellerkrankung für diesen (Ashapkin *et al.*, 2019; Brassard *et al.*, 2016; Köks *et al.*, 2016). Fraglich ist jedoch inwieweit bei PXE eine frühzeitige Alterung bzw. ein beschleunigter Alterungsprozess vorliegt, da PXE bis heute nur sehr sporadisch vor diesem Hintergrund betrachtet wurde. Einer der Gründe ist sicherlich die Komplexität des Phänomens Alterung, da eine Einordnung von pathologischen Symptomatiken, wie die bei einer PXE-Erkrankung, in die komplexen Alterungsprozesse häufig erschwert ist bzw. die Datenlage dafür nicht ausreicht.

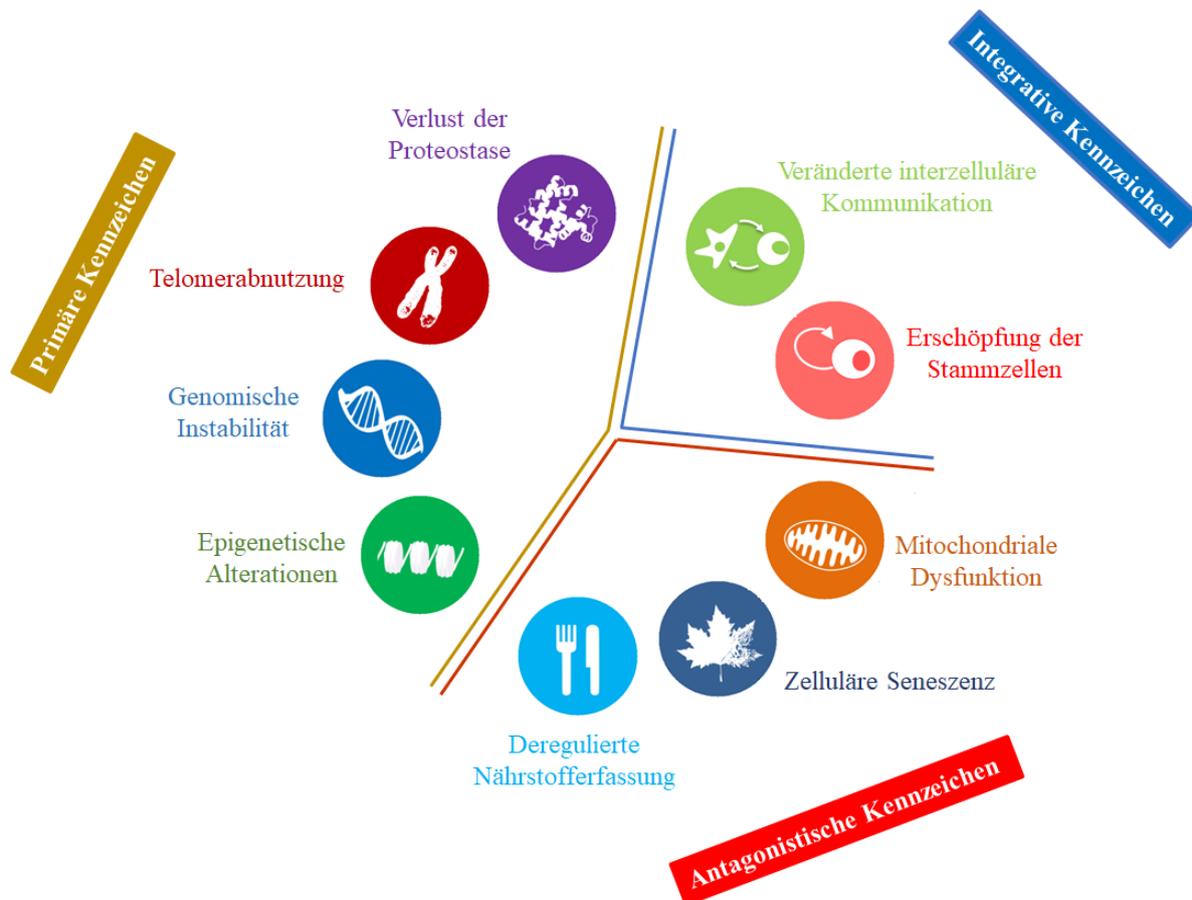


Abbildung 4: Kennzeichen der Alterung bestehend aus den primären Kennzeichen, antagonistischen Kennzeichen und integrativen Kennzeichen (verändert nach (López-Otín *et al.*, 2013)).

Um die Beurteilung und das Verständnis von Alters-assoziierten vor allem molekularen Vorgängen zu erleichtern, lieferten López-Otín *et al.* einen Ansatz zur Konzeptionalisierung des komplexen Alterungsprozesses, indem sie neun Kennzeichen der Alterung definierten (López-Otín *et al.*, 2013) (Abb.: 4). Alterung ist demnach gekennzeichnet durch den progressiven Verlust der physiologischen Funktionalität und Integrität, sodass im Laufe der Zeit mehr Schäden akkumulieren, welche den Organismus immer anfälliger machen für altersbedingte Erkrankungen, wie Krebs, Diabetes oder kardiovaskuläre Erkrankungen, die

letztendlich zum Tod führen. Der Ansatz gliedert zudem die neun definierten Kennzeichen des Alterungsprozesses in drei grundlegende übergeordnete Kategorien. So wird zwischen primären, antagonistischen und integrativen Kennzeichen der Alterung unterschieden, welche nicht isoliert betrachtet werden sollten, jedoch eine klare hierarchische kausale Abfolge aufweisen (Abb.: 5).

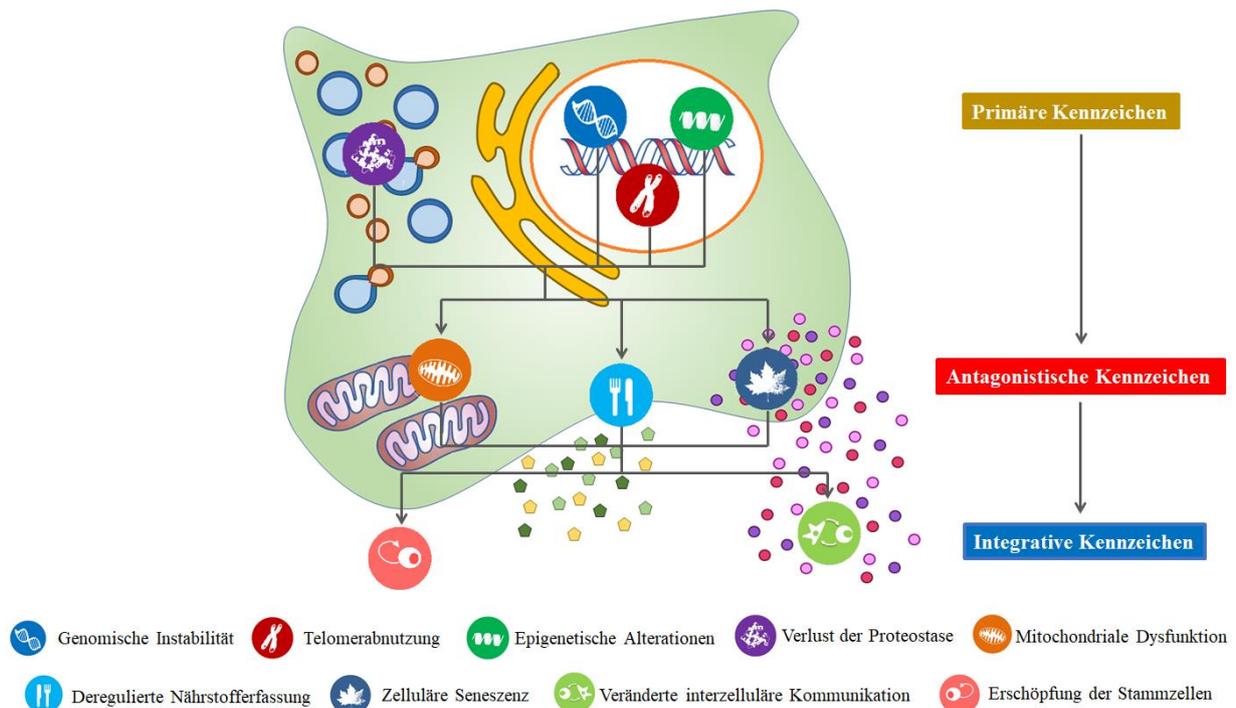


Abbildung 5: Kausaler und funktionaler Zusammenhang der Kennzeichen der Alterung (verändert nach (Gonzalez-Meljem *et al.*, 2018; López-Otín *et al.*, 2013)).

Die primären Kennzeichen beinhalten damit Faktoren, welche ursächlich bzw. förderlich für die Akkumulation zellulärer Schäden sind. Dazu zählen Faktoren wie die genomische Instabilität, Telomerabnutzung sowie epigenetische Alterationen und Alterationen der Proteostase (Aunan *et al.*, 2016; López-Otín *et al.*, 2013; Rebelo-Marques *et al.*, 2018). Im Fall von HGPS ist vor allem eine gesteigerte genomische Instabilität sowie eine Telomerabnutzung ursächlich für die frühzeitige Alterung. So basiert HGPS auf Mutationen im Gen für das Kernhüllenprotein Lamin A, was zu einer Akkumulation einer verkürzten dauerhaft farnesylierten Form von Lamin A, dem Progerin, führt. Die Anhäufung von Progerin beeinträchtigt die Funktionalität und Integrität der Kernlamina und beschleunigt die Telomerabnutzung was letztendlich zu dem schwerwiegenden Krankheitsverlauf bei HGPS führt (Allsopp *et al.*, 1992; Cao *et al.*, 2011; Decker *et al.*, 2009). Im Fall von PXE weisen

vorangegangene Studien darauf hin, dass hier auch metabolisch proteostatische Alterationen eine Rolle spielen könnten. Dabei stehen vor allem die aberrante Expression der Matrixmetalloproteinase 2 und 9 sowie eine Induktion der Hydroxy-Methylglutaryl-Coenzym-A Reduktase (HMGCR) im Vordergrund (Diekmann *et al.*, 2009; Kuzaj *et al.*, 2014a; Quaglino *et al.*, 2005; Zarbock *et al.*, 2010). Ob diese Alterationen jedoch in den Kontext vorzeitiger Alterungsprozesse passen und demnach zu einer Initiation der Faktoren der antagonistischen Kennzeichen führen, ist bis heute schwer zu beurteilen. Die antagonistischen Kennzeichen selbst beschreiben Faktoren, welche die Folgen der Faktoren der primären Kennzeichen kompensieren und eindämmen sollen. Den antagonistischen Kennzeichen sind demnach eine deregulierte Nährstoffaufnahme, mitochondriale Dysfunktionen sowie die Ausbildung zellulärer Seneszenz zugeordnet (López-Otín *et al.*, 2013). Für PXE konnten zwar in *Abcc6*^{-/-}-Mäusen Hinweise auf eine mitochondriale Dysfunktion gezeigt werden (Martin *et al.*, 2012), bezüglich der Beteiligung einer deregulierten Nährstoffaufnahme ist jedoch wenig bekannt. Das antagonistische Kennzeichen der zellulären Seneszenz beschreibt einen durch die Akkumulation zellulärer Schäden (primäre Kennzeichen) ausgelösten permanenten Zellzyklusarrest, durch den die Verbreitung dieser Schäden limitiert bzw. eine Entartung der Zelle verhindert werden soll. Seneszente Zellen teilen sich demnach nicht mehr, aber sind dennoch metabolisch aktiv. Sie weisen zudem unter anderem einen charakteristischen häufig proinflammatorischen Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotypen (SASP) auf, der sich von dem teilender Zellen unterscheidet. Die Ausprägung eines SASPs trägt maßgeblich dazu bei, dass seneszente Zellen durch das Immunsystem aus dem Organismus entfernt werden und es damit zur Erneuerung des Gewebes kommt. Kommt es zu einer Beeinträchtigung des Immunsystems mit steigendem Alter, akkumulieren immer mehr seneszente Zellen im Gewebe, was folglich die Gewebshomöostase negativ beeinflusst und altersbedingte Erkrankungen begünstigt (Muñoz-Espín and Serrano, 2014; S. Watanabe *et al.*, 2017). Für PXE konnte eine gesteigerte zelluläre Seneszenz bislang lediglich in einem *ABCC6-knockdown* Modell in HepG2-Zellen gezeigt werden (Miglionico *et al.*, 2017). Der Nachweis in primären Kulturen bzw. *in vivo* fehlt bis heute. Steigt der Stress durch die zellulären Schäden, sodass die kompensatorischen Mechanismen der Zellen nicht mehr ausreichen, entstehen die integrativen Kennzeichen der Alterung. Diese beinhalten die Erschöpfung der Stammzellen sowie eine veränderte interzelluläre Kommunikation (López-Otín *et al.*, 2013). Für PXE zeigte eine Studie von Baccarani *et al.* eine aberrante Expression von matrixassoziierten Rezeptoren, welche die interzelluläre Kommunikation beeinflussen könnte (Baccarani Contri *et al.*, 1993). Des Weiteren ist bekannt, dass systemische

kalzifizierungsinhibitorische Proteine wie Fetuin-A und das Matrix-Gla-Protein sowie der Kalzifizierungsinhibitor PPI in veränderter Konzentration im Blut von PXE-Patienten und *Abcc6*^{-/-}-Mäusen vorliegt (Hendig *et al.*, 2008c, 2006; Jahnen-Dechent *et al.*, 2011; Jansen *et al.*, 2014, 2013; Luo *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2017). Inwieweit dies besonders im Fall einer PXE-Erkrankung zu einer veränderten interzellulären Kommunikation im Zuge eines potenziellen beschleunigten Alterungsprozesses beiträgt, bleibt diskutabel.

1.6. Aktuelle Therapien bei einer PXE-Erkrankung

Durch das eingeschränkte Wissen über die genaue Funktion des ABCC6-Transporterproteins und damit den Pathomechanismus von PXE gibt es bis heute keine spezifische und effektive Therapie. Die typischen Hautläsionen einer PXE-Erkrankung können bei Bedarf mittels eines operativen Eingriffes meist nachhaltig entfernt werden. Dabei kann es jedoch durch eine beeinträchtigte Wundheilung zu verstärkten Narbenbildungen kommen (Viljoen *et al.*, 1990). Entwickelt ein PXE-Patient durch die Ausbildung angioider Streifen im Auge eine CNV, wird diese zum jetzigen Zeitpunkt meistens durch intravitreale Injektionen eines *vascular endothelial growth factor* (VEGF) Antagonistens, wie dem Bevacizumab (Avastin) oder Ranibizumab (Lucentis) therapiert (Bhatnagar *et al.*, 2007; Mimoun *et al.*, 2017; Pedersen *et al.*, 2007). Um vor allem vaskuläre Komplikationen vorzubeugen und zu behandeln, wird bei vielen PXE-Patienten eine Medikation mit Statinen vorgenommen. In einer Umfrage unter 1747 PXE-Patienten aus der *PXE International Patient Registry*, gab ein Drittel an Cholesterin-senkende Medikamente zu nehmen oder in der Vergangenheit genommen zu haben (Germain, 2017). Die genauen molekularen Mechanismen, die durch die Behandlung mit Statinen die Progression einer PXE-Erkrankung beeinflussen, sind bis heute nicht abschließend geklärt. Neben der Therapie mit Statinen wird auch eine Medikation mit Bisphosphonaten in Betracht gezogen. So zeigte eine vorangegangene Studie mit *Abcc6*^{-/-}-Mäusen, dass durch die Gabe des nicht Stickstoff-haltigen Bisphosphonats Etidronat eine Mineralisierung in diesen Mäusen reduziert werden kann. Eine Behandlung mit dem Aminobisphosphonat Alendronat zeigte keine Effekte in den *Abcc6*^{-/-}-Mäusen (Li *et al.*, 2015). Der Grund für diese selektive Wirkung bestimmter Bisphosphonate bzw. Bisphosphonat-Klassen ist jedoch bis heute nicht eindeutig geklärt. Trotz der positiven Wirkung im Hinblick auf die Vermeidung von Gefäßverschlüssen ist die Gabe von nichtsteroidalen Antirheumatikern, wie Acetylsalicylsäure (Aspirin) bei einer PXE-Erkrankung wegen des erhöhten Risikos für gastrointestinale Blutungen häufig kontraindiziert. Eine solche Therapie ist jedoch trotzdem möglich, wenn das

Risiko einer Blutung zu Gunsten des Verhinderns von Gefäßverschlüssen durch diese Medikamente nach sorgfältiger Abwägung in Kauf genommen werden kann (Chassaing *et al.*, 2005; Germain, 2017). Jegliche medikamentöse Therapie zur Behandlung oder Vorbeugung von Gefäßverschlüssen sollte durch physisches Training, wie z.B. sich in ihrer Länge steigernde regelmäßige Spaziergänge, unterstützt werden, da dies bei Patienten mit *Claudicatio intermittens* nachweislich zur Verbesserung der Symptome führt (Amighi *et al.*, 2004).

1.7. Therapeutischer Nutzen einer Statintherapie bei PXE

Statine sind Cholesterin-senkende Medikamente, welche die HMGCR, das Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese, inhibieren. Die HMGCR katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterinbiosynthese, die Umwandlung des Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA) zu Mevalonat. Alle Statine sind kompetitive Inhibitoren der HMGCR und besitzen demnach eine funktionelle Gruppe, welche dem HMG-CoA ähnelt. Diese funktionelle Gruppe ist mit einer komplexen hydrophoben Ringstruktur kovalent verknüpft. Verschiedene Seitengruppen dieser Ringstruktur beeinflussen zudem die Löslichkeit und damit die pharmakokinetischen Eigenschaften der unterschiedlichen Statine. Atorvastatin, Simvastatin, Fluvastatin und Lovastatin sind somit eher lipophil wohingegen Pravastatin eher hydrophil veranlagt ist. Auch die Form, in der die Statine verabreicht werden, unterscheidet sich. Lovastatin und Simvastatin stellen dabei die einzigen beiden Statine dar, welche als inaktive Substanzen in der Lacton-Form verabreicht und dann durch die Hydrolyse *in vivo* aktiviert werden. Atorvastatin, Fluvastatin sowie Pravastatin werden hingegen in ihrer bereits aktiven Form appliziert (Corsini *et al.*, 1999, 1995; Istvan and Deisenhofer, 2001; Schachter, 2005). Wie bereits erwähnt, wird ein nennenswerter Anteil der PXE-Patienten mittels Statinen therapiert oder hat in der Vergangenheit eine solche Therapie erhalten (Germain, 2017). Auf welchem molekularen Mechanismus der therapeutische Erfolg von Statinen bei einer PXE-Erkrankung zurückzuführen ist, ist nicht genau bekannt. Studien von Kuzaj *et al.*, in primären dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten zeigten, dass bei PXE eine gestörte Cholesterinhomöostase vorliegt, woraus sich dann schließlich ein Ansatz für eine erste Erklärung auf molekularer Ebene für den therapeutischen Erfolg einer Statintherapie bei einer PXE-Erkrankung ergab (Kuzaj *et al.*, 2014a). Es ist jedoch auch bekannt, dass Statine diverse weitere Effekte unabhängig der Cholesterin-senkenden Wirkung auslösen können. So zeigte eine Studie von Jacob *et al.*, dass eine Therapie mit Statinen die Mortalität in Probanden zwischen 70 und 90 Jahren unabhängig von dem Cholesterinlevel der Probanden senken kann

(Jacobs *et al.*, 2013). Ein weiteres Beispiel stellt unter anderem der erfolgsversprechende Therapieansatz mit Statinen bei HGPS da. Eine Studie von Varela *et al.* ergab so, dass eine Therapie mit Statinen, welche durch die Gabe von Bisphosphonaten ergänzt wird, auch die Lebensdauer bei HGPS positiv beeinflussen kann (Varela *et al.*, 2008). So läuft aktuell eine klinische Studie zu einer Kombinationstherapie mit Pravastatin, Zolendronat und Lonafarnib bei Patienten mit HGPS (Klinische Studie: NCT00916747) (Carrero *et al.*, 2016). Der Wirkmechanismus von Statinen, welcher zu einem positiven Effekt in den HGPS-Patienten führt, wird weitestgehend der Verhinderung der Prenylierung von Lamin A bzw. Progerin durch die Inhibierung der HMGCR und damit der Reduktion der für die Prenylierung notwendigen Intermediate der Cholesterinbiosynthese Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) zugesprochen (Varela *et al.*, 2008) und damit weniger der reinen Reduktion der Cholesterinkonzentration. Die Beeinträchtigung der Synthese der Isoprenoide FPP und GGPP beeinflusst nicht nur die Prenylierung von Laminen, sondern auch die Prenylierung von kleinen GTPasen wie Ras, Rho, Rac und Rab. Die Prenylierung der kleinen GTPasen ist unter anderem notwendig für ihre korrekte Lokalisierung und damit ihre Funktion (Das, 2001; Magee and Marshall, 1999; Molnár *et al.*, 2001; Pereira-Leal *et al.*, 2001). Aktive GTPasen der Rho-Familie führen dabei z.B. über die Aktivierung der Janus Kinase (JAK) und als Folge dessen der *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT) 3 zu einer Induktion der Interleukin (IL) 6-Expression. Statine haben demnach ebenfalls eine antiinflammatorische Wirkung (Omoigui, 2007). Studien zeigten weiterführend, dass Statine ebenfalls eine Wirkung auf Kalzifizierungsprozesse haben. So ergab eine Studie mit *Abcc6*^{-/-}-Mäusen, dass eine Gabe von Atorvastatin zwar eine Mineralisierung nicht reversieren, aber dennoch aufhalten konnte (Guo *et al.*, 2013). Die molekularen Mechanismen, die in diesem Fall zur Verhinderung der Kalzifizierung in den *Abcc6*^{-/-}-Mäusen führen, sind allerdings nicht eindeutig geklärt. Dennoch existieren weitere Studien in denen Kalzifizierungsprozesse durch eine Atorvastatinbehandlung aufgehalten werden und teils ebenfalls auf eine Beteiligung der kleinen GTPasen hinweisen (Kizu *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2010; Rajamannan *et al.*, 2005). Andere Studien zeigten ebenfalls, dass Statine die Osteoblastendifferenzierung stimulieren und damit eine Mineralisierung eher begünstigen (Maeda *et al.*, 2004, 2001). Diese vielseitigen Ergebnisse über die Wirkung von Statinen zeigt, dass für eine umfassendere Beurteilung des therapeutischen Nutzens einer Statintherapie bei PXE-Patienten mehr Daten vor allem über die Wirkung jenseits der Cholesterin-senkenden Eigenschaft gesammelt werden müssen. Gerade durch den Zusammenhang der molekularen Charakteristika von HPGS und PXE kann ein

Einfluss der Statine auf molekulare Alterungsprozesse bei PXE nicht ausgeschlossen werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

1.8. Zielsetzung der Arbeit

PXE ist eine autosomal-rezessiv vererbare Erkrankung, welche durch eine progressive Kalzifizierung der elastischen Fasern des Bindegewebes charakterisiert ist. Neben der klinischen Symptomatik einer PXE-Erkrankung wie dem Elastizitätsverlust der Haut oder der vorzeitigen Makuladegeneration, welche an Charakteristika physiologischer Alterung erinnern, weist PXE zudem einige molekulare Gemeinsamkeiten mit bekannten progeroiden Erkrankungen, wie HGPS, auf bei denen ein vorzeitiger bzw. beschleunigter Alterungsprozess nachgewiesen wurde. Trotz dieser Tatsachen wurde PXE bis heute nur bedingt vor dem Hintergrund einer vorzeitigen Alterung betrachtet.

Entsprechend des Modells von López-Otín *et al.* zur Konzeptionalisierung des komplexen Alterungsprozesses ist der erste Teil dieser Arbeit in drei aufeinander aufbauende Projekte unterteilt. Zur initialen Beurteilung eines potenziellen Alterungsprozesses sollten im ersten Projekt Faktoren der integrativen Kennzeichen der Alterung, insbesondere der interzellulären Kommunikation, betrachtet werden. Dazu sollte zunächst die Serumkonzentration bekannter Biomarker des Alterns in gesunden Probanden unterschiedlichen Alters analysiert werden. Nachfolgend erfolgte die vergleichende Analyse der Konzentration dieser Biomarker im Serum von PXE-Patienten und gesunden Kontrollen. Bei abweichenden oder nicht eindeutigen Ergebnissen wurde dafür ebenfalls die Genexpression einzelnen Biomarker in primären dermalen Fibroblasten untersucht. Im zweiten Projekt sollte eine tiefergehende Analyse des Alterungsprozesses bei PXE durch die Betrachtung antagonistischer Kennzeichen der Alterung auf zellulärer Ebene in humanen dermalen Fibroblasten durchgeführt werden. Da durch vorherige Studien bekannt ist, dass der PXE-Phänotyp in Fibroblasten vor allem unter Entzug exogener Lipoproteine/Cholesterin verstärkt wird, wurden die Zellkulturen in diesem Teil sowie in den nachfolgenden Teilen der Arbeit zusätzlich oder, im Fall der Atorvastatinbehandlung, ausschließlich in Medium mit 10% Lipoprotein-deplidiertem fetalem Kälberserum (LPDS) durchgeführt. Die Analyse der antagonistischen Kennzeichen umfasst dabei die Untersuchung der zellulären Seneszenz und des SASPs, sowie die Identifikation potenziell relevanter Zellzyklusinhibitoren und weiterer Faktoren der Zellzykluskontrolle. Im dritten Part sollten nähere Informationen über die primären Kennzeichen und damit der eigentlichen Ursache des möglicherweise beschleunigten Alterungsprozesses gesammelt

werden. Hier sollte dabei, vor allem im Hinblick auf weitere mögliche Gemeinsamkeiten zu HGPS, die genomische Instabilität mit der Evaluierung der A-Typ Lamine sowie der Telomerabnutzung betrachtet werden. Des Weiteren sollte eine erste Betrachtung proteostatischer Faktoren wie der Autophagieleistung bei ABCC6-Defizienz vorgenommen werden.

Die nähere Charakterisierung des molekularen Alterungsprozesses bei PXE sollte neben eines besseren Verständnisses für den Pathomechanismus bei PXE auch Informationen darüber liefern, ob, wie bei HGPS, die Therapie mit Statinen einen therapeutischen Nutzen abseits der reinen Cholesterin-senkenden Wirkung bei PXE haben könnte. In einem letzten Teil dieser Arbeit sollte daher der Einfluss von Atorvastatin auf verschiedenste PXE und Alterungs-assoziierte Faktoren in primären dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten analysiert werden.

2. Material

2.1. PXE- und Kontroll-Kohorte

Bei allen PXE-Patienten, deren Probenmaterialien in dieser Arbeit verwendet wurde, ist die PXE-Diagnose entsprechend der Konsensus-Kriterien gesichert (Plomp *et al.*, 2010). Alters- und geschlechtsadjustierte Blutspender dienten in der vorliegenden Arbeit als gesunde Kontrollen. Alle Probanden haben der Verwendung ihrer Materialien zugestimmt. Die Ethikkommission des HDZ NRW hat dem Forschungsvorhaben zugestimmt.

Für die Analyse des Konzentrationsverlaufs der Biomarker des Alterns im Blut von gesunden Spendern unterschiedlichen Alters wurde die Kontroll-Kohorte in drei Untergruppen aufgeteilt. Die entsprechenden Gruppen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Für die vergleichenden Analysen wurden sowohl die PXE- als auch die Kontroll-Kohorte in je zwei altersspezifische Untergruppen unterteilt. Dabei ergab sich für jede Kohorte eine Gruppe mit Spendern < 45 Jahren und eine mit Spendern > 45 Jahren. Die Alters- und Geschlechtsverteilung ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 1: Alters- und Geschlechtsverteilung der gesunden Kontrollen

Gruppe	Kontroll-Kohorte (CCL11, GDF11, IGF1, IGFBP3) (n = 45)	Kontroll-Kohorte (PPi) (n = 70)
<i>≤ 30 Jahre</i>		
weiblich	8 (20,0 ± 3,87 Jahre)	15 (25,1 ± 3,00 Jahre)
männlich	—	11 (24,36 ± 4,12 Jahre)
<i>31-49 Jahre</i>		
weiblich	14 (39,3 ± 8,22 Jahre)	10 (41,4 ± 6,18 Jahre)
männlich	8 (43,6 ± 5,63 Jahre)	15 (39,6 ± 5,44 Jahre)
<i>≥ 50 Jahre</i>		
weiblich	10 (57,2 ± 5,64 Jahre)	7 (55,3 ± 3,95 Jahre)
männlich	5 (56,6 ± 6,25 Jahre)	12 (53,7 ± 3,88 Jahre)

Tabelle 2: Alters- und Geschlechtsverteilung der PXE- und Kontroll-Kohorte

Gruppe	PXE-Kohorte (n = 45)	Kontroll-Kohorte (n = 45)
<i>< 45 Jahre</i>		
weiblich	18 (31.9 ± 7.86 Jahre)	18 (32.0 ± 7.87 Jahre)
männlich	5 (39.6 ± 4.51 Jahre)	5 (39.8 ± 4.60 Jahre)
<i>> 45 Jahre</i>		
weiblich	14 (55.0 ± 8.20 Jahre)	14 (54.7 ± 7.53 Jahre)
männlich	8 (54.6 ± 9.38 Jahre)	8 (53.6 ± 6.70 Jahre)

2.2. Humane Zelllinien

Normale humane dermale Fibroblasten (Kontroll-Fibroblasten) von gesunden Spendern wurden von *Coriell Institute for Medical Research* (Camden, USA) kommerziell erworben. Dermale Fibroblasten von PXE-Patienten wurden aus Hauptbiopsien gewonnen. Die Charakteristika der verwendeten Fibroblasten sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Charakteristika der verwendeten PXE- sowie Kontroll-Fibroblasten

Zelllinie	Geschlecht	Alter ¹	Entnahme- region	ABCC6-Genotyp ²		Genotypstatus
<i>PXE-Patient</i>						
P3M ^a	männlich	57	Hals	c.3421C>T (p.Arg1141*)	c.3883-6G>A (SSM)	cht
P128M ^a	männlich	51	Hals	c.3769_3770insC (p.L1259fsX1277)	c.3769_3770insC (p.L1259fsX1277)	hm
P255F ^a	weiblich	48	Arm	c.3421C>T (p.Arg1141*)	c.2787+1G>T	cht
<i>Kontrolle</i>						
M57A ^b (AG13145)	männlich	57	Arm	-	-	wt
M52A ^b (AG11482)	männlich	52	Arm	-	-	wt
F48A ^b (AG14284)	weiblich	48	Arm	-	-	wt

hm, homozygot; cht, compound heterozygot; ht, heterozygot; wt, Wildtyp; SSM, Spleißstellenmutation

^aFibroblasten wurden aus Hautbiopsien expandiert (Hendig *et al.*, 2008b).

^bFibroblasten wurden von *Coriell Institute for Medical Research* (Camden, USA) kommerziell erworben.

¹Alter in Jahren.

²Nukleotidnummerierung basiert auf der cDNA Sequenz mit A als erste Nukleinsäure im ATG Translationsstart +1 (GenBank Accessionnummer NM_001171.2).

2.3. Chemikalien und Reagenzien

3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio] propane-sulfonate) (CHAPS)	Sigma, Taufkirchen
4-Methylumbelliferyl β -D-galactopyranoside Sigma (MUG)	Sigma, Taufkirchen
4-Chloro-3-Indolyl β -D-Galaktosid (x-Gal)	Sigma, Taufkirchen

Aceton	Merck, Darmstadt
Adenosine 5'-phosphosulfate sodium salt (APS)	Sigma, Taufkirchen
Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate (FLAAS)	Sigma, Taufkirchen
Atorvastatin calcium salt	Sigma, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Benzamidin	Sigma, Taufkirchen
Bicinchoninsäure	Sigma, Taufkirchen
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen
Cab-O-sil (Silicic anhydride)	Sigma, Taufkirchen
DAPI	Thermo Fisher, Carlsbad
Diethanolamin	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
DNA-Längenstandard pUC19/MspI	MBBL, Bielefeld
dNTPs (100 mM)	Solis BioDyne, Tartu, EST
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (absolut)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (EtBr 0,5 mg/mL)	Sigma, Taufkirchen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, Taufkirchen
<i>Firefly-luciferase-assay-ATP-mix</i> (FLAAM)	Sigma, Taufkirchen
Formaldehydlösung, 37 %	Sigma, Taufkirchen
Kaliumferrocyanid	Sigma, Taufkirchen
Kaliumferricyanid	Sigma, Taufkirchen
Kupfersulfatlösung	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumdichlorid	Serva, Heidelberg
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt

Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
Oligo (dT)12-18 Primer	Biomers, Ulm
Roti Histofix 4 %	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Sephadex G50/G150	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
TRIS	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen
Wasser (Ampuwa)	Fresenius-Kabi, Bad Homburg
Wasser (Aqua B. Braun)	B. Braun, Melsungen
Wasser (UPLC-Gradient-Grade)	Thermo Scientific, USA
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

2.4. Puffer und Lösungen

10 x TBE-Puffer	1000 mM TRIS-HCl 10 mM EDTA 900 mM Borsäure pH 8,4
DNA-Ladepuffer	0,05 % Xylenxyanol 0,05 % Bromphenolblau 60 % Saccharose
BCA-Arbeitslösung	98 % Bikuninsäure 2 % Kupfersulfat

Färbelösung (qualitativer Seneszenzassay)	0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat
	0,1 M Zitronensäure
	5 mM Ferrocyanid
	5 mM Ferricyanid
	150 mM NaCl
	2 mM MgCl ₂
	1 mg/mL X-Gal
Lysepuffer (quantitativer Seneszenzassay)	0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat
	0,1 M Zitronensäure
	5 mM CHAPS
	0.5 mM Benzamidine
	0.25 mM PMSF
Reaktionspuffer (quantitativer Seneszenzassay)	0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat
	0,1 M Zitronensäure
	300 mM NaCl
	10 mM β -Mercaptoethanol
	4 mM MgCl ₂
	1,7 mM MUG

2.5. Kommerzielle Puffer und Lösungen

BigDye Puffer (5x)	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
Pierce RIPA Puffer	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA

2.6. Zellkulturmedien und –zusätze

Antibiotikum/Antimykotikum (100 x)	PAN-Biotech, Aidenbach
DMEM (1 x, high glucose)	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
DMEM <i>Fluorobrite</i>	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Biowest, Nuaille, Frankreich
L-Glutamin (200 mM)	PAN-Biotech, Aidenbach
DPBS (1 x)	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
Trypsin-EDTA-Lösung (10 x)	PAN-Biotech, Aidenbach

2.7. Proteine und Enzyme

ATP-Sulfurylase	New England BioLabs, Frankfurt
HotStart Taq DNA- Polymerase (5 U/ μ L)	Qiagen GmbH, Hilden
Humanes <i>High Density</i> Lipoprotein, gelöst	Merck, Darmstadt
Kollagen Typ I (5 mg/mL)	Ibidi, Planegg
Superscript II Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA

2.8. Antikörper

<i>Rabbit monoclonal</i> Anti-Lamin A/C (ab108595)	Abcam, Cambridge, UK
<i>Mouse monoclonal</i> Anti-Progerin (ab66587)	Abcam, Cambridge, UK
<i>Mouse monoclonal</i> Anti-Nucleolin (ab13541)	Abcam, Cambridge, UK
<i>Rabbit polyclonal</i> Anti-Lamin B1 (ab16046)	Abcam, Cambridge, UK
<i>Mouse monoclonal</i> Anti-LAMP-1 (ab25630)	Abcam, Cambridge, UK
FITC-konjugierter <i>goat-anti-rabbit</i>	Jackson Immuno Research, UK
TRITC-konjugierter <i>goat-anti-mouse</i>	Jackson Immuno Research, UK

2.9. Kommerzielle Test- und Reaktionssysteme

<i>Autophagy Detection Kit</i>	Abcam, Cambridge, UK
BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	ABI, Foster City, USA
Cholesterol-Effluxassaykit	Abcam, Cambridge, UK
Human CCL2/MCP-1 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Abingdon, UK
Human CCL11/Eotaxin Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Abingdon, UK
Human GDF-11/BMP-11 DuoSet ELISA Kit	R&D Systems, Abingdon, UK
Human IGF-1 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Abingdon, UK
Human IGFBP3 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Abingdon, UK
hGUSB, endogene Kontrolle	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
hRPLPO, endogene Kontrolle	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
LightCycler 480 SYBR-Green I Master	Roche, Mannheim
MSB Spin PCRapace Kit	Stratec Biomedical AG, Birkenfeld
NucleoSpin Blood	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin RNA II	Macherey-Nagel, Düren
<i>Relative Human Telomere Length Quantification qPCR Assay Kit</i>	ScienCell, San Diego, USA
Superscript II Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
TaqMan Universal Mastermix	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA

2.10. Oligonukleotide

Tabelle 4: Oligonukleotide für die qPCR.

Gen	5'-3'Sequenz	Produktlänge [bp]	Referenz ¹	Annealing Temperatur (°C)
<i>β-ACTIN</i>	CGCGAGAAGATGACCC	411	NM_001101	59
<i>Beta-Actin</i>	ATTGCCAATGGTGATGAC			

Tabelle 4: Oligonukleotide für die qPCR (Fortsetzung).

Gen	5'-3'Sequenz	Produktlänge [bp]	Referenz ¹	Annealing Temperatur (°C)
<i>β2M</i>	TGTGCTCGCGCTACTCTCTCTT	137	NM_004048	59
<i>Beta-2-microglobulin</i>	CGGATGGATGAAACCCAGACA			
<i>ENPPI</i>	AATGCCCTTTGGACACT	151	NM_006208	59
<i>Ektonukleotidpyrophosphatase 1</i>	CCCGTAACTTTTGGT			
<i>FDPS</i>	TTGCTCCTCCCTCAGAATGAAC	185	NM_001135821.1	59
<i>Farnesyl-diphosphat Synthase</i>	TGCCTCCAATGGCATTGTACT			
<i>FNTB</i>	ATGCGCGTTGTTGCTTAACG	281	NM_002028.3	66
<i>Protein farnesyltransferase subunit beta</i>	TCTGCAAAAACAAGCCTTGGTACA			
<i>GAPDH</i>	AGGTCGGAGTCAACGGAT	223	NM_002046	59
<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase</i>	TCCTGGAAGATGGTGATG			
<i>GDF11</i>	AGGCCATTGGCAGAGCATCGAC	289	NM_005811.3	63
<i>Growth differentiation factor 11</i>	GTCCCAGCCGAAAGCCTCAAAG			
<i>GUSB</i> <i>β-Glucuronidase</i>	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA			60
<i>HDLBP</i>	GAACGCAGTTCACAGTACAG	217	NM_005336	60
<i>High density lipoprotein-binding Protein</i>	GTAACGGTGAAGGTCAAAGG			

Tabelle 4: Oligonukleotide für die qPCR (Fortsetzung).

Gen	5'-3'Sequenz	Produktlänge [bp]	Referenz ¹	Annealing Temperatur (°C)
<i>HMGCR</i>	AAGTTTGCCCTCAGTTCC	179	NM_000859.2	59
<i>HMG-CoA Reduktase</i>	ACTGACATGCAGCCAAAG			
<i>ICAM1</i>	ACCATCTACAGCTTTCCGGC	293	NM_000201.3	63
<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>	CAATCCCTCTCGTCCAGTCG			
<i>IGFBP3</i>	GCGCCAGGAAATGCTAGTGA	318	NM_001013398.1	63
<i>Insulin-like growth factor binding protein 3</i>	GGGAATGTGTACACCCCTGG			
<i>IL6</i>	ACAGCCACTCACCTCTTCAG	122	NM_000600.4	63
<i>Interleukin 6</i>	GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC			
<i>LMNB1</i>	GCAGACTTACCATGCCAAAC	258	NM_005573.3	63
<i>Lamin B1</i>	TCCCTTATTTCCGCCATCTC			
<i>LDLR</i>	CGACTGCAAGGACAAATCTG	122	NM_000527	60
<i>Low density lipoprotein receptor</i>	AGTCATATTCCCGGTACAC			
<i>LMNA</i> ^a	CTTCTGCCTCCAGTGTCACG	139	NM_170707.3	60
<i>Lamin A</i>	AGTTCTGGGGGCTCTGGGT Sonde: ACTCGCAGCTACCG			
<i>LMNA</i> ^a	CAACTCCACTGGGGAAGAAGTG	123	NM_001282625.1	60
<i>Lamin C</i>	CGGCGGCTACCACTCAC Sonde: TGCGCAAGCTGGTG			

Tabelle 4: Oligonukleotide für die qPCR (Fortsetzung).

Gen	5'-3'Sequenz	Produktlänge [bp]	Referenz¹	Annealing Temperatur (°C)
<i>LMNA</i> ^a	ACTGCAGCAGCTCGGGG	123	NM_001282626.1	60
<i>Progerin</i>	TCTGGGGGCTCTGGGC Sonde: CGCTGAGTACAACCT			
<i>MCPI</i>	CTTCTGTGCCTGCTGCTCATA	161	NM_002982.3	63
<i>Monocyte chemotactic Protein 1</i>	GGACACTTGTCGCTGGTGATT			
<i>NCL</i>	AAGGCACAGAACCGACTACG	284	NM_005381.3	63
<i>Nucleolin</i>	TCTCGCATCTCGCTCTTTCT			
<i>OPN</i>	TGATGACCATGTGGACAG	322	NM_000900	63
<i>Osteopontin</i>	ACCATTCAACTCCTCGCT			
<i>p21/ CDKN1A</i>	GCAGACCAGCATGACAGATTTC	363	NM_000389.4	66
<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>	ACCTCCGGGAGAGAGGAAAA			
<i>p27/ CDKN1B</i>	CAGCTTGCCCGAGTTCTACT	238	NM_004064.4	66
<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>	AGAAGAATCGTCGGTTGCAGG			
<i>p53</i>	AGATAGCGATGGTCTGGC	381	NM_000546.5	63
<i>Tumor protein p53</i>	TTGGGCAGTGCTCGCTTAGT			
<i>PCYOX</i>	CACTTCAGCAGCCTATTACC	262	NM_016297	59
<i>Prenylesteinoxidase 1</i>	CCAGTTGCTCTCAAATACC			

Tabelle 4: Oligonukleotide für die qPCR (Fortsetzung).

Gen	5'-3' Sequenz	Produktlänge [bp]	Referenz ¹	Annealing Temperatur (°C)
<i>RPLPO</i> <i>Large Ribosomal Protein</i>	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA			60
<i>Single copy reference (SCR) Primer Set</i>	ScienCell, San Diego, USA			60
<i>Telomer Primer Set</i>	ScienCell, San Diego, USA			60
<i>ZMPSTE24</i> <i>Zinkmetalloprotease STE24</i>	ACCACCGGAGTTAGGACAGA CCAGGGACTGAGTGATCTCAT	221	NM_005857.5	66

^a Sequenzen der *Primer* und Sonden sind übernommen von Rodriguez *et al.* (Rodriguez *et al.*, 2009)

¹ Accessionnummern der Referenzsequenzen von GenBank.

2.11. Verbrauchsmaterialien

96-Kavitätenplatte, schwarz, Rundboden	Fisher Scientific, San Diego, USA
96-Kavitätenplatte, schwarz, transparenter F-Boden	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-Kavitätenplatte, transparent, F-Boden	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-Kavitätenplatte, weiß, F-Boden	Sarstedt, Nümbrecht
<i>Amicon Ultra centrifugal filter units</i>	Merck, Darmstadt
Deckgläser	VWR International GmbH, Darmstadt
Falcon-tube (15 mL, 50 mL)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Filterspitzen	Nerbe, Winsen
Kontaktspitzen, 50 µl	Sudmann, Leopoldshöhe
Kryoröhrchen	Roth, Karlsruhe
Mikrotiterplatte 96 Kavitäten f. Kultivierung, F-Boden, gedeckelt	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Objektträger	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster
Parafilm	Fleischhacker, Mannheim
Pasteurpipetten	Brand GmbH, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäße 200 µL	Sarstedt, Nürnbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnbrecht
<i>ProLong Diamond Antifade Mountant</i>	Fisher Scientific, San Diego, USA
qPCR-Platten, 384er, weiß	Biozym Scientific, Hessisch
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 mL)	Sarstedt, Nürnbrecht
Receiver column	Macherey-Nagel, Düren
Reservoirs für Mehrkanalpipette	Biotix, San Diego, USA
Sequenzierplatten	Fisher Scientific, San Diego, USA
Spritzen (10 mL, 30 mL, 50 mL)	B. Braun, Melsungen
Sterile Einwegpipetten (5, 10, 205, 50 mL)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Sterilfilter 20 µm	Sartorius, Göttingen
Zellkulturschalen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatten (6, 12, 24, 48, 96 Kavitäten)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellschaber	Greiner bio-one, Frickenhausen
Versiegelungsfolie für qPCR-Platten	Nunc, Thermo Scientific, Schwerte

2.12. Geräte

<i>Architect CI8000</i>	Abbott, Chicago, USA
ABI Prism 3500 Genetic Analyzer	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
Agarose- Gelelektrophoresekammer	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
Analysenwaage LC 2000	Sartorius, Göttingen
CO ₂ -Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen
Eismaschine	Eismaschinen, Isernhagen
Fluoreszenzmikroskop TE2000-S	Nikon GmbH, Düsseldorf
Gasbrenner fireboy eco Integra	Biosciences, Fernwald
Geldokumentationsanlage Fusion SL	Peqlab, Erlangen

Gelelektrophorese-System	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
JuLi Br Live Cell Analyzer NanoEnTek Inc.	Waltham, USA
Konfokales Laserscan Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar
LightCycler 480 II	Roche, Mannheim
Lichtmikroskop Labovert	Leitz, Wetzlar
Magnetrührer RTCbasic IKA	IKA Werke GmbH, Staufen
NanoDrop 2000	Thermo Scientific, San Diego, USA
pH-Meter Five Easy Plus TM FEP20	Mettler Toledo, Columbus, USA
Plattformschüttler Unimax 1010	Heidolph, Schwabach
Pipettier-Roboter	LTF Labortechnik, Wasserburg
Sicherheitswerkbank Bioair Safeflow 1.2	EuroClone S.p.A., Siziano, ITA
Sicherheitswerkbank	Fisher Scientific, San Diego, USA
Stickstofftank 500series chart	German Cryo, Jüchen
Tecan Reader Infinite 200 PRO	Tecan, Männedorf, Schweiz
Thermocycler Landgraf	Landgraf Laborsysteme, Langenhagen
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage	Santorius, Göttingen
Wasserbad	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
Zentrifuge ROTIXA/ RP	Hettich Ag, Bäch
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich Ag, Bäch
Zentrifuge Eppendorf 5417	Eppendorf, Hamburg

2.13. Software

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Graphpad Prism 5.0	GraphPad Software, San Diego, USA
icontrol	Tecan, Männedorf, Schweiz
ImageJ	https://imagej.nih.gov/ij/

LAS X

LightCycler 480 SQ 1.5.1

Microsoft Office
NIS-Element AR 4.20.00

Pubmed

Sequence-Analysis Software

Leica Microsystems, Wetzlar

Roche, Mannheim

Microsoft Corporation, Redmond, USA
Nikon GmbH, Düsseldorf

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

Perkin Elmer, Waltham, USA

3. Methoden

3.1. Zellbiologische Methoden

3.1.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen

Normale humane dermale Fibroblasten (Kontroll-Fibroblasten) sowie Fibroblasten von PXE-Patienten werden für die Standardkultivierungen in DMEM supplementiert mit 10% FCS, 2% L-Glutamin und 1% Antibiotikum/ Antimykotikum auf Zellkulturschalen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Alle 3-4 Tage wird das Medium gewechselt.

3.1.2. Passagieren adhärenter eukaryotischer Zellen

Adhärenent wachsende eukaryotische Zellen werden bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 bis 100% passagiert. Dafür wird zunächst das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen mit 1x DPBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturschale werden nachfolgend 5 ml einer 1x Trypsin-EDTA Lösung hinzugegeben und für 5 min bei 37°C inkubiert. Das vollständige Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturschale wird mikroskopisch kontrolliert. Anschließend werden 5 ml FCS-haltiges Zellkulturmedium zur Inhibierung der Proteaseaktivität zu der Zellsuspension gegeben. Die Zellsuspension wird dann in ein entsprechendes Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Nachfolgend wird der Überstand abgenommen und das Zellpellet in einer optimalen Menge frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wird dann entweder direkt wieder ausgesät oder zunächst für die Bestimmung der Zellzahl weiter verwendet.

3.1.3. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellsuspension wird mit einer 0,4% igen Trypanblau-Lösung verdünnt (Verhältnis 1:1). Da der Farbstoff Trypanblau durch geschädigte Zellmembranen diffundiert, resultiert dies in einer Blaufärbung toter Zellen. Für die Bestimmung der Lebendzellzahl werden daher 20 µl der 1:1 Verdünnung in die Messkammer überführt und die Zellzahl mittels Zellzähler JuliBr bestimmt.

3.1.4. Kryokonservierung und Revitalisierung eukaryotischer Zellen

Für eine längere, stabile Lagerung von Zellkulturen werden diese in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Dazu wird eine Zellsuspension wie zuvor beschrieben (3.1.2) hergestellt. In einem Kryoröhrchen werden 500 µl dieser Zellsuspension mit 500 µl vorgekühltem

Kryomedium (80 % FCS, 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO)) vereint. Das Kryoröhrchen mit der Suspension wird dann in einem Metallblock über Nacht bei -80°C gelagert. Am nächsten Tag erfolgt die Überführung der Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff.

Für die Revitalisierung der Zellen werden diese zunächst aus dem Stickstofftank entnommen, aufgetaut und sofort in vorgewärmtes Zellkulturmedium überführt. Am nächsten Tag werden die Zellen mit 1x DPBS gewaschen und zur weiteren Kultivierung mit frischem Medium versetzt.

3.1.5. Aussäen adhärenter eukaryotischer Zellen

Für alle Experimente werden Zellen zwischen Passage 7 und 12 verwendet. Zunächst wird, wie zuvor erläutert, die Zellzahl mittels Zellzähler bestimmt (3.1.3.). Wenn nicht anders erwähnt, werden die Zellen mit einer finalen Zelldichte von 177 Zellen/ mm^2 ausgesät. Für die mRNA-Analysen, die Bestimmung der Telomerlängen, die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität sowie für den Antikörper-Array werden die Zellen in 60 mm Zellkulturschalen kultiviert. Für die Ansätze, welche für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden, werden die Zellen in 12-Kavitätenplatten kultiviert.

3.1.6. Delipidieren von fetalem Kälberserum

Die Erstellung von Lipoprotein-deplidierten fetalem Kälberserum (LPDS) wird analog zu der Beschreibung von Gibson *et al.* durchgeführt (Gibson *et al.*, 1990). Dazu wird 1 g Cab-o-sil mit 50 ml FCS vermischt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird das Gemisch bei 4°C und $5000 \times g$ für 1 h zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgenommen und bei -20°C gelagert. Für die Herstellung von Medium mit 10% LPDS wird das LPDS durch einen $0,2 \mu\text{m}$ Filter sterilfiltriert und dem entsprechenden Medium zugefügt. Durch das Delipidieren des FCS wird das freie Cholesterin um ca. 78%, LDL um ca. 95% und HDL um ca. 57% gesenkt. Die Triglyceridkonzentration bleibt unverändert.

3.1.7. Zellkultivierung in Lipoprotein-deplidierten Medium

Die Zellen werden in der finalen Zelldichte (177 Zellen/ mm^2) ausgesät und adhären über Nacht. Am nächsten Tag werden die Zellen mit 1x DPBS gewaschen und entweder mit frischem Medium supplementiert mit 10% FCS oder mit frischem Medium supplementiert mit 10% LPDS versetzt. Für die mRNA-Analysen, wie auch für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Faktoren des SASPs werden die Zellen nach Mediumwechsel für

weitere 21 Tage kultiviert, wobei das Medium alle 3-4 Tage gewechselt wird. Für die mRNA-Analysen der weiteren Faktoren, werden die Zellen nach Mediumwechsel für weitere 24 h kultiviert. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration dieser Faktoren, sowie für die Durchführung der Immunfluoreszenznachweise und die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität werden die Zellen für zusätzlich 72 h nach dem initialen Wechseln des Mediums kultiviert.

3.1.8. Behandlung mit Atorvastatin

Die Zellen werden, wie zuvor, in der finalen Zelldichte (177 Zellen/ mm²) ausgesät und adhären über Nacht. Am nächsten Tag werden die Zellen mit 1x DPBS gewaschen und mit frischem Medium supplementiert mit 10% LPDS sowie 20 μ M Atorvastatin versetzt. Für die Analyse der mRNA-Expression sowie für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der analysierten Faktoren werden die Zellen nach Mediumwechsel für weitere 72 h kultiviert.

3.1.9. Ernte adhärenter eukaryotischer Zellen für die DNA - sowie RNA-Isolierung

Für die spätere DNA- bzw. RNA-Isolierung werden die Zellen nach der entsprechenden Kultivierungsdauer geerntet. Dazu wird das Medium abgenommen, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C für die spätere weitere Analytik gelagert. Die Zellen werden mit 1x DPBS gewaschen. Anschließend werden 350 μ l RA1 Lysepuffer aus dem *RNA Spin Blood Kit* der Firma Macherey-Nagel (Düren) mit 3,5 μ l β -Mercaptoethanol versetzt und auf die Zellen pipettiert. Mittels eines Zellschabers werden die Zellen von der Zellkulturplatte gelöst und anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Zelllysate wird dann entweder direkt für die Isolierung von Nukleinsäure verwendet oder bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. Isolierung von Gesamt- DNA aus Zelllysaten

Für die Isolierung der Gesamt-DNA aus Zelllysaten wird das *NucleoSpin Blood Kit* der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Für die Isolierung werden die zuvor gesicherten 50 μ l des aufgereinigtes Zelllysates verwendet (3.2.2.). Die 50 μ l Zelllysate werden mit 75 μ l 99,9%igem Ethanol vermischt und das Gemisch wird auf die beiliegende *NucleoSpin Blood* Säule gegeben.

Es folgt ein Zentrifugationsschritt für 1 min bei 13 000 x g, sodass die DNA an die Silikamembran der Säule binden kann. Nach Bindung der DNA an die Silikamembran der Säule folgt ein erster Waschschrift mit 500 µl BW-Puffer. Nach Zentrifugation für 1 min bei 13 000 x g folgt ein zweiter Waschschrift mit 600 µl B5-Puffer. Es folgen zwei weitere Zentrifugationen von je 1 min und 13 000 x g. Zur Elution wird eine adäquate Menge DNase-freies Wasser auf die Silikamembran der Säule pipettiert, für 1 min bei RT inkubiert und die Säule anschließend 1 min bei 13 000 x g zentrifugiert. Die isolierte DNA wird dann entweder mittels *NanoDrop* 2000 der Firma ThermoFisher (San Diego, USA) vermessen oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.2. Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllysaten

Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus Zelllysaten wird das *RNA Spin Blood Kit* der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Die zuvor generierten Zelllysate werden auf die erste Aufreinigungssäule *NucleoSpin Filter* gegeben und für 1 min bei 13 000 x g zentrifugiert. Von dem aufgereinigten Eluat werden 50 µl für die DNA-Isolierung gesichert. Der Rest des Eluats wird mit 350 µl 70%igem Ethanol versetzt und auf eine zweite Säule *NucleoSpin RNA Column* gegeben und erneut 1 min bei 13 000 x g zentrifugiert. Zur Entsalzung der Säule werden anschließend 350 µl *Membrane Desalting Buffer* auf die Membran pipettiert und diese wiederum 1 min bei 13 000 x g zentrifugiert. Im Anschluss erfolgt der DNA-Abbau. Dafür wird eine 1:10 Verdünnung der rDNase in dem entsprechenden rDNase-Reaktionspuffer hergestellt und 95 µl dieser Verdünnung mittig auf die Membran pipettiert. Es folgt eine Inkubation von 15 min bei RT. Nach der Inkubation folgt die Inaktivierung der rDNase durch Zugabe von 200 µl des Waschpuffers RAW2. Nach einer weiteren Zentrifugation für 1 min bei 13 000 x g wird der Durchfluss verworfen und 600 µl des Waschpuffers RA3 auf die Säule pipettiert. Es wird nochmals für 1 min bei 13 000 x g zentrifugiert. Abschließend erfolgt ein dritter Waschschrift mit 250 µl des RA3-Puffers und eine erneute Zentrifugation für 2 min bei 13 000 x g. Zur Elution werden 25 µl RNase-freies Wasser mittig auf die Membran pipettiert, 1 min bei RT inkubiert und anschließend für 1 min bei 13 000 x g zentrifugiert. Die aufgereinigte RNA wird dann mittels *NanoDrop* 2000 der Firma ThermoFisher (San Diego, USA) vermessen und die entsprechende Menge zur cDNA-Synthese eingesetzt.

3.2.3. Photometrische Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die photometrische Bestimmung der Reinheit sowie Konzentration der isolierten DNA und RNA erfolgt mittels des *Nanodrop 2000* Spektralphotometers der Firma ThermoFisher (San Diego, USA). Nukleinsäuren wie DNA und RNA weisen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm auf. Proteine hingegen zeigen eine maximale Absorption bei 280 nm. Durch die Berechnung des Quotienten der Absorption bei 260 und 280 nm, kann somit die Reinheit der Nukleinsäure-Lösung bestimmt werden. Bei reiner RNA liegt der Quotient bei 2,0, bei reiner DNA bei 1,8. Die Konzentration der Nukleinsäure ergibt sich aus dem Lambert Beerschen Gesetz:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (\text{Gleichung 1})$$

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]

3.2.4. Reverse Transkription

Für die reverse Transkription der zuvor isolierten RNA in komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) wird das *Superscript II Reverse Transcriptase Kit* der Firma ThermoFisher (San Diego, USA) verwendet. Für jeden Ansatz werden 1 μg RNA, 2 μL einer 25 mM dNTP-Lösung und 2 μL einer Oligo-dT-Lösung (7 pmol) vereint. Dieser Reaktionsmix wird mit RNase-freiem Wasser auf 24 μl Gesamtvolumen aufgefüllt und anschließend für 5 min bei 65°C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgt eine Abkühlung auf Eis für mindestens 1 min. Es folgt die Zugabe von 8 μL 5 x *First Strand Buffer* und 4 μL DTT zu jedem Ansatz. Der Reaktionsansatz wird nachfolgend für 2 min bei 42°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 2 μl reverse Transkriptase und eine weitere Inkubation für 50 min bei 42°C. Die Denaturierung des Enzyms erfolgt durch die abschließende Inkubation für 15 min bei 70°C. Die fertige cDNA wird bei -20°C gelagert.

3.2.5. DNA-Amplifikation

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient zur Amplifikation von Nukleinsäure. Die Vervielfältigung der DNA basiert dabei auf sich wiederholenden Zyklen, welche in ihrem Aufbau jeweils drei wesentliche Schritte enthalten. Während des ersten

Schrittes, der Denaturierung, werden die DNA-Doppelstränge durch Hitze bei 95°C aufgetrennt. Der zweite Schritt, das *Annealing*, beinhaltet die Anlagerung der *Primer* an die DNA. Dieser Schritt wird bei der spezifischen *Annealing*-Temperatur der jeweiligen *Primer* durchgeführt. Diese *Annealing*-Temperatur wird zuvor durch eine Gradienten-PCR ermittelt. Der dritte Schritt, die Elongation, dient dann zur Verlängerung der *Primer* entlang des DNA-Einzelstranges in 5'-3'-Richtung. Nach Abschluss der Verlängerung beginnt ein neuer Zyklus. Während jedes Zyklus wird im Fall einer optimalen Effizienz die vorliegende Menge an DNA verdoppelt.

3.2.5.1. Gradienten-PCR

Für die Bestimmung der spezifischen *Annealing*-Temperatur eines *Primer*paares wird eine Gradienten-PCR durchgeführt. Für die PCR wird der in Tabelle 5 aufgeführte Mastermix für 13 Ansätze hergestellt.

Tabelle 5: Reaktionsansatz für PCR

Reagenz	Volumen [μl]
cDNA (1:10 verdünnt)	2,5
<i>SYBR-Green Mix</i>	5
<i>Primer forward</i> (25 μ M oder 20 μ M)	0,25
<i>Primer reverse</i> (25 μ M oder 20 μ M)	0,25
Wasser	2
Σ	10

Die cDNA wird in einer 1:10 Verdünnung eingesetzt. Die *Primer* haben in der Regel eine Konzentration 25 μ M, mit der Ausnahme der IL6-*Primer*, welche mit einer Konzentration von 20 μ M verwendet werden. Der *SYBR-Green Mix* enthält neben einem Fluorophor ebenso dNTPs sowie eine *Taq*-Polymerase. Das anzuwendende Temperaturprofil ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Temperaturprofil der Gradienten-PCR

Reaktionsschritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zyklen
Initiale Denaturierung	5:00	95	1
Denaturierung	0:10	95	
<i>Annealing</i>	0:15	50-70	45
Elongation	0:20	72	
Schmelzkurve	0:05	95	1
	15:00	65-97	
Kühlen	300	4	

3.2.5.2. Quantitative *real-time* PCR

Die relative Quantifizierung des mRNA-Expressionsniveaus verschiedener zu untersuchender Gene wird mittels quantitativer *real-time* PCR (qPCR) durchgeführt. Das sich im Reaktionsansatz befindende *SYBR-Green* interkaliert dabei ausschließlich in doppelsträngige DNA, sodass das aufgenommene Fluoreszenzsignal nach jedem Zyklus proportional zu der gebildeten Menge an Amplifikat zu diesem Zeitpunkt ist. Für die relative Quantifizierung ist dabei der Amplifikationszyklus von Bedeutung bei dem das aufgenommene Fluoreszenzsignal zum ersten Mal den definierten Schwellenwert (*cycle threshold*, C_T) überschreitet. Nach Überschreitung dieses C_T - Wertes steigt das Fluoreszenzsignal exponentiell an. Dabei gilt je früher der C_T - Wert überschritten wird, desto größer war die entsprechende RNA bzw. cDNA Ausgangsmenge.

Tabelle 7: qPCR Temperaturprofil

Reaktionsschritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zyklen
Initiale Denaturierung	5:00	95	1
Denaturierung	0:10	95	
<i>Annealing</i>	0:15	T _A	45
Elongation	0:20	72	
Schmelzkurve	0:05	95	1
	15:00	65-97	
Kühlen	300	4	

Der Reaktionsansatz für die qPCR ist in Tabelle 5 dargestellt und entspricht der Gradienten-PCR. Die *Primer* sind nach Möglichkeit Intron-überspannend designet worden, um mögliche Kontaminationen durch die Amplifikation von verbleibender DNA zu vermeiden.

Für die Messung werden die Ansätze mit Hilfe eines Pipettierroboters in eine weiße 384-Kavitäten Mikrotiterplatte pipettiert und diese mit einer optischen Folie verschlossen. Anschließend wird die Platte 1 min bei 1000 x g zentrifugiert und mit Hilfe des *LightCycler 480 II* (Roche, Schweiz) vermessen. Das dazugehörige Temperaturprofil findet sich in Tabelle 7. Die spezifische *Annealing*-Temperatur für jedes verwendete *Primer*paar wird zuvor über eine Gradienten-PCR ermittelt. Durch die abschließende Schmelzkurven-Analytik wird die Produktspezifität und Reinheit des Amplifikats kontrolliert.

Die relative Quantifizierung erfolgt dann mittels effizienzkorrigierter $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Dabei werden die C_T -Werte der Proben in Relation zu den C_T -Werten der möglichst konstant exprimierten Haushaltsgene betrachtet (Livak and Schmittgen, 2001). Um Schwankungen in den Haushaltsgenen auszugleichen, wird ein Normalisierungsfaktor basierend auf dem geometrischen Mittel der C_T -Werte der Haushaltsgene gebildet, und zur Errechnung des $\Delta\Delta C_T$ -Wertes genutzt. Als Haushaltsgene werden in dieser Arbeit *Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)*, *beta-2-Mikroglobulin ($\beta 2M$)* sowie *β -Aktin* verwendet.

3.2.5.3. Hydrolysesondenbasierte qPCR

Um die unterschiedlichen Transkriptvarianten von *Lamin A* nachweisen zu können, wurde eine hydrolysesondenbasierte Variante der qPCR nach Rodriguez *et al.* verwendet (Rodriguez *et al.*, 2009). Bei dieser Variante der qPCR bindet eine spezielle Hydrolysesonde an die komplementäre Sequenz auf dem DNA-Einzelstrang in dem zu amplifizierenden Bereich. Die Hydrolysesonde trägt am 3'-Ende ein Fluorophor und am 5'-Ende einen sogenannten *Quencher*. Durch den Förster-Resonanzenergietransfer wird das Fluoreszenzsignal unterbunden solange sich *Quencher* und Fluorophor in räumlicher Nähe zueinander befinden. Trifft die *Taq*-Polymerase dann im Zuge der Verlängerung des *Primers* während der Elongationsphase auf die am DNA-Einzelstrang gebundene Sonde, wird diese durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase degradiert. Durch die Degradation der Hydrolysesonde befinden sich Fluorophor und *Quencher* nicht mehr in ausreichender räumlicher Nähe zueinander, sodass das Fluoreszenzsignal nicht mehr vom *Quencher* unterbunden werden kann. Das aufgenommene Fluoreszenzsignal ist demnach auch hier direkt proportional zu der gebildeten Menge an Amplifikat zu dem Zeitpunkt. Da es sich im Fall der Varianten von *Lamin A* um Transkripte mit bis auf wenige Ausnahmen nahezu identischen Sequenzen handelt, sind die hier verwendeten Hydrolysesonden zusätzlich mit einem *Minor Groove Binder* konjugiert. Dadurch kann eine höhere Spezifität bei der Bindung an die Zielsequenz erlangt werden, sodass es möglich wird auch besonders kurze Sonden zu verwenden.

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze für *Lamin A*, *Lamin C*, *Progerin* sowie für die verwendeten Haushaltsgene β -*Glucuronidase* (*GUSB*) und *Large Ribosomal Protein* (*RPLP0*) sind in Tabelle 8, das dazugehörige Temperaturprofil ist in Tabelle 9 zusammengefasst. Für die Haushaltsgene werden vorgefertigte *Taqman Assays* der Firma ThermoFisher (San Diego, USA), welche sowohl die entsprechenden *Primer* als auch Sonden enthalten, verwendet. Die relative Quantifizierung erfolgt ebenfalls, wie bei der *SYBR-Green* basierten qPCR, mittels effizienzkorrigierter $\Delta\Delta C_T$ -Methode.

Tabelle 8: Reaktionsansätze für hydrolysesondenbasierte qPCR

Reagenz	Volumen [μ l]				
	<i>Lamin A</i>	<i>Lamin C</i>	<i>Progerin</i>	<i>GUSB</i>	<i>RPLP0</i>
cDNA (1:10 verdünnt)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>TaqMan Univ. Mastermix</i>	5	5	5	5	5
<i>Primer forward</i> (25 μ M)	0,12	0,12	0,2	-	-
<i>Primer reverse</i> (25 μ M)	0,36	0,36	0,12	-	-
Hydrolysesonde (10 μ M)	0,2 (FAM)	0,2 (FAM)	0,2 (FAM)	-	-
<i>Taqman Assay</i>	-	-	-	0,5 (VIC)	0,5 (VIC)
Wasser	1,82	1,82	1,98	2	2
Σ	10	10	10	10	10

Tabelle 9: Temperaturprofil der hydrolysesondenbasierten qPCR

Reaktionsschritt	Zeit [min]	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zyklen
UNG-Inkubation	5:00	50	1
Polymeraseaktivierung	10:00	95	1
Denaturierung	0:15	95	50
<i>Annealing/</i> Elongation	1:00	60	
Kühlen	300	4	

3.2.5.4. Bestimmung der relativen Telomerlänge mittels qPCR

Für die Bestimmung der relativen Telomerlängen wird zunächst die DNA, wie zuvor beschrieben (3.2.1.), isoliert. Die Messung wird mithilfe des *Relative Human Telomere Length Quantification qPCR Assay Kits* (ScienCell, San Diego, USA) durchgeführt. Dieses beinhaltet sowohl ein *Telomer Primer Set* als auch ein *single copy reference (SCR) Primer Set*. Da die Telomere aus repetitiven Sequenzen bestehen, können die *Primer* des *Telomer Primer Sets* an

einer beliebigen Stelle im Bereich der Telomere binden. Trifft die DNA-Polymerase nun infolge der Elongation des *Primers* in 5'-Richtung auf einen weiteren *Primer*, welcher ebenfalls gebunden hat, so entfernt diese die notwendigen Basen durch ihre 5'-Exonukleaseaktivität. Das Resultat jedes PCR-Zyklus ist so eine vollständige Kopie des Telomers. Die *Primer* des beigefügten *SCR Primer Sets* dienen der Normalisierung und damit der Amplifikation einer 100 bp langen Region im humanen Chromosom 17.

Für die Durchführung der qPCR wird der in Tabelle 10 aufgeführte Reaktionsansatz zusammengegeben.

Tabelle 10: Reaktionsansatz zur Bestimmung der relativen Telomerlänge

Reagenz	Volumen [μl]
DNA	2,5 (3 ng/ μ l)
<i>Telomer Primer Set</i> <u>oder</u> <i>SCR Primer Set</i>	2,0
<i>SYBR-Green Mix</i>	10
H ₂ O	5,5
Σ	20

Die Messung wird mittels *LightCycler 480 II* (Roche, Schweiz) und dem in Tabelle 11 gezeigten Temperaturprofil durchgeführt. Die Berechnung der relativen Telomerlänge erfolgt entsprechend der Angaben des Herstellers und entspricht weitestgehend der auch sonst hier angewandten $\Delta\Delta C_T$ -Methode.

Tabelle 11: Temperaturprofil zur Bestimmung der relativen Telomerlänge

Reaktionsschritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zyklen
Initiale Denaturierung	10:00	95	1
Denaturierung	0:20	95	
<i>Annealing</i>	0:20	52	32
Elongation	0:45	72	
Schmelzkurve	0:05	95	1
	15:00	65-97	
Kühlen	300	4	

3.2.6. Agarose-Gelelektrophorese

Durch die Agarose-Gelelektrophorese lassen sich negativ geladene DNA-Fragmente ihrer Größe nach auftrennen. Dabei migrieren kleine DNA-Fragmente schneller und damit weiter durch das elektrische Feld bzw. Gel als lange Fragmente. Für die Herstellung von 1,8%igen Agarosegelen werden 1,8 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer durch kurzes Aufkochen gelöst. Zu der Lösung werden 10 µl Ethidiumbromid gegeben und diese wird dann in einen Gelträger gegossen. Nach vollständiger Polymerisierung werden sowohl 5 µl der DNA-Proben, welche mit 2 µl DNA-Ladepuffer versetzt werden als auch 3,5 µl DNA-Längenstandard (pUC19/MspI, MBBL, Bielefeld) in die Geltaschen pipettiert. Anschließend erfolgt die elektrophoretische Auftrennung bei 120 V und 14 mA für 30 min. Da das im Gel enthaltene Ethidiumbromid in die DNA interkaliert, können die Fragmentgrößen nach der Auftrennung durch Anregung mit UV-Licht über ein Fluoreszenzsignal bestimmt werden.

3.2.7. Aufreinigung von PCR-Produkten für die Sequenzierung

Vorbereitend für die Sequenzierung wird der qPCR Reaktionsansatz mittels *MSB Spin PCRapace Kits* der Firma *Strattec Biomedical* (Birkenfeld) von überschüssigen PCR-Komponenten gereinigt. Hierfür werden 25 µl des Reaktionsansatzes mit 250 µl Bindungspuffer vermischt und auf die beiliegende Säule pipettiert. Die Säule wird dann für

4 min bei 13 000 x g zentrifugiert. Für die Elution werden 10 µl DNase-freies Wasser auf die Membran gegeben und 1 min bei RT inkubiert. Anschließend wird für 1 min bei 13 000 x g zentrifugiert. Das Eluat wird bei -20°C gelagert.

3.2.8. Sanger-Sequenzierung der gereinigten PCR-Produkte

Die Sequenzierung der gereinigten PCR-Produkte wird mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger durchgeführt. Hierbei kommt es zum zufälligen Einbau von unterschiedlich basenabhängigen fluoreszenzmarkierten Didesoxyribonukleosid-Triphosphaten (ddNTPs). Durch eine fehlende Hydroxygruppe am 3'-Ende der ddNTPs, kommt es nach dessen Einbau zum Kettenabbruch, da die Polymerase dadurch nicht in der Lage ist den DNA-Strang weiter zu verlängern. Nach diesem Prinzip entstehen Fragmente jeder Länge. Diese Fragmente werden dann mittels Kapillar-Gelelektrophorese in einer Gelmatrix (POP7-Polymer) aufgetrennt.

Zur Generierung der fluoreszenzmarkierten Fragmente wird eine PCR durchgeführt. Dafür wird der in Tabelle 12 aufgeführte Reaktionsansatz erstellt und die PCR mit dem in Tabelle 13 gezeigten Temperaturprofil durchgeführt.

Tabelle 12: Reaktionsansatz für Sequenzierreaktion

Reagenz	Volumen [µl]
Gereinigtes Amplifikat	3,0
<i>BigDye Premix</i>	2,0
<i>Primer forward oder reverse</i> (2,5 µM)	1,5
<i>BigDye Puffer</i> (5x)	4,0
HPLC-H ₂ O	9,5
Σ	20

Tabelle 13: Temperaturprofil der Sequenzierreaktion

Reaktionsschritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zyklen
Initiale Denaturierung	2:00	95	1
Denaturierung	0:10	95	
<i>Annealing</i>	0:10	T _A	30
Elongation	4:00	72	
Kühlen	300	4	

Nach der Generierung der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente werden die Reaktionsansätze mittels Sephadex-G50 Gelfiltration gereinigt. Dafür wird die Säule mit 750 µl Sephadex-G50 Suspension beschickt und für 2 min bei 1000 x g zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen und die Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es werden dann 20 µl des Reaktionsansatzes auf die Säule pipettiert und 4 min bei 1000 x g zentrifugiert. Der gereinigte Reaktionsansatz wird dann 1:1 mit HPLC-Wasser verdünnt, elektrophoretisch mit 10 kV injiziert und die anschließende Kapillar-Elektrophorese bei 50°C und 8,5 kV für 90 min mittels *3500 Genetic Analyzer* (ThermoFisher, San Diego, USA) durchgeführt. Das Ergebnis wird dann mit der *Sequence-Analysis Software* (Perkin Elmer, Waltham, USA) ausgewertet.

3.3. Proteinbiochemische Methoden

3.3.1. Messung des Cholesterolgehalts in FCS und LPDS

Die Bestimmung des Cholesterol-, LDL- sowie Triglyceridgehalts in FCS und LPDS wird mittels *Architect CI8000* (Abbott, Chicago, USA) durchgeführt.

3.3.2. Bichinonsäure-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten wird mittels Bichinonsäure (BCA)-Assay durchgeführt. Diese Methode basiert auf der Reduktion von Cu²⁺- zu Cu⁺-Ionen durch reduzierende Gruppen der Proteine. Die Cu⁺-Ionen bilden dann mit zwei BCA-Molekülen einen violetten Farbkomplex aus. Dieser kann kolorimetrisch bei einer

Wellenlänge von 562 nm detektiert werden. Die gemessene Absorption steht damit in einem proportionalen Zusammenhang mit der Proteinkonzentration des Zelllysates.

Es werden 25 µl des zu analysierenden Zelllysates in Doppelbestimmung in eine 96-Kavitäten Mikrotiterplatte vorgelegt. Wenn Verdünnungen notwendig sind, werden diese in dem entsprechenden Puffer durchgeführt. Um eine quantitative Aussage tätigen zu können, werden zusätzlich jeweils 25 µl einer BSA-Standardreihe (0, 50, 100, 200, 400, 600, 1000 µg/mL) ebenfalls in Doppelbestimmung aufgetragen. Zu jeder vorgelegten Probe sowie zum Standard werden 200 µl einer Kupfersulfat/BCA-Lösung, welche im Verhältnis 50:1 vorliegt, hinzugegeben und sorgfältig vermischt. Das Reaktionsgemisch wird für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend bei 562 nm vermessen.

3.3.3. Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie werden Deckgläser (Ø 18 mm) mit 5 µg/cm² Kollagen (ibidi, Planegg) beschichten und in 12-Kavitäten Zellkulturplatten gelegt. Die Zellen werden, wie zuvor beschrieben (3.1.5.), darin ausgesät und nach dem initialen Mediumwechsel für weitere 72 h in Medium mit 10% FCS bzw. 10% LPDS kultiviert. Nach dem entsprechenden Kultivierungszeitraum wird das Medium abgenommen und die Zellen mit 1x DPBS gewaschen. Zur Fixierung und Permeabilisierung werden die Zellen mit 200 µl eines Aceton:Methanol Gemisches (1:1) versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Die Zellen werden dann erneut zweimal mit 1x DPBS gewaschen und mit 200 µl einer 1%igen BSA-Lösung (in 1x DPBS) zum Blockieren nicht spezifischer Bindestellen überschichtet und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit 200 µl des primären Antikörpers in der entsprechenden Verdünnung in 0,1%iger BSA-Lösung (Tabelle 14) für 2 h bei RT. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit 1x DPBS werden die Zellen für eine weitere Stunde mit dem sekundären Antikörper in der entsprechenden Verdünnung in 0,1%iger BSA-Lösung (Tabelle 14) unter dem Ausschluss von Licht bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wird erneut zweimal mit 1x DPBS gewaschen. Die Zellen werden dann mit 150 µl einer DAPI-Lösung versetzt und für weitere 10 min inkubiert. Nach abschließenden drei weiteren Waschschrritten mit 1x DPBS werden die Deckgläser aus der 12-Kavitäten Mikrotiterplatte entfernt und auf dem Objektträger mittels des Eindeckmittels *ProLong Diamond Antifade Mountant* der Firma ThermoFisher (San Diego, USA) fixiert. Nachdem das Eindeckmittel über Nacht getrocknet ist, können die Präparate mittels konfokalem Laserscanmikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar) oder am Fluoreszenzmikroskop TE2000-S (Nikon GmbH, Düsseldorf) ausgewertet werden.

Tabelle 14: Verdünnungen der verwendeten primären und sekundären Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
<i>Primäre Antikörper</i>		
<i>Rabbit monoclonal Anti-Lamin A/C (ab108595)</i>	Abcam, Cambridge, UK	1:500
<i>Mouse monoclonal Anti-Progerin (ab66587)</i>	Abcam, Cambridge, UK	1:10
<i>Mouse monoclonal Anti-Nucleolin (ab13541)</i>	Abcam, Cambridge, UK	1:500
<i>Rabbit polyclonal Anti-Lamin B1 (ab16046)</i>	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
<i>Mouse monoclonal Anti-LAMP-1 (ab25630)</i>	Abcam, Cambridge, UK	1:50
<i>Sekundäre Antikörper</i>		
FITC-konjugierter <i>goat-anti-rabbit</i>	Jackson Immuno Research, UK	1:75
TRITC-konjugierter <i>goat-anti-mouse</i>	Jackson Immuno Research, UK	1:75

3.3.4. Fluorimetrischer Nachweis autophagischer Vakuolen

Zum fluorimetrischen Nachweis autophagischer Vakuolen wird ein kommerziell erhältliches Testsystem der Firma Abcam (Camebridge, UK) verwendet. Das zu verwendende Färbereagenz entwickelt dabei nach Anregung bei 488 nm eine helle Fluoreszenz in Vesikeln, welche während der Autophagie entstehen. Für die Durchführung werden die Zellen nach beschriebenem Vorgehen (3.1.5.) auf μ -Slides mit 8-Kavitäten der Firma ibidi (Planegg) ausgesät. Nach dem initialen Mediumwechsel nach 24 h werden die Fibroblasten für weitere 72 h in Medium mit 10% FCS oder Medium mit 10% LPDS kultiviert. Zur besseren Beurteilung des autophagischen Flux werden die Zellen 48 h nach dem initialen Mediumwechsel für die finalen 24 h zusätzlich mit 20 μ M Chloroquin oder dem entsprechenden Lösungsmittel (H_2O) behandelt. Nach der entsprechenden Kultivierungsdauer werden die Fibroblasten entsprechend der Angaben des Herstellers behandelt. Für die Färbelösung werden dabei 2 μ l des Färbereagenz und 1 μ l Hoechst zur Färbung des Zellkerns je Milliliter des mitgelieferten Assay-Puffers gegeben. 300 μ l dieser Färbelösung werden dann zu jeder Kavität gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation und mehrmaligem Waschen werden die Präparate mittels Fluoreszenzmikroskop TE2000-S (Nikon GmbH, Düsseldorf) ausgewertet.

3.3.5. Bestimmung der Plasma PPI-Konzentration

Zur Bestimmung der PPI-Konzentration im Plasma gesunder Probanden verschiedenen Alters wird ein bekannter enzymgekoppelter Biolumineszenzassay nach Prosdocimo *et al.* an die Messung in humanem Plasma angepasst (Prosdocimo *et al.*, 2009). Dazu wird von gesunden Spendern Vollblut in einer Lithium-Heparin Monovette gesammelt und initial bei 2500 x g zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und erneut für 10 min bei 2500 x g zentrifugiert. Anschließend werden 3 ml des gewonnen Plasmas auf einen 30 kDa Filter (*Amicon Ultra centrifugal filter units*, Ultra-4, MWCO 30 kDa, Merck, Darmstadt) pipettiert und für 20 min bei 2000 x g zentrifugiert. In dem gereinigten Durchlauf kann nun die PPI-Konzentration bestimmt werden.

Dazu werden die Proben zunächst 1:10 in reinem HEPES-gepuffertem DMEM ohne Zusatz von FCS verdünnt. Die Standardreihe (0, 10, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 nM) zur Quantifizierung wird mit Adenosin-5'-Triphosphatdisodiumsalzhydrat (FLAAS, 1 µmol/µl ATP) ebenfalls in reinem HEPES-gepuffertem DMEM ohne Zusatz von FCS angesetzt. Die Proben sowie der Standard werden 5 min bei 100°C hitzeinaktiviert, um eine Hydrolyse des metastabilen PPis durch enzymatische Reaktivität zu verhindern. Es wird dann Adenosin-5'-Phosphosulfatsodiumsalz (APS, 25 µM) 1:1000 in Wasser verdünnt und 20 µl davon mit 4 µl Adenosin-5'-Triphosphatassaymix (FL-AAM) vermischt und in eine weiße 96-Kavitäten Mikrotiterplatte vorgelegt. Anschließend werden 75 µl der Probe bzw. des Standards in Dreifachbestimmung hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 60 min bei 27°C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgt die Messung am *Tecan infinite m200pro* (Tecan, Schweiz). Zunächst wird der initiale ATP-Ausgangswert der Proben bestimmt indem 5 Messungen in einem 2 min Intervall durchgeführt werden. Anschließend erfolgt die Zugabe von 1 µl ATP-Sulfurylase (0,01 U), welche die Umsetzung von PPI zu ATP katalysiert. Direkt nach der Zugabe wird erneut die Biolumineszenz in einem Intervall von 2 min detektiert. Diese Messung wird fortgesetzt bis das detektierbare Signal deutlich abnimmt. Die PPI-Konzentration der Probe ergibt sich dann durch Subtraktion des Signals des initialen ATPs von dem maximalen gemessenen Signal nach Zugabe der ATP-Sulfurylase.

3.3.6. Qualitativer Seneszenzassay

Für die Bestimmung des Anteils an seneszenten Zellen in einer Kultur wird die Aktivität der β -Galaktosidase nach der Methode von Dimri *et al.* bestimmt (Dimri *et al.*, 1995). Diese Methode basiert auf der Umsetzung von 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid

(X-Gal) durch die β -Galaktosidase, wodurch eine bläuliche Färbung entsteht. Die β -Galaktosidase hat ihr pH-Optimum im sauren Bereich und ihre Aktivität ist in der Regel bei zellulärer Seneszenz deutlich erhöht. Um eine erhöhte β -Galaktosidaseaktivität besser deutlich machen zu können, erfolgt der Nachweis bei pH 6, also in einem nicht optimalen pH-Bereich. In diesem Fall wird X-Gal nur sichtbar von den Zellen umgesetzt, welche eine deutlich erhöhte Aktivität aufweisen. Folglich erscheinen auch nur diese Zellen bläulich.

Für die Durchführung dieses Nachweises werden die Zellen wie bereits zuvor beschrieben in 6-Kavitäten Zellkulturplatten ausgesät (3.1.5.) und nach dem initialen Mediumwechsel für weitere 72 h in Medium mit 10% FCS oder 10% LPDS kultiviert. Nach der entsprechenden Kultivierungsdauer wird das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit 1x DPBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen für 3 - 5 min mit 2 ml einer 3%igen Formaldehydlösung bei RT fixiert. Nach der Fixierung erfolgen zwei weitere Waschstschritte mit 1x DPBS. Anschließend erfolgt die Zugabe von 2 ml der in Tabelle 15 aufgeführten Färbelösung. Die Zellen werden über Nacht bei 37°C und ohne CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag kann mittels Farbkamera die Färbung der Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgewertet werden.

Tabelle 15: Reaktionspuffer des qualitativen Seneszenzassays

Reagenz	Konzentration
Dinatriumhydrogenphosphat	0,2 M
Zitronensäure	0,1 M
Kaliumhexacyanoferrat (II)	5 mM
Kaliumhexacyanoferrat (III)	5 mM
Natrumchlorid	150 mM
Magnesiumchlorid	2 mM
X-Gal	1 mg/ml

3.3.7. Quantitativer Seneszenzassay

Neben der Bestimmung der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidaseaktivität durch die Umsetzung von X-Gal und der damit verbundenen Blaufärbung seneszenter Zellen kann die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität auch über eine fluorimetrische Messung erfolgen (Gary and Kindell, 2005). Die Methode basiert auf der β -Galaktosidase abhängigen Hydrolyse von 4-Methylumbelliferyl- β -D-Galaktopyranosid (MUG) zu dem über Fluoreszenz nachweisbaren 7-Hydroxyl-4-Methylcoumarin. Für die Durchführung des Nachweises werden die Zellen in der bereits beschriebenen Zelldichte in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät (3.1.5.) und nach dem initialen Mediumwechsel für weitere 72 h in Medium mit 10% FCS oder 10% LPDS kultiviert. Am Ende der entsprechenden Kultivierungsdauer wird das Medium abgenommen und die Zellen viermal mit 1x DPBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen in 300 μ l Lysepuffer (Tabelle 16) von der Zellkulturschale mit einem Zellschaber abgekratzt und 5 min bei 12 000 x g zentrifugiert. 50 μ l des Überstandes werden gesichert, um einen BCA-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration durchzuführen (3.3.2.). Zur Erstellung des Reaktionspuffers werden 0,057 g MUG in 1 ml DMSO gelöst und 100 μ l dieser Lösung in 10 ml Reaktionspuffer (Tabelle 17) gegeben, um eine MUG-Konzentration von 1,7 mM zu erreichen. Anschließend werden 100 μ l des Zellysates mit 100 μ l des Reaktionspuffers vermischt und der Reaktionsansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation werden je 50 μ l des Reaktionsansatzes mit 150 μ l einer Natriumcarbonat-Lösung versetzt, um die Reaktion abzustoppen. 150 μ l des abgestoppten Reaktionsansatzes werden in eine schwarze 96-Kavitäten Mikrotiterplatte pipettiert und mittels *Tecan Reader Infinite 200 PRO* (Tecan, Schweiz) vermessen (Anregung: 360 nm, Emission: 465 nm). Das Ergebnis wird dann auf die durch den BCA-Assay ermittelte Proteinkonzentration normiert.

Tabelle 16: Lysepuffer des quantitativen Seneszenzassays

Reagenz	Konzentration
Dinatriumhydrogenphosphat	0,2 M
Zitronensäure	0,1 M
CHAPS	5 mM
Benzamidine	0.5 mM
PMSF	0.25 mM

Tabelle 17: Reaktionspuffer des quantitativen Seneszenzassays

Reagenz	Konzentration
Dinatriumhydrogenphosphat	0,2 M
Zitronensäure	0,1 M
Natriumchlorid	300 mM
β -Mercaptoethanol	10 mM
Magnesiumchlorid	4 mM
MUG (170 mM <i>stock</i>)	1,7 mM

3.3.8. Antikörper-Array

Für die Durchführung des Antikörper-Arrays werden die Zellen in der bereits beschriebenen Zelldichte in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät (3.1.5.). Um die erforderliche Proteinkonzentration zu erreichen, werden je Patienten- bzw. Kontroll-Zelllinie acht biologische Replikate mitgeführt. Nach 24 h erfolgt der Mediumwechsel hin zu Medium, welches mit 10% LPDS supplementiert ist. Die Fibroblasten werden dann für weitere 72 h in diesem Medium kultiviert. Nach der entsprechenden Kultivierungsdauer wird das Medium verworfen und die Fibroblasten viermal mit 1x DPBS gewaschen. Anschließend werden 150 μ l RIPA-Puffer der Firma ThermoFisher (San Diego, USA) zu dem Ersten der acht biologischen Replikate jeder Zelllinie gegeben und die Zellen mittels Zellschaber von der Zellkulturschale entfernt und lysiert. Das entstandene Zelllysate wird dann zu dem zweiten biologischen Replikat jeder Zelllinie gegeben, sodass auch hier die Fibroblasten mittels Zellschaber entfernt und lysiert werden können. Dieses Vorgehen wird bis zum achten biologischen Replikat fortgeführt, um eine möglichst hohe Proteinkonzentration zu erreichen. Die Proteinkonzentrationen der fertigen Zelllysate werden dann mittels BCA-Assay (3.3.2.) ermittelt. Alle Zelllysate werden auf eine Konzentration von 3 mg/ml verdünnt. Die drei PXE- sowie die drei Kontroll-Zelllinien werden dann jeweils zu gleichen Anteilen verreinigt.

In diesen beiden Zelllysaten werden dann die relativen Proteinmengen 60 verschiedener Proteine mittels Antikörper-Array durch die Firma *Full Moon BioSystems* (Sunnyvale, USA) bestimmt. Der Array wird entsprechend der Vorgaben des Herstellers von diesem durchgeführt.

Verkürzt zusammengefasst werden dabei die Proteine zunächst mittels Biotinylierung markiert. Dafür wird nach einem Austausch des Puffers das Zelllysate mit einer Biotin/DMF-Lösung (10 µg/µl) für 2 h bei RT inkubiert. Bevor die biotinylierte Probe mit dem Antikörper-Array inkubiert wird, werden die unspezifischen Bindestellen des Arrays mittels einer *Blocking Solution* für 40 min bei RT abgesättigt. Die *Blocking Solution* wird rückstandslos entfernt und es erfolgt anschließend eine Inkubation der biotinylierten Probe mit dem Antikörper-Array für 2 h bei RT, sodass die entsprechenden Proteine an die immobilisierten Antikörper auf dem Array binden können. Zur Detektion wird der Antikörper-Array abschließend nach mehrmaligem Waschen mit deionisiertem Wasser mit einer Cy3-Streptavidin-Lösung (1 mg/ml) für 45 min bei RT im Dunkeln inkubiert und nach erneutem mehrfachen Waschen mittels eines *Array-Scanners* gescannt.

3.3.9. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen in Seren sowie Zellkulturüberständen werden kommerziell erhältliche Testsysteme der Firma *R&D Systems* (Minnesota, USA) verwendet. Das Testprinzip der verwendeten ELISAs beruht dabei auf der Bindung eines Zielproteins an einen in der Mikrotiterplatte immobilisierten Antikörper. Nach Bindung des Zielproteins an den immobilisierten Antikörper wird ein zweiter Antikörper, welcher ein anderes Epitop des Zielproteins erkennt, hinzugegeben. An diesen Antikörper ist eine Peroxidase gekoppelt durch die nach Zugabe eines chromogenen Substrates ein Produkt entsteht, welches über die Absorption bei 450 nm nachweisbar ist. Die gemessene Absorption ist dabei proportional zu der Konzentration des Zielproteins in der verwendeten Probe.

3.3.9.1. Bestimmung der CCL11-Proteinkonzentration mittels ELISA

Für die Bestimmung der CCL11-Proteinkonzentration im Serum von PXE-Patienten und gesunden Kontrollen wird ein kommerziell erhältlicher *Sandwich* ELISA der Firma *R&D Systems* (Minnesota, USA) verwendet. Der ELISA wird gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Serumproben werden unverdünnt eingesetzt und der Standard entsprechend der Vorgaben seriell mit dem *Calibrator Diluent* RD60 verdünnt. Die Absorption der Proben bei 450 nm (Korrekturwellenlänge: 540 nm) wird mittels *Tecan Reader Infinite 200 PRO* (Tecan, Schweiz) vermessen.

3.3.9.2. Bestimmung der IGF1-Proteinkonzentration mittels ELISA

Die Bestimmung der IGF1-Proteinkonzentration im Serum von PXE-Patienten und gesunden Kontrollen erfolgt mittels eines kommerziell erhältlicher *Sandwich* ELISAs der Firma *R&D Systems* (Minnesota, USA). Der Test wird entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Um die totale IGF1-Konzentration, bestehend aus freiem sowie gebundenem IGF1 zu ermitteln, werden die Serumproben entsprechend der Vorgaben des Herstellers vorbehandelt. Daraus resultiert, dass die Proben in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt werden. Der Standard wird, wie im Herstellerprotokoll vorgegeben, entsprechend seriell mit dem *Calibrator Diluent* RD5-22 verdünnt eingesetzt. Die Detektion der Absorption bei 450 nm (Korrekturwellenlänge: 540 nm) wird mittels *Tecan Reader Infinite 200 PRO* (Tecan, Schweiz) durchgeführt.

3.3.9.3. Bestimmung der IGFBP3-Proteinkonzentration mittels ELISA

Die IGFBP3-Proteinkonzentration im Serum von PXE-Patienten und gesunden Kontrollen sowie im Zellkulturüberstand der PXE- und Kontroll-Fibroblasten wird mithilfe eines kommerziell erhältlichen ELISAs der Firma *R&D Systems* (Minnesota, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Serumproben werden je nach Bedarf in einer Verdünnung von 1:100 oder 1:200 eingesetzt. Zellkulturüberstände benötigen eine Verdünnung von 1:50. Verdünnungen werden mit dem beigefügten *Calibrator Diluent* RD5P angesetzt. Der Standard wird, wie vom Hersteller angegeben, seriell ebenfalls mit *Calibrator Diluent* RD5P verdünnt und eingesetzt. Die Absorption der Proben bei 450 nm (Korrekturwellenlänge: 540 nm) wird mittels *Tecan Reader Infinite 200 PRO* (Tecan, Schweiz) vermessen. Die ermittelten Proteinkonzentrationen im Zellkulturüberstand werden auf den entsprechenden DNA-Gehalt der Kultur normiert.

3.3.9.4. Bestimmung der GDF11-Proteinkonzentration mittels ELISA

Zur Bestimmung der GDF11-Proteinkonzentration im Serum von PXE-Patienten und gesunden Kontrollen wird das *DuoSet ELISA Development Kit* der Firma *R&D Systems* (Minnesota, USA) verwendet. Der ELISA wird im Allgemeinen, wie vom Hersteller empfohlen, etabliert. Der Standard wird, wie vorgegeben, seriell verdünnt. Als Verdünnungsmittel des Standards wird hier FCS eingesetzt. Als Leerwert für den Standard dient reines FCS. Um Wechselwirkungen des humanen Serums mit der Antikörperreaktion zu berücksichtigen, wird das niedrigste gemessene Signal aller Proben als Proben-Leerwert definiert. Die Detektion der

Absorption bei 450 nm (Korrekturwellenlänge: 540 nm) wird mittels *Tecan Reader Infinite 200 PRO* (Tecan, Schweiz) vermessen.

3.3.9.5. Bestimmung der MCP1-Proteinkonzentration mittels ELISA

Die MCP1-Proteinkonzentration wird mittels eines kommerziell erhältlichen ELISAs der Firma *R&D Systems* (Minnesota, USA) im Zellkulturüberstand von Fibroblasten von PXE-Patienten sowie von gesunden Kontrollen bestimmt. Die Durchführung des ELISAs erfolgt nach Herstellerangaben. Zellkulturüberstände werden je nach Bedarf 1:4 oder 1:100 verdünnt eingesetzt. Die Verdünnung der Proben erfolgt mit dem beigefügtem *Calibrator Diluent RD5L*. Der MCP1-Standard wird, wie vom Hersteller vorgegeben, seriell ebenfalls mittels *Calibrator Diluent RD5L* verdünnt. Die Absorption bei 450 nm (Korrekturwellenlänge: 540 nm) wird mit dem *Tecan Reader Infinite 200 PRO* (Tecan, Schweiz) vermessen. Die ermittelten Proteinkonzentrationen in den Zellkulturüberständen werden auf den DNA-Gehalt der entsprechenden Kultur normiert.

3.3.10. Bestimmung der Proteinkonzentration von IL6 im Zellkulturüberstand

Die Bestimmung der IL6-Konzentration im Zellkulturüberstand von Fibroblasten von PXE-Patienten sowie gesunden Kontrollen erfolgte mittels Cobas e411 (Roche Diagnostic, Schweiz). Das Testverfahren entspricht einem Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA). Hierbei werden 30 µl des Zellkulturüberstandes mit einem monoklonalen biotinylierten IL6-spezifischem Antikörper inkubiert. Durch Zugabe eines weiteren mit einem Ruthenium-Komplex beschichteten IL6-spezifischen Antikörpers bilden die beiden Antikörper mit dem Antigen einen *Sandwich*-Komplex. Zusätzlich werden Streptavidin-beschichtete Mikropartikel hinzugegeben, welche nach Überführung des Reaktionsgemisches in die Messzelle mittels magnetischer Kräfte an der Oberfläche der Elektrode fixiert werden. Nicht gebundene Substanzen werden durch die Spülung mit einer *ProCell*-Lösung entfernt. Durch Anlegen einer Spannung an der Elektrode kommt es zur Anregung des Rutheniumkomplexes und damit zur Aussendung von Licht, sodass ein entsprechendes Signal bei 620 nm detektiert werden kann. Die Konzentration von IL6 entspricht so der Menge der gebundenen Rutheniumkomplexe an der Elektrode bzw. der Intensität des detektierbaren Signals bei 620 nm.

3.3.11. Bestimmung des Cholesterolinflux sowie -efflux

Zur Beurteilung des Cholesterolinflux sowie -efflux der PXE-Fibroblasten sowie von Kontroll-Fibroblasten wird ein kommerzielles System, welches ursprünglich zur Analyse der Kapazität von verschiedenen Cholesterolakzeptoren entwickelt wurde, adaptiert und verwendet. Dieses System basiert auf der Inkubation von Makrophagen mit fluoreszenzmarkiertem Cholesterol und die anschließende Behandlung dieser mit verschiedenen zu untersuchenden Akzeptoren. In dem ursprünglichen System ist damit der Akzeptor der Faktor, welcher variiert und damit im Hinblick auf seine Aufnahmekapazität untersucht wird. Zur Adaption und damit zur Evaluation der Influx sowie -Effluxkapazität von Fibroblasten verschiedener Spender wird das ursprüngliche System dahin verändert, dass der Akzeptor konstant gehalten wird und die Zellen, welche mit dem fluoreszenzmarkiertem Cholesterol inkubiert werden, variiert werden. Für das abgeänderte Verfahren werden so initial 10^5 Zellen/Kavität der zu untersuchenden Fibroblasten Zelllinie in eine 96-Kavitäten-Zellkulturplatte ausgesät. Für jede Zelllinie werden dabei vier zu behandelnden Proben und vier Negativkontrollen mitgeführt. Zusätzlich werden für eine Positivkontrolle in zwei Kavitäten Kontroll-Fibroblasten ausgesät. Nach dem Aussäen werden die Fibroblasten solange bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert bis eine vollständige Adhärenz erreicht ist. Parallel wird der beigefügte Equilibrierungspuffer (5 ml) auf 37°C erwärmt und jeweils 10 μl von *Reagent A* und 10 μl von *Reagent B* zugegeben. 4,6 ml dieses Gemisches werden dann mit 4,6 ml des *Labeling Reagents* vermischt, sodass der Reaktionsmix entsteht. Der nicht verwendete Equilibrierungspuffer wird für die Bestimmung des Leerwertes verwendet. Liegt bei den ausgesäten Zellen eine Adhärenz vor, wird das Zellkulturmedium abgesaugt und mit 200 μl DMEM *Fluorobrite* je Kavität vorsichtig gewaschen. Die zu behandelnden Proben sowie die Negativ- und Positivkontrollen werden dann mit 100 μl des Reaktionsmix behandelt. Die Kavitäten für die Leerwerte werden mit je 100 μl des Equilibrierungspuffers versetzt. Es folgt die Inkubation der Zellen mit dem Reaktionsmix für 16 h über Nacht. Zur Vorbereitung der Akzeptorinkubation wird am nächsten Tag zunächst die Positivkontrolle auf Eis aufgetaut und 1:5 in DMEM *Fluorobrite* verdünnt. Zudem wird das *High-density lipoprotein* (HDL) in DMEM *Fluorobrite* mit einer finalen Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ gelöst. Anschließend wird der Reaktionsmix von den Zellen entfernt und diese zweimal mit 200 μl DMEM *Fluorobrite* vorsichtig gewaschen. Zu den zu behandelnden Fibroblasten werden dann je 100 μl der HDL-Lösung hinzugegeben. Die Negativkontrolle sowie die Kavitäten für die Leerwerte werden mit je 100 μl reinem DMEM *Fluorobrite* und die Positivkontrolle wird mit der zuvor angesetzten 1:5 Verdünnung der mitgelieferten Positivkontrolle behandelt. Alle Ansätze

werden bei 37°C und 5% CO₂ für 24 h inkubiert. Am dritten Tag werden dann die Überstände in eine schwarze 96-Kavitäten Mikrotiterplatte überführt und bei $\lambda_{ex}= 482 \text{ nm}/\lambda_{em}= 515 \text{ nm}$ das Fluoreszenzsignal detektiert. In die Zellkulturplatte werden 100 μl des Lysepuffers gegeben und diese für 30 min bei 200 rpm und RT geschüttelt. Die Zellysate werden anschließend zu den jeweiligen Überständen pipettiert und eine zweite Messung bei $\lambda_{ex}= 482 \text{ nm}/\lambda_{em}= 515 \text{ nm}$ durchgeführt.

Anhand der ermittelten Werte lässt sich nun eine Aussage über den Cholesterolinflux, den Gesamt-Cholesterolefflux sowie über den Akzeptor-vermittelten Cholesterolefflux treffen. Der Akzeptor-vermittelte Cholesterolefflux ergibt sich dabei durch das Verhältnis zwischen der Menge an fluoreszenzmarkiertem Cholesterol im Überstand (Ü) zu der Gesamtmenge des fluoreszenzmarkiertem Cholesterol (L) jeweils nach Abzug des Signals der Leerwerte (B) sowie des Signals der Negativkontrolle (NK) (Gleichung 2).

$$\text{Akzeptor-vermittelter Cholesterolefflux [\%]:} \quad \frac{(\ddot{U}-B)-(NK-B)}{(L-B)-(NK-B)} \cdot 100 \quad (\text{Gleichung 2})$$

Ü: Fluoreszenzsignal im Überstand

L: Fluoreszenzsignal im Überstand + Lysat

B: Fluoreszenzsignal des Leerwerts

NK: Fluoreszenzsignal der Negativkontrolle

Der Gesamt-Cholesterolefflux ergibt sich weiterführend dann aus dem Verhältnis zwischen der Menge an fluoreszenzmarkiertem Cholesterol im Überstand (Ü) zu der Gesamtmenge des fluoreszenzmarkiertem Cholesterol (L) nach Abzug des Leerwertes ohne Berücksichtigung der Negativkontrolle (Gleichung 3).

$$\text{Gesamt-Cholesterolefflux [\%]:} \quad \frac{(\ddot{U}-B)}{(L-B)} \cdot 100 \quad (\text{Gleichung 3})$$

Ü: Fluoreszenzsignal im Überstand

L: Fluoreszenzsignal im Überstand + Lysat

B: Fluoreszenzsignal des Leerwerts

NK: Fluoreszenzsignal der Negativkontrolle

Zur Bestimmung des Cholesterolinflux kann die Gesamtmenge des fluoreszenzmarkierten Cholesterols (L) herangezogen werden, da dies der Menge entspricht, die während der Inkubation mit dem Reaktionsmix von den jeweiligen Fibroblasten aufgenommen werden konnte.

3.4. Statistische Analysen

GraphPad Prism 5.0 wird als statistische Software verwendet. Mittels Shapiro-Wilk-Test wird getestet, ob die Daten normalverteilt sind. Für die Analyse der Serumkonzentrationen wird im Fall einer Normalverteilung bei den vergleichenden Gruppen ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt. Liegt keine Normalverteilung vor wird der *Mann-Whitney U-Test* verwendet. Für die übrigen Analysen wird ebenfalls der *Mann-Whitney U-Test* verwendet. Bei $p < 0,05$ wird von einer statistischen Signifikanz ausgegangen.

4. Ergebnisse

Alterung ist ein heterogener Prozess, der durch den progressiven Verlust der physiologischen Funktionalität und Integrität charakterisiert ist. Im Laufe des Alterungsprozesses wird der Organismus demnach immer anfälliger für altersbedingte Erkrankungen wie Diabetes, Krebs oder kardiovaskuläre Erkrankungen, welche letztendlich zum Tod führen. Der Ansatz von López-Otín *et al.* zur Konzeptionalisierung des komplexen Alterungsprozesses gliedert die Kennzeichen der Alterung in drei grundlegende Kategorien, sodass zwischen primären, antagonistischen und integrativen Kennzeichen unterschieden wird (López-Otín *et al.*, 2013). Aus diesem Grund wird nachfolgend zunächst mit der Analyse integrativer Kennzeichen der Alterung begonnen, um ausgehend davon den potenziellen Alterungsprozess gezielt weiter über die antagonistischen und primären Kennzeichen im Ursprung zu charakterisieren. Abschließend werden die Ergebnisse bezüglich des Einflusses einer Statintherapie auf die zuvor evaluierten und auf weitere PXE-assoziierte Faktoren gezeigt.

4.1. Bestimmung molekularer und zellulärer Biomarker des Alterns im Serum bzw. Plasma sowie in primären Fibroblasten von PXE-Patienten sowie gesunden Kontrollen zur Analyse integrativer Kennzeichen der Alterung

Arbeiten auf dem Gebiet der Alterungsforschung konnten zeigen, dass Blut junger Mäuse verjüngende Effekte in älteren Mäusen bewirkt. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Blut von gesunden, jungen Probanden eine erhöhte Konzentration bestimmter Wachstumsfaktoren im Vergleich zum Blut von Älteren aufweist. Blut älterer Probanden hingegen zeigte eine Anreicherung von Faktoren, die zelluläre Alterungsprozesse begünstigen (Conboy *et al.*, 2005; Katsimpardi *et al.*, 2014; Loffredo *et al.*, 2013). In diesem Kontext werden vor allem der Growth Differentiation Factor 11 (GDF11), der Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1) und Eotaxin (CCL11) diskutiert (Loffredo *et al.*, 2013; Mariño *et al.*, 2010; Sinha *et al.*, 2014; Villeda *et al.*, 2011). Vor diesem Hintergrund sollte in dieser Arbeit zunächst der altersabhängige Konzentrationsverlauf von bekannten Biomarkern des Alterns im Serum bzw. Plasma von gesunden Spendern verifiziert werden. Hierfür wurden drei Altersgruppen (≤ 30 Jahre, 31-49 Jahre und ≥ 50 Jahre) gebildet. Anschließend sollte eine vergleichende Analyse zwischen den Serumkonzentrationen dieser Biomarker des Alterns von gesunden Probanden und PXE-Patienten durchgeführt werden. Dafür wurden zwei Altersgruppen (< 45 Jahre und > 45 Jahre) gebildet. Zusätzlich wurden die Genexpressionen ausgewählter

Biomarker in primären humanen dermalen Fibroblasten von gesunden Spendern sowie von PXE-Patienten untersucht.

4.1.1. Bestimmung molekularer Biomarker des Alterns im Serum und Plasma von gesunden Kontrollen unterschiedlichen Alters

In Abbildung 6 A ist das Ergebnis der CCL11-Proteinkonzentration im Serum der gesunden Spender unterschiedlichen Alters gezeigt. Wie zu erkennen ist, stieg die CCL11-Proteinkonzentration im Serum mit dem Alter der Spender an, sodass eine signifikante 1,5-fache Erhöhung der CCL11-Serumkonzentration zwischen der Altersgruppe ≤ 30 Jahre und den Spendern ≥ 50 Jahre detektiert werden konnte.

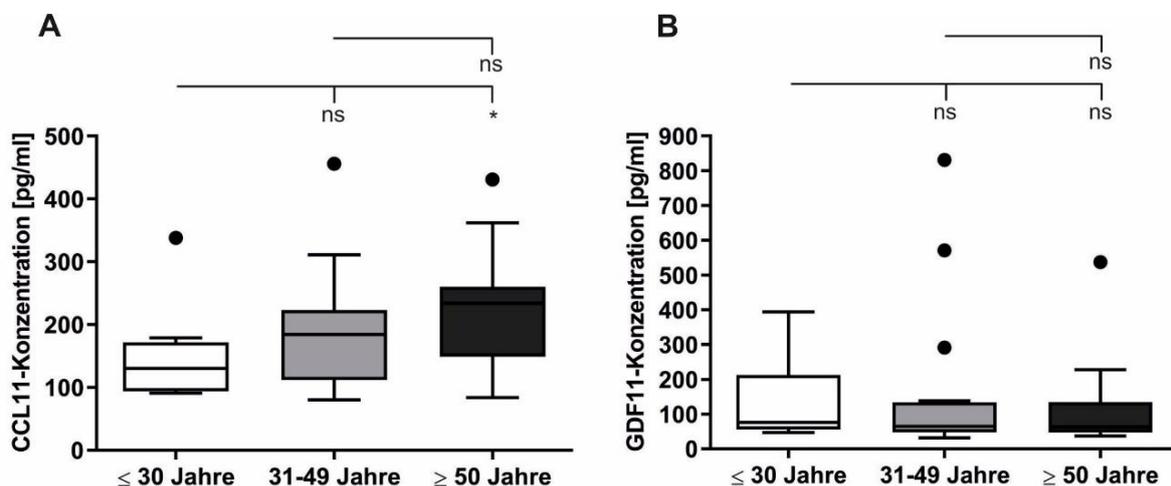


Abbildung 6: CCL11- und GDF11- Proteinkonzentration im Serum gesunder Kontrollen unterschiedlichen Alters. (A) CCL11-Proteinkonzentration im Serum (B) GDF11-Proteinkonzentration im Serum. Gezeigt sind die Altersklassen ≤ 30 Jahre (n=8), 31-49 Jahre (n=22) sowie ≥ 50 Jahre (n=15). Die Daten sind gezeigt als Box-Plot mit Median, 25. und 75. Perzentil und Tukey Whiskers ($\pm 1,5$ -facher Interquartilsabstand). ≤ 30 Jahre/ 31-49 Jahre: ns $p>0.05$. ≤ 30 Jahre/ ≥ 50 Jahre: * $p<0.05$; ns $p>0.05$. 31-49 Jahre/ ≥ 50 Jahre: ns $p>0.05$.

Als zweiter bekannter Biomarker des Alterns wurde die GDF11-Proteinkonzentration im Serum gesunder Spender unterschiedlichen Alters bestimmt (Abb. 6 B). Einige Werte der Messung lagen unterhalb der Detektionsgrenze und wurden nicht in die weitere Analyse einbezogen. Nach Ausschluss dieser Werte zeigte sich vor allem zwischen den Spendern ≤ 30 Jahre und der Spendergruppe im Alter von 31-49 Jahren eine tendenzielle Erniedrigung der GDF11-Proteinkonzentration im Serum, welche aber keine statistische Signifikanz erreichte. In Abbildung 7 A sind die Ergebnisse der Analyse der IGF1-Proteinkonzentration im Serum zu erkennen. Hier zeigte sich, entgegengesetzt zu den Ergebnissen für CCL11, eine

Erniedrigung der IGF1-Serumkonzentration mit steigendem Alter der gesunden Spender. So konnte eine signifikante 0,7-fache Erniedrigung der IGF1-Serumkonzentration bei den Spendern ≥ 50 Jahre im Vergleich zu den Spendern aus der Gruppe ≤ 30 Jahre ermittelt werden. Für die Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP3)-Proteinkonzentration im Serum konnte hingegen, ähnlich wie bei GDF11, eine tendenzielle Erniedrigung mit steigendem Alter detektiert werden, welche sich vorrangig zwischen der Altersgruppe ≤ 30 Jahre und der Altersgruppe 31-49 Jahre zeigte (Abb. 7 B). Auch diese Ergebnisse erreichten jedoch keine statistische Signifikanz.

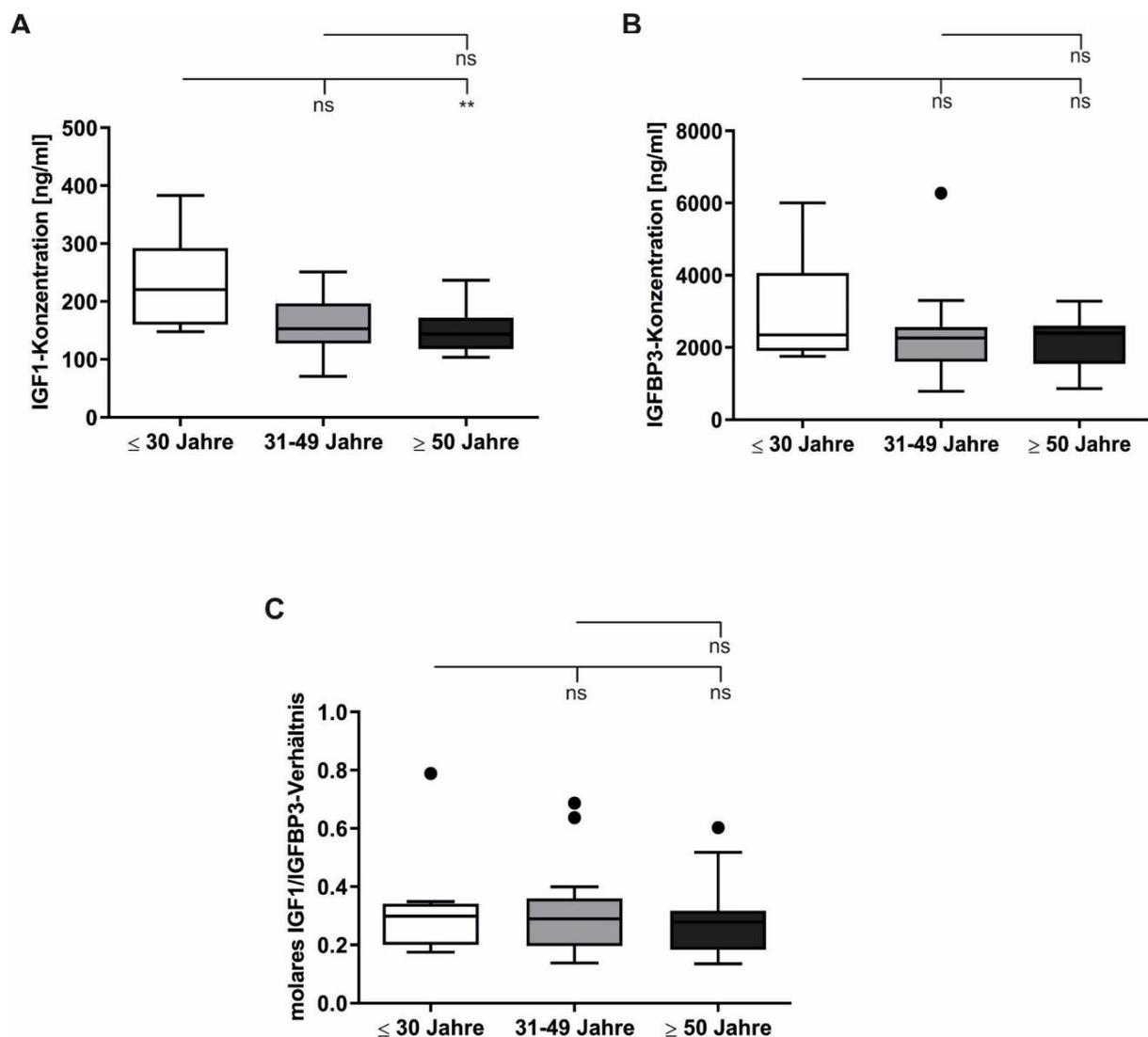


Abbildung 7: IGF1- und IGFBP3- Proteinkonzentration im Serum gesunder Kontrollen unterschiedlichen Alters sowie das molare IGF1/IGFBP3-Verhältnis. (A) IGF1-Proteinkonzentration im Serum (B) IGFBP3-Proteinkonzentration im Serum (C) molares IGF1/IGFBP3-Verhältnis. Gezeigt sind die Altersklassen ≤ 30 Jahre (n=8), 31-49 Jahre (n=22) sowie ≥ 50 Jahre (n=15). Die Daten sind gezeigt als Box-Plot mit Median, 25. und 75. Perzentil und Tukey Whiskers ($\pm 1,5$ -facher Interquartilsabstand). ≤ 30 Jahre/ 31-49 Jahre: ns $p > 0.05$. ≤ 30 Jahre/ ≥ 50 Jahre: ** $p \leq 0.01$; ns $p > 0.05$. 31-49 Jahre/ ≥ 50 Jahre: ns $p > 0.05$.

Um eine bessere Bewertung über die Verfügbarkeit von freiem IGF1 im Serum abgeben zu können, wurde ebenfalls das molare Verhältnis zwischen der IGF1-Serumkonzentration und der IGFBP3-Serumkonzentration ermittelt (Abb.: 7 C). Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede mit dem Alter und damit zwischen den einzelnen Altersgruppen. Als letzter Parameter sollte die PPI-Konzentration im Plasma gesunder Kontrollen unterschiedlichen Alters ermittelt werden. PPI ist nicht direkt ein bekannter Biomarker des Alterns, jedoch konnten vorangegangene Arbeiten zeigen, dass bei PXE-Patienten eine gestörte PPI-Homöostase vorliegt, die mit signifikant erniedrigten PPI-Plasmakonzentrationen einhergeht (Jansen *et al.*, 2014). Dieser systemische Mangel an dem Kalzifizierungsinhibitor PPI trägt folglich unter anderem zu der Kalzifizierung der Blutgefäße bei. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen einer Veränderung der Plasma PPI-Konzentration und möglichen Alterungsprozessen zu analysieren, wurde ein enzymatischer Lumineszenzassay zur Bestimmung der Plasma PPI-Konzentration in gesunden Kontrollen verschiedenen Alters durchgeführt. Wie in Abbildung 8 zu sehen, konnte ein signifikanter Anstieg der Plasma PPI-Konzentration in der Altersgruppe 31-49 Jahre im Vergleich zu der Gruppe ≤ 30 Jahre festgestellt werden (1,5-fach). Die Plasma PPI-Konzentration bei den gesunden Kontrollen ≥ 50 Jahre zeigte aufgrund einer großen Schwankung zwischen den Individuen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollen der Altersgruppe 31-49 Jahre sowie im Vergleich zu den Kontrollprobanden ≤ 30 Jahre.

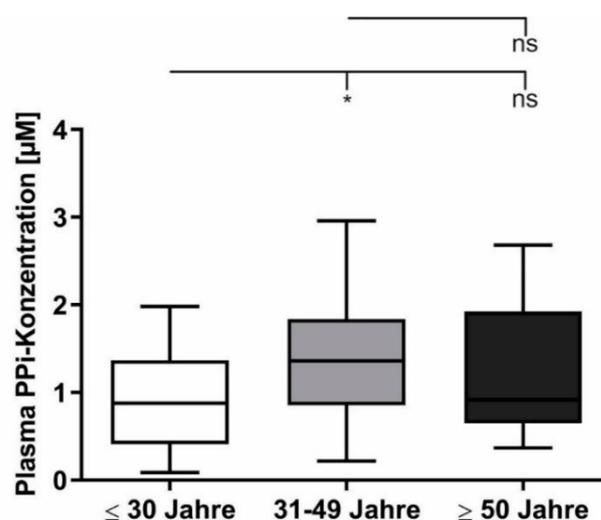


Abbildung 8: Plasma PPI-Konzentration gesunder Kontrollen unterschiedlichen Alters. Gezeigt sind die Altersklassen ≤ 30 Jahre (n=26), 31-49 Jahre (n=25) sowie ≥ 50 Jahre (n=20). Die Daten sind gezeigt als Box-Plot mit Median, 25. und 75. Perzentil und Tukey Whiskers ($\pm 1,5$ -facher Interquartilsabstand). ≤ 30 Jahre/ 31-49 Jahre: * $p \leq 0.05$. ≤ 30 Jahre/ ≥ 50 Jahre: ns $p > 0.05$. 31-49 Jahre/ ≥ 50 Jahre: ns $p > 0.05$.

4.1.2. Vergleich von molekularen und zellulären Biomarkern des Alterns im Serum und primären Fibroblasten von PXE-Patienten und gesunden Kontrollen

Klinische Symptome der PXE-Patienten, wie das Auftreten einer vorzeitigen Makuladegeneration, der Verlust der Hautelastizität sowie einer progredienten Arteriosklerose, könnten darauf hindeuten, dass PXE zu den Erkrankungen gehört, die mit einer vorzeitigen Alterungssymptomatik einhergehen. Interessanterweise können zudem pathobiochemische Parallelen zu Syndromen, bei denen eine vorzeitige Alterung bekannt ist (u.a. HGPS), festgestellt werden (Villa-Bellosta *et al.*, 2013). Weiterführend konnten Parabiose-Experimente mit *Abcc6*^{-/-}/*Rag*^{-/-}-Mäusen und gesunden Mäusen zeigen, dass durch eine gemeinsame Zirkulation der PXE-Phänotyp in den *Abcc6*-defizienten Mäusen durch bislang unbekannte Faktoren im Blut der gesunden Mäuse reversiert werden kann (Jiang *et al.*, 2010). Vor diesem Hintergrund erfolgte eine vergleichende Analyse der Konzentration der zuvor schon genannten Marker im Serum und in primären humanen dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten und gesunden Kontrollen. Die vergleichende Analyse der Faktoren sollte erste Hinweise auf einen möglichen frühzeitigen molekularen Alterungsprozess bei PXE erbringen. Um eine verlässlichere Aussage über das Verhältnis zwischen PXE und Kontrolle zu bekommen, wurden für die vergleichende Analyse, die Altersgruppen von drei auf zwei reduziert und somit die Fallzahl pro Altersgruppe erhöht.

4.1.2.1. Quantifizierung der CCL11-Serumkonzentration

Wie in Abbildung 9 zu sehen, stieg die CCL11-Proteinkonzentration im Serum sowohl bei PXE-Patienten als auch bei den gesunden Kontrollen mit dem Alter signifikant an. Sowohl die PXE-Kohorte > 45 Jahre wie auch die Kontroll-Kohorte > 45 Jahre zeigten demnach eine 1,5-fache Erhöhung im Vergleich zu der jeweiligen Kohorte < 45 Jahre. Zwischen der CCL11-Proteinkonzentration im Serum der Kontrollen und der PXE-Patienten konnten weder bei den Kohorten < 45 Jahre, noch bei den Kohorten > 45 Jahre signifikante Unterschiede festgestellt werden.

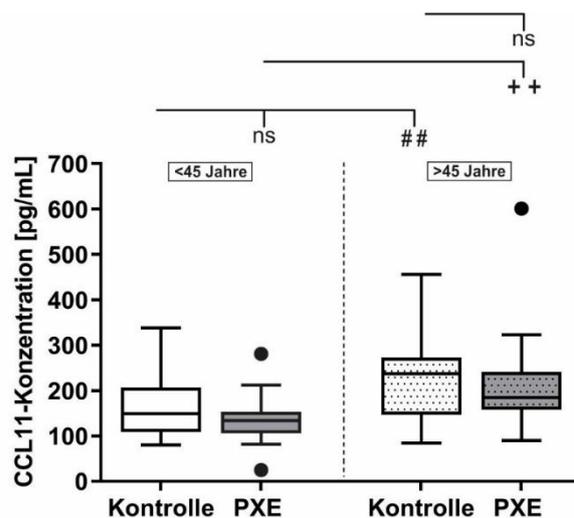


Abbildung 9: CCL11-Proteinkonzentration in Serum von gesunden Kontrollen (weiß) und PXE-Patienten (grau). Gezeigt sind die Altersklassen < 45 Jahre (n=23) sowie > 45 Jahre (n=22). Die Daten sind gezeigt als Box-Plot mit Median, 25. und 75. Perzentil und Tukey Whiskers ($\pm 1,5$ -facher Interquartilsabstand). Kontrolle/ PXE: ns $p > 0.05$. Kohorte (< 45 Jahre)/ Kohorte (> 45 Jahre): ##/++ $p \leq 0.01$.

4.1.2.2. Bestimmung der GDF11-Proteinkonzentration im Serum sowie der *GDF11*-Genexpression in primären Fibroblasten

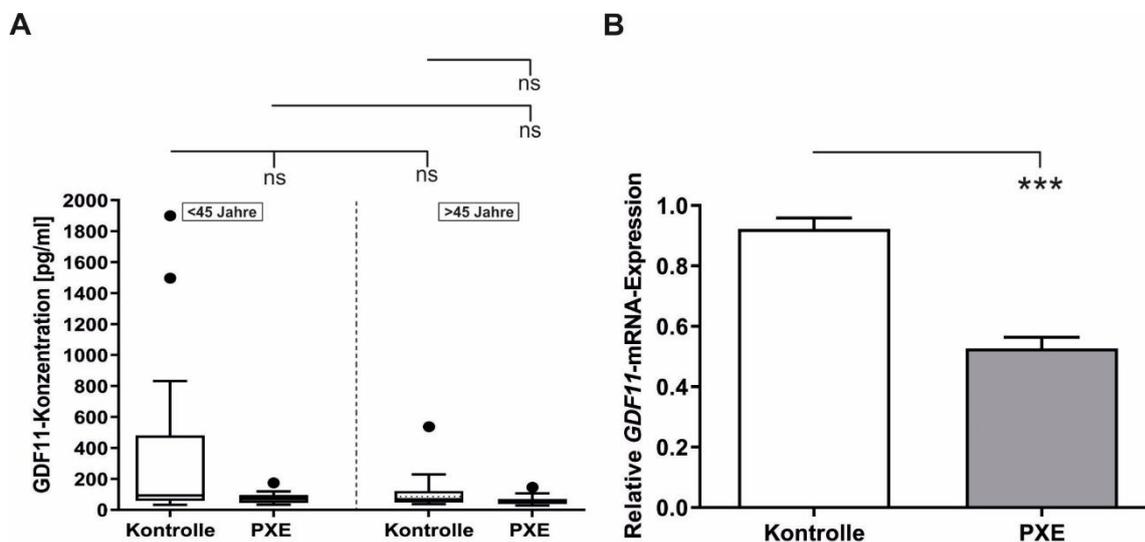


Abbildung 10: Systemische GDF11-Proteinkonzentration im Serum und lokale relative *GDF11*-mRNA-Expression in Fibroblasten gesunder Kontrollen (weiß) und PXE-Patienten (grau) (A) GDF11-Proteinkonzentration im Serum von gesunden Kontrollen und PXE-Patienten. Gezeigt sind die Altersklassen < 45 Jahre (n=23) sowie > 45 Jahre (n=22). Die Daten sind gezeigt als Box-Plot mit Median, 25. und 75. Perzentil und Tukey Whiskers ($\pm 1,5$ -facher Interquartilsabstand). Kontrolle/ PXE: ns $p > 0.05$. Kohorte (< 45 Jahre)/ Kohorte (> 45 Jahre): ns $p > 0.05$. (B) Relative *GDF11*-mRNA-Expression in Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3) nach 21 d Kultivierung in 10% FCS. Die Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardfehler. Kontrolle/ PXE: *** $p \leq 0.001$.

Für die Bestimmung der GDF11-Proteinkonzentration im Serum der PXE-Patienten sowie der Kontrollen konnten 20% der Messungen aufgrund von Werten unterhalb des Detektionslimits nicht für die Analyse verwendet werden (Abb. 10 A). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der GDF11-Serumkonzentration in PXE-Patienten und Kontrollen festgestellt werden. Ebenso konnte keine signifikante altersabhängige Veränderung der GDF11-Proteinkonzentration im Serum weder bei den Kontrollen noch bei den PXE-Patienten ermittelt werden. Um die GDF11-Expression in PXE-Patienten weiter zu analysieren, wurde die *GDF11*-Genexpression in primären humanen dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten sowie gesunden Kontrollen gemessen (Abb. 10 B). Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion der *GDF11*-mRNA-Expression in den PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollen (0,6-fach).

4.1.2.3. Bestimmung der IGF1- und IGFBP3-Proteinkonzentration im Serum sowie der IGFBP3-Genexpression in primären Fibroblasten

Für die IGF1-Proteinkonzentration im Serum konnte bei den gesunden Kontrollen aufgrund der neuen Gruppenbildung keine signifikante Erniedrigung der Konzentration mit dem Alter mehr festgestellt werden (Abb. 11 A). So zeigte sich in diesem Fall lediglich eine tendenzielle Erniedrigung der IGF1-Proteinkonzentration im Serum für die gesunden Kontrollen mit steigendem Alter. Ebenso konnte nur eine geringfügige nicht signifikante Erniedrigung der IGF1-Serumkonzentration bei den PXE-Patienten < 45 Jahren im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen ermittelt werden.

Für die IGFBP3-Proteinkonzentration im Serum konnten weder für die PXE-Patienten noch für die Kontrollen altersabhängige Veränderungen ermittelt werden (Abb. 11 B). Es zeigte sich jedoch eine signifikante Erhöhung der IGFBP3-Serumkonzentration für PXE-Patienten > 45 Jahre im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen (1,2-fach). Als Folge dessen, zeigte sich ebenfalls eine signifikante Erniedrigung des molaren Verhältnisses von IGF1/IGFBP3 für die PXE-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen (0,7-fach, Abb. 11 C).

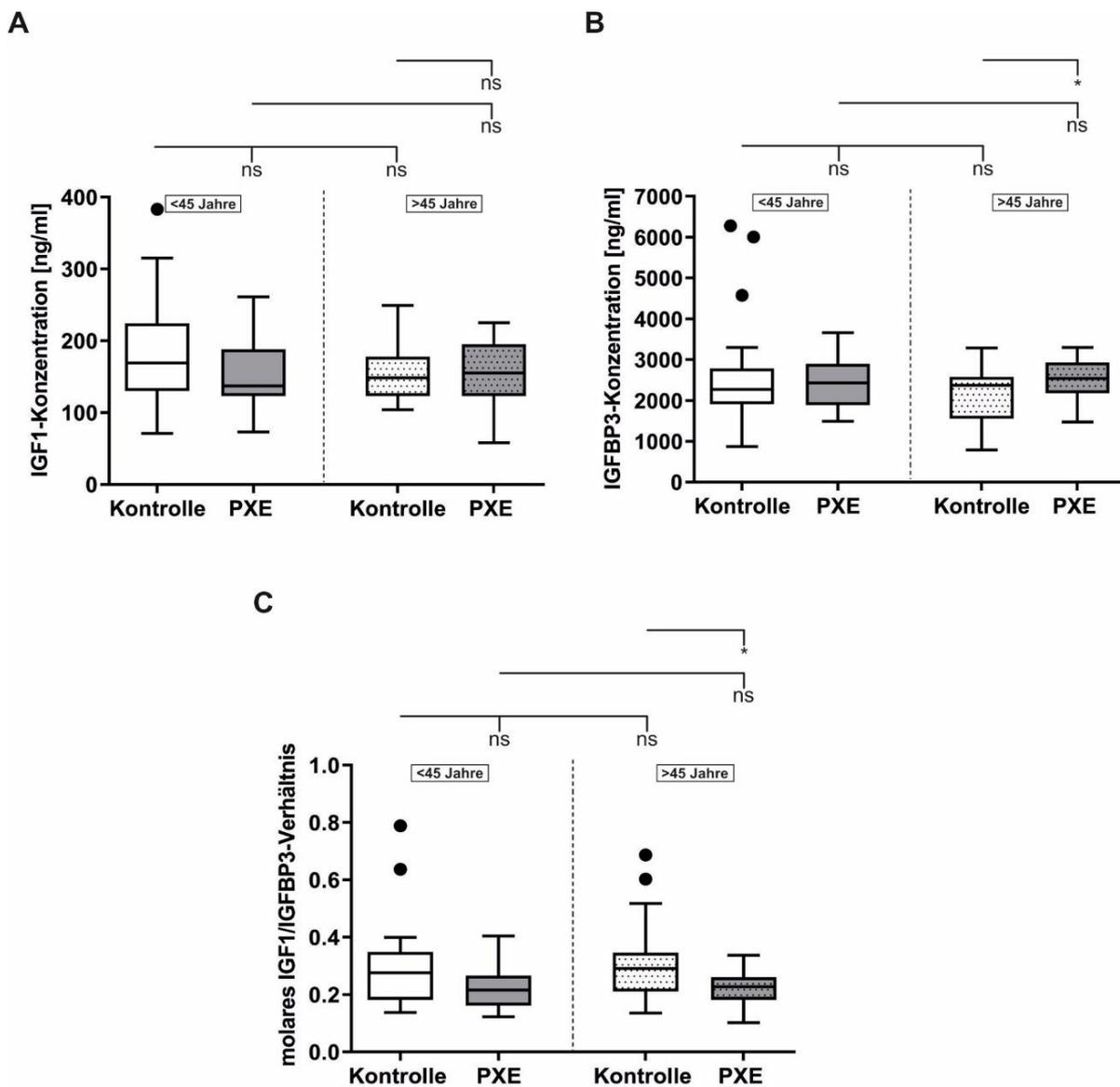


Abbildung 11: Systemische IGF1- und IGFBP3-Proteinkonzentration in Serum von gesunden Kontrollen (weiß) und PXE-Patienten (grau). (A) IGF1-Proteinkonzentration in Serum von gesunden Kontrollen und PXE-Patienten. (B) IGFBP3-Proteinkonzentration in Serum von gesunden Kontrollen und PXE-Patienten. (C) molares IGF1/IGFBP3-Verhältnis der Proteinkonzentration in Serum von gesunden Kontrollen und PXE-Patienten. Gezeigt sind die Altersklassen < 45 Jahre (n=23) sowie > 45 Jahre (n=22). Die Daten sind gezeigt als Box-Plot mit Median, 25. und 75. Perzentil und Tukey Whiskers ($\pm 1,5$ -fache Interquartilsabstand). Kontrolle/PXE: * $p \leq 0,05$; ns $p > 0,05$. Kohorte (< 45 Jahre)/Kohorte (> 45 Jahre): ns $p > 0,05$.

Aufgrund der veränderten IGFBP3-Serumkonzentrationen bei PXE-Patienten, wurde weiterführend die Genexpression, sowie die Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand von Fibroblasten von PXE-Patienten sowie von gesunden Kontrollen gemessen. Wie Abbildung 12 A zeigt, konnte eine signifikante 0,4-fache Erniedrigung der *IGFBP3*-mRNA-Expression in den PXE-Fibroblasten im Vergleich zur Kontrolle ermittelt werden.

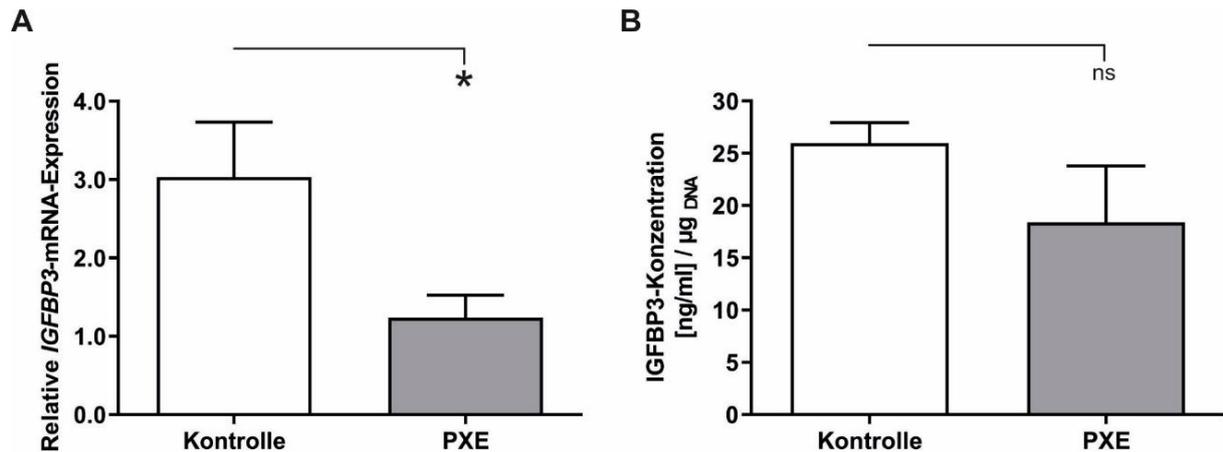
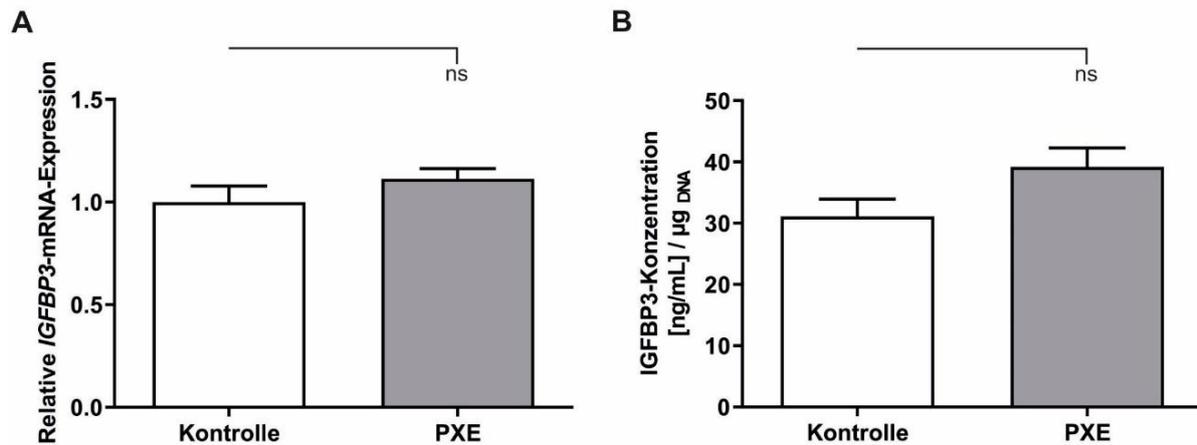


Abbildung 12: Lokale relative *IGFBP3*-mRNA-Expression und *IGFBP3*-Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand von Fibroblasten gesunder Kontrollen (weiß) und PXE-Patienten (grau). Fibroblasten wurden für 21 d in Medium mit 10% FCS kultiviert. (A) Relative *IGFBP3*-mRNA-Expression in Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3). (B) *IGFBP3*-Proteinkonzentration im Überstand von Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3). Die Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardfehler. Kontrolle/PXE: * $p \leq 0.05$; ns $p > 0.05$.

Im Hinblick auf die entsprechende *IGFBP3*-Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand ergab sich ebenfalls eine leichte Reduktion, welche jedoch keine statistische Signifikanz erreichte (Abb. 12 B). Um einen möglichen Einfluss des Geschlechts zu eruieren, wurden die Daten geschlechtsabhängig ausgewertet. So zeigten sich für die Fibroblasten der weiblichen PXE-Patientin keine Veränderung bzw. sogar eine tendenzielle Steigerung der *IGFBP3*-mRNA-Expression und Proteinkonzentration im Überstand im Vergleich zu der entsprechenden Kontrolle (Abb. 13 A und B). Die Fibroblasten der männlichen PXE-Patienten zeigten hingegen eine signifikante Reduktion sowohl der *IGFBP3*-mRNA-Expression (0,3-fach) als auch der Proteinkonzentration im Überstand (0,3-fach) im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen (Abb. 13 C und D).

Weiblich



Männlich

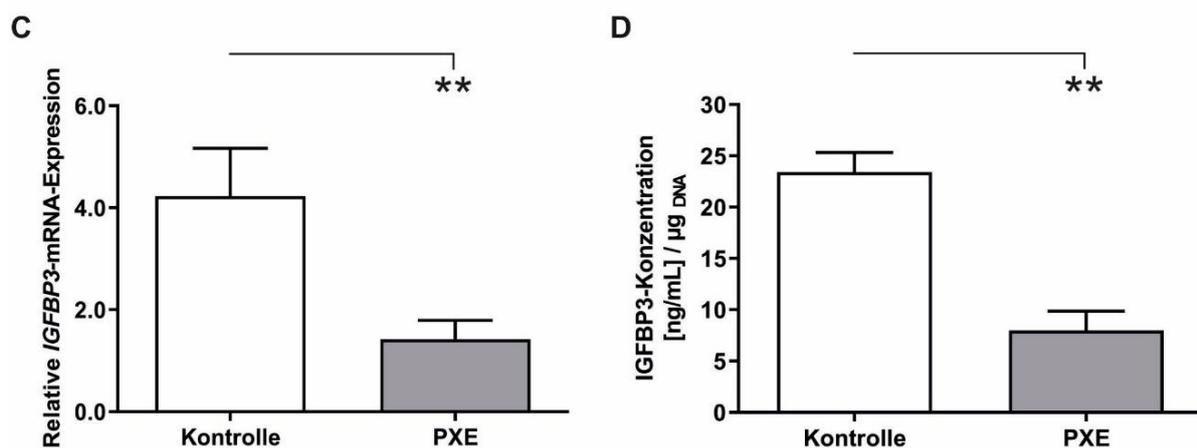


Abbildung 13: Geschlechtsspezifische relative *IGFBP3*-mRNA-Expression und IGFBP3-Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand von Fibroblasten gesunder Kontrollen (weiß) und PXE-Patienten (grau). Fibroblasten wurden für 21 d in Medium mit 10% FCS kultiviert. (A) Relative *IGFBP3*-mRNA-Expression von weiblichen Kontroll-Fibroblasten (n=1) und PXE-Fibroblasten (n=1) (B) IGFBP3-Proteinkonzentration im Überstand von weiblichen Kontroll-Fibroblasten (n=1) und PXE-Fibroblasten (n=1). (C) Relative *IGFBP3*-mRNA-Expression von männlichen Kontroll-Fibroblasten (n=2) und PXE-Fibroblasten (n=2). (D) IGFBP3-Proteinkonzentration im Überstand von männlichen Kontroll-Fibroblasten (n=2) und PXE-Fibroblasten (n=2). Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardfehler. Kontrolle/PXE: ** p \leq 0.01; ns p>0.05.

4.2. Identifizierung und Charakterisierung einer möglichen frühzeitigen zellulären Seneszenz als antagonistisches Kennzeichen der Alterung bei PXE

Aufbauend auf dem vorangegangenen Teil dieser Arbeit, sollte nun im nächsten Schritt ein beschleunigter Alterungsprozess auf zellulärer Ebene anhand der zellulären Seneszenz als antagonistisches Kennzeichen der Alterung bei PXE-Fibroblasten identifiziert und näher charakterisiert werden. Dabei sollte sowohl die Ausprägung eines seneszenten Phänotyps als auch die Ausbildung eines entsprechenden Sekretoms anhand von prominenten Seneszenzmarkern untersucht werden. Zudem sollte erörtert werden, welche Zellzyklusinhibitoren eine potenzielle Rolle bei der Initiation einer möglichen Seneszenz spielen.

4.2.1. Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität sowie der Lamin B1-Gen- und Proteinexpression als Seneszenz-assoziierte Marker

Der prominenteste Biomarker für den Nachweis seneszenten Zellen stellt die Bestimmung der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase (SA- β Gal) - Aktivität dar. Wie in Abbildung 14 A und B zu sehen, wurde diese sowohl qualitativ durch die Spaltung von X-Gal als auch semi-quantitativ durch die Umwandlung von MUG zu fluoreszierendem 4-MU bestimmt. Eine bläuliche Verfärbung im Fall des qualitativen Nachweises, sowie ein erhöhtes Fluoreszenzsignal im Fall des semi-quantitativen Nachweises sprechen dabei für eine erhöhte SA- β Gal - Aktivität und damit für eine vermehrte Seneszenz in der Kultur.

Bereits der qualitative Nachweis zeigte, dass der Anteil an bläulich gefärbten und damit seneszenten Zellen bei den PXE-Fibroblasten sowohl bei der Kultivierung in Medium mit 10% FCS als auch bei der Kultivierung in Medium mit 10% LPDS deutlich höher war als bei den entsprechenden Kontrollen (Abb. 14 A). Es zeigte sich ebenfalls, dass die PXE-Fibroblasten ein vergrößertes Zellvolumen im Vergleich zu den Kontrollen aufwiesen. Die Quantifizierung erfolgte demnach auf Basis eines abgewandelten Fluoreszenz-basierten Tests. Wie in Abbildung 14 B zu sehen, konnte auch hier ein signifikant 1,6-fach erhöhtes Fluoreszenzsignal für die PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontroll-Fibroblasten bei der Kultivierung in Medium mit 10% FCS ermittelt werden. Dies bestätigt die auf Basis des qualitativen Nachweises geäußerte Vermutung, dass der Anteil an seneszenten Zellen in der

Kultur der PXE-Fibroblasten signifikant höher gewesen ist als bei der entsprechenden Kontrolle.

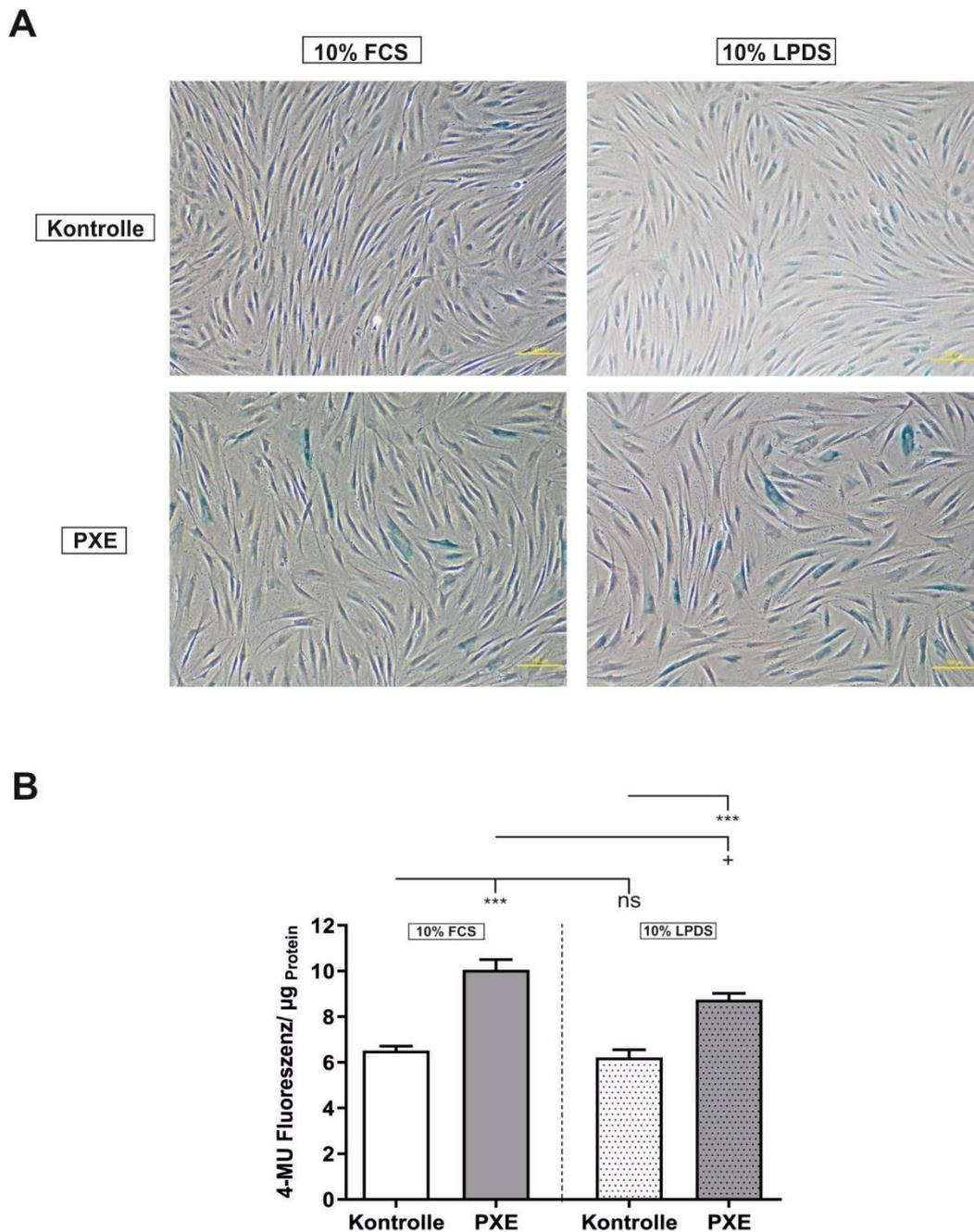


Abbildung 14: Nachweis der SA-β-Gal-Aktivität in Kontrollen (weiß) und PXE-Fibroblasten (grau). Fibroblasten wurden für 72 h in Medium mit 10% FCS oder 10% LPDS kultiviert. **(A)** Qualitative Bestimmung der SA-β-Gal-Aktivität in Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3). Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen. Maßstabsbalken: 100 µm. **(B)** Quantitative Bestimmung der SA-β-Gal-Aktivität in Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3). Kontrolle/ PXE: *** $p \leq 0.001$. 10% FCS/ 10% LPDS: + $p \leq 0.05$; ns $p > 0.05$.

Auch unter delipidierten Bedingungen zeigte sich eine signifikante 1,5-fache Erhöhung des Fluoreszenzsignals und damit ein erhöhter Anteil an seneszenten Zellen für die

PXE-Fibroblasten im Vergleich zur den entsprechenden Kontroll-Fibroblasten. Auch hier konnte also das Ergebnis des qualitativen Nachweises bestätigt werden. Zudem konnte durch den Fluoreszenz-basierten Nachweis gezeigt werden, dass es keinen signifikanten Unterschied in dem Anteil an seneszenten Zellen zwischen den Kontrollkulturen der unterschiedlichen Behandlungen gibt. Es zeigte sich jedoch, dass die Kultivierung in Medium mit 10% LPDS im Vergleich zu der Kultivierung mit 10% FCS zu einer signifikanten Verringerung des Anteils an seneszenten Zellen in den PXE-Fibroblastenkulturen führte (0,9-fach).

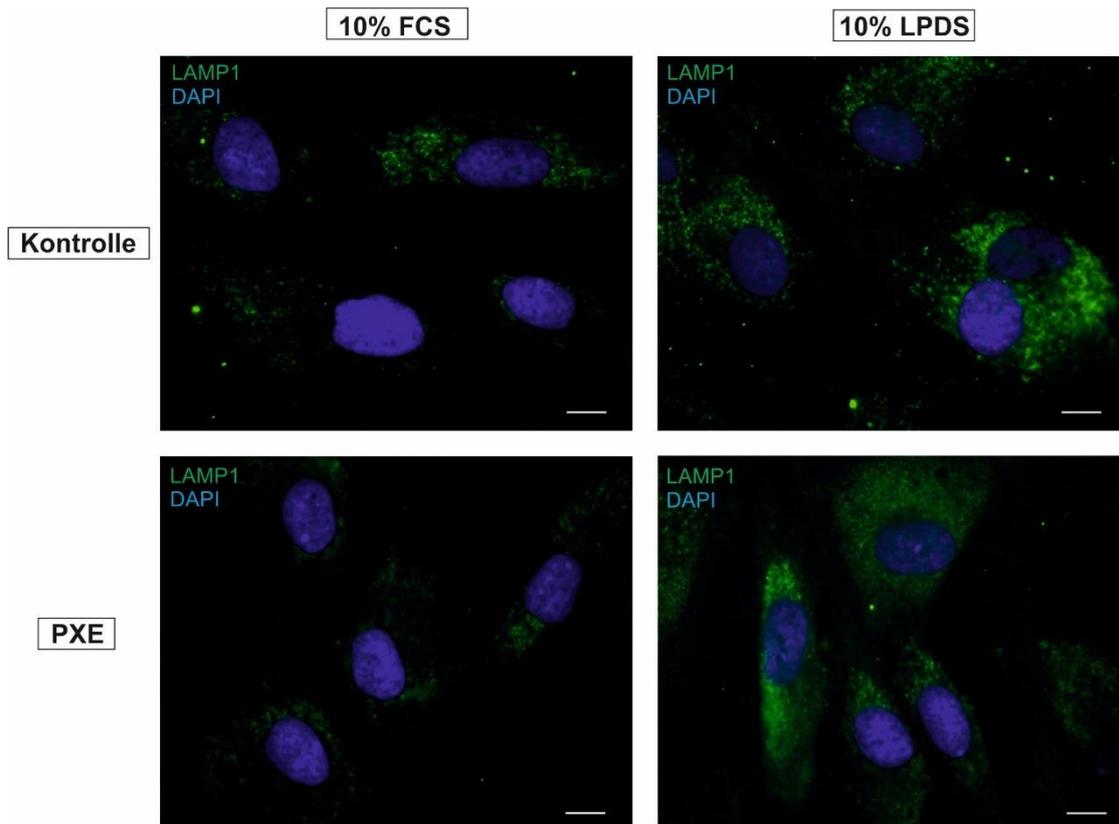


Abbildung 15: Immunfluoreszenzmikroskopie des Lysosomenmarkers LAMP1 in PXE-Fibroblasten und Kontrollen. Fibroblasten wurden für 72 h in Medium mit 10% FCS oder 10% LPDS kultiviert. Immunfluoreszenz des Lysosomenmarkers LAMP1 (grün) in Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3). Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen. Maßstabsbalken: 10 μ m.

Da es sich bei der β -Galaktosidase um ein lysosomales Enzym handelt, sollte weiterführend ebenfalls analysiert werden, ob die erhöhte detektierte Aktivität dieses Enzyms bei PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollen auf ein erhöhtes Vorkommen an Lysosomen zurückzuführen ist. Dazu wurde das Lysosomen-spezifische Protein Lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1) mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Aufgrund eines durchgängigen verhältnismäßig schwachen Signals konnten nicht alle Aufnahmen jeder Zelllinie eine verlässliche Aussage liefern. Es zeigten sich jedoch generell keine ersichtlichen

signifikanten Unterschiede bezüglich des LAMP1-Proteinlevels und demnach vermutlich ebenfalls keine großen Alterationen der Lysosomenanzahl zwischen PXE- und Kontroll-Fibroblasten, weder bei der Kultivierung in Medium mit 10% FCS noch bei der Kultivierung in 10% LPDS (Abb. 15). Abgesehen davon konnte jedoch trotz gleichbleibender bzw. sinkender SA- β -Gal - Aktivität in den Kontroll- bzw. PXE-Fibroblastenkulturen eine leichte Erhöhung des LAMP1-Proteinlevels bei der Kultivierung in 10% LPDS für beide Kulturen im Vergleich zu der Kultivierung in 10% FCS ermittelt werden.

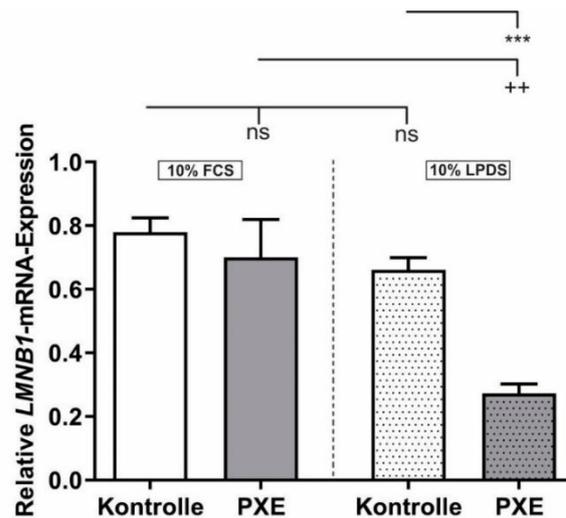


Abbildung 16: Relative *LMNB1*-mRNA-Expression in Kontrollen (weiß) und PXE-Fibroblasten (grau). Relative *LMNB1*-mRNA-Expression in Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3) nach 24 h Kultivierung in 10% FCS oder 10% LPDS. Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardfehler. Kontrolle/PXE: *** $p \leq 0.001$; ns $p > 0.05$. 10% FCS/ 10% LPDS: ++ $p \leq 0.01$; ns $p > 0.05$.

Zusätzlich zu der SA- β Gal - Aktivität ist bereits gezeigt worden, dass der Verlust von Lamin B1 als Seneszenzmarker dienen kann (Freund *et al.*, 2012; Shimi *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2017). Demzufolge wurde sowohl die *LMNB1*-mRNA-Expression als auch die Lamin B1-Proteinexpression und Lokalisation mittels Immunfluoreszenz analysiert. Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse. So konnten bei der Kultivierung in Medium mit 10% FCS keine signifikanten Unterschiede zwischen den PXE-Fibroblasten und den Kontroll-Fibroblasten festgestellt werden. Es zeigten sich zudem keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll-Fibroblasten, welche in Medium mit 10% FCS und den Kontroll-Fibroblasten, welche in Medium mit 10% LPDS kultiviert wurden. Für die PXE-Fibroblasten hingegen konnte eine signifikante Reduktion der *LMNB1*-mRNA-Expression unter delipidierten Bedingungen im Vergleich zu den Kontrollen, welche ebenfalls in Medium mit 10% LPDS kultiviert wurden (0,4-fach), wie auch zu den

PXE-Fibroblasten, welche in Medium mit 10% FCS kultiviert wurden (0,4-fach) festgestellt werden.

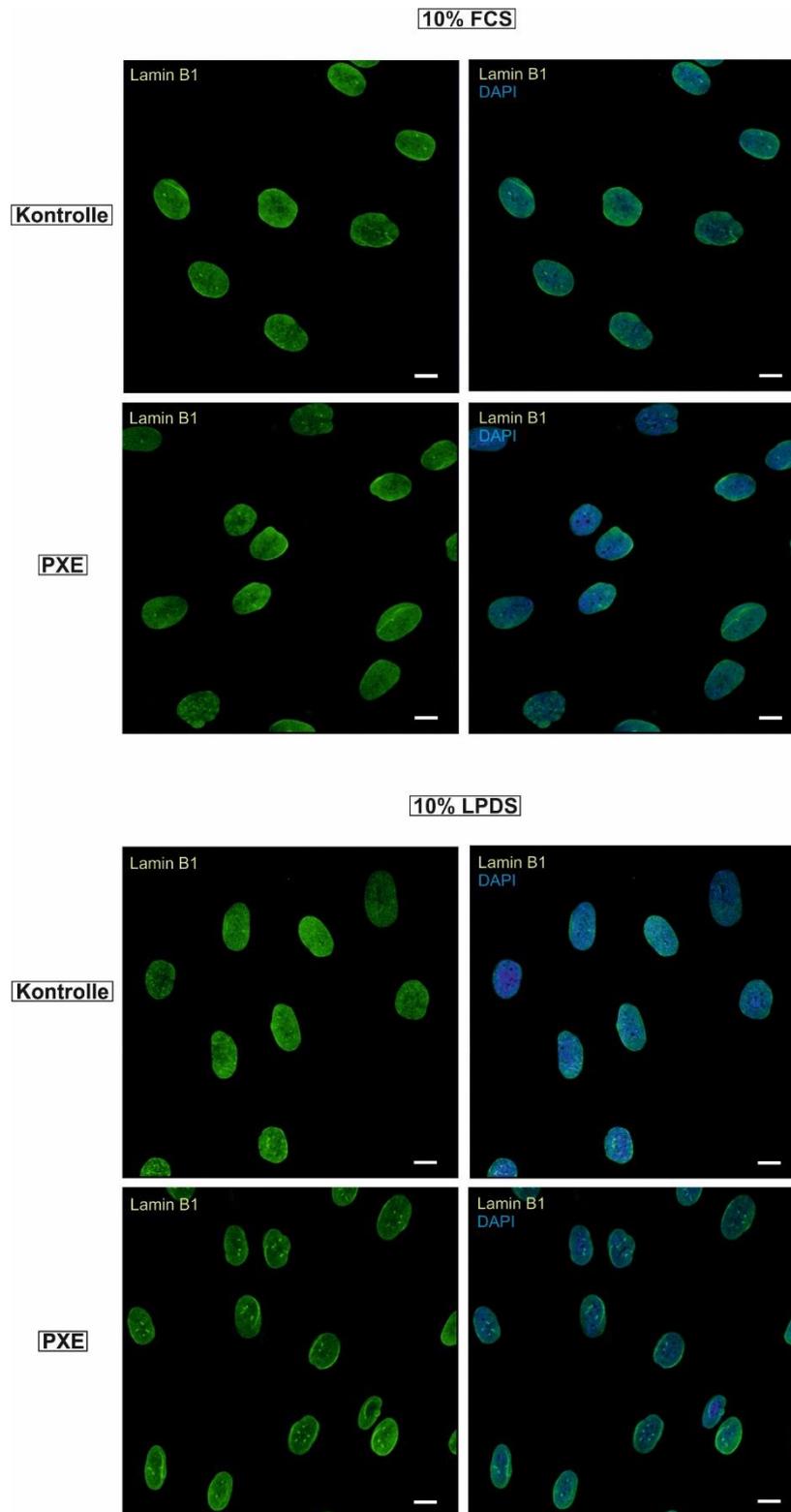


Abbildung 17: Konfokale Laserscannmikroskopie von Lamin B1 in Kontrollen und PXE-Fibroblasten. Immunfluoreszenz von Lamin B1 (grün) in Kontrollen (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3) nach 72 h Kultivierung in 10% FCS oder 10% LPDS. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen. Maßstabsbalken: 10 μ m.

Für die Beurteilung der Proteinexpression sowie der Verteilung von Lamin B1 wurde zusätzlich eine Immunfluoreszenz durchgeführt (Abb. 17). Hierbei konnten keine Unterschiede, weder zwischen PXE-Fibroblasten und Kontroll-Fibroblasten noch zwischen den verschiedenen Medien festgestellt werden.

4.2.2. Relative Gen- sowie Proteinexpression potenziell relevanter Faktoren des Zellzyklus

Für die Evaluation der potenziellen Rolle verschiedener Zellzyklusinhibitoren bei der Initiation des seneszenten Status in PXE-Fibroblasten wurden die Genexpression der Inhibitoren *p27*, *p21* sowie *p53* als prominente Marker seneszenten sowie quieszenten Zellen gemessen. Zusätzlich wurden diese, wie auch diverse weitere Faktoren der Zellzykluskontrolle mittels Antikörper-*Array* analysiert.

Für die *p27*-mRNA-Expression konnte in PXE-Fibroblasten sowohl bei der Kultivierung in Medium mit 10% FCS (0,5-fach) wie auch bei der Kultivierung in Medium mit 10% LPDS (0,4-fach) eine signifikante Reduktion im Vergleich zu den jeweiligen Kontroll-Fibroblasten festgestellt werden (Abb. 18 A). Keine signifikanten Unterschiede zeigten sich zwischen den Kontroll-Fibroblasten, welche in Medium mit 10% FCS kultiviert wurden und den Kontroll-Fibroblasten, welche in Medium mit 10% LPDS kultiviert wurden. Im Gegensatz dazu konnte unter delipidierten Bedingungen eine signifikante 0,6-fache Reduktion der *p27*-Genexpression bei den PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den PXE-Fibroblasten, welche in Medium mit 10% FCS kultiviert wurden, festgestellt werden.

Bei der Genexpressionsanalyse zeigte sich für *p21*, anders als bei *p27*, sowohl unter delipidierten Bedingungen (2,2-fach), wie auch bei der Kultivierung in Medium mit 10% FCS (3,8-fach) eine signifikante Erhöhung in den PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den entsprechenden Kontroll-Fibroblasten (Abb. 18 B). Trotz der immer noch signifikanten Steigerung der *p21*-mRNA-Expression in den PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollen unter delipidierten Bedingungen, konnte eine tendenzielle Erhöhung in den Kontroll-Fibroblasten und eine tendenzielle Reduktion in den PXE-Fibroblasten der *p21*-Genexpression im Vergleich zu Kontroll- bzw. PXE-Fibroblasten, welche in Medium mit 10% FCS kultiviert wurden, festgestellt werden. Diese Erhöhung bzw. Reduktion zwischen den verschiedenen Medien erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

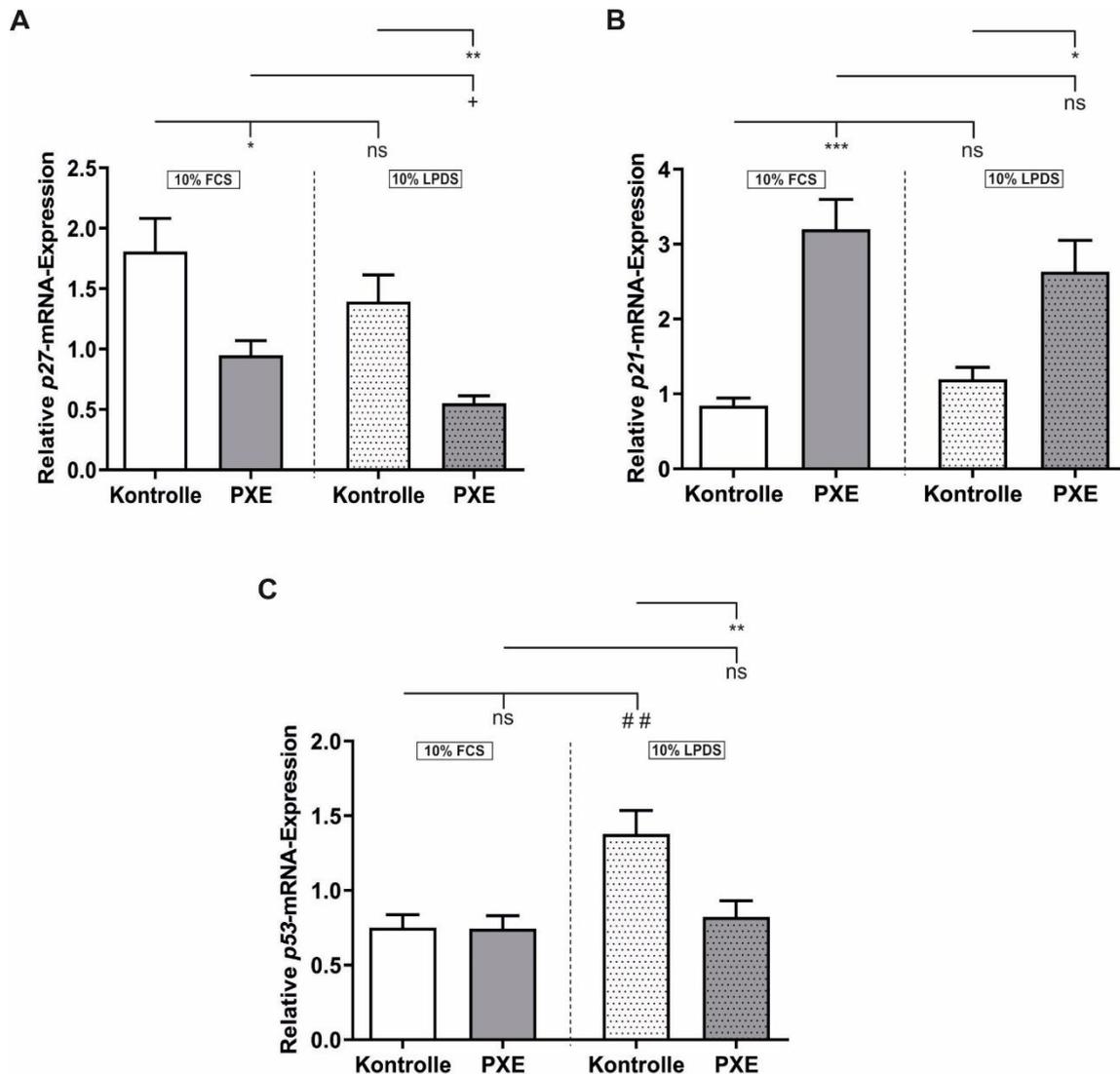


Abbildung 18: Relative p27-, p21- und p53-mRNA-Expression in Kontroll-Fibroblasten (weiß) und PXE-Fibroblasten (grau). Fibroblasten wurden für 24 h in Medium mit 10% FCS oder 10% LPDS kultiviert. (A) Relative p27-mRNA-Expression von Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3). (B) Relative p21-mRNA-Expression von Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3). (C) Relative p53-mRNA-Expression von Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3). Daten sind gezeigt als Mittelwert ± Standardfehler. Kontrolle/ PXE: * p ≤ 0.05; ** p ≤ 0.01; *** p ≤ 0.001; ns p > 0.05. 10% FCS/ 10% LPDS: + p ≤ 0.05; ## p ≤ 0.01; ns p > 0.05.

Des Weiteren wurde die Genexpression von p53, einem prominenten Zellzyklusinhibitor, untersucht (Abb. 18 C). Für die Kultivierungen in Medium mit 10% FCS zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der p53-mRNA-Expression zwischen PXE-Fibroblasten und den entsprechenden Kontroll-Fibroblasten. Für die Kultivierung in 10% LPDS wurde eine signifikante Erniedrigung der p53-Genexpression für die PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt (0,6-fach). Keine signifikanten Veränderungen der p53-Genexpression konnten in den PXE-Fibroblasten bei der Kultivierung in Medium mit 10% LPDS im Vergleich zu der p53-mRNA-Expression der PXE-Fibroblasten, welche in

Medium mit 10% FCS kultiviert wurden, festgestellt werden. Es wurde aber eine signifikante 1,8-fache Erhöhung der *p53*-Genexpression in den Kontrollen bei der Kultivierung in 10% LPDS im Vergleich zu den Kontrollen, welche in 10% FCS kultiviert wurden, festgestellt. Um einen weiteren Einblick zu bekommen, welche Faktoren eine Rolle bei der Zellzykluskontrolle in PXE-Fibroblasten spielen, wurde ein Antikörper-Array durchgeführt. Wie in Abbildung 19 zu erkennen ist, konnte für einen Teil der vermessenen Faktoren kein verlässliches Ergebnis erzielt werden, da die Signalintensität nicht signifikant oberhalb des Leerwertes lag. Aus diesem Grund sind nur die Werte zur weiteren Analyse verwendet worden, welche eine Signalintensität von mindestens dem Zweifachen des Leerwertes aufwiesen.

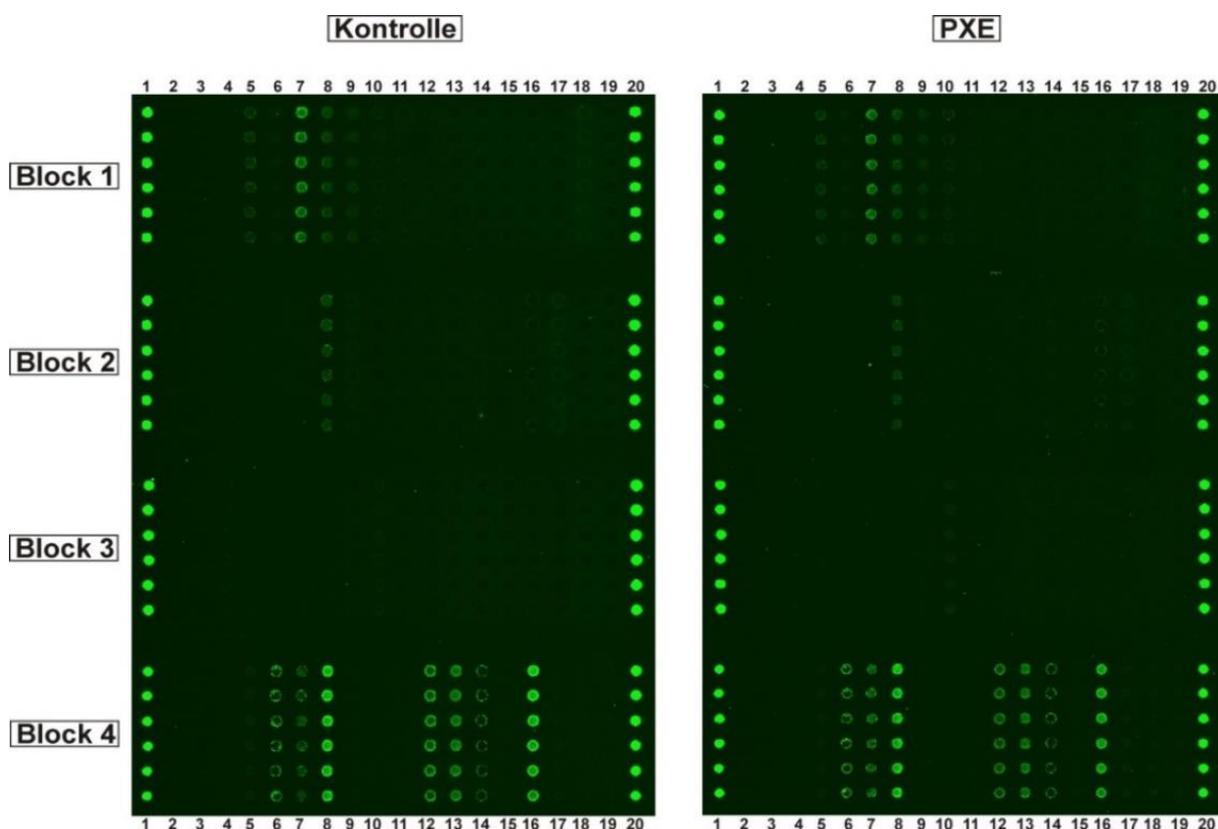


Abbildung 19: Cell Cycle Antibody-Array. Die Intensität des Fluoreszenzsignals eines Spots entspricht der Proteinkonzentration der auf diesen Spot aufgetragenen Probe. Fibroblasten wurden für 72 h in Medium mit 10% LPDS kultiviert. Das Ergebnis basiert auf vereinten Lysaten von Kontroll- und PXE-Fibroblasten von jeweils drei verschiedenen Spendern. Je Spender wurden jeweils acht biologische Replikate vereint. Jedes Protein wurde mit sechs technischen Replikaten vermessen. Positivkontrolle: Reihe 1 und 20; Leerwert: Reihe 2 und 3; Negativkontrolle: Reihe 18 und 19.

Wie der Tabelle 18 zu entnehmen, konnten keine signifikanten Unterschiede in den Signalintensitäten und damit den Proteinkonzentrationen zwischen PXE-Fibroblasten und Kontrollen ermittelt werden. Es konnte lediglich eine tendenzielle Erniedrigung einiger Cycline (Cyclin B1, Cyclin E sowie Cyclin D1) ermittelt werden, die aber statisch keine Signifikanz

erreichten. Die stärkste Erniedrigung konnte für die Glykogen Synthase Kinase 3b (GSK3b) gezeigt werden. Eine tendenzielle Erhöhung der Proteinkonzentration in dem PXE-Lysat konnte für die Klasse der 14.3.3 Proteine ermittelt werden.

Tabelle 18: Daten des Cell Cycle Antibody-Array. Angegeben sind die mittleren Signalintensitäten der auswertbaren Spots des Antikörper-Arrays, sowie das Verhältnis von PXE zu Kontrolle. Ab einem PXE/Kontrolle-Verhältnis von 2 bzw. 0,5 wurden die Proteinkonzentrationen als statistisch signifikant angenommen.

Array Position	Protein	Mittlere Signalintensität der Spots		Verhältnis PXE/Kontrolle
		Kontrolle	PXE	
Block 1, Nr. 5	Cyclin B1	585	492	0.84
Block 1, Nr. 6	Cyclin C	284	260	0.92
Block 1, Nr. 7	Cyclin E	2237	1715	0.77
Block 1, Nr. 8	Cdk3	964	887	0.92
Block 1, Nr. 9	Cdk8	560	514	0.92
Block 1, Nr. 10	CDC37	284	262	0.92
Block 1, Nr. 18	APC11	401	380	0.95
Block 2 Nr. 8	Cdk1/p34 ^{cdc2}	901	772	0.86
Block 2, Nr. 9	Cyclin D1	259	228	0.88
Block 2, Nr. 14	p21 ^{WAF1}	240	262	1.09
Block 2, Nr. 17	E2F-2	302	335	1.11
Block 3, Nr. 10	p130 ^{cas}	284	332	1.17
Block 4, Nr. 5	Ki67	304	257	0.85
Block 4, Nr. 6	Chk1	518	424	0.82
Block 4, Nr. 7	14.3.3, Pan	682	866	1.27
Block 4, Nr. 8	Cullin-3 (CUL-3)	4227	3821	0.90
Block 4, Nr. 12	Glykogen Synthase Kinase 3b (GSK3b)	1733	1153	0.67
Block 4, Nr. 13	p19 ^{ARF}	2247	1994	0.89
Block 4, Nr. 14	p57 ^{Kip2}	310	258	0.83

4.2.3. Analyse von Interleukin 6 (IL6), Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP1) sowie Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM1) als Faktoren des Seneszenz-assozierten sekretorischen Phänotyps bei PXE

Charakteristisch für seneszente Zellen ist die Ausprägung eines charakteristischen proinflammatorischen sekretorischen Phänotyps. Die Zusammensetzung dieses sekretorischen Phänotyps ist maßgeblich abhängig von dem Zelltyp sowie dem entsprechenden Stimulus, welcher zur Seneszenz führt bzw. geführt hat. Trotz der möglichen Variabilität des

Seneszenz-assoziierten Sekretoms, gibt es Faktoren, welche sich in den verschiedensten Ausprägungen finden lassen. Einer dieser Faktoren, welcher sich häufig wiederfindet, ist IL6 (Coppé *et al.*, 2010; López-Otín *et al.*, 2013; Rhinn *et al.*, 2019). Aufgrund dessen sollten zur Analyse eines proinflammatorischen sekretorischen Phänotyps bei PXE-Fibroblasten die *IL6*-Genexpression sowie Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand ermittelt werden. Zudem wurden MCP1 und ICAM1 als weitere, unter anderem IL6 abhängige, Faktoren getestet. Wie in Abbildung 20 A und B zu sehen, zeigte sich eine signifikante Erhöhung der *IL6*-mRNA-Expression (10% FCS: 24-fach; 10% LPDS: 30-fach, Abb. 20 A) als auch der Proteinkonzentration im Überstand (10% FCS: 43-fach; 10% LPDS: 59-fach, Abb. 20 B) der PXE-Fibroblasten sowohl unter delipidierten Bedingungen als auch bei der Kultivierung in Medium mit 10% FCS im Vergleich zu den jeweiligen Kontroll-Fibroblasten. Zwischen den beiden verschiedenen Medien ergaben sich keine signifikanten Unterschiede weder für die PXE- noch für die Kontroll-Fibroblasten.

Für die *MCPI*-Genexpression sowie Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand ergab sich ein zu IL6 vergleichbares Ergebnis. Auch hier zeigte sich sowohl bei der Kultivierung in Medium mit 10% FCS (mRNA-Expression: 2,8-fach, Proteinkonzentration: 9,0-fach) wie auch unter delipidierten Bedingungen (mRNA-Expression: 4,2-fach, Proteinkonzentration: 9,3-fach) eine Erhöhung der *MCPI*-Genexpression (Abb. 20 C) sowie Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand (Abb. 20 D) für die PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den entsprechenden Kontroll-Fibroblasten. Es konnte lediglich für die *MCPI*-Genexpression unter delipidierten Bedingungen eine statistische Signifikanz erreicht werden. Zusätzlich konnte hier ebenfalls eine signifikante Erniedrigung der *MCPI*-mRNA-Expression in den Kontroll-Fibroblasten zwischen der Kultivierung in Medium mit 10% FCS und der Kultivierung in Medium mit 10% LPDS festgestellt werden (0,8-fach).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen für *IL6* und *MCPI* zeigten sich für die *ICAM1*-Genexpression keine signifikanten Unterschiede zwischen PXE-Fibroblasten und Kontrollen sowie zwischen den verschiedenen Medien (Abb. 20 E). Trotz fehlender statistischer Signifikanz konnte jedoch unter delipidierten Bedingungen eine tendenzielle Erhöhung der *ICAM1*-Genexpression in den PXE-Fibroblasten sowohl im Vergleich zu den entsprechenden Kontroll-Fibroblasten wie auch im Vergleich zu den PXE-Fibroblasten bei der Kultivierung in Medium mit 10% FCS beobachtet werden. Eine Quantifizierung der löslichen ICAM1-Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand konnte aufgrund zu geringer Konzentrationen nicht verlässlich durchgeführt werden.

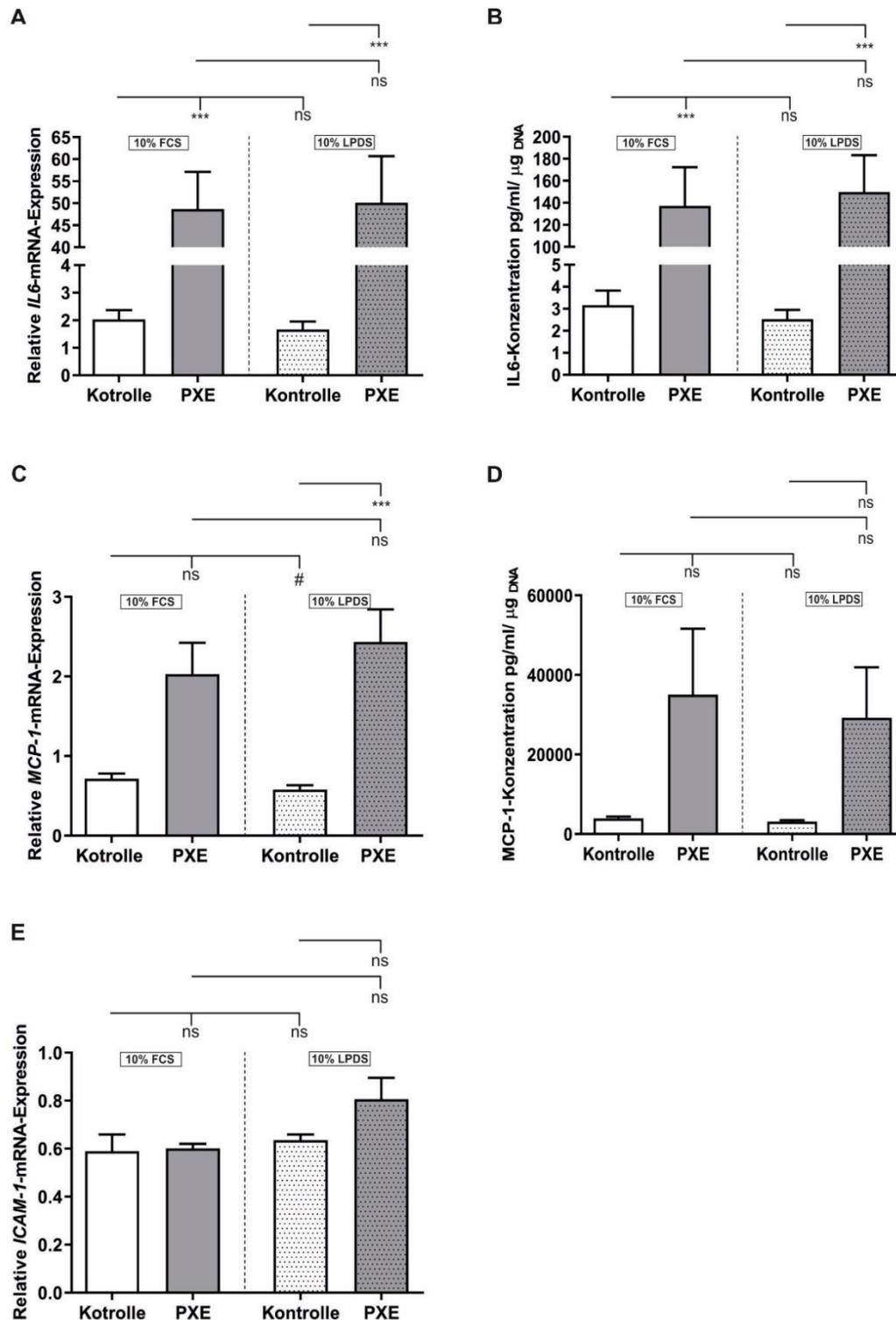


Abbildung 20: Relative mRNA-Expression und Proteinkonzentration proinflammatorischer Faktoren in Kontroll-Fibroblasten (weiß) und PXE-Fibroblasten (grau). Fibroblasten wurden für 21 d in Medium mit 10% FCS oder 10% LPDS kultiviert. (A) Relative *IL6*-mRNA-Expression von Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3). (B) *IL6*-Proteinkonzentration im Überstand von Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3). (C) Relative *MCP1*-mRNA-Expression von Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3). (D) *MCP1*-Proteinkonzentration im Überstand von Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3). (E) Relative *ICAM1*-mRNA-Expression von Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3). Daten sind gezeigt als Mittelwert ± Standardfehler. Kontrolle/PXE: *** $p \leq 0.001$; * $p \leq 0.05$; ns $p > 0.05$. 10% FCS/10% LPDS: # $p \leq 0.05$; ns $p > 0.05$.

4.3. Analyse potenzieller primärer Kennzeichen der frühzeitigen Alterung bei PXE

Der auslösende Stimulus, welcher die gehäufte Akkumulation von seneszenten Zellen im Organismus bewirkt und damit zu einem frühzeitigen bzw. beschleunigten Alterungsprozess führt, kann variieren. Nachfolgend sollten somit verschiedene potenzielle primäre Ursachen der frühzeitigen Alterung bei PXE untersucht werden.

4.3.1. Analyse genomischer Alterationen als primäre Ursache der frühzeitigen Alterung bei PXE

Im Fall von HGPS spielen vor allem genomische Alterationen eine vorrangige Rolle. So wurde anhand von dermalen Fibroblasten von gesunden Kontrollen und von HGPS-Patienten gezeigt, dass die Expression der mutanten, trunkierten Form von Lamin A, auch Progerin bezeichnet, mit zunehmender *in vitro* Zellalterung steigt (Rodriguez *et al.*, 2009). Aufgrund der pathophysiologischen Gemeinsamkeiten von HGPS und PXE sollte demnach im folgenden Teil dieser Arbeit die Rolle von genomischen Alterationen im Alterungsprozess von PXE analysiert werden.

4.3.1.1. Untersuchung der relativen Gen- und Proteinexpression der A-Typ Lamine, sowie deren prozessierender Enzyme bei PXE

Die Analyse der *Lamin A*- sowie *Lamin C*-mRNA-Expression zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen PXE-Fibroblasten und Kontrollen bei der Kultivierung in 10% FCS. Wurden die Fibroblasten in Medium mit 10% LPDS kultiviert, konnte eine signifikante Reduktion der Genexpression sowohl von *Lamin A* (0,6-fach, Abb. 21 A) als auch *Lamin C* (0,6-fach, Abb. 21 B) in den PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen festgestellt werden. Es konnte keine signifikante Veränderung der *Lamin A* und *Lamin C*-Genexpression bei den Kontroll-Fibroblasten zwischen den unterschiedlichen Medien gemessen werden, wohingegen eine signifikante Reduktion der *Lamin A*- (0,7-fach) und *Lamin C*- (0,6-fach) mRNA-Expression in den PXE-Fibroblasten unter delipidierten Bedingungen im Vergleich zu der Kultivierung in 10% FCS beobachtet wurde. Für die *Progerin*-mRNA-Expression zeigte sich eine 2,0-fache signifikante Erhöhung in den PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen bei der Kultivierung in

Medium mit 10% FCS (Abb. 21 C). Bei der Kultivierung in Medium mit 10% LPDS wurden keine signifikanten Veränderungen der *Progerin*-mRNA-Expression zwischen PXE-Fibroblasten und Kontrollen festgestellt. Zudem zeigten die Kontroll-Fibroblasten keine signifikanten Unterschiede der *Progerin*-Genexpression zwischen den verschiedenen Medien. Für die PXE-Fibroblasten, welche in Medium mit 10% LPDS kultiviert wurden, konnte hingegen eine signifikante Reduktion der *Progerin*-mRNA-Expression (0,4-fach) im Vergleich zu den PXE-Fibroblasten in Medium mit 10% FCS verzeichnet werden.

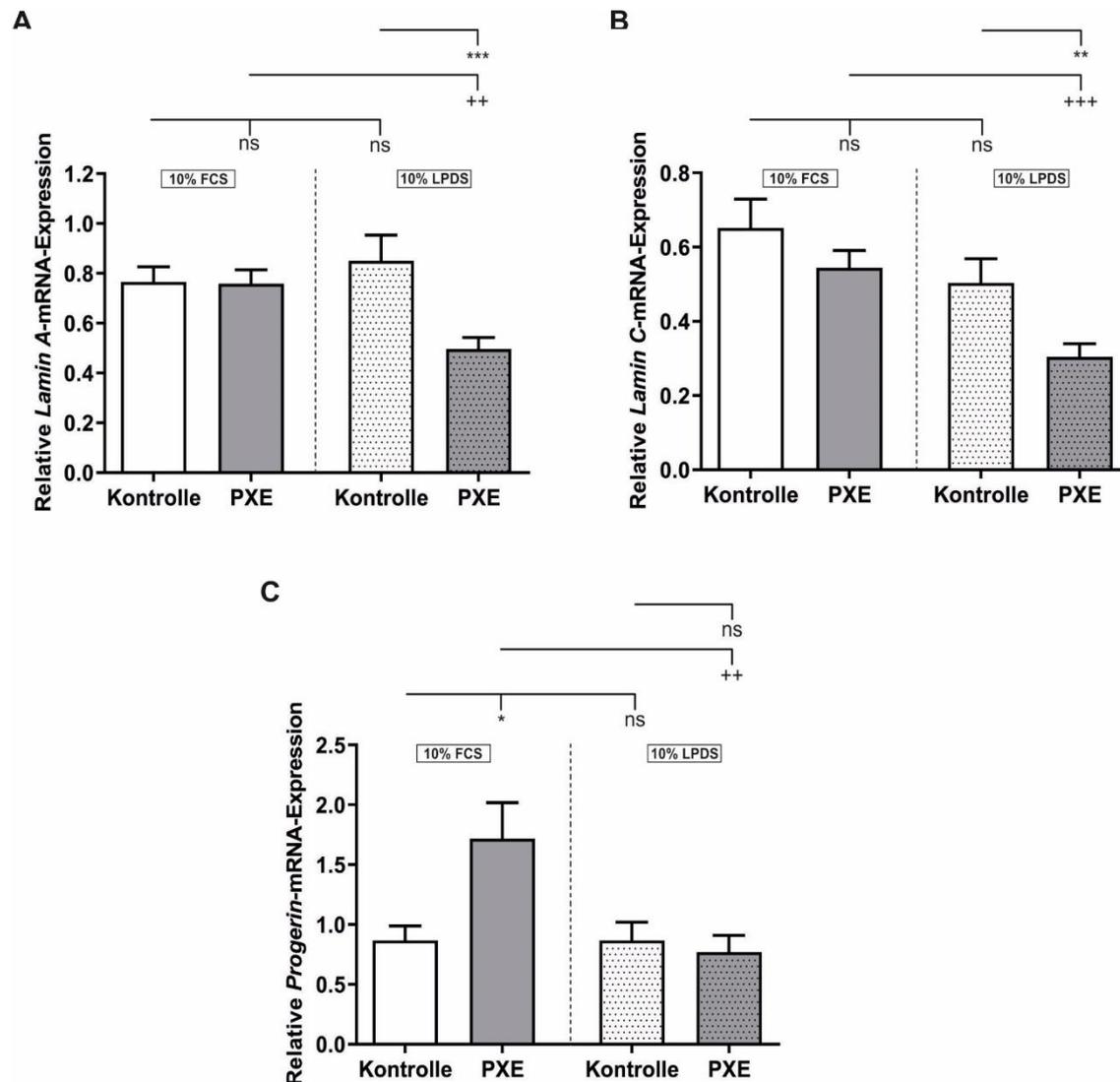


Abbildung 21: Relative mRNA-Expression der A-Typ Lamine in Kontroll-Fibroblasten (weiß) und PXE-Fibroblasten (grau). Fibroblasten wurden für 24 h in Medium mit 10% FCS oder 10% LPDS kultiviert. **(A)** Relative *Lamin A*-mRNA-Expression von Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3). **(B)** Relative *Lamin C*-mRNA-Expression von Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3). **(C)** Relative *Progerin*-mRNA-Expression von Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3). Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardfehler. Kontrolle/ PXE: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; ns $p > 0.05$. 10% FCS/ 10% LPDS: ++ $p \leq 0.01$; +++ $p \leq 0.001$; ns $p > 0.05$.

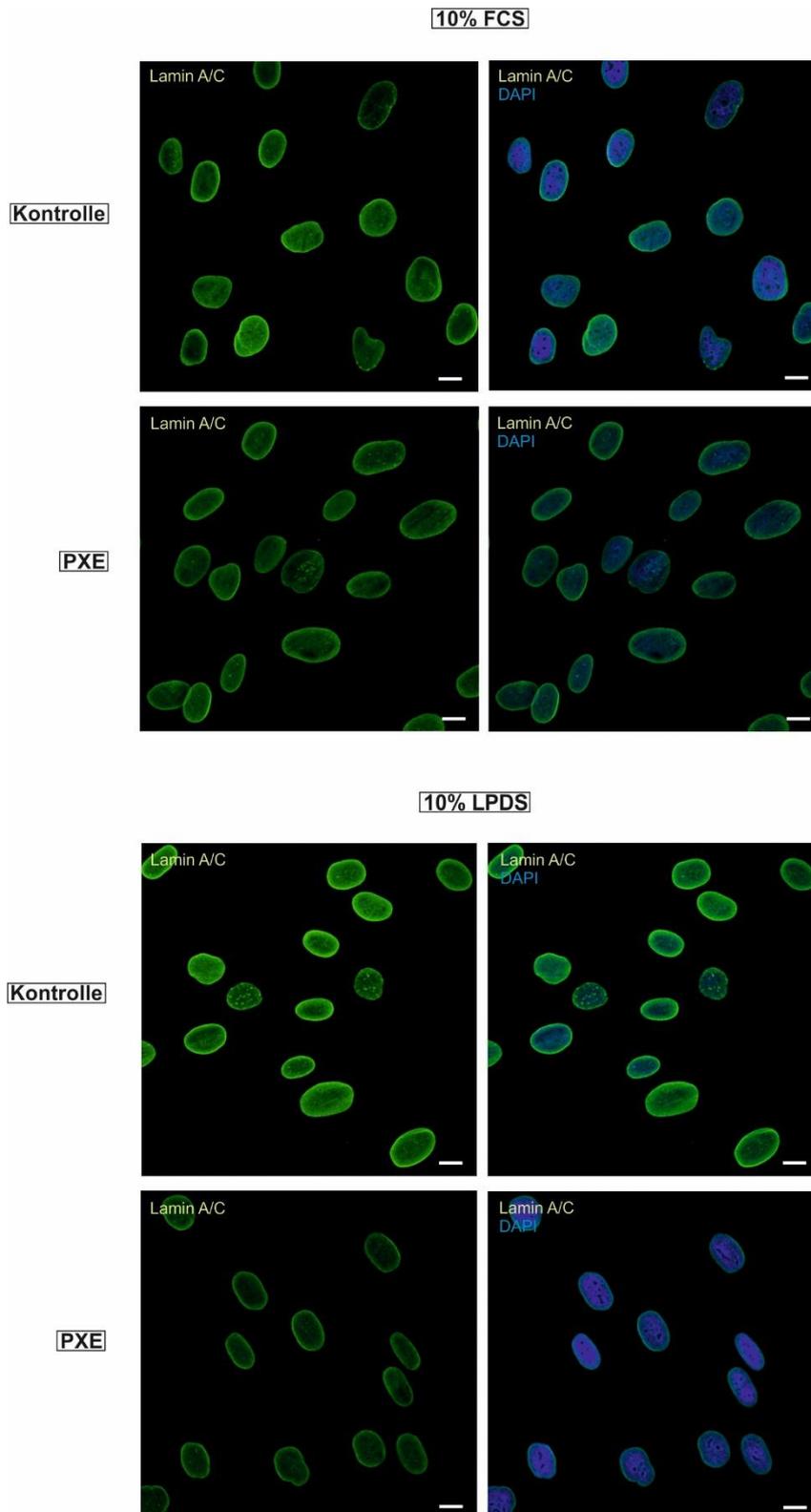


Abbildung 22: Konfokale Laserscannmikroskopie von Lamin A/C (grün) in Kontrollen (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3). Fibroblasten wurden 72 h in 10% FCS oder 10% LPDS kultiviert. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen. Maßstabsbalken: 10 µm.

Neben der Genexpression der A-Typ Lamine wurden ebenfalls die Proteinexpression bzw. die Proteinverteilung im Zellkern mittels Immunfluoreszenz analysiert. Wie Abbildung 22 zeigt, konnte lediglich bei den PXE-Fibroblasten bei der Kultivierung in 10% LPDS ein geringeres Signal im Vergleich zu den übrigen Ansätzen detektiert werden. Da sich dieses Ergebnis jedoch nicht konsequent in allen Präparaten zeigte und auch die Präparate der Kontroll-Fibroblasten Schwankungen ähnlicher Art aufwiesen, kann angenommen werden, dass keine gravierenden bzw. pathophysiologisch relevanten Unterschiede in der Lamin A/C-Proteinexpression zwischen PXE-Fibroblasten und Kontroll-Fibroblasten sowie auch nicht zwischen den verschiedenen Medien festgestellt werden konnten. Diese Annahme wird von der Tatsache gestützt, dass keine schwereren offensichtlichen Deformationen des Zellkerns zu erkennen sind, welche auf einen Verlust oder Fehlverteilung der Lamine hindeuten könnte. Immunfluoreszenzfärbungen von Progerin waren nicht möglich, da die Proteinmenge im Zellkern zu gering war.

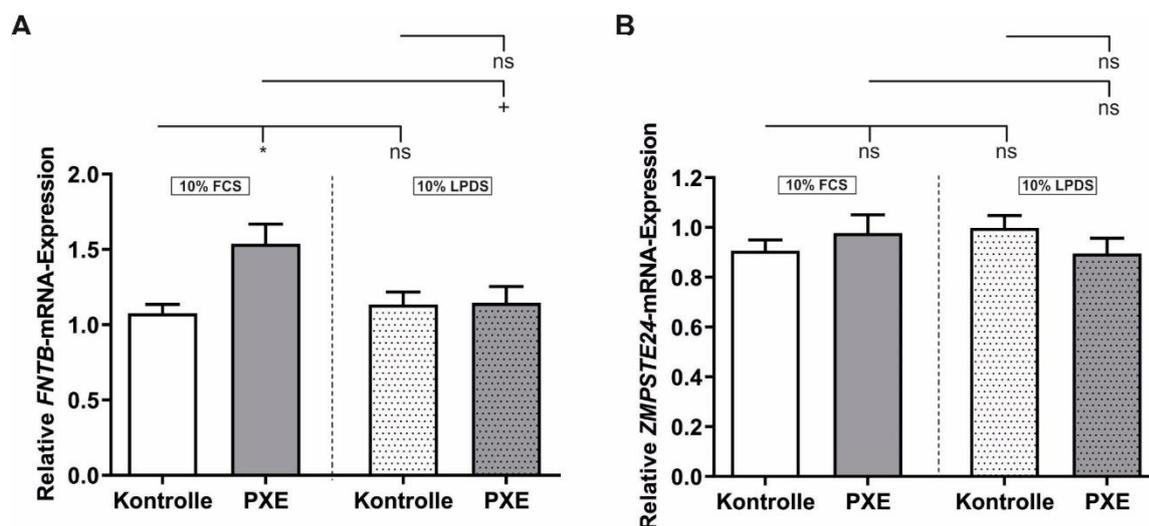


Abbildung 23: Relative *FNTB*- und *ZMPSTE24*-mRNA-Expression in Kontroll-Fibroblasten (weiß) und PXE-Fibroblasten (grau). Fibroblasten wurden für 24 h in Medium mit 10% FCS oder 10% LPDS kultiviert. (A) Relative *FNTB*-mRNA-Expression von Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3). (B) Relative *ZMPSTE24*-mRNA-Expression von Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3). Daten sind gezeigt als Mittelwert ± Standardfehler. Kontrolle/ PXE: * $p \leq 0.05$; ns $p > 0.05$. 10% FCS/10% LPDS: + $p \leq 0.05$; ns $p > 0.05$.

Für eine anfängliche Beurteilung hinsichtlich der Prozessierung der A-Typ Lamine, wurde zudem die *Farnesyltransferase B (FNTB)*- sowie die *Zinkmetalloprotease STE24 (ZMPSTE24)*-Genexpression in PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontroll-Fibroblasten untersucht. Wie in Abbildung 23 A zu erkennen ist, zeigte die *FNTB*-mRNA-Expression ein ähnliches Bild wie die zuvor gezeigte *Progerin*-Genexpression. Dies bedeutet, dass eine signifikante Erhöhung der *FNTB*-Genexpression (1,4-fach) in den PXE-Fibroblasten im

Vergleich zu den Kontrollen bei der Kultivierung in Medium mit 10% FCS festgestellt werden konnte. Wurden die Fibroblasten in Medium mit 10% LPDS kultiviert, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen PXE- und Kontroll-Fibroblasten. Die Applikation von delipidiertem FCS führte zudem zu keiner Veränderung der *FNTB*-Genexpression in Kontroll-Fibroblasten im Vergleich zu der Kultivierung in Medium mit 10% FCS. Entsprechend der Erhöhung der *FNTB*-mRNA-Expression in den PXE-Fibroblasten in Medium mit 10% FCS, konnte unter delipidierten Bedingungen eine 0,7-fache Erniedrigung der Expression in den PXE-Fibroblasten im Vergleich zu der Kultivierung in Medium mit 10% FCS festgestellt werden.

Für die *ZMPSTE24*-Genexpression konnten weder zwischen PXE-Fibroblasten und Kontrollen noch zwischen den verschiedenen Medien signifikante Unterschiede festgestellt werden (Abb. 23 B).

4.3.1.2. Bestimmung der Gen- sowie Proteinexpression von Nucleolin (NCL)

Neben der erhöhten Expression von Progerin ist bekannt, dass bei HGPS zudem Alteration anderer nuklearer Strukturen auftreten. Zu diesen Veränderungen zählen unter anderem die Vergrößerung und die Verringerung der Anzahl an Nucleoli, welche wichtige Subkompartimente des Zellkerns darstellen (Buchwalter and Hetzer, 2017).

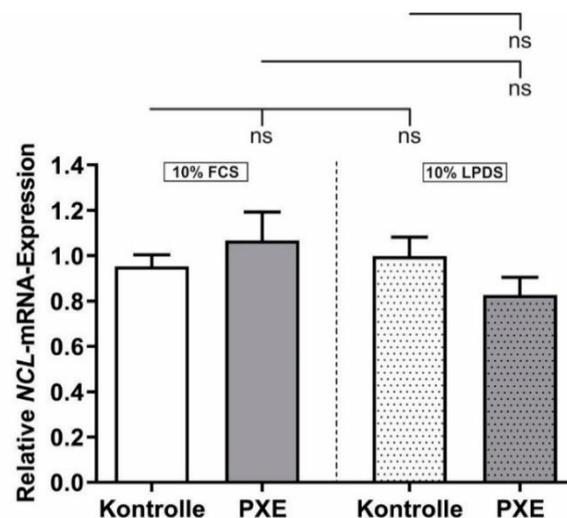


Abbildung 24: Relative *NCL*-mRNA-Expression in Kontroll-Fibroblasten (weiß) und PXE-Fibroblasten (grau). Relative *NCL*-mRNA-Expression von Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3) nach 24 h Kultivierung in 10% FCS oder 10% LPDS. Daten sind gezeigt als Mittelwert ± Standardfehler. Kontrolle/PXE: ns $p > 0.05$. 10% FCS/ 10% LPDS: ns $p > 0.05$.

Um mögliche Veränderung in der Struktur der Nucleoli zu erkennen, wurde die *NCL*-mRNA-Expression, einem in den Nucleoli häufig vorkommendes Protein, sowie dessen Proteinexpression und Verteilung mittels Immunfluoreszenz ermittelt.

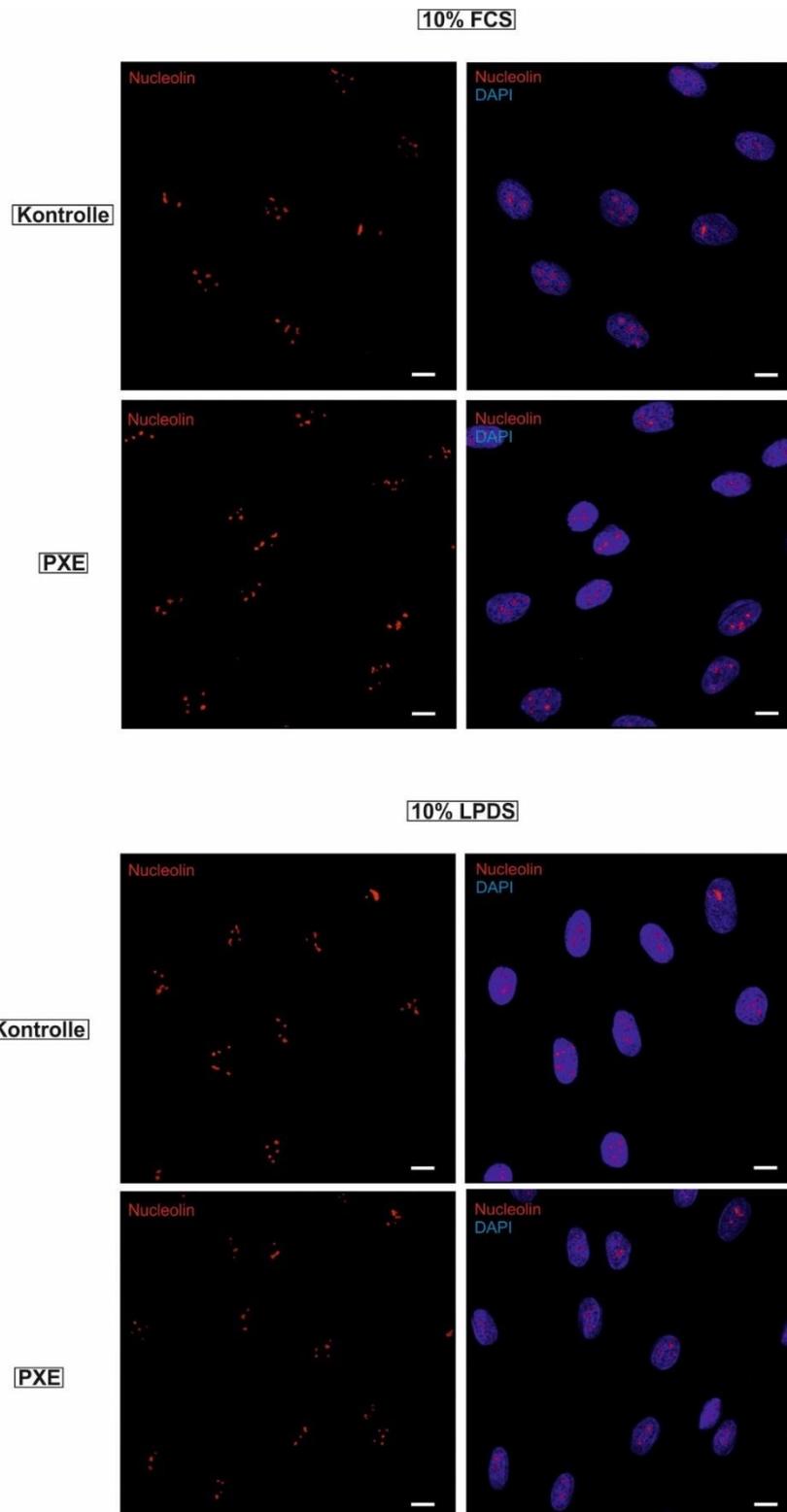


Abbildung 25: Konfokale Laserscannmikroskopie von Nucleolin (rot) in Kontrollen (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3). Fibroblasten wurden 72 h in 10% FCS oder 10% LPDS kultiviert. Zellkerne wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen. Maßstabsbalken: 10 μ m.

Wie in Abbildung 24 zu erkennen ist, zeigte die *NCL*-mRNA-Expression keine signifikanten Unterschiede, weder zwischen PXE-Fibroblasten und Kontroll-Fibroblasten noch zwischen den verschiedenen Medien. Es ließen sich lediglich leichte Tendenzen erkennen. Diese Tatsache wird weiterführend mit den in Abbildung 25 gezeigten Ergebnissen des Immunfluoreszenznachweises bestätigt. Auch hier konnten keine deutlichen Unterschiede der Nucleolin-Proteinexpression bzw. der Größe oder Anzahl der Nucleoli zwischen PXE-Fibroblasten und Kontrollen bzw. zwischen den verschiedenen Medien festgestellt werden.

4.3.1.3. Bestimmung der relativen Telomerlänge

In Studien ist bereits gezeigt worden, dass HGPS-Fibroblasten signifikant kürzere Telomere im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen aufweisen (Decker *et al.*, 2009). Um zu analysieren, ob eine beschleunigte Telomerabnutzung auch bei PXE eine Rolle bei dem Übergang in eine frühzeitige Seneszenz spielt, wurde die relative Telomerlänge mittels qPCR ermittelt.

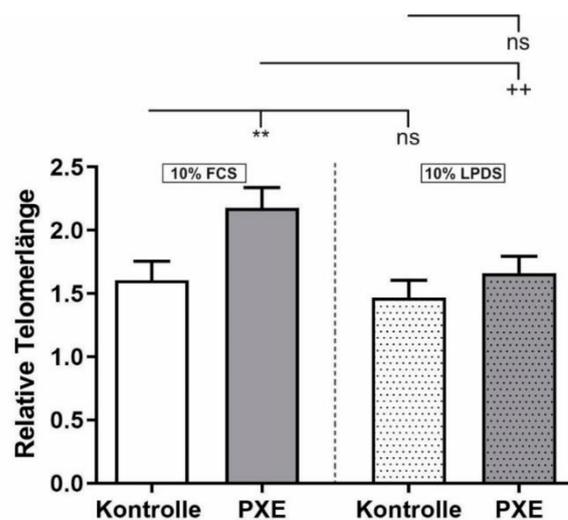


Abbildung 26: Relative Telomerlänge von Kontroll-Fibroblasten (weiß) und PXE-Fibroblasten (grau). Relative Telomerlänge von Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3) nach 24 h Kultivierung in 10% FCS oder 10% LPDS. Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardfehler. Kontrolle/PXE: ** $p \leq 0.01$; ns $p > 0.05$. 10% FCS/ 10% LPDS: ++ $p \leq 0.01$; ns $p > 0.05$.

Wie in Abbildung 26 zu sehen, konnten signifikant längere Telomere in den PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontroll-Fibroblasten bei der Kultivierung in Medium mit 10% FCS ermittelt werden (1,3-fach). Unter delipidierten Bedingungen zeigte sich eine ähnliche Tendenz für die PXE-Fibroblasten im Vergleich zu der entsprechenden Kontrolle, jedoch wurde hier keine statistische Signifikanz erreicht. Zwischen der Kultivierung in Medium mit 10% FCS und

der Kultivierung mit 10% LPDS konnten zwar keine signifikanten Unterschiede für die Kontroll-Fibroblasten ermittelt werden, jedoch zeigte sich eine signifikante Verkürzung der Telomere bei den PXE-Fibroblasten bei der Kultivierung in 10% LPDS im Vergleich zu der Kultivierung in Medium mit 10% FCS (0,8-fach).

4.3.2. Analyse metabolisch proteostatischer Alterationen als primäre Ursache der frühzeitigen Alterung bei PXE

Abgesehen von genomischen Aberrationen können metabolische Verschiebungen bzw. eine Beeinträchtigung der Proteostase eine Akkumulation von seneszenten Zellen bewirken (Kang *et al.*, 2011; Santra *et al.*, 2019). Da zum einen bekannt ist, dass bei HGPS eine gesteigerte Autophagieleistung zu beobachten ist (Mariño *et al.*, 2008) und zum anderen vorangegangene Arbeiten zeigten, dass bei PXE-Patienten ein gestörter Lipidstoffwechsel vorliegt (Kuzaj *et al.*, 2014a), sollten auch hier erste Hinweise darauf gesammelt werden, ob metabolische oder proteostatische Alterationen ursächlich für einen beschleunigten Alterungsprozess bei PXE sein könnten.

4.3.2.1. Analyse des Cholesterolinflux sowie –efflux

Aufgrund der bekannten Aberrationen der Cholesterinbiosynthese bei PXE (Kuzaj *et al.*, 2014a), sollte als erstes die Aufnahme von Cholesterin sowie dessen Abgabe im Zuge des reversen Cholesterintransportes bei primären Fibroblasten von PXE-Patienten sowie bei gesunden Kontrollen untersucht werden.

Es konnten für den relativen Cholesterolinflux keine signifikanten Unterschiede bei den PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontroll-Fibroblasten festgestellt werden (Abb. 27 A). Zudem zeigte sich lediglich eine leichte Erhöhung des Akzeptor-vermittelten (Abb. 27 B) sowie Gesamt-Cholesterolefflux (Abb. 27 C) im Fall der PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontroll-Fibroblasten. Diese Erhöhung erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

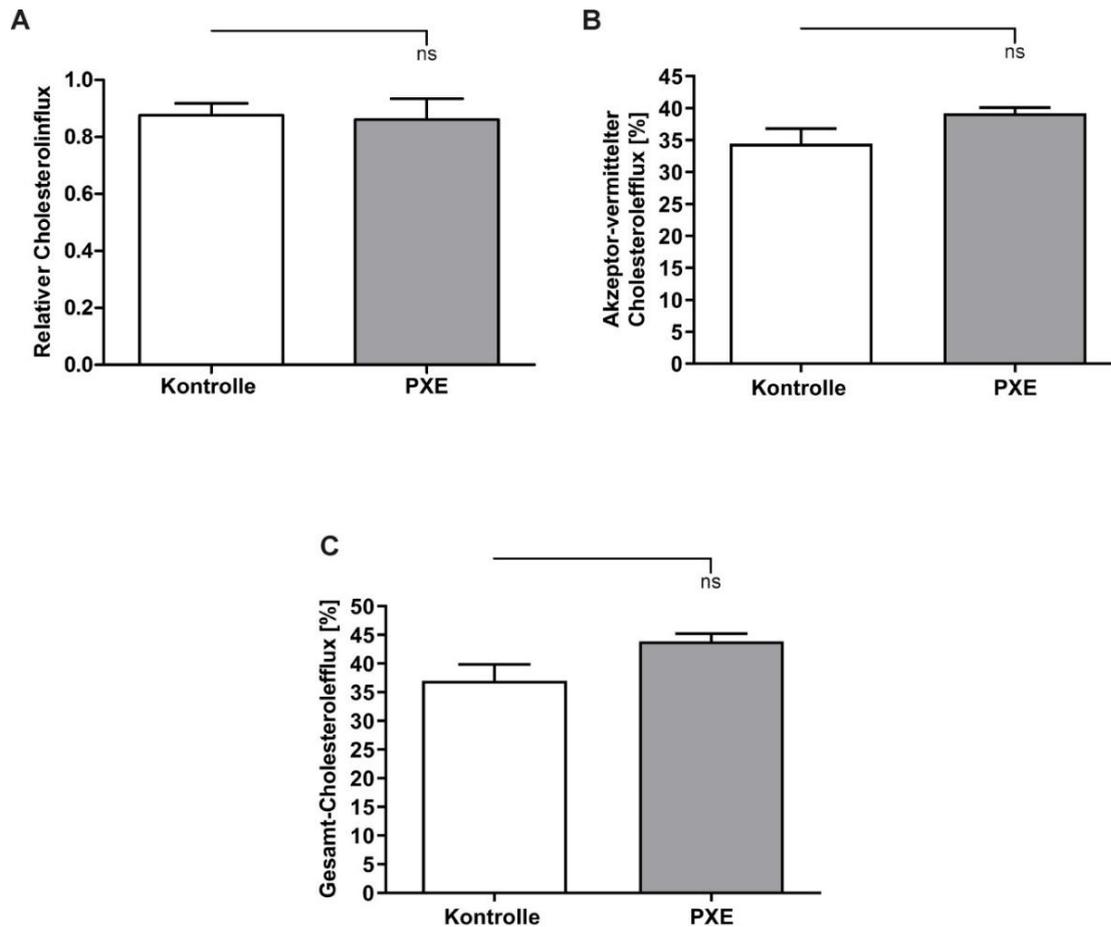


Abbildung 27: Cholesterinflux sowie - efflux von Kontroll-Fibroblasten (weiß) und PXE-Fibroblasten (grau). (A) Relativer Cholesterinflux von Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3). (B) Akzeptor-vermittelter Cholesterolefflux von Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3). (C) Gesamt-Cholesterolefflux von Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3). Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardfehler. Kontrolle/PXE: ns $p > 0.05$.

4.3.2.2. Untersuchung der Autophagie

Beim Erhalt der Proteostase sowie bei der korrekten Koordination des Abbaus von Triglyceriden und Cholesterinestern spielt der Prozess der Autophagie eine entscheidende Rolle (Cheng *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010). Zur Beurteilung der Autophagieleistung von PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den entsprechenden Kontroll-Fibroblasten wurden die Autophagosome sowie die Lysosome mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Zudem wurde durch die Behandlung mit 20 μ M Chloroquin die Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom inhibiert, sodass eine bessere Aussage über den autophagischen Flux getroffen werden konnte.

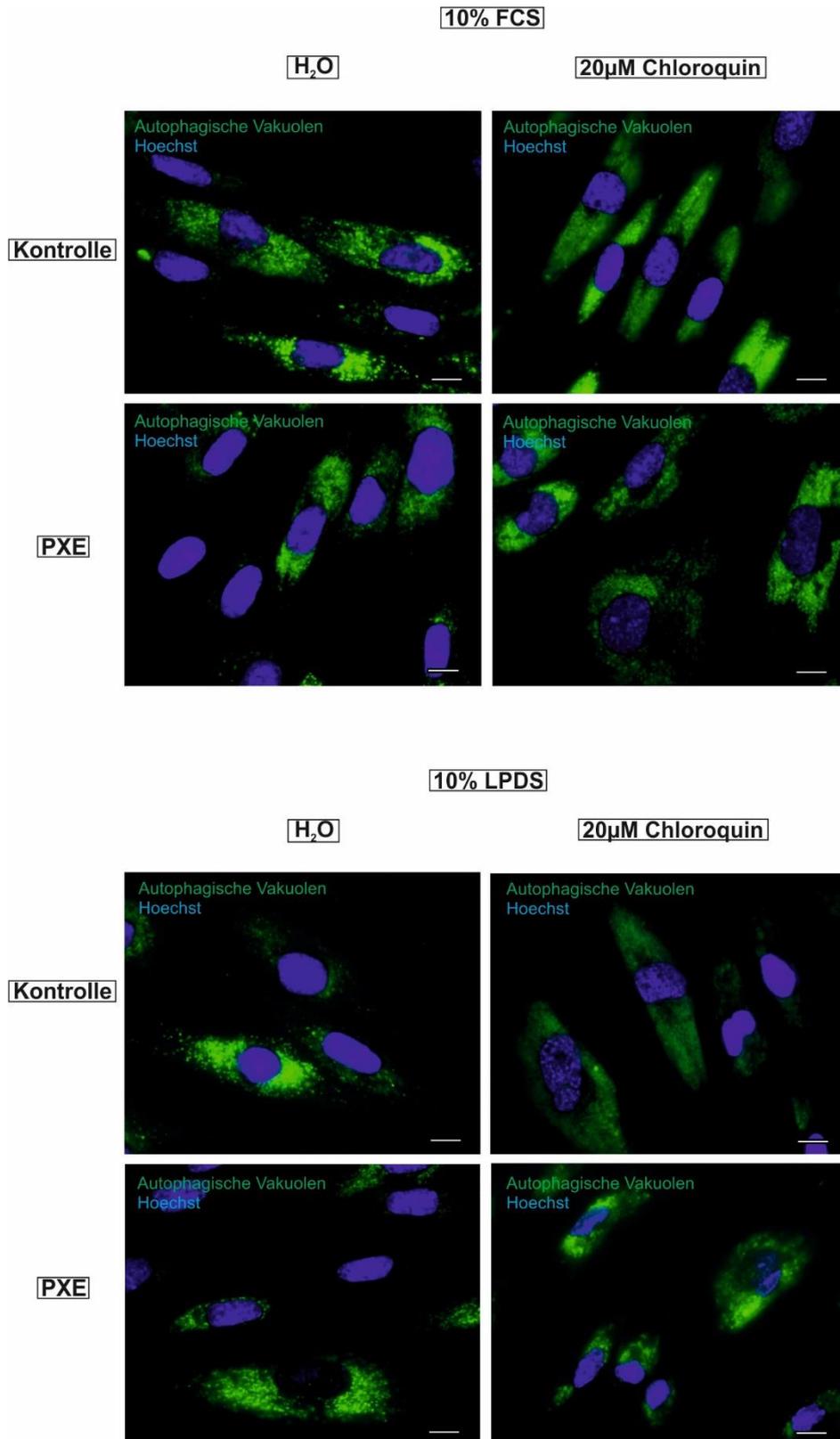


Abbildung 28: Autophagosome in Kontrollen und PXE-Fibroblasten. Autophagosome (grün) in Kontrollen (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3) nach 72 h Kultivierung in 10% FCS oder 10% LPDS. Die Zellen wurden 24 h vor Färbung mit 20 µM Chloroquin oder dem entsprechenden *Carrier* behandelt. Zellkerne wurden mit Hoechst (blau) angefärbt. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen. Maßstabsbalken: 10 µm.

In Abbildung 28 ist deutlich zu erkennen, dass es sowohl bei der Kultivierung in Medium mit 10% FCS wie auch bei der Kultivierung in delipidiertem Medium bei der Behandlung mit 20 μ M Chloroquin zu einer Akkumulation der Autophagosome sowohl in PXE-Fibroblasten wie auch in den Kontroll-Fibroblasten kam. Bei der Kultivierung in Medium mit 10% FCS sind zudem keine offensichtlichen Unterschiede in der Autophagosombildung bzw. des autophagischen Flux zwischen PXE-Fibroblasten und Kontrollen zu erkennen. Auch die Kontrollen, welche in Medium mit 10% LPDS kultiviert wurden, zeigten keinen erheblichen Unterschied in der Autophagieleistung im Vergleich zu den Kontrollen, welche in Medium mit 10% FCS kultiviert wurden. Die PXE-Fibroblasten, welche in Medium mit 10% LPDS kultiviert wurden, zeigten eine mit den Kontrollen vergleichbare Akkumulation von Autophagosomen bei der Behandlung mit 20 μ M Chloroquin, allerdings weisen die PXE-Fibroblasten der meisten Präparate mit dieser Behandlung eine veränderte Zellmorphologie auf, bei der es zu einer erheblichen Verkleinerung des Zellvolumens bis hin zu einer rundlichen Morphologie kommt.

Bei den Ergebnissen der LAMP1-Immunfluoreszenz hingegen (Abb. 29) zeigten sich keine morphologischen Veränderungen der PXE-Fibroblasten, weder bei der Kultivierung in DMEM mit 10% LPDS und der zusätzlichen Behandlung mit 20 μ M Chloroquin noch bei einem der anderen Ansätze. Wie schon zuvor erwähnt, war das detektierbare Signal durchgängig verhältnismäßig schwach, sodass nicht alle Aufnahmen jeder Zelllinie eine verlässliche Aussage lieferten. Die Immunfluoreszenz des Lysosomenmarkers LAMP1 deutete dennoch in einem Teil der Präparate einen leichten Anstieg der Lysosomenbildung in den PXE- und in den Kontroll-Fibroblasten unter delipidierten Bedingungen ohne Behandlung mit Chloroquin im Vergleich zu den jeweiligen Fibroblasten, welche ebenfalls ohne Chloroquin in DMEM mit 10% FCS kultiviert wurden, hin. Durch die Behandlung mit 20 μ M Chloroquin konnte ein deutlich stärkeres Signal und damit eine Akkumulation von Lysosomen sowohl bei PXE- wie auch bei den Kontroll-Fibroblasten im Vergleich zu der jeweils unbehandelten PXE- sowie Kontroll-Fibroblasten für beide Medien festgestellt werden. Hierbei zeigte sich eine nochmalige Steigerung des Signals bzw. Lysosomenbildung für PXE-Fibroblasten und Kontrollen bei der Kultivierung in DMEM mit 10% LPDS und 20 μ M Chloroquin im Vergleich zu den Kultivierungen in DMEM mit 10% FCS und 20 μ M Chloroquin. Ein Unterschied zwischen PXE-Fibroblasten und Kontroll-Fibroblasten konnte in keinem Fall festgestellt werden.

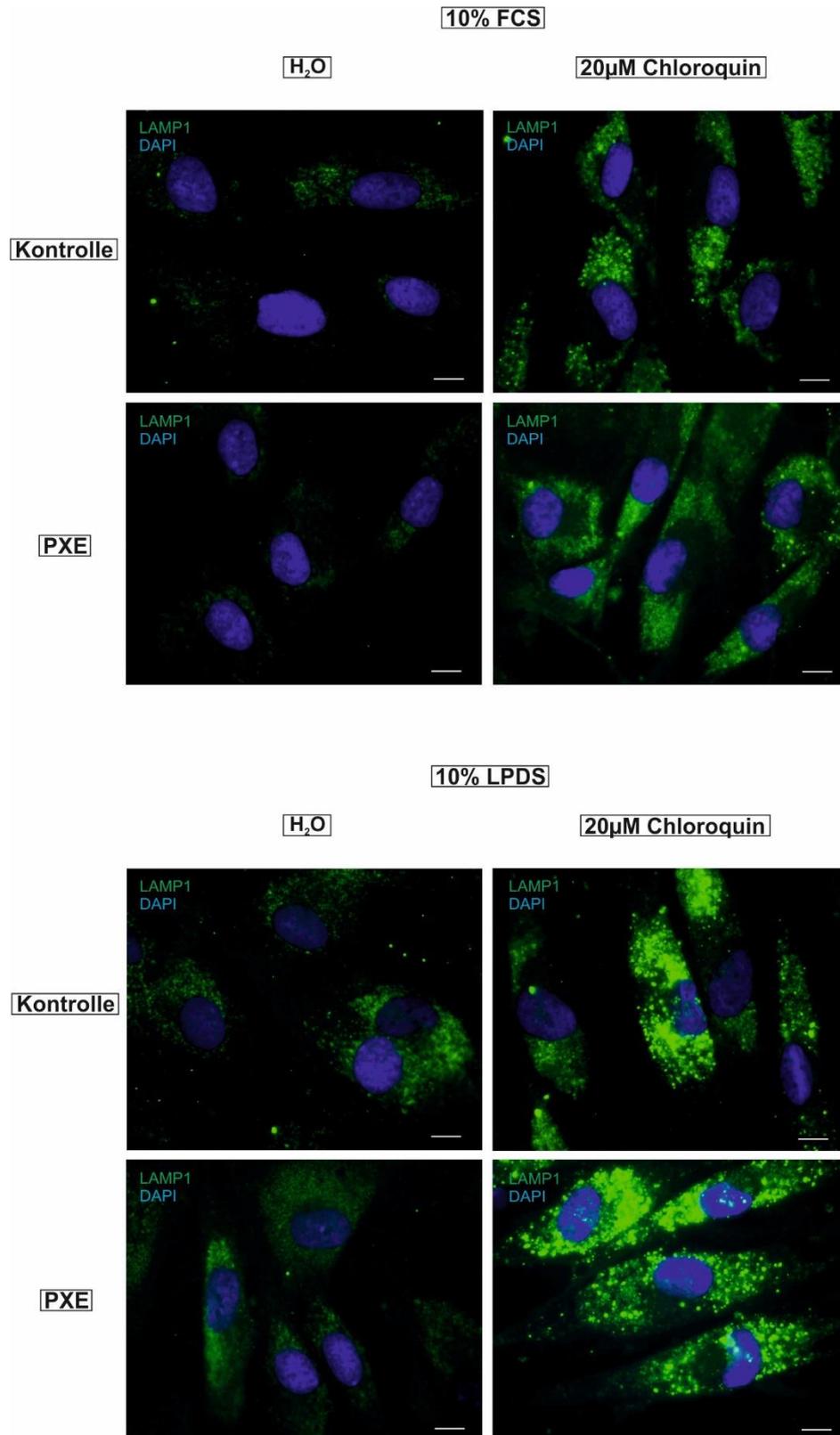


Abbildung 29: Immunfluoreszenz des Lysosomenmarkers LAMP1 in Kontrollen und PXE-Fibroblasten. LAMP1-Expression (grün) in Kontrollen (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3) nach 72 h Kultivierung in 10% FCS oder 10% LPDS. Die Zellen wurden 24 h vor Färbung mit 20 µM Chloroquin oder dem entsprechenden *Carrier* behandelt. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen. Maßstabsbalken: 10 µm

4.4. Einfluss einer Atorvastatinbehandlung auf verschiedene PXE-assoziierte Faktoren

In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass eine Therapie mit Statinen und Bisphosphonaten die Progression des HGPS verlangsamen kann (Varela *et al.*, 2008). Eine Therapie mit Statinen sowie die zusätzliche Gabe von Bisphosphonaten wird bei PXE-Patienten ebenfalls diskutiert (Germain, 2017; Guo *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015; Luft, 2013). Die genauen molekularen Mechanismen, welche zu einer verlangsamt Progression der Krankheiten führen, sind jedoch nicht bekannt. Es liegt nah, dass die cholesterinsenkende Wirkung der Statine ein Faktor ist, welcher, aufgrund der erhöhten HMGCR-Aktivität bei PXE, zu einem positiven Effekt im Krankheitsverlauf führt (Kuzaj *et al.*, 2014a). Neben der Inhibierung der HMGCR-Aktivität ist bereits bekannt, dass Statine diverse weitere Effekte, wie z.B. einen inhibierenden Einfluss auf die Expression von proinflammatorischen Faktoren oder das Fortschreiten von Kalzifizierungsprozessen haben (Ascer *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2013; Loppnow *et al.*, 2011). Besonders im Fall der Wirkung von Atorvastatin auf Kalzifizierungsprozesse bei PXE-Patienten ist wenig über die beteiligten Faktoren bekannt. Im nachfolgenden Teil dieser Arbeit sollte analysiert werden, ob durch die Applikation von Atorvastatin die Expression verschiedener PXE-assoziiierter Faktoren normalisiert werden kann, um damit das positive Wirkspektrum einer Statintherapie bei PXE weiter beschreiben zu können.

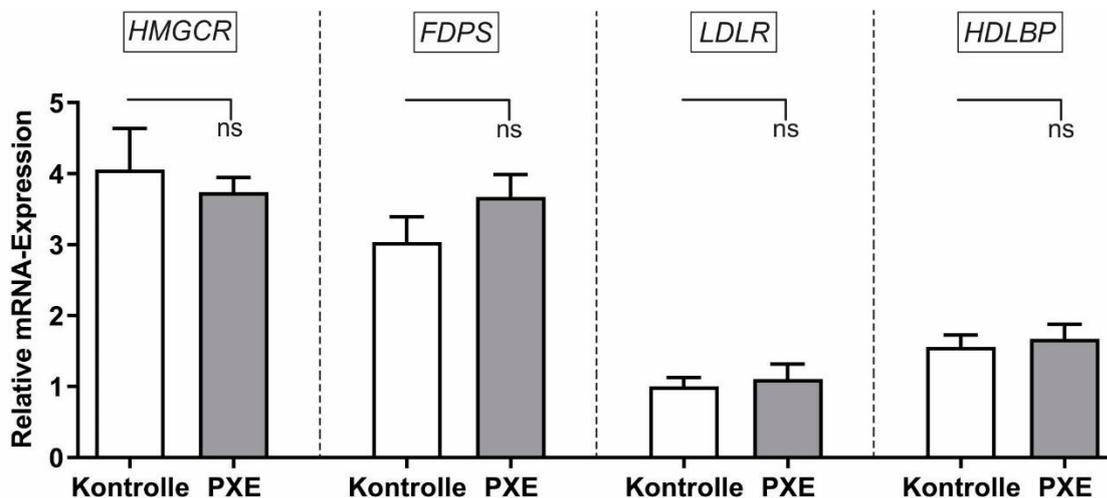


Abbildung 30: Relative HMGCR-, FDPS-, LDLR- und HDLBP-mRNA-Expression in Kontroll-Fibroblasten (weiß) und PXE-Fibroblasten (grau). Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3) wurden für 72 h in Medium mit 10% LPDS unter der Zugabe von 20 μ M Atorvastatin kultiviert. Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardfehler. Kontrolle/ PXE: ns $p > 0.05$.

Die Kultivierungen wurden in diesen Teil ausschließlich in delipidiertem Medium (10% LPDS) durchgeführt, da sich durch vorangegangene Arbeiten für viele Faktoren zeigte, dass unter

Entzug der Lipoproteine die pathophysiologischen Veränderungen in den PXE-Fibroblasten prononciert auftreten und entsprechende Effekte einer Statinbehandlung demnach besser detektiert werden könnten.

Zunächst sollte der Einfluss von Atorvastatin auf einzelne Faktoren, welche direkt mit der Cholesterinbiosynthese in Verbindung stehen, analysiert werden. In Abbildung 30 sind die Ergebnisse für die Genexpressionen der *HMGCR*, der *Farnesyldiphosphat Synthase (FDPS)*, des *low density lipoprotein Rezeptors (LDLR)* sowie des *high density lipoprotein-binding Proteins (HDLBP)* gezeigt. Es zeigten sich für alle Faktoren kein signifikanter Unterschied in den PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontroll-Fibroblasten.

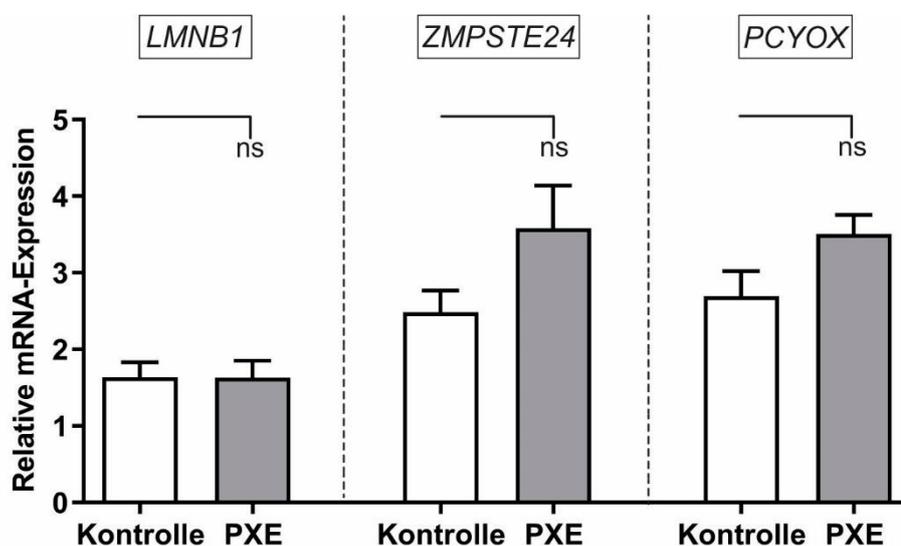


Abbildung 31: Relative *LMNB1*-, *ZMPSTE24*- und *PCYOX*-mRNA-Expression in Kontroll-Fibroblasten (weiß) und PXE-Fibroblasten (grau). Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3) wurden für 72 h in Medium mit 10% LPDS unter der Zugabe von 20 μ M Atorvastatin kultiviert. Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardfehler. Kontrolle/ PXE: ns $p > 0.05$.

Der Einfluss von Atorvastatin auf die Faktoren, welche mit Prenylierungsprozessen und damit im weiteren Sinne ebenfalls mit der Cholesterinbiosynthese in Verbindung stehen, sollten im nächsten Schritt untersucht werden. In Abbildung 31 ist das Ergebnis der *LMNB1*-, *ZMPSTE24*- sowie der *PCYOX*-Genexpression zu sehen. Wie auch schon bei den zuvor untersuchten Cholesterin-assoziierten Faktoren war auch hier kein signifikanter Unterschied bei allen untersuchten Faktoren zwischen den mit Atorvastatin behandelten PXE-Fibroblasten und den Kontrollen festzustellen.

Im nächsten Schritt sollte der Einfluss von Atorvastatin auf Bestandteile des SASPs untersucht werden. In Abbildung 32 sind die Ergebnisse für die *IL6*-, *IGFBP3*- sowie die *GDF11*-Genexpression gezeigt. Für die *IL6*-Genexpression konnte trotz

Atorvastatinbehandlung weiterhin eine signifikante Erhöhung in den PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontroll-Fibroblasten festgestellt werden (5,5-fach). Auch für die *IGFBP3*-Genexpression zeigte sich, wie schon zuvor, eine signifikant erniedrigte Genexpression in den PXE-Fibroblasten im Vergleich zur Kontrolle (0,3-fach).

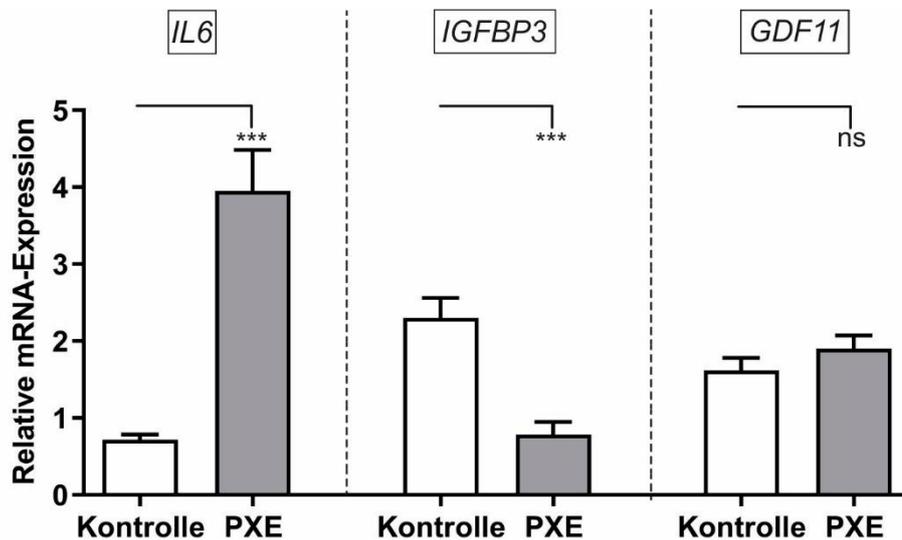


Abbildung 32: Relative *IL6*-, *IGFBP3*- und *GDF11*-mRNA-Expression in Kontroll-Fibroblasten (weiß) und PXE-Fibroblasten (grau). Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3) wurden für 72 h in Medium mit 10% LPDS unter der Zugabe von 20 μ M Atorvastatin kultiviert. Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardfehler. Kontrolle/ PXE: ns $p > 0.05$; *** $p \leq 0.001$.

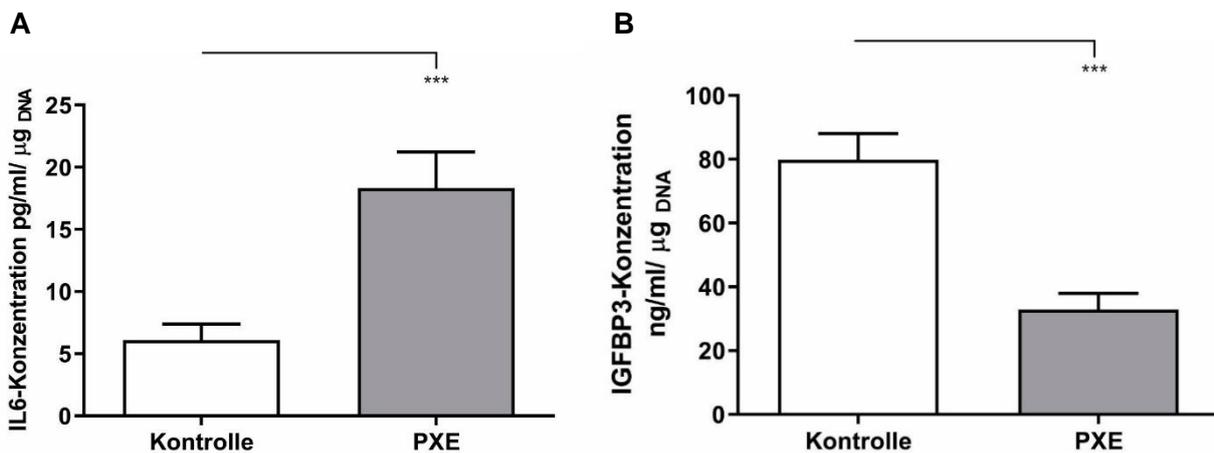


Abbildung 33: IL6- und IGFBP3-Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand von Kontroll-Fibroblasten (weiß) und PXE-Fibroblasten (grau). Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3) wurden für 72 h in Medium mit 10% LPDS unter der Zugabe von 20 μ M Atorvastatin kultiviert. (A) IL6-Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand. (B) IGFBP3-Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand. Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardfehler. Kontrolle/ PXE: *** $p \leq 0.001$.

Wie in Abbildung 33 zu erkennen, konnte dieses Ergebnis ebenfalls durch die Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand bestätigt werden. So zeigte sich für die IL6-Proteinkonzentration eine signifikante Erhöhung (3,0-fach) und für die IGFBP3-Proteinkonzentration eine signifikante Erniedrigung (0,4-fach) in den PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontroll-Fibroblasten. Im Gegensatz zu der *IL6*- sowie *IGFBP3*-Genexpression zeigte sich für die *GDF11*-Genexpression kein signifikanter Unterschied zu den Kontroll-Fibroblasten.

Studien zeigten bereits, dass Atorvastatin einer fortschreitenden Kalzifizierung entgegenwirken kann (Guo *et al.*, 2013). Über die molekularen Zusammenhänge ist bis jetzt allerdings wenig bekannt. Aus diesem Grund wurde auch der Einfluss von Atorvastatin auf bekannte Faktoren der PPI-Homöostase ermittelt. Dabei wurde für den Anfang der Fokus auf die Genexpression der antikalzifizierende Faktoren *ENPP1* und *Osteopontin (OPN)* gelegt. Für die *ENPP1*-mRNA-Expression zeigte sich trotz Atorvastatinbehandlung eine signifikante Reduktion in den PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollen (0,7-fach, Abb. 34). Auch für die *OPN*-Genexpression konnte für die PXE-Fibroblasten durch die Applikation von Atorvastatin kein zu den Kontroll-Fibroblasten vergleichbares Expressionsniveau erreicht werden. So zeigte sich auch hier eine signifikant erniedrigte *OPN*-Genexpression in den PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontroll-Fibroblasten (0,6-fach, Abb.: 34).

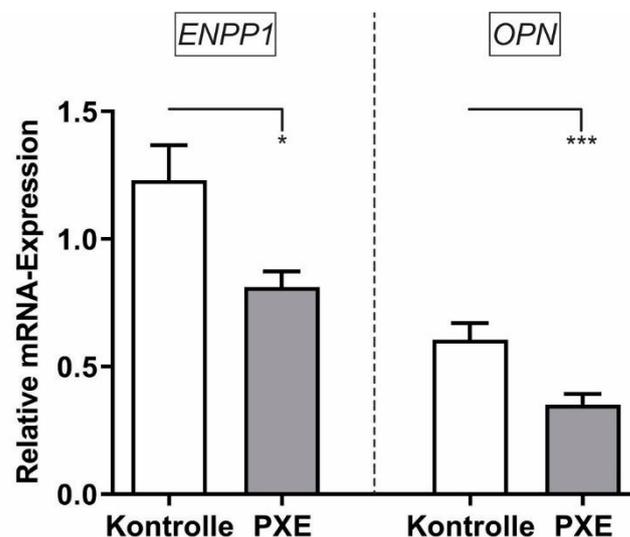


Abbildung 34: Relative *ENPP1*- und *OPN*-mRNA-Expression in Kontroll-Fibroblasten (weiß) und PXE-Fibroblasten (grau). Kontroll-Fibroblasten (n=3) und PXE-Fibroblasten (n=3) wurden für 72 h in Medium mit 10% LPDS unter der Zugabe von 20 μ M Atorvastatin kultiviert. Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardfehler. Kontrolle/ PXE: * $p \leq 0.05$ ***; $p \leq 0.001$.

5. Diskussion

5.1. Evaluierung integrativer Kennzeichen der Alterung bei PXE

Entsprechend des Modells von López-Otín *et al.* werden im nachfolgenden Teil der Arbeit zunächst die integrativen Kennzeichen der Alterung bei PXE diskutiert.

5.1.1. Veränderte Konzentration und Genexpression relevanter Biomarker des Alterns im Serum und dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten

Klinisch manifestiert sich PXE außer durch die augenscheinlichen Symptomatiken wie einem Elastizitätsverlust der Haut auch in veränderten Konzentrationen verschiedener zirkulierender Faktoren im Blut. So konnte in einer Studie von Jiang *et al.* nachgewiesen werden, dass eine weitere Kalzifizierung in *Abcc6^{-/-} / Rag1^{-/-}*-Mäusen durch einen gemeinsamen Blutkreislauf mit Wildtyp-Mäusen aufgehalten werden konnte (Jiang *et al.*, 2010). Auch die Inkubation mit Serum von PXE-Patienten führte nachweislich zur Bildung von Aggregaten abnormaler elastischer Fasern bei dermalen Fibroblasten gesunder Probanden *in vitro* (Le Saux *et al.*, 2006). Vergleichbare Ergebnisse konnten durch mehrere Studien für Modelle physiologischer Alterung nachgewiesen werden. So konnte beobachtet werden, dass Blut junger Mäuse verjüngende Effekte in älteren Mäusen zeigt (Conboy *et al.*, 2005; Katsimpardi *et al.*, 2014; Loffredo *et al.*, 2013). Eine Veränderung von zirkulierenden Faktoren im Blut scheint somit sowohl bei physiologischen Alterungsprozessen als auch bei einer PXE-Erkrankung vorzuliegen. Um zu klären, ob auch Alters-assoziierte Biomarker zu den Faktoren gehören, welche in veränderter Konzentration bei PXE vorliegen, wurden CCL11, GDF11, IGF1 sowie IGFBP3 als bekannte Biomarker des Alterns in gesunden Probanden und PXE-Patienten unterschiedlichen Alters verglichen.

Der erste Biomarker, welcher näher betrachtet wurde, ist CCL11. CCL11 ist ein Chemokin, welches in verschiedensten Zelltypen exprimiert wird. Es ist vorrangig bekannt dafür an der Induktion der Chemotaxis von Eosinophilen beteiligt und somit ein Ligand des Chemokin Rezeptors 3 zu sein, welcher auf Eosinophilen, Basophilen und Th2 Lymphozyten exprimiert wird. CCL11 wird vor allem eine Rolle in inflammatorischen Prozessen, Arteriosklerose und der Neurogenese zugesprochen (Haley *et al.*, 2000; Matthews *et al.*, 1998; Ogilvie *et al.*, 2001; Villeda *et al.*, 2011). Zusätzlich dazu ist CCL11 ebenfalls als Biomarker physiologischer Alterung bekannt, da gezeigt wurde, dass die CCL11-Konzentration im Blut sowohl bei Mäusen

als auch Menschen mit zunehmendem Alter ansteigt (Hoefer *et al.*, 2017; Villeda *et al.*, 2011). In dieser Arbeit konnte ebenfalls ein sukzessiver Anstieg der CCL11-Konzentration im Serum der gesunden Kontrollen mit steigendem Alter nachgewiesen werden. Eine Studie von Mo *et al.* konnte zudem erhöhte CCL11-Konzentrationen im Serum mit altersassoziierten Erkrankungen in Verbindung bringen. So konnten gesteigerte CCL11-Serumkonzentrationen in allen Stadien der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) festgestellt werden. Die einzige Ausnahme bildete hier die feuchte AMD, bei der kein signifikanter Anstieg der CCL11-Konzentration im Serum im Vergleich zu den gesunden Kontrollen festgestellt werden konnte (Mo *et al.*, 2010). Eine Beeinträchtigung des Sehvermögens, mit Ähnlichkeiten zur feuchten AMD, ist eine der klinischen Manifestationen, die im Fall einer PXE-Erkrankung auftreten können (Ellabban *et al.*, 2012; Georgalas *et al.*, 2011; Myung *et al.*, 2010). Das Ergebnis unveränderter CCL11-Konzentrationen im Serum von Patienten mit feuchter AMD unterstützt so den Fakt, dass die vergleichende Analyse in dieser Arbeit ebenfalls keinen Unterschied in der CCL11-Proteinkonzentration im Serum von PXE-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen ergab.

Als nächster Biomarker der Alterung wurde GDF11 untersucht. Bezüglich der GDF11-Konzentration im Serum konnte bei den gesunden Kontrollen lediglich eine tendenzielle Erniedrigung mit dem Alter festgestellt werden. Ebenfalls keine eindeutigen Unterschiede ergaben sich bei dem Vergleich der GDF11-Konzentration im Serum von PXE-Patienten und Kontrollen. Als Mitglied der *Transforming Growth Factor β* -Superfamilie wird GDF11 in einem Großteil aller Gewebe exprimiert und spielt bei einer Vielzahl von Entwicklungsprozessen eine Rolle (Simoni-Nieves *et al.*, 2019). Dazu zählen unter anderem die anterior-posterior Strukturierung des Axialskeletts (McPherron *et al.*, 1999), die Osteoblastendifferenzierung (Lu *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2015) sowie die Neurogenese (Shi and Liu, 2011). Aufgrund der Beteiligung an diversen Entwicklungsprozessen wird GDF11 ebenfalls häufig als *Anti-Aging* Faktor betitelt, jedoch ist die Datenlage hierzu nicht eindeutig. So zeigten Loffredo *et al.* eine Reduktion der GDF11-Konzentration im Serum mit dem Alter und wiesen nach, dass eine Applikation von rekombinanten GDF11 eine altersbedingte kardiale Hypertrophie in Mäusen reversieren kann (Loffredo *et al.*, 2013). Dementsprechend verknüpfte eine weitere Studie erniedrigte GDF11-Konzentrationen mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und einer erhöhten Mortalität (Olson *et al.*, 2015). Dem gegenüber steht eine Studie von Egermann *et al.*, die auf eine Erhöhung der GDF11-Konzentration im Serum mit dem Alter hindeutet (Egerman *et al.*, 2015). Diese Kontroversität und Uneindeutigkeit der Ergebnisse spiegelt sich auch in den hier ermittelten

heterogenen Ergebnissen für die Serumkonzentrationen wider. Anzumerken ist zudem, dass die ermittelten Werte für die GDF11-Konzentrationen in den Seren in dieser Arbeit sich teils in der Nähe bzw. sogar unterhalb des Detektionslimits befanden, sodass dies die Frage aufwirft, ob die niedrigen Level des systemischen GDF11 überhaupt einen Einfluss auf die pathobiochemischen Prozesse bei PXE haben. Aus diesem Grund wurde weiterführend die lokale *GDF11*-Genexpression in dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten und gesunden Kontrollen ermittelt. Es zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der *GDF11*-mRNA-Expression in PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den entsprechenden Kontroll-Fibroblasten. Eine vorangegangene Studie zeigte im Vergleich von 3 Monate und 24 Monate alten Mäusen eine Reduktion der GDF11-Gen- sowie Proteinexpression in der Milz der älteren Mäuse. Zudem wiesen sie nach, dass die Milz im Vergleich mit anderen Geweben das höchste mRNA-Level aufwies und damit potenziell einen großen Einfluss auf die Konzentration des zirkulierenden GDF11 hat (Loffredo *et al.*, 2013). Dementsprechend ist es nicht verwunderlich, dass sich die Ergebnisse der GDF11-Konzentration im Serum und der *GDF11*-Genexpression in Fibroblasten in dieser Arbeit maßgeblich voneinander unterscheiden. Nichtsdestotrotz weisen die Ergebnisse daraufhin, dass weniger die systemische GDF11-Konzentration, aber dafür die lokale GDF11-Expression im peripheren Gewebe einen Einfluss auf die Pathobiochemie bei PXE haben könnte. Zusätzlich liefert dies einen weiteren Hinweis für einen beschleunigten Alterungsprozesses bei PXE.

Ein weiterer Faktor, welcher näher betrachtet wurde, ist IGF1. IGF1 ist ein Hormon, welches vorrangig in der Leber exprimiert wird und diverse Funktionen prä- sowie postnatal hat. Die Produktion von IGF1 wird durch das *Growth Hormone* (GH) stimuliert, sodass ein negativer *Feedback Loop* zwischen IGF1 und GH entsteht. Das IGF1-Level erreicht dabei sein Maximum in der Pubertät und sinkt nachfolgend mit steigendem Alter. Dieses Phänomen wird auch Somatopause genannt und ist assoziiert mit altersbedingten Symptomatiken wie dem Verlust von Muskelmasse, Adiposität oder verringerter Knochendichte (O'Connor *et al.*, 1998; Puche and Castilla-Cortázar, 2012). Eine Studie mit progeroiden *Zmpste24^{-/-}*-Mäusen, welche HGPS nachempfunden sind, zeigte so, dass diese Mäuse ein gestörtes GH/IGF1-Verhältnis einhergehend mit einer erniedrigten IGF1-Plasmakonzentration aufweisen. Wurde diesen Mäusen rekombinantes IGF1 verabreicht, konnte das GH/IGF1-Verhältnis verbessert und damit die Lebenszeit der Mäuse verlängert werden (Mariño *et al.*, 2010). Eine Erniedrigung der zirkulierenden IGF1-Konzentration in gesunden Individuen mit steigendem Alter konnte ebenfalls in dieser Arbeit festgestellt werden. Obwohl sich zwischen den Altersgruppen ≤ 30 Jahre und der Gruppe 31- 49 Jahre keine statistisch signifikante Abnahme aufgrund großer

individueller Schwankungen zeigte, erschien die Reduktion der IGF1-Konzentration hier ausgeprägter als zwischen den Altersgruppen 31-49 Jahre und ≥ 50 Jahre. Eine Studie von O'Connor *et al.* zeigte diesbezüglich, dass das IGF1-Level in Männern gleichmäßig mit steigendem Alter sinkt. Frauen zeigen hingegen in jüngeren Jahren eine deutlich schnellere Abnahme der zirkulierenden IGF1-Konzentration als Männer bzw. Frauen in höherem Alter (O'Connor *et al.*, 1998). Ein signifikanter Unterschied im Verlauf der IGF1-Konzentration im Serum zwischen Männern und Frauen konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden, jedoch schließt dies einen Einfluss dieses oder anderer individueller Faktoren nicht aus. Es konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen der IGF1-Serumkonzentration der PXE-Patienten und den gesunden Kontrollen festgestellt werden. Da sowohl ABCC6 als auch IGF1 primär in der Leber exprimiert werden (Puche and Castilla-Cortázar, 2012; Sjögren *et al.*, 1999), erscheint es also unwahrscheinlich, dass eine ABCC6-Defizienz einen Einfluss auf die Expression bzw. Sekretion von IGF1 hat. Das sekretierte bzw. zirkulierende IGF1 im Serum ist zu fast 90% in einem ternären Komplex mit IGFBP3 und dem *acid label subunit* (ALS) gebunden. In Geweben fehlt das ALS, sodass hier meist nur ein binärer Komplex zwischen IGF1 und IGFBP3 entsteht. Durch die Bindung an IGFBP3 wird die Halbwertszeit des IGF1 verlängert. Außerdem wird die Bioverfügbarkeit von freiem IGF1 und damit seine biologische Aktivität durch die Bindung an IGFBP3 kontrolliert (Ferry *et al.*, 1999). Studien zeigten, dass die IGFBP3-Expression sowohl in Fibroblasten höherer Passage als auch in seneszenten humanen Endothelzellen der Nabelvene gesteigert vorliegt (Kim *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2004). In dieser Arbeit konnten keine signifikanten Veränderungen der IGFBP3-Serumkonzentration mit dem Alter festgestellt werden. Es zeigte sich jedoch auch hier besonders in der Altersgruppe ≤ 30 Jahre eine größere Schwankung unter den Individuen. Im Vergleich mit dem Serum der PXE-Patienten zeigte sich eine signifikante Erhöhung der IGFBP3-Serumkonzentration für die PXE-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen > 45 Jahre. Durch die Berechnung des molaren IGF1/IGFBP3-Verhältnisses kann somit vermutet werden, dass weniger freies IGF1 im Serum der PXE-Patienten > 45 Jahre im Vergleich zu der entsprechenden Kontroll-Kohorte vorliegt. Dies wiederum würde für eine Verringerung der IGF1-Signalweiterleitung im peripheren Gewebe und somit für potenzielle beschleunigte Alterungsprozesse sprechen. Des Weiteren ist bekannt, dass gewebsspezifisch exprimiertes IGFBP3 parakrine und autokrine Effekte auf die IGF1-Signalweiterleitung hat (Oliver *et al.*, 2005). So ergab die Messung der lokalen *IGFBP3*-mRNA-Expression und IGFBP3-Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand entgegengesetzt zu der IGFBP3-Serumkonzentration in beiden Fällen eine Reduktion für die PXE-Fibroblasten im

Vergleich zu den gesunden Kontrollen, sodass im Allgemeinen von einer erhöhten IGF1-Signalweiterleitung ausgegangen werden könnte. Auffällig war hier, dass sich die Ergebnisse geschlechterspezifisch unterschieden. Für die Fibroblasten männlicher PXE-Patienten ergab sich so eine signifikante Reduktion wohingegen keine Veränderungen für die Fibroblasten der weiblichen PXE-Patientin beobachtet werden konnten. Eine Studie von Oliver *et al.* unterstützt die Vermutung der geschlechtsspezifischen IGFBP3-Expression. So zeigten sie in ihrer Studie eine Reduktion der IGFBP3-Proteinexpression in IGF1-überexprimierender Skelettmuskulatur von männlichen und keine Veränderung in IGF1-überexprimierender Skelettmuskulatur von weiblichen älteren Mäusen im Vergleich zu den Jüngeren. Des Weiteren wiesen sie nach, dass dieses Ergebnis nicht von geschlechtsabhängigen Reaktionen auf die Überexpression des IGF1 abhängt, sondern andere alters- bzw. geschlechtsspezifische Faktoren ursächlich sein müssen (Oliver *et al.*, 2005). Abgesehen von der gegensätzlichen IGFBP3-Proteinexpression, konnte in dieser Arbeit auch eine geschlechtsabhängige *IGFBP3*-mRNA-Expression gezeigt werden, was auf eine gewebsspezifische Regulation hindeuten könnte. Eine gesteigerte *IGFBP3*-mRNA-Expression konnte im retinalen Gefäßsystem im Fall einer Hypoxie detektiert werden. Dies wurde mit einer protektiven Wirkung zur Verhinderung abnormaler Neovaskularisierung in Verbindung gebracht (Lofqvist *et al.*, 2007). Eine verringerte gewebsspezifische IGFBP3-Expression, wie sie hier für die Fibroblasten männlicher Patienten gezeigt wurde, könnte somit zu der Entwicklung einer CNV bei PXE beitragen, sofern sich ähnliche Ergebnisse in retinalem Gewebe nachweisen ließen. In diesem Fall wäre es jedoch verwunderlich, sollte dies ausschließlich männliche PXE-Patienten betreffen, da bekannt ist, dass vorrangig Frauen von PXE betroffen sind (Germain, 2017). Die höhere Prävalenz einer PXE-Erkrankung bei Frauen könnte somit auch der Grund für die entgegengesetzten Ergebnisse der IGFBP3-Serumkonzentration und der Expression in den Fibroblasten sein. So wurden deutlich mehr Seren weiblicher Spenderinnen analysiert, als von männlichen Spendern, sodass hier eher ein Anstieg als eine Reduktion beobachtet werden konnte. Die Ergebnisse zeigen dennoch, dass eine ABCC6-Defizienz zu aberranten IGFBP3-Serumkonzentrationen und vor allem zu einer Alteration der gewebsspezifischen IGFBP3-Gen- sowie Proteinexpression führt. Dies unterstützt wiederum die Hypothese eines vorzeitigen Alterungsprozesses bei PXE und bekräftigt vor allem erneut die Tatsache, dass eine ABCC6-Defizienz einen direkten Einfluss in betroffenem peripherem Gewebe hat.

Als letzter zirkulierender Faktor wurde PPI untersucht. Es ist bereits bekannt, dass eine ABCC6-Defizienz mit verringerten systemischen und lokalen PPI-Konzentrationen assoziiert

ist (Boraldi *et al.*, 2014, 2013; Dabisch-Ruthe *et al.*, 2014; Jansen *et al.*, 2014, 2013; Zhao *et al.*, 2017). So zeigte eine Studie von Jansen *et al.*, dass *Abcc6*^{-/-}-Mäuse verringerte Plasma PPI-Konzentrationen aufweisen. Zudem wiesen sie nach, dass die extrazelluläre ATP-Konzentration, welche als primäre Quelle für PPI gilt, bei einer Überexpression von ABCC6 in HEK293-Zellen drastisch ansteigt (Jansen *et al.*, 2013). Dementsprechend wurde in einer Studie von Dabisch-Ruthe *et al.* gezeigt, dass sowohl das zytosolische wie auch das extrazelluläre PPI-Level bei Fibroblasten von PXE-Patienten erniedrigt vorliegt (Dabisch-Ruthe *et al.*, 2014). Unklar ist jedoch bis heute, ob Veränderungen der PPI-Plasmakonzentration mit Alterungsprozessen in Verbindung stehen. Villa-Belosta *et al.* lieferten zwar durch eine Studie, in der gezeigt wurde, dass in einem HGPS-Mausmodell ebenfalls erniedrigte PPI-Plasmakonzentrationen vorliegen, Hinweise auf einen altersspezifischen Zusammenhang, jedoch ist nicht eindeutig geklärt, ob dies auch für die PPI-Level in gesunden Individuen zutrifft. (Villa-Belosta *et al.*, 2013). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die PPI-Plasmakonzentration von gesunden Probanden unterschiedlichen Alters untersucht und gezeigt, dass es besonders zwischen den Altersgruppen ≤ 30 Jahre und der Gruppe 31-49 Jahre zu einem signifikanten Anstieg kommt. Durch eine vorrangegangene Studie wurde bereits nachgewiesen, dass das Alter eine essenzielle Rolle bei Kalzifizierungsprozessen spielt, da sich zeigte, dass Fibroblasten von adulten Spendern deutlich eher dazu tendieren zu kalzifizieren als neonatale Fibroblasten (Boraldi *et al.*, 2015). Es ist daher nicht auszuschließen, dass der Anstieg der PPI-Plasmakonzentration vor allem im mittleren Alter bei den gesunden Probanden einer frühzeitigen Kalzifizierung entgegenwirken soll. Ab einem gewissen Alter scheint jedoch dieser potenzielle kompensatorische Mechanismus der Progression der Alterungsprozesse zu unterliegen, sodass auch in gesunden Individuen typische mit Kalzifizierungsprozessen assoziierte Symptomatiken, wie kardiovaskuläre Komplikationen, auftreten. Liegen von Beginn an, wie bei PXE-Patienten, erniedrigte PPI-Konzentrationen im Plasma vor, könnte dies dazu führen, dass diese Symptomatiken entsprechend früher auftreten. Dies würde auch mit der Beobachtung korrelieren, dass erste Symptome bei PXE im Durchschnitt mit ca. 13 Jahren auftreten und 20 Jahre nach der Erstdiagnose, also in der 3.-4. Lebensdekade, fast 100% der Patienten massive Augenhintergrundsveränderungen aufweisen (Plomp *et al.*, 2010), was bei gesunden Individuen nicht der Fall ist. Die verringerten PPI-Konzentrationen im Plasma bei PXE-Patienten deuten damit ebenfalls auf einen vorzeitigen Alterungsprozess hin.

Zusammengefasst kann also festgestellt werden, dass eine ABCC6-Defizienz mit Alterationen von systemischen und vor allem lokalen Veränderungen der Konzentration bekannter

Biomarker des Alterns einhergeht. Dies kann in Teilen mit einem vorzeitigen Alterungsprozess in Verbindung gebracht werden.

5.2. Evaluierung antagonistischer Kennzeichen der Alterung bei PXE

Aufbauend auf dem vorangegangenen Kapitel werden im nachfolgenden Teil die antagonistischen Kennzeichen der Alterung bei PXE diskutiert.

5.2.1. Ausbildung einer zellulären Seneszenz und eines Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps bei Fibroblasten von PXE-Patienten

Durch die Analyse der Biomarker des Alterns bei PXE, ist bereits deutlich geworden, dass sich Alterationen vor allem auf zellulärer Ebene zeigen. Aus diesem Grund sollte die zelluläre Seneszenz bei PXE-Fibroblasten als antagonistisches Kennzeichen der Alterung näher betrachtet werden. Generell ist bekannt, dass der Anteil an seneszenten Zellen mit zunehmendem Alter steigt (Dimri *et al.*, 1995; Melk *et al.*, 2003). In dieser Arbeit sollte so eine gesteigerte zelluläre Seneszenz bei PXE-Fibroblasten im Zuge einer vorzeitigen Alterung über die Beurteilung der zellulären Morphologie, der Bestimmung der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase (SA- β -Gal) Aktivität, der Lamin B1-Expression, der Expression verschiedener Zellzyklusinhibitoren und anderer Zellzyklus-assoziiierter Faktoren sowie über die Analyse eines potenziellen SASP nachgewiesen werden. Zudem wurden die Fibroblasten für diesen Teil der Arbeit sowohl in Medium mit 10% FCS sowie in Medium mit 10% LPDS kultiviert, da vorherige Arbeiten zeigten, dass pathologische Veränderungen in den PXE-Fibroblasten besonders in Abwesenheit exogener Lipoproteine sichtbar wurden (Kuzaj *et al.*, 2014a).

Morphologische Veränderungen von Zellen können in vielerlei zellulären Prozessen wie der Apoptose oder Differenzierung beobachtet werden. Auch bei der Ausbildung einer Seneszenz kommt es demnach zu morphologischen Veränderungen. Bei Fibroblasten äußert sich dies in dem Übergang von einer Spindelform hin zu einer vergrößerten, abgeflachten und irregulären Zellform (Chen *et al.*, 2000; Hayflick and Moorhead, 1961). Diese Veränderung der Morphologie konnte hier ebenfalls für die PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontroll-Fibroblasten sowohl unter Standardbedingungen sowie bei der Kultivierung in Medium mit 10% LPDS beobachtet werden. Senescente Zellen weisen zudem eine erhöhte

SA- β -Gal-Aktivität auf, sodass dies als Indikator einer vermehrten zellulären Seneszenz in der Kultur dienen kann (Dimri *et al.*, 1995; Gary and Kindell, 2005; Lee *et al.*, 2006). Diese SA- β -Gal-Aktivität entspricht dabei der lysosomalen β -Galaktosidase (β -Gal)-Aktivität und steigt mit der allgemeinen lysosomalen Aktivität an. Die lysosomale β -Gal-Aktivität ist aufgrund des sauren Milieus innerhalb des Lysosoms bei einem pH-Wert zwischen 4,0 und 4,5 maximal. Im Fall eines seneszenten Status der Zellen steigt die β -Gal-Aktivität jedoch so stark an, dass sie auch bei einem nicht optimalen pH-Wert 6,0 detektiert werden kann (Dimri *et al.*, 1995). So konnte bereits für das progeroide Syndrom HGPS eine gesteigerte β -Gal-Aktivität in *in vitro* kultivierten Fibroblasten beobachtet werden (Wheaton *et al.*, 2017). Für die PXE-Fibroblasten konnte diesbezüglich bis zu diesem Zeitpunkt lediglich eine gesteigerte Seneszenz für ein *ABCC6-knockdown* Modell in HepG2-Zellen gezeigt werden (Miglionico *et al.*, 2017). In dieser Arbeit konnte nun erstmals eine signifikante Steigerung der SA- β -Gal-Aktivität und damit dem Anteil an seneszenten Zellen einer Kultur primärer Fibroblasten von PXE-Patienten sowohl bei der Kultivierung in Medium mit 10% FCS als auch in Medium mit 10% LPDS im Vergleich zu der jeweiligen Kontrolle detektiert werden. Mehrere Studien führten die Steigerung der SA- β -Gal-Aktivität primär auf eine Steigerung der Proteinkonzentration der β -Gal sowie einer erhöhten Lysosomenanzahl und Aktivität zurück (Kurz *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006). Ein Unterschied in der Menge der Lysosomen zwischen PXE-Fibroblasten und Kontrollen konnte in dieser Arbeit unter keiner Bedingung festgestellt werden, sodass der Anstieg der SA- β -Gal Aktivität in diesem Fall nicht auf die Akkumulation von Lysosomen zurückzuführen ist, sondern auf eine gesteigerte Aktivität der vorhandenen Lysosome oder auf eine gesteigerte Proteinkonzentration der β -Gal in diesen Lysosomen. Anzumerken ist ebenfalls, dass durch die Applikation von 10% LPDS eine Reduktion der SA- β -Gal-Aktivität für die PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den PXE-Fibroblasten, welche unter Standardbedingungen kultiviert wurden, festgestellt werden konnte, obwohl bei der Zugabe von 10% LPDS gleichzeitig eine Zunahme der Lysosomenmarkers LAMP1 verzeichnet wurde. Dies bedeutet, dass durch den Entzug der Lipoproteine zwar potenziell die Menge an Lysosomen ansteigt, die enthaltene β -Gal aber entweder weniger aktiv ist oder insgesamt eine geringere Konzentration an β -Gal vorliegt.

Da eine Beurteilung der zellulären Seneszenz nur auf der Grundlage der morphologischen Veränderung und der β -Gal-Aktivität nicht ausreichend ist, wurde weiterführend die Lamin-B1-Expression evaluiert. Ein Verlust von Lamin B1 ist mit zellulärer Seneszenz assoziiert (Freund *et al.*, 2012; Shimi *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2017). Für die PXE-Fibroblasten konnten in dieser Arbeit keine signifikanten Veränderungen der *LMNB1*-Genexpression bei der

Kultivierung in Medium mit 10% FCS im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden, aber eine signifikante Reduktion durch die Applikation von 10% LPDS. Eine Studie von Freund *et al.* zeigte, dass ein Verlust von Lamin B1 in seneszenten Zellen unabhängig von einer DNA-Schadensantwort, reaktiven Sauerstoffspezies und der Aktivierung der p38-mitogenaktivierten Proteinkinase sowie des *nuclear factor* (NF) κ B ist. Sie wiesen vielmehr nach, dass die Reduktion von Lamin B1 mit der Stimulierung des p53 und des Retinoblastom Proteins (pRB) assoziiert ist (Freund *et al.*, 2012). Lamin B1 untersteht so im Allgemeinen unter anderem der Kontrolle des Transkriptionsfaktor E2F. E2F ist an das hypophosphorylierte pRB gebunden. Die Cyclin-abhängigen Kinasen (CdK) 4 und 6, welche zusammen mit dem Cyclin D einen Komplex bilden, sowie die CdK 2 und der entsprechende CdK2-Cyclin E-Komplex führen so letztendlich zur Phosphorylierung des pRB und damit zur Freisetzung des E2F, welches folglich die Expression von Lamin B1 initiieren kann (Hallstrom *et al.*, 2008). Der in dieser Arbeit durchgeführte Antikörper-Array zeigte zunächst keine signifikanten Alterationen der Proteinkonzentration verschiedener nachweisbarer Cycline bzw. CdKs sowie von E2F. In Stresssituationen werden die CdKs sowie der Komplex aus Cdk und dem entsprechenden Cyclin ihrerseits durch verschiedenste CdK-Inhibitoren kontrolliert und inhibiert, sodass pRB hypophosphoryliert verbleibt und eine Freisetzung von E2F nicht stattfindet. Die Folge daraus ist ein dauerhafter Zyklusarrest aufgrund der Hypophosphorylierung von pRB und eine Reduktion der Expression E2F abhängiger Proteine, wie Lamin B1 (Giacinti and Giordano, 2006; Shimi *et al.*, 2011; Weinberg, 1995). CdK-Inhibitoren, welche zu der Inhibierung der CdK 4/6 bzw. des CdK 4/6-Cyclin D-Komplexes sowie der CdK 2 bzw. des CdK2-Cyclin E-Komplexes und damit zum Zellzyklusarrest führen sind unter anderem p27 sowie p21. Letzteres wird häufig durch den CdK-Inhibitor p53 reguliert (Abbas and Dutta, 2009; Lee and Kim, 2009). Für die *p21*-Genexpression konnte in den PXE-Fibroblasten ein signifikanter Anstieg im Vergleich zu den Kontroll-Fibroblasten in beiden Medien beobachtet werden. In Bezug auf die *p53*-mRNA-Expression konnte bei den Kontroll-Fibroblasten eine Induktion durch die Applikation von 10% LPDS im Vergleich zu der Kultivierung in 10% FCS beobachtet werden, eine vergleichbare Induktion blieb im Fall der PXE-Fibroblasten in beiden Medien aus. Die gleichbleibende Genexpression von *p53* bei den PXE-Fibroblasten weist nicht nur auf einen p53-unabhängigen p21-vermittelten Mechanismus für die Initiation der zellulären Seneszenz bei PXE hin, sondern stellt auch infrage, ob die verringerte *LMNB1*-Genexpression bei den PXE-Fibroblasten durch einen p53/pRB vermittelten Signalweg bedingt ist. Auffällig ist zudem, dass eine Reduktion der *LMNB1*-Expression nur unter delipidierten Bedingungen sowie

ausschließlich auf Genebene und nicht auf Proteinebene zu beobachten war. Lamin B1 gehört zu den Proteinen, zu dessen vollständiger Reifung eine Prenylierung am C-terminalen Ende gehört (Jung *et al.*, 2013). Durch die bei PXE beobachtete Induktion der Cholesterinbiosynthese, besonders unter delipidierten Bedingungen (Kuzaj *et al.*, 2014a), ist es so vorstellbar, dass vermehrt Isoprenoide in der Zelle vorliegen, die eventuell zu einer vermehrten Reifung prenylierter Proteine wie Lamin B1 beitragen. Zur Aufrechterhaltung der Homöostase wäre es demnach denkbar, dass die hier beobachtete Reduktion der *LMNB1*-Genexpression eher ein kompensatorischer Effekt ist, um einen Überschuss von Lamin B1 zu vermeiden als eine direkte Folge des Zellzyklusarrests. Darauf weisen auch die unauffälligen Ergebnisse des Lamin B1 Immunfluoreszenznachweises hin. Abgesehen davon bedeutet eine Nichtbeteiligung von p53 an den pathobiochemischen Mechanismen bei PXE nicht, dass eine zelluläre Seneszenz allein durch die Hochregulierung von p21 ausgeschlossen ist. So existieren mehrere Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren STAT1 sowie STAT3 innerhalb des p21-Promotors, welche bei Aktivierung die p21-Expression unabhängig von p53 induzieren können (Gartel and Tyner, 1999). STAT3 ist Teil des JAK-STAT-Signalweges, welcher unter anderen über kleine GTPasen aktiviert wird. Für die einwandfreie Lokalisierung und damit ihre Funktion ist die Prenylierung dieser kleinen GTPasen notwendig (Das, 2001; Magee and Marshall, 1999; Molnár *et al.*, 2001; Omoigui, 2007; Pereira-Leal *et al.*, 2001), sodass hier durch die Induktion der Cholesterinbiosynthese bei PXE ein möglicher Zusammenhang mit der Induktion der *p21*-Genexpression bestehen könnte. Neben der Induktion der *p21*-Genexpression konnte in dieser Arbeit ebenfalls erstmals eine drastisch erhöhte *IL6*-Genexpression bzw. Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand für die PXE-Fibroblasten nachgewiesen werden. Diese war dabei weitestgehend unabhängig von den Kultivierungsbedingungen. Eine vermehrte Expression von IL6 ist ebenfalls mit der Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges assoziiert. Zudem führt IL6 selbst zu einer Aktivierung von STAT3 und damit nicht nur zu einer weiteren autokrinen Stimulation seiner eigenen Expression, sondern ebenfalls zur Induktion der *p21*-Genexpression (Bellido *et al.*, 1998; Gartel and Tyner, 1999; Omoigui, 2007). Entgegengesetzt zu der starken *p21*-Genexpression konnte jedoch nur eine geringfügige Erhöhung der p21-Proteinkonzentration mittels Antikörper-Array in den PXE-Fibroblasten in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Aufgrund der begrenzten Aussagekraft von Antikörper-Arrays und des unbekanntenen Phosphorylierungsstatus von p21, wirft dies die Frage auf, inwieweit p21 wirklich an der Initiation der zellulären Seneszenz bei PXE beteiligt ist. Bezüglich der Wirkung von IL6, zeigte sich aber, dass die exogene Applikation von IL6 ebenfalls über die Aktivierung von STAT3

und der Beteiligung des IGFBP5 sowie gesteigertem oxidativem Stress zu der Initiation zellulärer Seneszenz in humanen TIG3-Fibroblasten führt (Kojima *et al.*, 2012). Dies würde zu der in dieser Arbeit beobachteten erhöhten β -Gal-Aktivität passen und gleichzeitig auf eine Initiation zellulärer Seneszenz über IL6 hindeuten.

Auch die Evaluation der *p27*-mRNA-Expression für die PXE-Fibroblasten unterstützt die Theorie einer vorzeitigen Seneszenz. So ergaben die Ergebnisse sowohl bei der Kultivierung in Medium mit 10% FCS wie auch bei der Kultivierung in Medium mit 10% LPDS eine signifikante Erniedrigung der *p27*-Genexpression für die PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den jeweiligen Kontroll-Fibroblasten. Eine erhöhte Expression von *p27* wird unter anderem nicht nur mit einem permanenten Zellzyklusarrest in Verbindung gebracht, sondern auch mit einem temporären Proliferationsarrest aufgrund von Kontaktinhibition (Dulic, 2013; Polyak *et al.*, 1994). Vor dem Hintergrund einer frühzeitigen vermehrten Seneszenz bei PXE-Fibroblasten kann vermutet werden, dass es durch die geringere Teilungsrate zu keinem bzw. einem verminderten Proliferationsarrest durch Kontaktinhibition in dieser Kultur im Vergleich zu den Kontroll-Fibroblasten kommt und damit zu keiner Induktion der *p27*-Genexpression.

Senescente Zellen weisen zudem einen speziellen SASP auf, zu dem ebenfalls die bereits diskutierten Biomarker des Alterns GDF11 sowie IGFBP3 gehören. Ein SASP zeichnet sich vor allem durch die gesteigerte Expression und Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie IL6, aus (López-Otín *et al.*, 2013), was abermals zu der hier detektierten drastischen Induktion der IL6-Expression beitragen würde. Neben der Induktion der IL6-Expression bei PXE-Fibroblasten, konnte zudem in dieser Arbeit eine Erhöhung der *MCP1*-Genexpression für die PXE-Fibroblasten vor allem unter delipidierten Kulturbedingungen festgestellt werden. MCP1 gehört zu der Familie der C-C Chemokine und reguliert unter anderem die Migration und Infiltration von Monozyten und Makrophagen. Die Expression von MCP1 wird vor allem induziert durch oxidativen Stress, Zytokine sowie Wachstumsfaktoren (Deshmane *et al.*, 2009). Vorangegangene Studien zeigten so eine gesteigerte MCP1-Expression als Resultat einer erhöhten Konzentration von IL6 bzw. des Komplexes aus IL6 und dem entsprechenden löslichen IL6-Rezeptor in verschiedensten Zelltypen (Choi *et al.*, 2016; Marino *et al.*, 2008; Spörri *et al.*, 1999). Dementsprechend gilt MCP1, wie IL6, als häufiger Bestandteil eines SASPs. Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine Behandlung mit MCP1 zu einer erhöhten β -Gal-Aktivität sowie zu einer erhöhten Expression von CdK-Inhibitoren in humanen Keratinozyten führt (Lee *et al.*, 2016), was ebenfalls zu den Ergebnissen dieser Arbeit passt und eine parakrine Wirkung des proinflammatorischen SASPs bezüglich der Initiation einer

zellulären Seneszenz vermuten lässt. Es ist zudem bekannt, dass IL6 die Expression von ICAM1, einem weiteren Faktor der Immunantwort, sowie seine Sekretion induzieren kann (Marino *et al.*, 2001). Die lösliche Form des ICAM1 entsteht dabei durch Zytokin reguliertes alternatives Spleißen (Giorelli *et al.*, 2002) sowie durch proteolytische Spaltung in Zuge der Immunantwort (Grenier and Bodet, 2008). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die *ICAM1*-Genexpression in seneszenten dermalen Fibroblasten deutlich erhöht vorliegt (Shelton *et al.*, 1999). Des Weiteren konnte bereits in vorangegangenen Studien dargelegt werden, dass sowohl im Serum von PXE-Patienten, sowie im Zellkulturüberstand von C3H-Makrophagen, welche eine ABCC6-Defizienz aufweisen, eine erhöhte ICAM1-Konzentration nachzuweisen ist (Bauer *et al.*, 2018; Hendig *et al.*, 2008a). Trotz der drastisch erhöhten IL6-Expression und einer vermutlichen vermehrten Seneszenz in den PXE-Fibroblasten konnte in dieser Arbeit keine signifikante Induktion der *ICAM1*-Genexpression in den PXE Fibroblasten festgestellt werden. Eine Studie von Gorgoulis *et al.* zeigte, dass die Hochregulierung der ICAM1-Expression maßgeblich mit einer p53-Induktion zusammenhängt (Gorgoulis *et al.*, 2005). Eine erhöhte Expression von p53 konnte für die PXE-Fibroblasten in dieser Arbeit nicht festgestellt werden.

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass PXE-Fibroblasten eine frühzeitig vermehrte Seneszenz *in vitro* aufweisen, welche mit einer Induktion des CdK-Inhibitors p21, sowie der Bildung eines proinflammatorischen SASPs assoziiert zu sein scheint. Mögliche Ursachen für die Ausprägung eines seneszenten Phänotyps sind nicht bekannt. Eine Beteiligung des JAK-STAT Signalweges und damit eine Beteiligung des Cholesterinstoffwechsels sind weiterhin denkbar.

5.3. Evaluierung primärer Kennzeichen der Alterung bei PXE

Auf der Grundlage der vorangegangenen Ergebnisse dieser Arbeit sollen im nachfolgenden Abschnitt die Ergebnisse der Untersuchungen zu den primären Kennzeichen der Alterung bei PXE weiterführend diskutiert und evaluiert werden.

5.3.1. Metabolische nicht aber genomische Alterationen sind potenziell ursächlich für den seneszenten Phänotypen bei Fibroblasten von PXE-Patienten

In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass es zu Alterationen der *LMNB1*-Genexpression bei PXE-Fibroblasten kommt. Zudem ist bekannt, dass PXE einige molekulare Überschneidungen mit der progeroiden Erkrankung HGPS aufweist (Boraldi *et al.*, 2014, 2013; Dabisch-Ruthe *et al.*, 2014; Jansen *et al.*, 2014, 2013; Zhao *et al.*, 2017), bei dessen Pathomechanismus die unzureichende Prozessierung eines weiteren Lamins eine essenzielle Rolle spielt. So ist der primäre Faktor bei HGPS, welcher zur Ausprägung des seneszenten Phänotyps führt, in den meisten Fällen eine *de novo* Mutation im Gen für das Kernhüllenprotein Lamin A, welche zu der Aktivierung einer Spleißstelle und damit zu einer verkürzten unzureichend prozessierten Form des Lamin A führt. Diese Variante wird auch Progerin genannt (McClintock *et al.*, 2007). Durch die unzureichende Prozessierung verbleibt Progerin dauerhaft farnesyliert, was zu drastischen Alterationen und Beschädigungen der nukleären Struktur und Integrität führt (Cao *et al.*, 2011). Aus diesem Grund sollte zunächst geklärt werden, ob Alterationen in der Lamin A-Prozessierung auch ursächlich für die Entwicklung einer vorzeitigen Seneszenz bei PXE sein könnten. Die Analyse der mRNA-Expression der Spleißvarianten des *LMNA*-Gens, *Lamin A* und *Lamin C*, zeigten keine Veränderungen in den PXE-Fibroblasten im Vergleich zur Kontrolle bei der Kultivierung in 10% FCS. Für die *Progerin*-Genexpression hingegen konnte ein signifikanter Anstieg unter diesen Bedingungen detektiert werden. Dies entspricht den Ergebnissen von Rodriguez *et al.*, welche trotz eines starken Anstiegs der *Progerin*-mRNA-Expression in HGPS-Fibroblasten keine Veränderung in der *Lamin A*- oder *Lamin C*-Genexpression zeigten (Rodriguez *et al.*, 2009). Durch die Applikation von 10% LPDS hingegen zeigte sich in dieser Arbeit eine signifikante Reduktion der *Lamin A* sowie *Lamin C*-Genexpression für die PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den entsprechenden Kontroll-Fibroblasten sowie im Vergleich zu den PXE-Fibroblasten, welche unter Standardbedingungen kultiviert wurden. Eine Reduktion der *Lamin A/C*-Genexpression konnte bereits ebenfalls in einer Studie von Miglionico *et al.* in

ABCC6-knockdown HepG2-Zellen nachgewiesen werden (Miglionico *et al.*, 2017). Die genauen molekularen Zusammenhänge blieben jedoch ungeklärt. Ein kompensatorischer Effekt, um einen Überfluss an A-Typ Laminen durch die Induktion der Cholesterinbiosynthese und damit der Prenylierung zu verhindern und die Integrität des Zellkerns zu bewahren, wäre ein mögliches Szenario, welches auch schon zuvor im Fall der Alterationen der *LMNB1*-Genexpression vermutet wurde. Dafür würden auch die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalyse sprechen, die ebenfalls keine ersichtlichen Veränderungen, weder in der Lamin A/C-Proteinkonzentration noch der Lokalisation im Zellkern der PXE-Fibroblasten aufzeigten. Es konnten ebenfalls keine Deformationen des Zellkerns der PXE-Fibroblasten festgestellt werden.

Um einen besseren Eindruck der Prozessierung der A-Typ Lamine bei PXE zu bekommen, wurden zusätzlich die Farnesyltransferase *FNTB* sowie die Metalloprotease *ZMPSTE24* analysiert. Farnesyltransferasen katalysieren die Übertragung einer Farnesylgruppe auf das CaaX-Motiv am C-terminalen Ende eines Proteins, in diesem Fall Lamin A (Long *et al.*, 2001). Mehrere Studien zeigten, dass die Toxizität von Progerin direkt mit der dauerhaften Farnesylierung assoziiert ist und eine Inhibierung von Farnesyltransferasen und damit die Verhinderung der Farnesylierung zu einer Verbesserung der nukleären Struktur und Integrität bei HGPS führt (Capell *et al.*, 2005; Mallampalli *et al.*, 2005; Toth *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008, 2005). Für die *FNTB*-Genexpression der Fibroblasten der PXE-Patienten konnte in dieser Arbeit eine mit der *Progerin*-mRNA-Expression vergleichbare Induktion bei der Kultivierung in 10% FCS detektiert werden. Dies lässt vermuten, dass nicht nur mehr Progerin in den PXE-Fibroblasten vorliegt, sondern dieses auch farnesyliert wird und damit potenziell toxisch wirkt. Zudem zeigte eine Studie von Kuzaj *et al.*, dass trotz der gesteigerten HMGCR-Aktivität in PXE-Fibroblasten keine Induktion der *Farnesyldisphosphatsynthase (FDPS)* bei der Kultivierung mit 10% FCS vorliegt (Kuzaj *et al.*, 2014a). Da die FDPS verantwortlich ist für die Umwandlung von Isopentenylidiphosphat zu Farnesyldiphosphat (Cerqueira *et al.*, 2016), dem Substrat der Farnesyltransferase, kann so vermutet werden, dass die Steigerung der *FNTB*-Genexpression nicht maßgeblich durch ein Überangebot von Farnesyldiphosphat begründet ist. Auch unter delipidierten Bedingungen konnte für die *FNTB*-Genexpression eine zu Progerin vergleichbares Ergebnis detektiert werden. Die allgemeine Reduktion der Genexpression der A-Typ Lamine unter delipidierten Bedingungen könnte somit zu der Reduktion der *FNTB*-mRNA-Expression beitragen. Neben der *FNTB* wurde in dieser Arbeit ebenfalls die mRNA-Expression der *ZMPSTE24* untersucht. *ZMPSTE24* ist eine Zinkmetalloprotease, welche sowohl im endoplasmatischen Retikulum als auch in der inneren

nukleären Membran lokalisiert ist (Barrowman *et al.*, 2008). ZMPSTE24 ist verantwortlich für die Abspaltung der 15 C-terminalen Aminosäuren und damit ebenfalls an der Farnesylierung während der Lamin A-Prozessierung beteiligt (Goblirsch *et al.*, 2020). *Zmpste24*^{-/-}-Mäuse dienen auch als Mausmodell für HGPS, da diese eine Akkumulation von dauerhaft farnesyliertem Prelamin A aufweisen, was eine ähnliche toxische Wirkung hat wie Progerin (Varela *et al.*, 2008). In der hier vorliegenden Arbeit konnten bei der Kultivierung in 10% FCS, im Gegensatz zu der *FNTB*-Genexpression, keine vergleichbaren Veränderungen für die *ZMPSTE24*-mRNA-Expression bei den PXE-Fibroblasten festgestellt werden. Dies bedeutet, dass der Induktion der *FNTB*-Genexpression eine gleichbleibende mRNA-Expression der *ZMPSTE24* gegenübersteht, was die Vermutung eines gehäuften Vorkommens von dauerhaft farnesyliertem Prelamin A aufwirft. Dementsprechend konnte eine vorrangegangene Studie zudem zeigen, dass die Expression der *Prenylcyteinoxidase 1 (PCYOX)*, welche für den Abbau von prenylierten Proteinen, wie Lamin A oder Progerin, verantwortlich ist, bei der Kultivierung in 10% FCS in PXE-Fibroblasten erhöht vorliegt (Kuzaj *et al.*, 2014a). Dies könnte demnach auf die Notwendigkeit eines gesteigerten Abbaus aufgrund der Akkumulation von Progerin oder Prelamin A hindeuten, um die Integrität des Zellkerns weiter zu gewährleisten. Es zeigte sich zudem, dass die *PCYOX*-Genexpression unter delipidierten Bedingungen in den PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontroll-Fibroblasten signifikant erniedrigt vorliegt (Kuzaj *et al.*, 2014a). Dies könnte demnach entweder eine Folge der Erniedrigung der *Lamin A* sowie *Progerin*-Genexpression unter delipidierten Bedingungen sein oder die verringerte *Lamin A*-sowie *Progerin*-Genexpression könnte ebenfalls ein kompensatorischer Effekt aufgrund der erniedrigten *PCYOX*-Genexpression bei der Applikation von 10% LPDS sein, um die Integrität und Struktur des Zellkerns zu gewährleisten. Des Weiteren erscheint eine direkte Beeinflussung der *ZMPSTE24*-Genexpression und damit der Prozessierung von Lamin A durch die Induktion der HMGCR-Aktivität in den PXE-Fibroblasten jedoch als unwahrscheinlich, da weder Unterschiede in der *ZMPSTE24*-Genexpression noch in der Immunfluoreszenzanalyse von Lamin A/C zwischen den verschiedenen Medien noch zwischen PXE- und Kontroll-Fibroblasten festgestellt werden konnten. Trotz dieser möglichen molekularen Zusammenhänge ist es jedoch weiterhin fraglich, ob die Verdopplung der *Progerin*-Genexpression oder eine potenzielle Akkumulation von dauerhaft farnesyliertem Prelamin A einen maßgeblichen Einfluss auf die Ausbildung eines seneszenten Phänotyps bzw. die Pathobiochemie bei PXE hat. So kann z.B. im Fall von HGPS eine Induktion der Progerin-Expression um das 500-fache detektiert werden (Rodriguez *et al.*, 2009). Auch das bereits erwähnte unauffällige Ergebnis der Immunfluoreszenzanalyse von Lamin A/C in den

PXE-Fibroblasten unterstützt die Theorie, dass eine Akkumulation von Progerin oder Prelamin A nicht primär für den seneszenten Phänotypen bei PXE verantwortlich ist. Unterstützend hinzu kommt, dass der Versuch Progerin mittels Immunfluoreszenz in PXE-Fibroblasten zu detektieren erfolglos verblieb, was die Vermutung einer untergeordneten Rolle von Progerin in der Pathophysiologie bei PXE nochmals bekräftigt.

Neben der gesteigerten Genexpression von Progerin zeigen Fibroblasten von HGPS-Patienten auch Alterationen anderer nukleärer Strukturen auf. Dies betrifft z.B. die Nucleoli, welche wichtige Subkompartimente des Zellkerns darstellen und vor allem eine Rolle in der Biogenese von Ribosomen spielen (Shaw and Brown, 2012). So weisen HGPS-Fibroblasten vergrößerte Nucleoli auf. Kleine Nucleoli werden dementsprechend als Merkmal für Langlebigkeit beschrieben (Buchwalter and Hetzer, 2017; Tiku *et al.*, 2017). Über den Nachweis von Nucleolin, welches ein wichtiges Protein innerhalb der Nucleoli darstellt (Ginisty *et al.*, 1999), konnten in dieser Arbeit keine signifikanten Alterationen in der Größe der Nucleoli bei PXE-Fibroblasten festgestellt werden. Zudem zeigten Studien, dass es in proliferierenden Zellen zu einer Akkumulation von Nucleolin kommt (Chen *et al.*, 1991; Sirri *et al.*, 1997). PXE-Fibroblasten zeigten jedoch weder eine aberrante *NCL*-Genexpression noch eine deutliche Proteinakkumulation von Nucleolin sowohl bei der Kultivierung in Medium mit 10% FCS als auch in Medium mit 10% LPDS. Dies weist darauf hin, dass Alterationen der nucleolären Organisation wahrscheinlich keine bzw. eine untergeordnete Rolle in der Entwicklung des seneszenten Phänotyps spielen.

Neben den Alterationen der Nucleoli ist bekannt, dass HGPS-Fibroblasten ebenfalls signifikant kürzere Telomere aufweisen (Allsopp *et al.*, 1992; Decker *et al.*, 2009). Telomere selbst sind am Ende der Chromosomen lokalisiert und sind aus *Tandem Repeats* aufgebaut. Bei einer ausreichenden Länge schützen die Telomere die Chromosomen vor einer vorzeitigen Degradation. Im Zuge der Alterung verkürzen sich diese Telomere jedoch mit jeder Zellteilung bis sie eine kritische Länge erreichen. Um eine ernsthafte Schädigung der DNA zu verhindern, gehen die Zellen folglich in die zelluläre Seneszenz über, sodass weitere Zellteilungen und damit eine weitere Verkürzung der Telomere unterbunden wird (Aubert and Lansdorp, 2008). Für die PXE-Fibroblasten konnten in dieser Arbeit im Durchschnitt längere Telomere im Vergleich zu den Kontrollen im Fall der Kultivierung in Medium mit 10% FCS festgestellt werden. Da die beschleunigte Telomerabnutzung bei HGPS primär durch die Akkumulation von Progerin ausgelöst wird (Benson *et al.*, 2010; Decker *et al.*, 2009), erscheint es plausibel, dass aufgrund der deutlich geringeren Progerin-Expression keine vergleichbare Verkürzung der Telomere in PXE-Fibroblasten detektierbar war. Dennoch unterstützen die im Vergleich zu den

Kontroll-Fibroblasten längeren Telomere in PXE-Fibroblasten das Ergebnis der zuvor detektierten Akkumulation seneszenten Fibroblasten bei PXE. So kommt es vermutlich zu keiner weiteren Telomerverkürzung aufgrund des vorzeitigen Proliferationsarrestes der PXE-Fibroblasten. Zusätzlich weist dies daraufhin, dass der gehäufte Übergang in die Seneszenz bei PXE-Fibroblasten in erster Linie vermutlich nicht durch genomische Alterationen bzw. vorzeitiger Telomerabnutzung bedingt ist, sondern auf andere zelluläre Stressfaktoren zurückzuführen ist. Relevante Stressfaktoren könnten so metabolische Verschiebungen sein, bei denen die Induktion der Cholesterinbiosynthese in den PXE-Fibroblasten eine Rolle spielen könnte. Verschiedene Studien zeigten bereits, dass Alterationen des Lipidmetabolismus durchaus mit zellulärer Seneszenz und Alterung assoziiert sind (Ban *et al.*, 2018; Flor *et al.*, 2017; Kuhla *et al.*, 2011; Sene *et al.*, 2013; Walter, 2009). Die Annahme metabolischer Einflüsse bei PXE wird von dem Ergebnis gestützt, dass durch die Applikation von 10% LPDS sowohl signifikant kürzere Telomere als auch eine Verringerung des Vorkommens seneszenten Zellen bei PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den PXE-Fibroblasten, welche unter Standardbedingungen kultiviert wurden, detektiert werden konnten. Dies könnte bedeuten, dass die Restriktion der Cholesterinversorgung auf die endogene Cholesterinproduktion zum einen den PXE-Phänotypen, wie im Fall der Expression der A- und B-typ Lamine, deutlicher hervorbringt, jedoch ebenfalls einen positiven Effekt hat, indem es einen potenziellen Überschuss an Cholesterin oder eines davon abgeleiteten Metaboliten und damit einen vorzeitigen Proliferationsstop bis zu einem gewissen Grad verhindert. Eine Studie mit Makrophagen zeigte bereits, dass eine Akkumulation von freiem Cholesterin in älteren Makrophagen assoziiert ist mit altersbedingten Erkrankungen wie Arteriosklerose, Krebs oder einer Makuladegeneration. Die Studie wies zudem nach, dass der Grund für die Akkumulation des Cholesterins in der Zelle insbesondere ein ineffektiver Cholesterolefflux aus den Makrophagen auf HDL ist (Sene *et al.*, 2013). Durch die vorliegende Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass zum einen der Großteil des Cholesterolefflux in PXE-Fibroblasten HDL-vermittelt ist und zum anderen PXE-Fibroblasten eine tendenzielle Erhöhung des Cholesterolefflux aufweisen. Dabei ergaben sich aber keine signifikanten Unterschiede zu den Kontroll-Fibroblasten. Es zeigte sich zudem kein Unterschied in der Aufnahme von exogenem Cholesterin bei den PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollen. Aufgrund dessen, dass in dieser Arbeit keine signifikanten Beeinträchtigungen des Cholesterolefflux, im Hinblick auf die Fähigkeit der PXE-Fibroblasten Cholesterin aus der Zelle zu schleusen, identifiziert werden konnten, liegt die Vermutung nahe, dass es sich demzufolge, wenn überhaupt, eher um eine Störung der HDL-Biogenese bei PXE handelt.

Diese Vermutung wird gestützt durch die Tatsache, dass durch eine Studie mit *Abcc6*^{-/-}-Mäusen eine Reduktion des HDL-Cholesterins im Plasma dieser Mäuse im Vergleich zu *wt*-Mäusen nachgewiesen wurde (Gorgels *et al.*, 2005). Die Tatsache, dass für die PXE-Fibroblasten jedoch weder ein vermehrter Cholesterolefflux noch Alterationen des Cholesterolinflux detektiert werden konnten, wirft zwei grundlegenden Fragen auf. Zum einen stellt sich die Frage, welcher initiale Faktor zur Induktion der Cholesterinbiosynthese führt und zum anderen stellt sich die Frage, wie oder wo der potenzielle Überschuss an Cholesterin oder eines daraus abgeleiteten Metaboliten in der Zelle verbleibt. Bezüglich der möglichen Ursache zeigten Hosen *et al.* mit einer *Molecular Docking* Studie, dass 25-Hydroxyvitamin D2 von den über 4600 getesteten Metaboliten in ihrer Studie die höchste Affinität zur Substratbindestelle des ABCC6-Transporters hat und somit als mögliches Substrat infrage kommen würde (Hosen *et al.*, 2014). 25-Hydroxyvitamin D2 entsteht in der Leber durch die Umsetzung von Ergocalciferol (Vitamin D2), welches aus der Nahrung aufgenommen wird. 25-Hydroxyvitamin D2 wird dann in der Niere zu 1,25-Dihydroxyvitamin D2 umgewandelt, welches wiederum in den Zielgeweben die Expression verschiedenster Gene beeinflussen kann (Bosworth and de Boer, 2013). Käme es nun durch eine ABCC6-Defizienz zu keiner Freisetzung des 25-Hydroxyvitamin D2 aus der Leber, entstünde ein systemischer Mangel, sodass kein 1,25-Dihydroxyvitamin D2 in der Peripherie zur Verfügung steht. Außer über die Nahrung kann ein weiteres Vitamin D-Derivat, das Cholecalciferol (Vitamin D3) z.B. in der Haut durch UV-Strahlung aus 7-Dehydrocholesterin, einem Cholesterinvorläufer, gebildet werden. Dieses Vitamin D3 durchläuft dann ebenfalls einen ähnlichen Prozess wie Vitamin D2 (Bosworth and de Boer, 2013). Aufgrund des systemischen 1,25-Dihydroxyvitamin D2 Mangels, könnte es so zu einer Induktion der endogenen Cholesterinbiosynthese kommen, um entsprechend ausgleichend die Vitamin D3-Synthese zu stimulieren. Kuzaj *et al.* zeigten so, dass die Genexpression der Lanosterolsynthase, einem Vorläufer des 7-Dehydrocholesterins, deutlich erhöht in den PXE-Fibroblasten vorliegt (Kuzaj *et al.*, 2014a). Eine weitere Studie zeigte, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D3 nicht nur in der Niere gebildet wird, sondern auch in Keratinozyten lokal im Gewebe entstehen kann (Bikle *et al.*, 1986), was eine gewebsspezifische Regulation vermuten lässt. Zudem zeigte sich, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D3 sowohl induktive als auch inhibitorische Effekte in Bezug auf die HMGCR-Aktivität verschiedener Zelltypen *in vitro* hat (Gupta *et al.*, 1989), sodass dies auch den charakteristischen PXE-Phänotypen *in vitro* unabhängig von einem systemischen Mangel erklären würde.

Eine Möglichkeit des Abbaus von Cholesterin bzw. daraus abgeleiteter Metabolite wäre der Abbau über Autophagie. Autophagie ist ein kataboler Prozess bei dem sowohl fehlerhafte

Proteine sowie Organellen abgebaut werden, um die Gewebshomöostase auch unter Nährstoffmangel oder Stress aufrecht zu erhalten (Kim *et al.*, 2018). Es wird derzeit vermutet, dass die Autophagie mit zunehmendem Alter abnimmt, was die Gewebshomöostase negativ beeinflusst und Alterung begünstigt (Barbosa *et al.*, 2019; Rubinsztein *et al.*, 2011). Auf der anderen Seite zeigte eine Studie von Marino *et al.*, dass bei progeroiden *Zmpste24*^{-/-}-Mäuse eine Induktion der Autophagie vorliegt. Sie wiesen nach, dass dies auf die Inhibierung des *mechanistic Target of Rapamycin* (mTOR) zurückzuführen ist und als „*pro-survival*“-Faktor die Gewebshomöostase aufrechterhalten soll. Die chronische Induktion autophagischer Prozesse trägt letzten Endes jedoch ebenfalls zu der beschleunigten Alterung in diesen Mäusen bei (Mariño *et al.*, 2008). Ein Hinweis auf eine gesteigerte Autophagie konnte in dieser Arbeit lediglich durch eine gesteigerte lysosomale SA-β-Gal-Aktivität, welche auf eine allgemeine Steigerung der lysosomalen Aktivität im Fall der PXE-Fibroblasten hindeutet, geliefert werden. Weiterführend konnten in dieser Arbeit aber keine signifikanten Veränderungen der Autophagieleistung weder in Bezug auf die Bildung autophagischer Vakuolen noch in Bezug auf die Bildung der Lysosomen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen festgestellt werden. Es zeigte sich lediglich eine Induktion der Lysosomenbildung sowohl für die PXE-Fibroblasten wie auch für die Kontroll-Fibroblasten bei der Kultivierung in Medium mit 10% LPDS im Vergleich zu der Kultivierung in Medium mit 10% FCS. Dies spricht für eine Induktion des Abbaus von Triglyceriden und Cholesterinestern durch autophagische-lysosomale Abbauprozesse, um den Energiehaushalt unter Lipoprotein-armen Bedingungen zu kontrollieren. Ein Unterschied zwischen PXE-Fibroblasten und Kontroll-Fibroblasten war hier jedoch ebenfalls nicht zu detektieren. Nach einer Studie von Kim *et al.* zeigten Fibroblasten älterer Spender ebenfalls keine Unterschiede in der Autophagieleistung im Vergleich zu Fibroblasten jüngerer Spender. Sie postulierten, dass die gehäufte Akkumulation von fehlerhaften Proteinen und Organellen mit steigendem Alter nicht zwangsläufig durch eine verminderte Autophagieleistung begründet ist, sondern die Menge an abzubauenen fehlerhaften Proteinen und Organellen mit steigendem Alter zunimmt, sodass es trotz gleichbleibender Autophagieleistung zu einer Beeinträchtigung der Gewebshomöostase in älteren Fibroblasten kommt (Kim *et al.*, 2018). Ähnliche Zustände könnten hier für die PXE-Fibroblasten vorliegen, da es offensichtlich zu metabolischen Alterationen wie einer Hypertriglyceridemie oder der Induktion der Cholesterinbiosynthese (Kuzaj *et al.*, 2014a, 2014b), welche letztendlich zu der Akkumulation von Cholesterin oder davon abgeleiteten Metaboliten beiträgt, kommt.

Zusammengefasst weisen die Ergebnisse darauf hin, dass weniger genomische Alterationen oder eine beschleunigte Telomerabnutzung, sondern eher metabolische proteostatische Aberrationen ursächlich für den seneszenten Phänotypen bei PXE-Fibroblasten sind. Veränderungen der A- sowie B-Typ Lamine scheinen demnach ebenfalls sekundäre Phänomene dieser metabolischen Verschiebungen, insbesondere der Induktion der Cholesterinbiosynthese, zu sein.

5.4. Multifaktorieller Einfluss von Atorvastatin auf die Genexpression bei PXE

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass bei PXE ein beschleunigter Alterungsprozess vorliegt, der vermutlich primär durch metabolische Verschiebungen begründet ist. Die genaue Assoziation zwischen dieser Symptomatik und einer ABCC6-Defizienz ist allerdings bis heute nicht geklärt, was vorrangig daran liegt, dass das physiologische Substrat des ABCC6-Transporters unbekannt ist. Aus diesem Grund existieren bis zu diesem Zeitpunkt auch keine spezifischen und effektiven Therapien für eine PXE-Erkrankung. Eine der therapeutischen Optionen, welche bei PXE häufig diskutiert wird, ist der Einsatz von Statinen, jedoch ist wenig darüber bekannt, welche Mechanismen letztendlich bei PXE-Patienten zu einem positiven Effekt führen. Durch die Studie von Kuzaj *et al.* konnte erstmals über den Nachweis einer erhöhten HMGCR-Aktivität in PXE-Fibroblasten eine Verbindung zu der Wirkung von Statinen bei PXE-Patienten hergestellt werden (Kuzaj *et al.*, 2014a). Die Testung der tatsächlichen Wirkung von Statinen vor allem in PXE-Fibroblasten ist bis jetzt jedoch nicht erfolgt, obwohl dies nicht nur Informationen über den therapeutischen Nutzen einer Statintherapie bei PXE geben würde, sondern auch zu einem besseren Verständnis über mögliche Pathomechanismen führen könnte. In dieser Arbeit wurde so zunächst die Wirkung von Atorvastatin auf verschiedene PXE relevante Faktoren getestet, um das Wirkspektrum einer derartigen Therapie bei PXE zu sondieren. Atorvastatin wurde verwendet, da bereits eine Studie von Guo *et al.* zeigte, dass Atorvastatin auch, abseits der reinen Cholesterin-senkenden Wirkung dieses Statins, einen inhibierenden Effekt auf Kalzifizierungsprozesse in *Abcc6*^{-/-}-Mäusen hat (Guo *et al.*, 2013). Die molekularen Zusammenhänge blieben aber auch hier ungeklärt. Für diesen Teil der Arbeit wurden die Fibroblasten ausschließlich in Lipoprotein-delipidiertem Medium kultiviert, um den Einfluss auf die endogene Cholesterinbiosynthese zu maximieren.

In einem ersten Schritt wurde so die Wirkung von Atorvastatin auf Faktoren des Cholesterinstoffwechsels getestet. Generell ist bekannt, dass die Cholesterinhomöostase streng durch verschiedene Stimuli reguliert wird. Dabei kann Cholesterin entweder endogen über Acetyl-CoA und Mevalonat mithilfe der HMGCR synthetisiert werden oder exogen über LDL und den LDLR aufgenommen werden. Bei einem ausreichenden Level an intrazellulärem Cholesterin wird durch eine Endprodukthemmung die Aktivität der HMGCR sowie die LDLR-Expression reprimiert, um einen Überschuss an Cholesterin in der Zelle zu verhindern (Goldstein and Brown, 1990). Die Studie von Kuzaj *et al.* zeigte, dass bereits nach 24 h eine signifikant gesteigerte HMGCR-Aktivität in PXE-Fibroblasten vorliegt (Kuzaj *et al.*, 2014a). So könnte vermutet werden, dass es mit längerer Kultivierungsdauer, wie im vorliegenden Fall, aufgrund des *Feedback*-Mechanismus zu einer erniedrigten Genexpression für die *HMGCR* sowie für den *LDLR* in PXE-Fibroblasten kommt. Unter dem Einfluss des HMGCR-Inhibitors Atorvastatin konnte passend zu dieser Theorie in dieser Arbeit weiterführend keine Veränderung der *HMGCR* sowie der *LDLR*-Genexpression in den PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen beobachtet werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass unter Atorvastatineinfluss vermutlich keine deutlich erhöhte Cholesterinbiosynthese bzw. kein Überschuss an Cholesterin in den PXE-Fibroblasten vorliegt. Dieses Ergebnis wird von vorherigen Studien gestützt, welche ebenfalls nachwiesen, dass eine Statintherapie zum einen zu einer Induktion der HMGCR-Expression (Göbel *et al.*, 2019) und zum anderen zu einer erhöhten *LDLR*-Genexpression führt (Qin *et al.*, 1992).

Weiterführend wurde die Genexpression der *FDPS* sowie des *HDLBP* analysiert. Für die *FDPS*-Genexpression konnte in der Studie von Kuzaj *et al.* nach 24 h eine signifikante Induktion für die PXE-Fibroblasten detektiert werden (Kuzaj *et al.*, 2014a). Da die *FDPS* direkt mit der Cholesterinbiosynthese assoziiert ist, könnte dessen verstärkte Expression eine direkte Folge der Induktion der Cholesterinbiosynthese sein. Durch die Behandlung mit Atorvastatin zeigt sich immer noch eine leichte Induktion der *FDPS*-Genexpression in den PXE-Fibroblasten, welche aber keine statistische Signifikanz mehr erreichte. Dies bestärkt die zuvor aufgestellte Theorie, dass sich die Cholesterinsyntheserate durch die Behandlung mit Atorvastatin an das Niveau der Kontrollen annähert. Im Gegensatz zu der *FDPS* ist die genaue Funktion des *HDLBP* bzw. seine Assoziation mit dem Cholesterinstoffwechsel noch nicht geklärt. Chiu *et al.* zeigten, dass das *HDLBP* in atherosklerotischen Plaques exprimiert wird, was eine potenzielle Rolle im Cholesterinmetabolismus aufzeigt (Chiu *et al.*, 1997). McKnight *et al.* zeigten zudem, dass das *HDLBP*-mRNA-Level in J774 Makrophagen nach einer Inkubation mit exogenem Cholesterin bzw. einer darauffolgenden intrazellulären

Cholesterinakkumulation deutlich anstieg (McKnight *et al.*, 1992). Für das HDLBP zeigte sich in der Studie von Kuzaj *et al.* eine signifikante Erniedrigung in den PXE-Fibroblasten im Vergleich zur Kontrolle (Kuzaj *et al.*, 2014a). Im Gegensatz dazu, zeigten sich mit Applikation des Atorvastatins in dieser Arbeit keine signifikanten Veränderungen der *HDLBP*-Genexpression für die PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollen, was zum einen die Annahme, dass das HDLBP mit dem Cholesterinmetabolismus assoziiert ist unterstreicht und zum anderen ebenfalls auf eine Annäherung des Cholesterinmetabolismus der PXE-Fibroblasten an den der Kontrollen durch die Atorvastatinbehandlung bestärkt. McKnight *et al.* zeigten zudem, dass eine Überexpression in Säugetierzellen zu einem moderaten Anstieg der HDL-Bindung an die Zelloberfläche führte, sodass das HDLBP möglicherweise den Cholesterolefflux aus der Zelle erleichtert. Eine direkte Bindung des HDL durch das HDLBP beurteilten sie jedoch als unwahrscheinlich, da die Struktur des HDLBP nicht der der klassischen Membranrezeptoren entspricht (McKnight *et al.*, 1992). Würde ein solcher Zusammenhang bestehen, würde dies bedeuten, dass es durch die deutliche Reduktion der *HDLBP*-Genexpression in den PXE-Fibroblasten, welche durch Kuzaj *et al.* nachgewiesen wurde (Kuzaj *et al.*, 2014a), zu einer Beeinträchtigung des Cholesterolefflux kommen müsste, was durch die Ergebnisse dieser Arbeit allerdings nicht bestätigt werden konnte. Ob es zu einem deutlichen Anstieg des Cholesterolefflux durch eine Atorvastatinbehandlung kommt, bleibt ungeklärt.

Weiterführend wurden die *LMNBI*, *ZMPSTE24* sowie die *PCYOX*-Genexpression untersucht, welche über ihre Assoziation mit Prenylierungsprozessen ebenfalls in Zusammenhang mit der Cholesterinbiosynthese stehen. Dass die HMGCR bzw. damit Teile der Cholesterinbiosynthese maßgeblich mit Prenylierungsprozessen in Verbindung stehen, konnte bereits durch eine Arbeit von Lacher *et al.* nachgewiesen werden, die zeigte, dass eine exogene Applikation von GGPP zu HMGCR-defizienten T-Zellen den sonst letalen Verlauf dieser Deletion verhindern kann. Eine exogene Zugabe von Cholesterin hatte hingegen keinen Einfluss (Lacher *et al.*, 2017). Für die *LMNBI*-Genexpression wurden bei der Behandlung mit Atorvastatin keine statistisch signifikanten Veränderungen für die PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollen detektiert. Für *LMNBI* konnte in einem vorherigen Teil dieser Arbeit bereits eine Reduktion der Genexpression in den PXE-Fibroblasten im unbehandelten Zustand bereits nach 24 h festgestellt werden. Unter der Annahme, dass sich im unbehandelten Zustand nach 72 h ähnliche Verhältnisse ergeben, wie nach 24 h, weist diese potentielle Induktion der *LMNBI*-Genexpression durch die Hemmung der HMGCR-Aktivität bzw. durch die Behandlung mit Atorvastatin darauf hin, dass die Reduktion der *LMNBI*-mRNA-Expression

sowie die zuvor diskutierte Reduktion der A-Typ Lamine in den unbehandelten PXE-Fibroblasten vermutlich tatsächlich keine Folge einer frühzeitigen Seneszenz und damit des p53/pRB vermittelten Signalweges, sondern eher eine Folge des Umsatzes von Prenylierungsprozessen und damit der Induktion der HMGCR-Aktivität in den PXE-Fibroblasten ist. Für die *ZMPSTE24*-Genexpression konnten weder zuvor im unbehandelten Zustand noch mit der Behandlung von Atorvastatin eindeutige bzw. statistisch signifikante Veränderungen festgestellt werden, sodass dies keine direkte Aussage über den Einfluss der Cholesterinbiosynthese auf diesen Faktor zulässt. Für die *PCYOX*-Genexpression konnte jedoch durch die Studie von Kuzaj *et al.* eine statistisch signifikante Reduktion für die PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollen bereits nach 24 h Kultivierung festgestellt werden (Kuzaj *et al.*, 2014a). Bei der Behandlung mit Atorvastatin konnten in dieser Arbeit keine statistisch signifikanten Veränderungen festgestellt werden. Wird auch hier angenommen, dass sich nach 72 h Kultivierung vergleichbare Ergebnisse im unbehandelten Zustand für die PXE-Fibroblasten ergeben wie nach 24 h, würde dies nochmals bestätigen, dass sich nicht nur der Status der Cholesterinbiosynthese direkt, sondern sich ebenfalls der Status der Prenylierungsprozesse durch die Statinbehandlung an das Niveau der Kontrollen annähert. Um weiter aufzuklären, ob eine Behandlung mit Atorvastatin einen Einfluss auf den seneszenten Phänotypen der PXE-Fibroblasten hat, wurden außerdem Faktoren des SASPs getestet. Eine Studie von Zineh *et al.* zeigte, dass Atorvastatin die Produktion von IL6 in humanen Endothelzellen der Nabelvene konzentrationsabhängig senkte (Zineh *et al.*, 2006). Es ist zudem bekannt, dass der antiinflammatorische Effekt der Statine dabei unter anderem über die Inhibierung der Prenylierung kleiner GTPasen und die damit verbundene Unterdrückung der Aktivierung des JAK-STAT Signalweges verläuft (Omoigui, 2007). Da für die *IL6*-Genexpression sowie für die IL6-Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand trotz Atorvastatinbehandlung immer noch eine signifikante Erhöhung für die PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden konnte, schließt die Beteiligung des JAK-STAT Signalweges an der gesteigerten IL6-Expression nicht aus, zeigt allerdings, dass entweder die verwendete Atorvastatinkonzentration nicht hoch genug war, um eine vollständige Unterdrückung der IL6-Expression zu erreichen oder weitere, eventuell insbesondere auf den seneszenten Phänotypen zurückzuführende induktive Mechanismen, welche die IL6-Expression steigern, eine Rolle spielen. Die Frage, ob eine weitere Erhöhung der Atorvastatinkonzentration im Zellkulturmodell sinnvoll ist und eine klinisch relevante Aussage zur Folge haben könnte, bleibt diskutabel, da bereits die hier angewendete Konzentration vergleichsweise hoch ist und entsprechend einer vorherigen Studie von Mohammadi *et al.* der

Konzentration im Blut eines 70 kg schweren Mannes mit 5 L Blutvolumen unter der Annahme einer kompletten Absorption bei Aufnahme von 80 mg Atorvastatin entspricht (Mohammadi *et al.*, 1998). 80 mg Atorvastatin ist dabei in vielen Fällen die maximale empfohlene Tagesdosis (Stone *et al.*, 2014).

Zwei weitere Faktoren, welche als bekannte Biomarker des Alterns untersucht wurden, sind das IGFBP3 sowie GDF11. Wie für IL6 konnte auch für IGFBP3 kein zu den Kontrollen vergleichbares Ergebnis erzielt werden. Es zeigte sich so, wie schon zuvor, eine statistisch signifikante Reduktion der *IGFBP3*-Genexpression sowie Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand. Eine Studie von Narayanan *et al.* zeigte eine allgemeine Reduktion des zirkulierenden IGFBP3 als Folge einer Atorvastatintherapie in Patienten mit Typ 2 Diabetes (Narayanan *et al.*, 2013). Da jedoch bekannt ist, dass sich die gewebsspezifische IGFBP3-Expression von der systemischen IGFBP3-Konzentration durchaus unterscheiden kann (Oliver *et al.*, 2005), ist es auch hier nicht auszuschließen, dass Atorvastatin im peripheren Gewebe eine abweichende Wirkung zeigt. Nichtsdestotrotz scheint die Behandlung mit Atorvastatin keinen bzw. wenn überhaupt einen limitierten Effekt auf die IGFBP3-Expression zu haben. Im Gegensatz zu IL6 und IGFBP3 zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede für die *GDF11*-Genexpression. Dem gegenüber steht die in dieser Arbeit zuvor detektierte Reduktion der *GDF11*-Genexpression in den PXE-Fibroblasten im unbehandelten Zustand. Unter der Annahme, dass sich trotz des unterschiedlichen Kultivierungszeitraums und der verschiedenen Medien ein vergleichbarer Zustand bereits nach 72 h in Medium mit 10% LPDS vorliegt, zeigt dies eine Normalisierung der *GDF11*-Genexpression durch Atorvastatin. Eine Studie von Mei *et al.* zeigte zudem, dass GDF11 nicht nur die *IL6*-Genexpression in *apoE*^{-/-}-Mäusen reduzieren kann, sondern zum anderen auch die Menge an proinflammatorischen Zytokinen in Makrophagen über intrazelluläre Signalwege unter anderem über die Inhibierung von JNK und NF- κ B p65 vermindert (Mei *et al.*, 2016). So lässt sich nicht nur vermuten, dass auch die Induktion der *GDF11*-Genexpression den antiinflammatorischen Effekt des Atorvastatins in PXE-Fibroblasten verstärkt, sondern zeigt auch, dass Atorvastatin einen Einfluss auf weitere Faktoren des SASPs, abseits von IL6, hat.

Zusätzlich dazu ist bereits bekannt, dass Atorvastatin nicht nur einen antiinflammatorischen Effekt hat, sondern, dass es sich auch inhibierend auf Kalzifizierungsprozesse auswirkt. So zeigte eine Studie von Guo *et al.*, dass eine Gabe von Atorvastatin bei *Abcc6*^{-/-}-Mäusen zwar eine Mineralisierung nicht reversieren, aber dennoch aufhalten konnte (Guo *et al.*, 2013). Zunächst wurde ENPP1 als antikalzifizierender Faktor untersucht. ENPP1 ist ein Membran-gebundenes Enzym, welches durch die Hydrolyse von Nukleosidtriphosphaten maßgeblich zu

der extrazellulären Generierung von PPi beiträgt (Nam *et al.*, 2011). Verschiedene Studien zeigten, dass ein erniedrigter PPi-Level eine Kalzifizierung begünstigt, sodass PPi als Kalzifizierungsinhibitor bekannt ist (Fleisch and Bisaz, 1962; Lomashvili *et al.*, 2014, 2005; Villa-Bellosta *et al.*, 2013). Auch im Fall von PXE gilt eine erniedrigte extrazelluläre PPi-Konzentration als eine Ursache für die beobachtete Matrixkalzifizierung (Dabisch-Ruthe *et al.*, 2014). In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls bereits eine erniedrigte *ENPP1*-Genexpression, sowie Aktivität in den PXE-Fibroblasten nachgewiesen (Dabisch-Ruthe *et al.*, 2014). In dieser Arbeit konnte trotz der Behandlung mit Atorvastatin immer noch eine statistisch signifikante Reduktion der *ENPP1*-Genexpression für die PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollen ermittelt werden, was Zweifel an der Beteiligung von ENPP1 an der potenziellen kalzifizierungshemmenden Wirkung einer Atorvastatintherapie aufwirft. Abgesehen davon konnte eine Studie von Watanabe *et al.* zeigen, dass *Loss-of function Enpp1^{ttw/ttw}*-Mäuse eine vorzeitige Alterung aufweisen (R. Watanabe *et al.*, 2017), was zum einen zusätzlich die Beteiligung von ENPP1 am Alterungsprozess und eine potenzielle vorzeitige Alterung bei PXE bestätigt, jedoch andererseits eine relevante Wirkung von Atorvastatin auf Alters-assoziierte molekulare Prozesse infrage stellt. Weiterführend ist bekannt, dass ENPP1 über die Generierung von PPi die OPN-Expression stimuliert (Nam *et al.*, 2011). OPN ist ein extrazelluläres saures Phosphoprotein, welches sich unter anderem in kalzifiziertem Gewebe anreichert. Durch seine hohe Affinität zu Hydroxyapatit ist OPN ein potenter Inhibitor ektopter Kalzifizierungen (Boskey *et al.*, 1993; Giachelli and Steitz, 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte trotz Atorvastatinbehandlung eine signifikante Reduktion in den PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden, was im direkten Zusammenhang mit der ebenfalls weitestgehend unveränderten *ENPP1*-Genexpression stehen könnte und demnach den limitierten Effekt von Atorvastatin auf diese antikalzifizierenden Faktoren bestätigt. Zusätzlich konnte eine Reduktion der OPN-Expression in murinem Knochenmark mit dem Alter in Verbindung gebracht werden (Guidi *et al.*, 2017), was die Assoziation einer *ABCC6*-Defizienz mit einer vorzeitigen Alterung bestärkt.

Die Behandlung mit Atorvastatin scheint so zunächst einmal vorrangig einen positiven Einfluss auf die PXE-Fibroblasten zu haben, indem es vor allem die Expression von Faktoren, welche direkt abhängig vom Cholesterinstoffwechsel oder Prenylierungsvorgängen sind, normalisiert. Ein direkter positiver Effekt auf Alterungsprozesse scheint dabei nur selektiv und sekundär zu sein. In diesem Zusammenhang scheint so zur effektiven Behandlung von Kalzifizierungsprozessen eine reine Therapie mit Atorvastatin nicht auszureichen. Die Ergebnisse von Studien in *Abcc6*-defizienten Mäusen sowie PXE-Patienten weisen jedoch

darauf hin, dass eine Therapie mit Bisphosphonaten, in diesem Fall durchaus erfolgsversprechend sein könnte (Kranenburg *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018). Bisphosphonate unterteilen sich grundsätzlich in zwei Klassen: (1) die Stickstoff-haltigen Bisphosphonate, welche über die Inhibierung der Farnesylpyrophosphatsynthase die Prenylierung der kleinen GTPasen beeinflusst und damit einen direkten Einfluss auf die Funktion der Osteoklasten nimmt und (2) die nicht Stickstoff-haltigen Bisphosphonate, welche durch ihre enorme Ähnlichkeit zu PPI zu der Synthese eines nicht hydrolysierbaren ATP-Analogons führen und damit eine Vielzahl von zellulären Prozessen beeinflusst (Russell, 2006). Im Fall von HGPS erwies sich vor allem die Kombinationstherapie aus Statin und Aminobisphosphonat als erfolgsversprechend, da so eine effektivere Inhibierung der Prenylierung von Progerin bzw. Prelamin A erreicht werden konnte, was den Alterungs-assoziierten Phänotypen maßgeblich verbesserte ((Varela *et al.*, 2008); clinical trial: NCT00731016). Für PXE ergab hingegen eine Studie von Li *et al.*, dass Etidronat, ein nicht Stickstoff-haltiges Bisphosphonat einen antimineralisierenden Effekt in *Abcc6*^{-/-}-Mäusen hatte. Alendronate, ein Aminobisphosphonat, zeigte hingegen keine Wirkung (Li *et al.*, 2015). Eine Wirkung von Stickstoff-haltigen Bisphosphonaten bei PXE-Fibroblasten konnte zwar in einer Studie von Dabisch-Ruthe *et al.* durch die Behandlung mit Zolendronat gezeigt werden (Dabisch-Ruthe *et al.*, 2014), allerdings ist Zolendronat auch ein bis zu 10 000-fach potenterer Inhibitor als Etidronat (Russell, 2006). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Kalzifizierungsprozess bei PXE wahrscheinlich nicht direkt durch die Alterationen der Cholesterinbiosynthese bei PXE bedingt ist, sondern entweder unabhängig davon entsteht oder zumindest nur ein sekundärer Effekt auf die metabolische Verschiebung ist. Um sowohl der Induktion der Cholesterinbiosynthese bzw. der vor allem über Prenylierungsprozesse zusammenhängenden Alterationen als auch der vorzeitigen Kalzifizierung entgegenzuwirken, wäre bei PXE eine Kombinationstherapie aus Statinen und nicht Stickstoff-haltigen Bisphosphonaten denkbar. Dies bedarf aber weiterer Untersuchungen.

5.5. Hypothetisches Modell molekularer zellulärer Zusammenhänge bei PXE und Ausblick auf zukünftige Arbeiten

In dieser Arbeit konnte zum einen ein Zusammenhang zwischen einer ABCC6-Defizienz und vorzeitigen molekularen Alterungsprozessen hergestellt werden und zum anderen konnten nähere Kenntnisse über das Wirkspektrum einer Statintherapie bei PXE erworben werden. Ein potenzieller Zusammenhang der molekularen Mechanismen einer ABCC6-Defizienz, welcher sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit und vorherigen Studien ergibt, ist in Abbildung 35 dargestellt. Entsprechend dieses Ansatzes kommt es infolge des Funktionsverlustes des ABCC6-Transporters zu einer Akkumulation ein oder mehrere Substrate des Transporters in der Leber, sodass dementsprechend ein Mangel dieser Metabolite im Blutstrom bzw. in der Peripherie entsteht. Hosen *et al.* zeigten mit einer *Molecular Docking* Studie, dass unter anderem Sterine, wie Brassicasterin von den über 4600 getesteten Metaboliten eine der höchsten Affinitäten zur Substratbindestelle des ABCC6-Transporters aufweisen und somit als mögliche Substrate infrage kommen würden (Hosen *et al.*, 2014). In einer vorangegangenen Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass *Abcc6*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu *wt*- Mäusen eine erniedrigte Konzentration an z.B. Brassicasterin im Serum aufweisen (Ibold, 2018). Durch eine ABCC6-Defizienz könnte so eine gestörte Phytosterinabsorption in diesen Mäusen vorliegen, welche wiederum die HMGCR-Aktivität im peripheren Gewebe stimulierend beeinflussen könnte. Die vergleichsweise höchste Affinität zur Substratbindestelle des ABCC6-Transporters wiesen Hosen *et al.* jedoch für 25-Hydroxyvitamin D₂ nach (Hosen *et al.*, 2014). Durch die ABCC6-Defizienz könnte so auch hier ein systemischer Mangel entstehen, sodass kein Vitamin D in Form von 1,25-Dihydroxyvitamin D₂ in der Peripherie zur Verfügung steht. Dies wiederum könnte folglich die gewebsspezifische Synthese von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in den PXE-Fibroblasten stimulieren. Da 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ aus 7-Dehydrocholesterin, einem Cholesterinvorläufer, gebildet wird (Bosworth and de Boer, 2013), könnte dies die Induktion der Cholesterinbiosynthese erklären. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Vitamin D zu einer gesteigerten ATP-Sekretion führen kann (Biswas and Zanello, 2009), sodass folglich ein Mangel an Vitamin D zu einer verminderten Sekretion führen würde. Da ATP als primäre Quelle des extrazellulären PPi gilt (Jansen *et al.*, 2013), würde dies die erniedrigten extrazellulären PPi-Konzentrationen in PXE-Fibroblasten erklären. Ein Vitamin D-Mangel ist so zudem assoziiert mit Kalzifizierungsprozessen (Watson *et al.*, 1997). Martin *et al.* konnten jedoch in einem Großteil der PXE-Patienten in ihrer Studie keinen systemischen Mangel an Vitamin D feststellen (Martin *et al.*, 2017), wobei sich die Studie lediglich auf

25-Hydroxyvitamin D bezieht. Zudem ist nicht bekannt, ob hier Ergocalciferol oder Cholecalciferol analysiert wurde. Dementsprechend wäre es sinnvoll eine spezifische Testung hinsichtlich verschiedener Vitamin D-Derivate in Serum sowie in PXE-Fibroblasten durchzuführen, um zu analysieren, ob es zu einer Akkumulation bzw. einem Mangel an bestimmten Derivaten kommt.

Unabhängig davon, bewirkt die Akkumulation des ABCC6-Substrats in PXE-Fibroblasten offensichtlich einen charakteristischen Phänotyp *in vitro* ohne Beteiligung eines systemischen Mangels. Eine vorangegangene Studie zeigte, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ nicht nur in der Niere gebildet wird, sondern auch in Keratinozyten lokal im Gewebe entstehen kann (Bikle *et al.*, 1986). Eine weitere Studie konnte zudem bereits zeigen, dass vor allem 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ sowohl induktive als auch inhibitorische Effekte in Bezug auf die HMGCR-Aktivität verschiedener Zelltypen *in vitro* hat (Gupta *et al.*, 1989), was den PXE-Phänotypen *in vitro* erklären könnte. Da bereits bekannt ist, dass die HMGCR-Aktivität maßgeblich mit Prenylierungsprozessen assoziiert ist (Lacher *et al.*, 2017), kann vermutet werden, dass die erhöhte HMGCR-Aktivität in PXE-Fibroblasten zu vermehrten Prenylierungsprozessen in diesen führt. Um dies besser beurteilen zu können, wäre es jedoch sinnvoll zunächst einmal die, für Prenylierungsprozesse notwendigen, Intermediate der Cholesterinbiosynthese FPP und GGPP zu quantifizieren. Zudem wäre es sinnvoll diverse Prenyltransferasen nicht nur auf ihre Genexpression zu untersuchen, sondern ebenfalls deren Aktivität zu bestimmen. Ein erster Hinweis auf eine vermehrte Proteinprenylierung sind die reduzierten Genexpressionen der A- sowie B-Typ Lamine in PXE-Fibroblasten, welche als prenylierte Proteine direkt abhängig von Alterationen dieses Mechanismus sind. Weitere Proteine, welche direkt davon betroffen sind, sind die kleinen GTPasen, welche in diversen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle spielen (Das, 2001; Magee and Marshall, 1999; Molnár *et al.*, 2001; Pereira-Leal *et al.*, 2001). Im Fall der PXE-Fibroblasten könnte so die Aktivierung der kleinen GTPasen zur Induktion des JAK-STAT-Signalweges führen, welcher, wie in dieser Arbeit für die PXE-Fibroblasten detektiert, zu einer Induktion der IL6-Expression führen könnte. STAT3 könnte dabei ebenfalls p21 hochregulieren, welches wiederum zusammen mit der gesteigerten IL6-Expression zu der Etablierung des seneszenten Phänotyps mit entsprechendem SASP der PXE-Fibroblasten führen könnte. Um diese Zusammenhänge zu prüfen, sollte in weiterführenden Studien analysiert werden, ob es zu einer vermehrten Prenylierung bzw. Aktivierung dieser GTPasen sowie des JAK-STAT-Signalweges in PXE-Fibroblasten kommt. Auch die Analyse hinsichtlich einer potenziellen parakrinen Wirkung des offensichtlich proinflammatorischen Sekretoms von PXE-Fibroblasten könnte

weiteren Aufschluss über die Progression einer PXE-Erkrankung geben. Versuche mit Atorvastatin bzw. der Inhibierung der HMGCR-Aktivität könnten dabei ebenfalls zum einen Aufschluss über die direkte Assoziation mit der Induktion der Cholesterinbiosynthese geben und zum anderen zeigen, ob eine Statinbehandlung eine potenzielle parakrine Wirkung auf umliegende Zellen unterbinden kann. Bezüglich einer Therapie konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Statintherapie zwar einen inhibierenden Effekt auf die Sekretion des SASPs haben könnte, jedoch die Wirkung diesbezüglich und besonders der Effekt auf Kalzifizierungsprozesse bei PXE beschränkt ist, sodass es als alleinige Therapie nicht effektiv genug erscheint. Eine zusätzliche Gabe von Bisphosphonaten, als PPI-Analogon, sollte demnach weiter als Option betrachtet werden, bedarf allerdings auch weiterer Studien. Aufgrund der Assoziation zu vorzeitiger molekularer Alterung könnte zudem der Einsatz von Substanzen getestet werden, welche die Autophagieleistung erhöhen. In diesem Zusammenhang erwies sich bereits Rapamycin bei der Therapie von HGPS als erfolgsversprechend, da dies die Autophagieleistung erhöht und somit die Akkumulation potenziell toxischer Proteine minimiert (Cao *et al.*, 2011). Ein ähnlicher Effekt hinsichtlich des vermutlich akkumulierenden ABCC6-Substrates wäre demnach denkbar. Weitere Studien sind aber auch hier nötig, um dies zu verifizieren.

Zusammengefasst konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals nachgewiesen werden, dass eine ABCC6-Defizienz mit einer vorzeitigen zellulären Seneszenz sowie mit einem, unter anderem proinflammatorischen, sekretorischen Phänotypen assoziiert ist. Dies scheint zum einen durch metabolische Alterationen bedingt zu sein und zum anderen durch erniedrigte extrazelluläre bzw. Plasma-PPI-Konzentrationen und einer damit verbundenen progressiven Matrixkalzifizierung zusätzlich verstärkt zu werden. In diesem Zusammenhang konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine Statintherapie sich vermutlich positiv auf den metabolischen Status hinsichtlich der Cholesterinbiosynthese der PXE-Patienten auswirkt, jedoch nicht ausreicht, um durch einen antiinflammatorischen oder antikalzifizierenden Effekt die Sekretion proinflammatorischer Zytokine zu unterbinden oder die Expression antikalzifizierender Faktoren ausreichend zu stimulieren. Trotz dieser Erkenntnisse bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen, um die beteiligten Signalwege einwandfrei zu identifizieren und eine mögliche Therapie eventuell durch die zusätzliche Gabe von Bisphosphonaten zu optimieren.

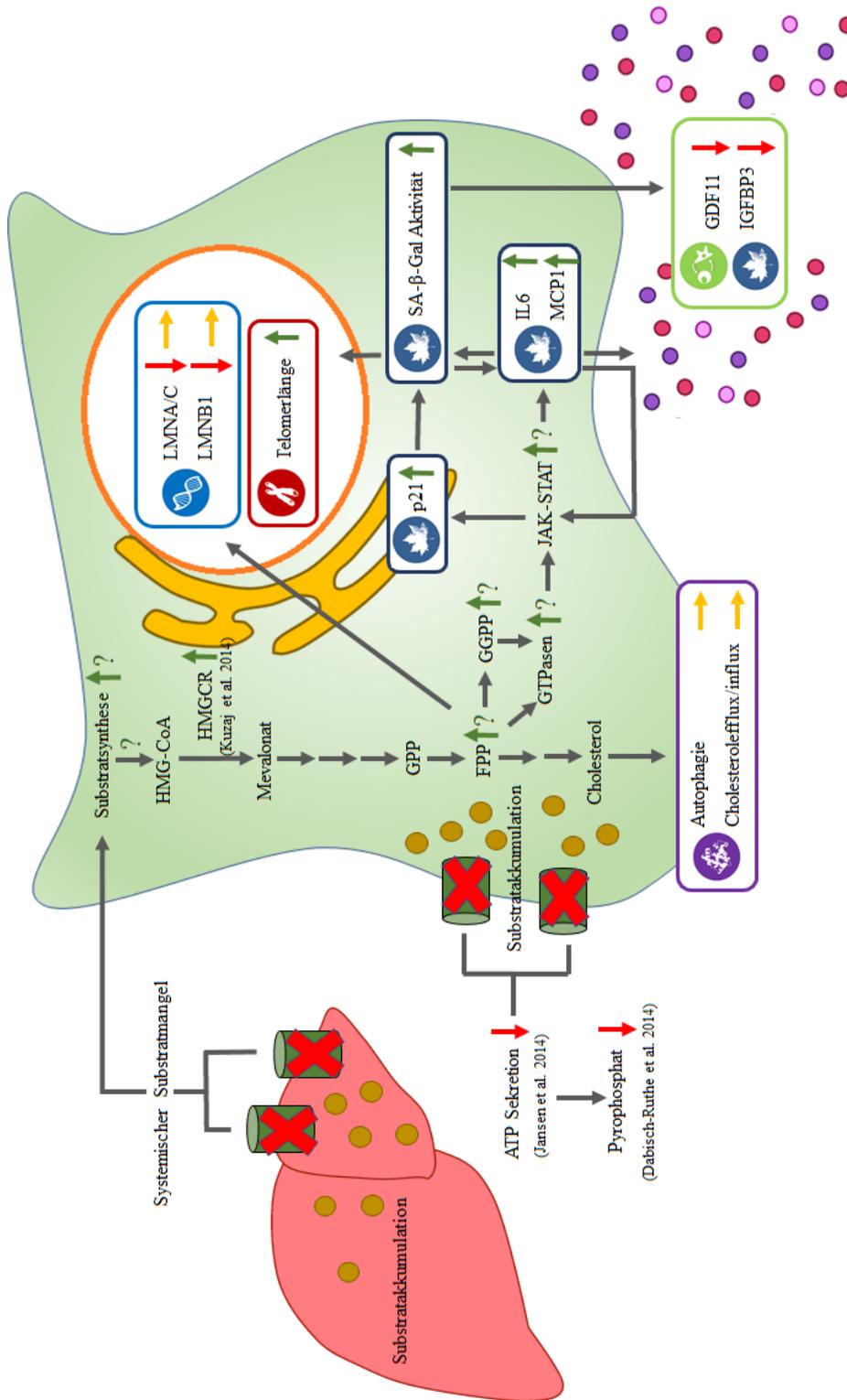


Abbildung 35: Hypothetisches Modell molekularer Zusammenhänge in PXE-Fibroblasten. Die ABCG6-Defizienz könnte in der Leber zu einer Akkumulation des möglichen ABCG6-Substrats führen, was folglich zu einem Mangel an diesem im Blutstrom bzw. in der Peripherie führen würde. In den PXE-Fibroblasten würde dieser Mangel zu einer endogenen Synthese dieses Substrats führen, welches dann ebenfalls durch die ABCG6-Defizienz intrazellulär akkumuliert. Dies führt zudem zur Reduktion der ATP-Sekretion sowie zu einer Erniedrigung des extrazellulären Pyrophosphats. Die Induktion der Cholesterinbiosynthese bewirkt zudem durch vermehrte Prenylierung die Aktivierung kleiner GTPasen und des JAK-STAT Signalweges, welcher wiederum zur vermehrten IL6-Produktion sowie über STAT3 zur Hochregulierung von p21 beiträgt. IL6 sowie p21 führen zur Ausbildung einer zellulären Seneszenz und zur Sekretion aberranter Konzentrationen verschiedener SASP-Faktoren.

6. Abkürzungsverzeichnis

°C	Temperatur in Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
ABCC6	Adenosintriphosphat-Bindungskassettentransporterprotein 6 der Subfamilie C
ACDC	arteriellen Kalzifizierung bedingt durch eine CD73-Defizienz
ALS	<i>acid label subunit</i>
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
APS	Adenosin-5'-Phosphosulfatsodiumsalz
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
β2M	Beta-2-Mikroglobulin
β-Aktin	Beta-Aktin
BCA	Bichinonsäure
Bp	Basenpaare
CCL11	Eotaxin
CdK	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHAPS	3-[(3-Chloramidopropyl) Dimethylammonium]-1-Propansulfonat
CNV	choroidalen Neovaskularisation
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat

DPBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, ohne Ca und Mg
ECLIA	Elektrochemilumineszenz-Immunoassay
ENPP1	Ektonukleotidpyrophosphatase 1
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FCS	Fetales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
FDPS	Farnesyldiphosphatsynthase
FL-AAM	Adenosin-5'-Triphosphatassaymix
FNTB	Farnesyltransferase B
FPP	Farnesylpyrophosphat
GACI	generalisierten infantilen Arterienkalzifikation
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
GDF11	<i>Growth Differentiation Factor 11</i>
GGCX	γ -Glutamylcarboxylase
GGPP	Gerallygeranylpyrophosphat
GH	<i>Growth Hormone</i>
GUSB	<i>β-Glucuronidase</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HDLBP	<i>High Density Lipoprotein Binding Protein</i>
HGPS	Hutchinson-Gilford Progeriesyndrom
HMGCR	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
ICAM1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IGF1	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IGFBP3	Insulin-like growth factor binding protein 3
IL6	Interleukin 6
JAK	Janus Kinase
L	Liter
LAMP1	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>

LDLR	<i>Low Density Lipoprotein</i> Rezeptor
LMNB1	Lamin B1
LPDS	Lipoprotein-deplidiertem FCS
MCP1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger-Ribonukleinsäure</i>
MUG	4-Methylumbelliferyl- β -D-Galactopyranosid
NCL	Nucleolin
NBD	Nukleotidbindedomäne
OPN	Osteopontin
PCYOX	Prenylcysteinoxidase 1
PPi	Pyrophosphat
pRB	Retinoblastom Protein
PXE	<i>Pseudoxanthoma elasticum</i>
qPCR	Relative quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RPLP0	<i>Large Ribosomal Protein</i>
RT	Raumtemperatur
SA- β -Gal	Seneszenzassoziierte β -Galactosidase
SASP	Seneszenzassoziiertes Sekretorisches Phänotyp
SCR	<i>single copy reference</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TMD	Transmembrandomänen
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
ZMPSTE24	Zink-Metalloproteinase STE24

7. Literatur

- Abbas, T., Dutta, A., 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat. Rev. Cancer* 9, 400–414.
- Aessopos, A., Farmakis, D., Loukopoulos, D., 2002. Elastic tissue abnormalities resembling pseudoxanthoma elasticum in beta thalassemia and the sickling syndromes. *Blood* 99, 30–35.
- Allsopp, R.C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Futcher, A.B., Greider, C.W., Harley, C.B., 1992. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10114–10118.
- Amighi, J., Sabeti, S., Schlager, O., Francesconi, M., Ahmadi, R., Minar, E., Schillinger, M., 2004. Outcome of Conservative Therapy of Patients with Severe Intermittent Claudication. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 27, 254–258.
- Ascer, E., Bertolami, M.C., Venturinelli, M.L., Buccheri, V., Souza, J., Nicolau, J.C., Ramires, J.A.F., Serrano, C.V., 2004. Atorvastatin reduces proinflammatory markers in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis* 177, 161–166.
- Ashapkin, V.V., Kutueva, L.I., Kurchashova, S.Y., Kireev, I.I., 2019. Are There Common Mechanisms Between the Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome and Natural Aging? *Front. Genet.* 10, 455.
- Aubert, G., Lansdorp, P.M., 2008. Telomeres and aging. *Physiol. Rev.* 88, 557–579.
- Aunan, J.R., Watson, M.M., Hagland, H.R., Søreide, K., 2016. Molecular and biological hallmarks of ageing. *Br. J. Surg.* 103, e29–46.
- Baccarani Contri, M., Tiozzo, R., Croce, M.A., Andreoli, T., De Paepe, A., 1993. Cell-matrix interactions in cultured dermal fibroblasts from patients with an inherited connective-tissue disorder. *Cytotechnology* 11, S112–114.
- Ban, N., Lee, T.J., Sene, A., Dong, Z., Santeford, A., Lin, J.B., Ory, D.S., Apte, R.S., 2018. Disrupted cholesterol metabolism promotes age-related photoreceptor neurodegeneration. *J. Lipid Res.* 59, 1414–1423.
- Barbosa, M.C., Grosso, R.A., Fader, C.M., 2019. Hallmarks of Aging: An Autophagic Perspective. *Front. Endocrinol.* 9, 790.
- Barrowman, J., Hamblet, C., George, C.M., Michaelis, S., 2008. Analysis of Prelamin A Biogenesis Reveals the Nucleus to be a CaaX Processing Compartment. *Mol. Biol. Cell* 19, 5398–5408.
- Bauer, C., le Saux, O., Pomozi, V., Aherrahrou, R., Kriesen, R., Stölting, S., Liebers, A., Kessler, T., Schunkert, H., Erdmann, J., Aherrahrou, Z., 2018. Etidronate prevents dystrophic cardiac calcification by inhibiting macrophage aggregation. *Sci. Rep.* 8, 5812.

- Bellido, T., O'Brien, C.A., Roberson, P.K., Manolagas, S.C., 1998. Transcriptional activation of the p21(WAF1,CIP1,SDI1) gene by interleukin-6 type cytokines. A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* 273, 21137–21144.
- Benson, E.K., Lee, S.W., Aaronson, S.A., 2010. Role of progerin-induced telomere dysfunction in HGPS premature cellular senescence. *J. Cell Sci.* 123, 2605–2612.
- Bergen, A.A., Plomp, A.S., Schuurman, E.J., Terry, S., Breuning, M., Dauwerse, H., Swart, J., Kool, M., van Soest, S., Baas, F., ten Brink, J.B., de Jong, P.T., 2000. Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat. Genet.* 25, 228–231.
- Bhatnagar, P., Freund, K.B., Spaide, R.F., Klancnik, J.M., Cooney, M.J., Ho, I., Fine, H.F., Yannuzzi, L.A., 2007. Intravitreal bevacizumab for the management of choroidal neovascularization in pseudoxanthoma elasticum. *Retina Phila. Pa* 27, 897–902.
- Bikle, D.D., Nemanic, M.K., Whitney, J.O., Elias, P.W., 1986. Neonatal human foreskin keratinocytes produce 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochemistry* 25, 1545–1548.
- Biswas, P., Zanello, L.P., 2009. 1 α ,25(OH)₂ Vitamin D₃ Induction of ATP Secretion in Osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* 24, 1450–1460.
- Boraldi, F., Annovi, G., Bartolomeo, A., Quaglino, D., 2014. Fibroblasts from patients affected by Pseudoxanthoma elasticum exhibit an altered PPI metabolism and are more responsive to pro-calcifying stimuli. *J. Dermatol. Sci.* 74, 72–80.
- Boraldi, F., Annovi, G., Guerra, D., Paolinelli Devincenzi, C., Garcia-Fernandez, M.I., Panico, F., De Santis, G., Tiozzo, R., Ronchetti, I., Quaglino, D., 2009. Fibroblast protein profile analysis highlights the role of oxidative stress and vitamin K recycling in the pathogenesis of pseudoxanthoma elasticum. *Proteomics Clin. Appl.* 3, 1084–1098.
- Boraldi, F., Annovi, G., Vermeer, C., Schurgers, L.J., Trenti, T., Tiozzo, R., Guerra, D., Quaglino, D., 2013. Matrix gla protein and alkaline phosphatase are differently modulated in human dermal fibroblasts from PXE patients and controls. *J. Invest. Dermatol.* 133, 946–954.
- Boraldi, F., Bartolomeo, A., Di Bari, C., Cocconi, A., Quaglino, D., 2015. Donor's age and replicative senescence favour the in-vitro mineralization potential of human fibroblasts. *Exp. Gerontol.* 72, 218–226.
- 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, 1575–1579.
- Boskey, A.L., Maresca, M., Ullrich, W., Doty, S.B., Butler, W.T., Prince, C.W., 1993. Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner.* 22, 147–159.
- Bosworth, C., de Boer, I.H., 2013. Impaired Vitamin D Metabolism in CKD. *Semin. Nephrol.* 33, 158–168.
- Brassard, J.A., Fekete, N., Garnier, A., Hoesli, C.A., 2016. Hutchinson-Gilford progeria syndrome as a model for vascular aging. *Biogerontology* 17, 129–145.

- Buchwalter, A., Hetzer, M.W., 2017. Nucleolar expansion and elevated protein translation in premature aging. *Nat. Commun.* 8, 328.
- Cao, K., Graziotto, J.J., Blair, C.D., Mazzulli, J.R., Erdos, M.R., Krainc, D., Collins, F.S., 2011. Rapamycin reverses cellular phenotypes and enhances mutant protein clearance in Hutchinson-Gilford progeria syndrome cells. *Sci. Transl. Med.* 3, 89ra58.
- Capell, B.C., Erdos, M.R., Madigan, J.P., Fiordalisi, J.J., Varga, R., Conneely, K.N., Gordon, L.B., Der, C.J., Cox, A.D., Collins, F.S., 2005. Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 12879–12884.
- Carrero, D., Soria-Valles, C., López-Otín, C., 2016. Hallmarks of progeroid syndromes: lessons from mice and reprogrammed cells. *Dis. Model. Mech.* 9, 719–735.
- Cerqueira, N.M.F.S.A., Oliveira, E.F., Gesto, D.S., Santos-Martins, D., Moreira, C., Moorthy, H.N., Ramos, M.J., Fernandes, P.A., 2016. Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview. *Biochemistry* 55, 5483–5506.
- Chassaing, N., Martin, L., Calvas, P., Le Bert, M., Hovnanian, A., 2005. Pseudoxanthoma elasticum: a clinical, pathophysiological and genetic update including 11 novel ABCC6 mutations. *J. Med. Genet.* 42, 881–892.
- Chen, C.M., Chiang, S.Y., Yeh, N.H., 1991. Increased stability of nucleolin in proliferating cells by inhibition of its self-cleaving activity. *J. Biol. Chem.* 266, 7754–7758.
- Chen, Q.M., Tu, V.C., Catania, J., Burton, M., Toussaint, O., Dilley, T., 2000. Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 22), 4087–4097.
- Cheng, J., Ohsaki, Y., Tauchi-Sato, K., Fujita, A., Fujimoto, T., 2006. Cholesterol depletion induces autophagy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 246–252.
- Chiu, D.S., Oram, J.F., LeBoeuf, R.C., Alpers, C.E., O'Brien, K.D., 1997. High-Density Lipoprotein-Binding Protein (HBP)/Vigilin Is Expressed in Human Atherosclerotic Lesions and Colocalizes With Apolipoprotein E. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 2350–2358.
- Choi, J.M., Rotimi, O.O., O'Carroll, S.J., Nicholson, L.F.B., 2016. IL-6 stimulates a concentration-dependent increase in MCP-1 in immortalised human brain endothelial cells. *F1000Research* 5, 270.
- Conboy, I.M., Conboy, M.J., Wagers, A.J., Girma, E.R., Weissman, I.L., Rando, T.A., 2005. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 433, 760–764.
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., Campisi, J., 2010. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 5, 99–118.
- Corsini, A., Bellosta, S., Baetta, R., Fumagalli, R., Paoletti, R., Bernini, F., 1999. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol. Ther.* 84, 413–428.

- Corsini, A., Maggi, F.M., Catapano, A.L., 1995. Pharmacology of competitive inhibitors of HMG-CoA reductase. *Pharmacol. Res.* 31, 9–27.
- Dabisch-Ruthe, M., Kuzaj, P., Götting, C., Knabbe, C., Hendig, D., 2014. Pyrophosphates as a major inhibitor of matrix calcification in Pseudoxanthoma elasticum. *J. Dermatol. Sci.* 75, 109–120.
- Darier J, 1896. Pseudoxanthoma elasticum. *Monatsh F Pr Derm Bd XXIII* Nr 12.
- Das, U.N., 2001. Statins and the prevention of dementia. *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.* 165, 908–909.
- Decker, M.L., Chavez, E., Vulto, I., Lansdorp, P.M., 2009. Telomere length in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Mech. Ageing Dev.* 130, 377–383.
- Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., Sawaya, B.E., 2009. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J. Interferon Cytokine Res.* 29, 313–326.
- Diekmann, U., Zarbock, R., Hendig, D., Szliska, C., Kleesiek, K., Götting, C., 2009. Elevated circulating levels of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in pseudoxanthoma elasticum patients. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 87, 965–970.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 9363–9367.
- Dulic, V., 2013. Senescence Regulation by mTOR. In: Galluzzi, L., Vitale, I., Kepp, O., Kroemer, G. (Eds.), *Cell Senescence, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 15–35.
- Egerman, M.A., Cadena, S.M., Gilbert, J.A., Meyer, A., Nelson, H.N., Swalley, S.E., Mallozzi, C., Jacobi, C., Jennings, L.L., Clay, I., Laurent, G., Ma, S., Brachat, S., Lach-Trifilieff, E., Shavlakadze, T., Trendelenburg, A.-U., Brack, A.S., Glass, D.J., 2015. GDF11 Increases with Age and Inhibits Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Metab.* 22, 164–174.
- Ellabban, A.A., Hangai, M., Yamashiro, K., Nakagawa, S., Tsujikawa, A., Yoshimura, N., 2012. Tomographic fundus features in pseudoxanthoma elasticum: comparison with neovascular age-related macular degeneration in Japanese patients. *Eye Lond. Engl.* 26, 1086–1094.
- Favre, G., Laurain, A., Aranyi, T., Szeri, F., Fulop, K., Le Saux, O., Duranton, C., Kauffenstein, G., Martin, L., Lefthérotis, G., 2017. The ABCC6 Transporter: A New Player in Biomineralization. *Int. J. Mol. Sci.* 18.
- Ferry, R., Katz, L., Grimberg, A., Cohen, P., Weinzimer, S., 1999. Cellular Actions of Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins. *Horm. Metab. Res.* 31, 192–202.
- Finger, R.P., Charbel Issa, P., Ladewig, M.S., Götting, C., Szliska, C., Scholl, H.P.N., Holz, F.G., 2009. Pseudoxanthoma elasticum: genetics, clinical manifestations and therapeutic approaches. *Surv. Ophthalmol.* 54, 272–285.

- Fleisch, H., Bisaz, S., 1962. Mechanism of calcification: inhibitory role of pyrophosphate. *Nature* 195, 911.
- Flor, A.C., Wolfgeher, D., Wu, D., Kron, S.J., 2017. A signature of enhanced lipid metabolism, lipid peroxidation and aldehyde stress in therapy-induced senescence. *Cell Death Discov.* 3, 17075.
- Freund, A., Laberge, R.-M., Demaria, M., Campisi, J., 2012. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol. Biol. Cell* 23, 2066–2075.
- Gartel, A.L., Tyner, A.L., 1999. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp. Cell Res.* 246, 280–289.
- Gary, R.K., Kindell, S.M., 2005. Quantitative assay of senescence-associated beta-galactosidase activity in mammalian cell extracts. *Anal. Biochem.* 343, 329–334.
- Georgalas, I., Tservakis, I., Papaconstantinou, D., Kardara, M., Koutsandrea, C., Ladas, I., 2011. Pseudoxanthoma elasticum, ocular manifestations, complications and treatment. *Clin. Exp. Optom.* 94, 169–180.
- Germain, D.P., 2017. Pseudoxanthoma elasticum. *Orphanet J. Rare Dis.* 12, 85.
- Gheduzzi, D., Boraldi, F., Annovi, G., DeVincenzi, C.P., Schurgers, L.J., Vermeer, C., Quaglino, D., Ronchetti, I.P., 2007. Matrix Gla protein is involved in elastic fiber calcification in the dermis of pseudoxanthoma elasticum patients. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 87, 998–1008.
- Gheduzzi, D., Sammarco, R., Quaglino, D., Bercovitch, L., Terry, S., Taylor, W., Ronchetti, I.P., 2003. Extracutaneous Ultrastructural Alterations in Pseudoxanthoma Elasticum. *Ultrastruct. Pathol.* 27, 375–384.
- Giachelli, C.M., Steitz, S., 2000. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 19, 615–622.
- Giacinti, C., Giordano, A., 2006. RB and cell cycle progression. *Oncogene* 25, 5220–5227.
- Gibson, K.M., Hoffmann, G., Schwall, A., Broock, R.L., Aramaki, S., Sweetman, L., Nyhan, W.L., Brandt, I.K., Wappner, R.S., Lehnert, W., 1990. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in cultured fibroblasts from patients with mevalonate kinase deficiency: differential response to lipid supplied by fetal bovine serum in tissue culture medium. *J. Lipid Res.* 31, 515–521.
- Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B., Bouvet, P., 1999. Structure and functions of nucleolin. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 6), 761–772.
- Giorelli, M., De Blasi, A., Defazio, G., Avolio, C., Iacovelli, L., Livrea, P., Trojano, M., 2002. Differential Regulation of Membrane Bound and Soluble ICAM 1 in Human Endothelium and Blood Mononuclear Cells: Effects of Interferon Beta-1a. *Cell Commun. Adhes.* 9, 259–272.
- Gliem, M., Zaeytijd, J.D., Finger, R.P., Holz, F.G., Leroy, B.P., Charbel Issa, P., 2013. An update on the ocular phenotype in patients with pseudoxanthoma elasticum. *Front. Genet.* 4, 14.

- Göbel, A., Breining, D., Rauner, M., Hofbauer, L.C., Rachner, T.D., 2019. Induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase mediates statin resistance in breast cancer cells. *Cell Death Dis.* 10, 91.
- Goblirsch, B.R., Pryor, E.E., Wiener, M.C., 2020. The tripartite architecture of the eukaryotic integral membrane protein zinc metalloprotease Ste24. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 88, 604–615.
- Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343, 425–430.
- Gonzalez-Meljem, J.M., Apps, J.R., Fraser, H.C., Martinez-Barbera, J.P., 2018. Paracrine roles of cellular senescence in promoting tumorigenesis. *Br. J. Cancer* 118, 1283–1288.
- Gordon, L.B., Rothman, F.G., López-Otín, C., Misteli, T., 2014. Progeria: A Paradigm for Translational Medicine. *Cell* 156, 400–407.
- Gorgels, T.G.M.F., Hu, X., Scheffer, G.L., van der Wal, A.C., Toonstra, J., de Jong, P.T.V.M., van Kuppevelt, T.H., Levelt, C.N., de Wolf, A., Loves, W.J.P., Scheper, R.J., Peek, R., Bergen, A.A.B., 2005. Disruption of *Abcc6* in the mouse: novel insight in the pathogenesis of pseudoxanthoma elasticum. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1763–1773.
- Gorgels, T.G.M.F., Waarsing, J.H., Herfs, M., Versteeg, D., Schoensiegel, F., Sato, T., Schlingemann, R.O., Ivandic, B., Vermeer, C., Schurgers, L.J., Bergen, A.A.B., 2011. Vitamin K supplementation increases vitamin K tissue levels but fails to counteract ectopic calcification in a mouse model for pseudoxanthoma elasticum. *J. Mol. Med.* 89, 1125–1135.
- Gorgoulis, V.G., Pratsinis, H., Zacharatos, P., Demoliou, C., Sigala, F., Asimacopoulos, P.J., Papavassiliou, A.G., Kletsas, D., 2005. p53-dependent ICAM-1 overexpression in senescent human cells identified in atherosclerotic lesions. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 85, 502–511.
- Grenier, D., Bodet, C., 2008. *Streptococcus suis* stimulates ICAM-1 shedding from microvascular endothelial cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 54, 271–276.
- Grönblad E, 1929. Angioid streaks-pseudoxanthoma elasticum. *Acta Ophthalmol.* 7 329–329.
- Guidi, N., Sacma, M., Ständker, L., Soller, K., Marka, G., Eiwen, K., Weiss, J.M., Kirchhoff, F., Weil, T., Cancelas, J.A., Florian, M.C., Geiger, H., 2017. Osteopontin attenuates aging-associated phenotypes of hematopoietic stem cells. *EMBO J.* 36, 840–853.
- Guo, H., Li, Q., Chou, D.W., Uitto, J., 2013. Atorvastatin counteracts aberrant soft tissue mineralization in a mouse model of pseudoxanthoma elasticum (*Abcc6* ^{-/-}). *J. Mol. Med.* 91, 1177–1184.
- Gupta, A.K., Sexton, R.C., Rudney, H., 1989. Effect of vitamin D3 derivatives on cholesterol synthesis and HMG-CoA reductase activity in cultured cells. *J. Lipid Res.* 30, 379–386.
- Haley, K.J., Lilly, C.M., Yang, J.H., Feng, Y., Kennedy, S.P., Turi, T.G., Thompson, J.F., Sukhova, G.H., Libby, P., Lee, R.T., 2000. Overexpression of eotaxin and the CCR3 receptor in human atherosclerosis: using genomic technology to identify a potential novel pathway of vascular inflammation. *Circulation* 102, 2185–2189.

- Hallstrom, T.C., Mori, S., Nevins, J.R., 2008. An E2F1-dependent gene expression program that determines the balance between proliferation and cell death. *Cancer Cell* 13, 11–22.
- Hayflick, L., Moorhead, P.S., 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585–621.
- Hendig, D., Adam, A., Zarbock, R., Szliska, C., Kleesiek, K., Götting, C., 2008a. Elevated serum levels of intercellular adhesion molecule ICAM-1 in Pseudoxanthoma elasticum. *Clin. Chim. Acta* 394, 54–58.
- Hendig, D., Langmann, T., Kocken, S., Zarbock, R., Szliska, C., Schmitz, G., Kleesiek, K., Götting, C., 2008b. Gene expression profiling of ABC transporters in dermal fibroblasts of pseudoxanthoma elasticum patients identifies new candidates involved in PXE pathogenesis. *Lab. Invest.* 88, 1303–1315.
- Hendig, D., Schulz, V., Arndt, M., Szliska, C., Kleesiek, K., Götting, C., 2006. Role of Serum Fetuin-A, a Major Inhibitor of Systemic Calcification, in Pseudoxanthoma Elasticum. *Clin. Chem.* 52, 227–234.
- Hendig, D., Zarbock, R., Szliska, C., Kleesiek, K., Götting, C., 2008c. The local calcification inhibitor matrix Gla protein in pseudoxanthoma elasticum. *Clin. Biochem.* 41, 407–412.
- Hennekam, R.C.M., 2006. Hutchinson–Gilford progeria syndrome: Review of the phenotype. *Am. J. Med. Genet. A.* 140A, 2603–2624.
- Hoefler, J., Luger, M., Dal-Pont, C., Culig, Z., Schennach, H., Jochberger, S., 2017. The “Aging Factor” Eotaxin-1 (CCL11) Is Detectable in Transfusion Blood Products and Increases with the Donor’s Age. *Front. Aging Neurosci.* 9, 402.
- Hosen, M.J., Zubaer, A., Thapa, S., Khadka, B., De Paepe, A., Vanakker, O.M., 2014. Molecular Docking Simulations Provide Insights in the Substrate Binding Sites and Possible Substrates of the ABCC6 Transporter. *PLoS ONE* 9, e102779.
- Hu, X., Plomp, A.S., van Soest, S., Wijnholds, J., de Jong, P.T.V.M., Bergen, A.A.B., 2003. Pseudoxanthoma elasticum: a clinical, histopathological, and molecular update. *Surv. Ophthalmol.* 48, 424–438.
- Ibold, B., 2018. Untersuchung der Auswirkungen einer Abcc6-Defizienz auf die Cholesterinhomöostase im Mausmodell. *Diss. Uni Bielef.*
- Istvan, E.S., Deisenhofer, J., 2001. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 292, 1160–1164.
- Jacobs, J.M., Cohen, A., Ein-Mor, E., Stessman, J., 2013. Cholesterol, statins, and longevity from age 70 to 90 years. *J. Am. Med. Dir. Assoc.* 14, 883–888.
- Jahren-Dechent, W., Heiss, A., Schäfer, C., Ketteler, M., 2011. Fetuin-A Regulation of Calcified Matrix Metabolism. *Circ. Res.* 108, 1494–1509.
- Jansen, R.S., Duijst, S., Mahakena, S., Sommer, D., Szeri, F., Váradi, A., Plomp, A., Bergen, A.A., Oude Elferink, R.P.J., Borst, P., van de Wetering, K., 2014. ABCC6–Mediated ATP Secretion by the Liver Is the Main Source of the Mineralization Inhibitor Inorganic

- Pyrophosphate in the Systemic Circulation—Brief Report. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 1985–1989.
- Jansen, R.S., Kucukosmanoglu, A., de Haas, M., Sapthu, S., Otero, J.A., Hegman, I.E.M., Bergen, A.A.B., Gorgels, T.G.M.F., Borst, P., van de Wetering, K., 2013. ABCC6 prevents ectopic mineralization seen in pseudoxanthoma elasticum by inducing cellular nucleotide release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 20206–20211.
- Jiang, Q., Endo, M., Dibra, F., Wang, K., Uitto, J., 2009. Pseudoxanthoma Elasticum Is a Metabolic Disease. *J. Invest. Dermatol.* 129, 348–354.
- Jiang, Q., Li, Q., Grand-Pierre, A.E., Schurgers, L.J., Uitto, J., 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, 701–707.
- Jiang, Q., Li, Q., Uitto, J., 2007. Aberrant mineralization of connective tissues in a mouse model of pseudoxanthoma elasticum: systemic and local regulatory factors. *J. Invest. Dermatol.* 127, 1392–1402.
- Jiang, Q., Oldenburg, R., Otsuru, S., Grand-Pierre, A.E., Horwitz, E.M., Uitto, J., 2010. Parabiotic Heterogenetic Pairing of *Abcc6*^{-/-}/*Rag1*^{-/-} Mice and Their Wild-Type Counterparts Halts Ectopic Mineralization in a Murine Model of Pseudoxanthoma Elasticum. *Am. J. Pathol.* 176, 1855–1862.
- Jung, H.-J., Nobumori, C., Goulbourne, C.N., Tu, Y., Lee, J.M., Tatar, A., Wu, D., Yoshinaga, Y., de Jong, P.J., Coffinier, C., Fong, L.G., Young, S.G., 2013. Farnesylation of lamin B1 is important for retention of nuclear chromatin during neuronal migration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E1923–E1932.
- Kang, H.T., Lee, K.B., Kim, S.Y., Choi, H.R., Park, S.C., 2011. Autophagy Impairment Induces Premature Senescence in Primary Human Fibroblasts. *PLoS ONE* 6, e23367.
- Katsimpardi, L., Litterman, N.K., Schein, P.A., Miller, C.M., Loffredo, F.S., Wojtkiewicz, G.R., Chen, J.W., Lee, R.T., Wagers, A.J., Rubin, L.L., 2014. Vascular and Neurogenic Rejuvenation of the Aging Mouse Brain by Young Systemic Factors. *Science* 344, 630–634.
- Kim, H., Park, S.-Y., Moon, S., Lee, J., Kim, S., 2018. Autophagy in Human Skin Fibroblasts: Impact of Age. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2254.
- Kim, K.S., Kim, M.-S., Seu, Y.B., Chung, H.Y., Kim, J.H., Kim, J.-R., 2007. Regulation of replicative senescence by insulin-like growth factor-binding protein 3 in human umbilical vein endothelial cells. *Aging Cell* 6, 535–545.
- Kizu, A., Shioi, A., Jono, S., Koyama, H., Okuno, Y., Nishizawa, Y., 2004. Statins inhibit in vitro calcification of human vascular smooth muscle cells induced by inflammatory mediators. *J. Cell. Biochem.* 93, 1011–1019.
- Kojima, H., Kunimoto, H., Inoue, T., Nakajima, K., 2012. The STAT3-IGFBP5 axis is critical for IL-6/gp130-induced premature senescence in human fibroblasts. *Cell Cycle* 11, 730–739.

- Köks, S., Dogan, S., Tuna, B.G., González-Navarro, H., Potter, P., Vandenbroucke, R.E., 2016. Mouse models of ageing and their relevance to disease. *Mech. Ageing Dev.* 160, 41–53.
- Kool, M., van der Linden, M., de Haas, M., Baas, F., Borst, P., 1999. Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer Res.* 59, 175–182.
- Kranenburg, G., de Jong, P.A., Bartstra, J.W., Lagerweij, S.J., Lam, M.G., Ossewaarde-van Norel, J., Risseeuw, S., van Leeuwen, R., Imhof, S.M., Verhaar, H.J., de Vries, J.J., Slart, R.H.J.A., Luurtsema, G., den Harder, A.M., Visseren, F.L.J., Mali, W.P., Spiering, W., 2018. Etidronate for Prevention of Ectopic Mineralization in Patients With Pseudoxanthoma Elasticum. *J. Am. Coll. Cardiol.* 71, 1117–1126.
- Kranenburg, G., de Jong, P.A., Mali, W.P., Attrach, M., Visseren, F.L.J., Spiering, W., 2017. Prevalence and severity of arterial calcifications in pseudoxanthoma elasticum (PXE) compared to hospital controls. Novel insights into the vascular phenotype of PXE. *Atherosclerosis* 256, 7–14.
- Kuhla, A., Blei, T., Jaster, R., Vollmar, B., 2011. Aging Is Associated With a Shift of Fatty Metabolism Toward Lipogenesis. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 66A, 1192–1200.
- Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y., Erusalimsky, J.D., 2000. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 20), 3613–3622.
- Kuzaj, P., Kuhn, J., Dabisch-Ruthe, M., Faust, I., Götting, C., Knabbe, C., Hendig, D., 2014a. ABCC6- a new player in cellular cholesterol and lipoprotein metabolism? *Lipids Health Dis.* 13, 118.
- Kuzaj, P., Kuhn, J., Michalek, R.D., Karoly, E.D., Faust, I., Dabisch-Ruthe, M., Knabbe, C., Hendig, D., 2014b. Large-Scaled Metabolic Profiling of Human Dermal Fibroblasts Derived from Pseudoxanthoma Elasticum Patients and Healthy Controls. *PLoS ONE* 9, e108336.
- Lacher, S.M., Bruttger, J., Kalt, B., Berthelet, J., Rajalingam, K., Wörtge, S., Waisman, A., 2017. HMG-CoA reductase promotes protein prenylation and therefore is indispensable for T-cell survival. *Cell Death Dis.* 8, e2824–e2824.
- Laube, S., Moss, C., 2005. Pseudoxanthoma elasticum. *Arch. Dis. Child.* 90, 754–756.
- Le Saux, O., Bunda, S., VanWart, C.M., Douet, V., Got, L., Martin, L., Hinek, A., 2006. Serum factors from pseudoxanthoma elasticum patients alter elastic fiber formation in vitro. *J. Invest. Dermatol.* 126, 1497–1505.
- Le Saux, O., Urban, Z., Tschuch, C., Csiszar, K., Bacchelli, B., Quaglino, D., Pasquali-Ronchetti, I., Pope, F.M., Richards, A., Terry, S., Bercovitch, L., de Paepe, A., Boyd, C.D., 2000. Mutations in a gene encoding an ABC transporter cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat. Genet.* 25, 223–227.

- Lebwohl, M., Schwartz, E., Lemlich, G., Lovelace, O., Shaikh-Bahai, F., Fleischmajer, R., 1993. Abnormalities of connective tissue components in lesional and non-lesional tissue of patients with pseudoxanthoma elasticum. *Arch. Dermatol. Res.* 285, 121–126.
- Lee, B.Y., Han, J.A., Im, J.S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E.C., Kleijer, W.J., DiMaio, D., Hwang, E.S., 2006. Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell* 5, 187–195.
- Lee, J., Kim, S.S., 2009. The function of p27^{KIP1} during tumor development. *Exp. Mol. Med.* 41, 765.
- Lee, W., Jo, S., Lee, M., Won, C., Lee, M., Choi, J., Chang, S., 2016. The Effect of MCP-1/CCR2 on the Proliferation and Senescence of Epidermal Constituent Cells in Solar Lentigo. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 948.
- Lefthériotis, G., Omarjee, L., Saux, O.L., Henrion, D., Abraham, P., Prunier, F., Willoteaux, S., Martin, L., 2013. The vascular phenotype in Pseudoxanthoma elasticum and related disorders: contribution of a genetic disease to the understanding of vascular calcification. *Front. Genet.* 4.
- Li, H., Tao, H., Hu, T., Fan, Y., Zhang, R., Jia, G., Wang, H., 2010. Atorvastatin reduces calcification in rat arteries and vascular smooth muscle cells. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 107, 798–802.
- Li, Q., Brodsky, J.L., Conlin, L.K., Pawel, B., Glatz, A.C., Gafni, R.I., Schurgers, L., Uitto, J., Hakonarson, H., Deardorff, M.A., Levine, M.A., 2014. Mutations in the ABCC6 Gene as a Cause of Generalized Arterial Calcification of Infancy: Genotypic Overlap with Pseudoxanthoma Elasticum. *J. Invest. Dermatol.* 134, 658–665.
- Li, Q., Jiang, Q., Pfindner, E., Váradi, A., Uitto, J., 2009. Pseudoxanthoma elasticum: clinical phenotypes, molecular genetics and putative pathomechanisms. *Exp. Dermatol.* 18, 1–11.
- Li, Q., Jiang, Q., Schurgers, L.J., Uitto, J., 2007. Pseudoxanthoma elasticum: Reduced γ -glutamyl carboxylation of matrix gla protein in a mouse model (*Abcc6*^{-/-}). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364, 208–213.
- Li, Q., Kingman, J., Sundberg, J.P., Levine, M.A., Uitto, J., 2018. Etidronate prevents, but does not reverse, ectopic mineralization in a mouse model of pseudoxanthoma elasticum (*Abcc6*^{-/-}). *Oncotarget* 9, 30721–30730.
- Li, Q., Sundberg, J.P., Levine, M.A., Terry, S.F., Uitto, J., 2015. The effects of bisphosphonates on ectopic soft tissue mineralization caused by mutations in the ABCC6 gene. *Cell Cycle Georget. Tex* 14, 1082–1089.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402–408.
- Loffredo, F.S., Steinhauser, M.L., Jay, S.M., Gannon, J., Pancoast, J.R., Yalamanchi, P., Sinha, M., Dall’Osso, C., Khong, D., Shadrach, J.L., Miller, C.M., Singer, B.S., Stewart, A., Psychogios, N., Gerszten, R.E., Hartigan, A.J., Kim, M.-J., Serwold, T., Wagers, A.J.,

- Lee, R.T., 2013. Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy. *Cell* 153, 828–839.
- Lofqvist, C., Chen, J., Connor, K.M., Smith, A.C.H., Aderman, C.M., Liu, N., Pintar, J.E., Ludwig, T., Hellstrom, A., Smith, L.E.H., 2007. IGFBP3 suppresses retinopathy through suppression of oxygen-induced vessel loss and promotion of vascular regrowth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 10589–10594.
- Lomashvili, K.A., Khawandi, W., O'Neill, W.C., 2005. Reduced Plasma Pyrophosphate Levels in Hemodialysis Patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 2495–2500.
- Lomashvili, K.A., Narisawa, S., Millán, J.L., O'Neill, W.C., 2014. Vascular calcification is dependent on plasma levels of pyrophosphate. *Kidney Int.* 85, 1351–1356.
- Long, S.B., Hancock, P.J., Kral, A.M., Hellinga, H.W., Beese, L.S., 2001. The crystal structure of human protein farnesyltransferase reveals the basis for inhibition by CaaX tetrapeptides and their mimetics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 12948–12953.
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., Kroemer, G., 2013. The Hallmarks of Aging. *Cell* 153, 1194–1217.
- Loppnow, H., Zhang, L., Buerke, M., Lautenschläger, M., Chen, L., Frister, A., Schlitt, A., Luther, T., Song, N., Hofmann, B., Rose-John, S., Silber, R.-E., Müller-Werdan, U., Werdan, K., 2011. Statins potently reduce the cytokine-mediated IL-6 release in SMC/MNC cocultures. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 994–1004.
- Lu, Q., Tu, M.-L., Li, C.-J., Zhang, L., Jiang, T.-J., Liu, T., Luo, X.-H., 2016. GDF11 Inhibits Bone Formation by Activating Smad2/3 in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Calcif. Tissue Int.* 99, 500–509.
- Luft, F.C., 2013. Pseudoxanthoma elasticum and statin prophylaxis. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 91, 1129–1130.
- Luo, G., Ducy, P., McKee, M.D., Pinero, G.J., Loyer, E., Behringer, R.R., Karsenty, G., 1997. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 386, 78–81.
- Maeda, T., Matsunuma, A., Kawane, T., Horiuchi, N., 2001. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 874–877.
- Maeda, T., Matsunuma, A., Kurahashi, I., Yanagawa, T., Yoshida, H., Horiuchi, N., 2004. Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells. *J. Cell. Biochem.* 92, 458–471.
- Magee, T., Marshall, C., 1999. New Insights into the Interaction of Ras with the Plasma Membrane. *Cell* 98, 9–12.
- Mallampalli, M.P., Huyer, G., Bendale, P., Gelb, M.H., Michaelis, S., 2005. Inhibiting farnesylation reverses the nuclear morphology defect in a HeLa cell model for Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 14416–14421.

- Marconi, B., Bobyr, I., Campanati, A., Molinelli, E., Consales, V., Brisigotti, V., Scarpelli, M., Racchini, S., Offidani, A., 2015. Pseudoxanthoma elasticum and skin: Clinical manifestations, histopathology, pathomechanism, perspectives of treatment. *Intractable Rare Dis. Res.* 4, 113–122.
- Mariño, G., Ugalde, A.P., Fernández, A.F., Osorio, F.G., Fueyo, A., Freije, J.M.P., López-Otín, C., 2010. Insulin-like growth factor 1 treatment extends longevity in a mouse model of human premature aging by restoring somatotroph axis function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 16268–16273.
- Mariño, G., Ugalde, A.P., Salvador-Montoliu, N., Varela, I., Quirós, P.M., Cadiñanos, J., van der Pluijm, I., Freije, J.M.P., López-Otín, C., 2008. Premature aging in mice activates a systemic metabolic response involving autophagy induction. *Hum. Mol. Genet.* 17, 2196–2211.
- Marino, M., Scuderi, F., Mazzarelli, P., Mannella, F., Provenzano, C., Bartoccioni, E., 2001. Constitutive and cytokine-induced expression of MHC and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human myoblasts. *J. Neuroimmunol.* 116, 94–101.
- Marino, M., Scuderi, F., Provenzano, C., Scheller, J., Rose-John, S., Bartoccioni, E., 2008. IL-6 regulates MCP-1, ICAM-1 and IL-6 expression in human myoblasts. *J. Neuroimmunol.* 196, 41–48.
- Markello, T.C., Pak, L.K., St. Hilaire, C., Dorward, H., Ziegler, S.G., Chen, M.Y., Chaganti, K., Nussbaum, R.L., Boehm, M., Gahl, W.A., 2011. Vascular pathology of medial arterial calcifications in NT5E deficiency: Implications for the role of adenosine in pseudoxanthoma elasticum. *Mol. Genet. Metab.* 103, 44–50.
- Martin, L., Hoppé, E., Kauffenstein, G., Omarjee, L., Navasiolava, N., Henni, S., Willoteaux, S., Leftheriotis, G., 2017. Early arterial calcification does not correlate with bone loss in pseudoxanthoma elasticum. *Bone* 103, 88–92.
- Martin, L.J., Lau, E., Singh, H., Vergnes, L., Tarling, E.J., Mehrabian, M., Mungrue, I., Xiao, S., Shih, D., Castellani, L., Ping, P., Reue, K., Stefani, E., Drake, T.A., Bostrom, K., Lusic, A.J., 2012. ABCC6 Localizes to the Mitochondria-Associated Membrane. *Circ. Res.* 111, 516–520.
- Matsuzaki, Y., Nakano, A., Jiang, Q.-J., Pulkkinen, L., Uitto, J., 2005. Tissue-specific expression of the ABCC6 gene. *J. Invest. Dermatol.* 125, 900–905.
- Matthews, A.N., Friend, D.S., Zimmermann, N., Sarafi, M.N., Luster, A.D., Pearlman, E., Wert, S.E., Rothenberg, M.E., 1998. Eotaxin is required for the baseline level of tissue eosinophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6273–6278.
- McClintock, D., Ratner, D., Lokuge, M., Owens, D.M., Gordon, L.B., Collins, F.S., Djabali, K., 2007. The mutant form of lamin A that causes Hutchinson-Gilford progeria is a biomarker of cellular aging in human skin. *PloS One* 2, e1269.
- McKnight, G.L., Reasoner, J., Gilbert, T., Sundquist, K.O., Hokland, B., McKernan, P.A., Champagne, J., Johnson, C.J., Bailey, M.C., Holly, R., 1992. Cloning and expression of a cellular high density lipoprotein-binding protein that is up-regulated by cholesterol loading of cells. *J. Biol. Chem.* 267, 12131–12141.

- McPherron, A.C., Lawler, A.M., Lee, S.J., 1999. Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11. *Nat. Genet.* 22, 260–264.
- Mei, W., Xiang, G., Li, Y., Li, H., Xiang, Lingwei, Lu, J., Xiang, Lin, Dong, J., Liu, M., 2016. GDF11 Protects against Endothelial Injury and Reduces Atherosclerotic Lesion Formation in Apolipoprotein E-Null Mice. *Mol. Ther.* 24, 1926–1938.
- Melk, A., Kittikowit, W., Sandhu, I., Halloran, K.M., Grimm, P., Schmidt, B.M.W., Halloran, P.F., 2003. Cell senescence in rat kidneys in vivo increases with growth and age despite lack of telomere shortening. *Kidney Int.* 63, 2134–2143.
- Miglionico, R., Ostuni, A., Armentano, M.F., Milella, L., Crescenzi, E., Carmosino, M., Bisaccia, F., 2017. ABCC6 knockdown in HepG2 cells induces a senescent-like cell phenotype. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 22, 7.
- Mimoun, G., Ebran, J.-M., Grenet, T., Donati, A., Cohen, S.-Y., Ponthieux, A., 2017. Ranibizumab for choroidal neovascularization secondary to pseudoxanthoma elasticum: 4-year results from the PIXEL study in France. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. Albrecht Von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* 255, 1651–1660.
- Mo, F.M., Proia, A.D., Johnson, W.H., Cyr, D., Lashkari, K., 2010. Interferon gamma-inducible protein-10 (IP-10) and eotaxin as biomarkers in age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 4226–4236.
- Mohammadi, A., Macri, J., Newton, R., Romain, T., Dulay, D., Adeli, K., 1998. Effects of atorvastatin on the intracellular stability and secretion of apolipoprotein B in HepG2 cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18, 783–793.
- Moitra, K., Garcia, S., Jaldin, M., Etoundi, C., Cooper, D., Roland, A., Dixon, P., Reyes, S., Turan, S., Terry, S., Dean, M., 2017. ABCC6 and Pseudoxanthoma Elasticum: The Face of a Rare Disease from Genetics to Advocacy. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1488.
- Molnár, G., Dagher, M.-C., Geiszt, M., Settleman, J., Ligeti, E., 2001. Role of Prenylation in the Interaction of Rho-Family Small GTPases with GTPase Activating Proteins †. *Biochemistry* 40, 10542–10549.
- Muñoz-Espín, D., Serrano, M., 2014. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 482–496.
- Myung, J.S., Bhatnagar, P., Spaide, R.F., Klancnik, J.M., Cooney, M.J., Yannuzzi, L.A., Freund, K.B., 2010. LONG-TERM OUTCOMES OF INTRAVITREAL ANTIVASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR THERAPY FOR THE MANAGEMENT OF CHOROIDAL NEOVASCULARIZATION IN PSEUDOXANTHOMA ELASTICUM: *Retina* 30, 748–755.
- Nam, H.K., Liu, J., Li, Y., Kragor, A., Hatch, N.E., 2011. Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase-1 (ENPP1) Protein Regulates Osteoblast Differentiation. *J. Biol. Chem.* 286, 39059–39071.
- Narayanan, R.P., Gittins, M., Siddals, K.W., Oliver, R.L., Hudson, J.E., White, A., Durrington, P., Davies, R.R., Rutter, M.K., Gibson, J.M., 2013. Atorvastatin administration is

- associated with dose-related changes in IGF bioavailability. *Eur. J. Endocrinol.* 168, 543–548.
- Neldner, K.H., Struk, B., 2002. Pseudoxanthoma Elasticum. In: Royce, P.M., Steinmann, B. (Eds.), *Connective Tissue and Its Heritable Disorders*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 561–583.
- Nitschke, Y., Baujat, G., Botschen, U., Wittkamp, T., du Moulin, M., Stella, J., Le Merrer, M., Guest, G., Lambot, K., Tazarourte-Pinturier, M.-F., Chassaing, N., Roche, O., Feenstra, I., Loechner, K., Deshpande, C., Garber, S.J., Chikarmane, R., Steinmann, B., Shahinyan, T., Martorell, L., Davies, J., Smith, W.E., Kahler, S.G., McCulloch, M., Wraige, E., Loidi, L., Höhne, W., Martin, L., Hadj-Rabia, S., Terkeltaub, R., Rutsch, F., 2012. Generalized Arterial Calcification of Infancy and Pseudoxanthoma Elasticum Can Be Caused by Mutations in Either ENPP1 or ABCC6. *Am. J. Hum. Genet.* 90, 25–39.
- Nitschke, Y., Rutsch, F., 2012. Generalized arterial calcification of infancy and pseudoxanthoma elasticum: two sides of the same coin. *Front. Genet.* 3, 302.
- O'Connor, K.G., Tobin, J.D., Harman, S.M., Plato, C.C., Roy, T.A., Sherman, S.S., Blackman, M.R., 1998. Serum levels of insulin-like growth factor-I are related to age and not to body composition in healthy women and men. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 53, M176-182.
- Ogilvie, P., Bardi, G., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., Ugucioni, M., 2001. Eotaxin is a natural antagonist for CCR2 and an agonist for CCR5. *Blood* 97, 1920–1924.
- Oliver, W.T., Rosenberger, J., Lopez, R., Gomez, A., Cummings, K.K., Fiorotto, M.L., 2005. The local expression and abundance of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in skeletal muscle are regulated by age and gender but not local IGF-I in vivo. *Endocrinology* 146, 5455–5462.
- Olson, K.A., Beatty, A.L., Heidecker, B., Regan, M.C., Brody, E.N., Foreman, T., Kato, S., Mehler, R.E., Singer, B.S., Hveem, K., Dalen, H., Sterling, D.G., Lawn, R.M., Schiller, N.B., Williams, S.A., Whooley, M.A., Ganz, P., 2015. Association of growth differentiation factor 11/8, putative anti-ageing factor, with cardiovascular outcomes and overall mortality in humans: analysis of the Heart and Soul and HUNT3 cohorts. *Eur. Heart J.* 36, 3426–3434.
- Omoigui, S., 2007. The Interleukin-6 inflammation pathway from cholesterol to aging--role of statins, bisphosphonates and plant polyphenols in aging and age-related diseases. *Immun. Ageing A* 4, 1.
- Passi, A., Albertini, R., Baccarani Contri, M., de Luca, G., de Paepe, A., Pallavicini, G., Pasquali Ronchetti, I., Tiozzo, R., 1996. Proteoglycan alterations in skin fibroblast cultures from patients affected with pseudoxanthoma elasticum. *Cell Biochem. Funct.* 14, 111–120.
- Pedersen, R., Soliman, W., Lund-Andersen, H., Larsen, M., 2007. Treatment of choroidal neovascularization using intravitreal bevacizumab. *Acta Ophthalmol. Scand.* 85, 526–534.

- Pereira-Leal, J.B., Hume, A.N., Seabra, M.C., 2001. Prenylation of Rab GTPases: molecular mechanisms and involvement in genetic disease. *FEBS Lett.* 498, 197–200.
- Pfendner, E.G., Vanakker, O.M., Terry, S.F., Vourthis, S., McAndrew, P.E., McClain, M.R., Fratta, S., Marais, A.-S., Hariri, S., Coucke, P.J., Ramsay, M., Viljoen, D., Terry, P.F., De Paepe, A., Uitto, J., Bercovitch, L.G., 2007. Mutation detection in the ABCC6 gene and genotype phenotype analysis in a large international case series affected by pseudoxanthoma elasticum. *J. Med. Genet.* 44, 621–628.
- Plomp, A.S., Toonstra, J., Bergen, A.A.B., van Dijk, M.R., de Jong, P.T.V.M., 2010. Proposal for updating the pseudoxanthoma elasticum classification system and a review of the clinical findings. *Am. J. Med. Genet. A.* 152A, 1049–1058.
- Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M., Koff, A., 1994. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* 8, 9–22.
- Pomozi, V., Brampton, C., van de Wetering, K., Zoll, J., Calio, B., Pham, K., Owens, J.B., Marh, J., Moisyadi, S., Váradi, A., Martin, L., Bauer, C., Erdmann, J., Aherrahrou, Z., Le Saux, O., 2017. Pyrophosphate Supplementation Prevents Chronic and Acute Calcification in ABCC6-Deficient Mice. *Am. J. Pathol.* 187, 1258–1272.
- Prosdocimo, D.A., Douglas, D.C., Romani, A.M., O'Neill, W.C., Dubyak, G.R., 2009. Autocrine ATP release coupled to extracellular pyrophosphate accumulation in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296, C828–839.
- Puche, J.E., Castilla-Cortázar, I., 2012. Human conditions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficiency. *J. Transl. Med.* 10, 224.
- Qin, W., Infante, J., Wang, S.R., Infante, R., 1992. Regulation of HMG-CoA reductase, apoprotein-B and LDL receptor gene expression by the hypocholesterolemic drugs simvastatin and ciprofibrate in Hep G2, human and rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1127, 57–66.
- Quaglino D, Boraldi F, Annovi G, Ronchetti I, 2011. The multifaceted complexity of genetic diseases: a lesson from pseudoxanthoma elasticum. In: *Advances in the Study of Genetic Disorders*. InTech.
- Quaglino, D., Boraldi, F., Barbieri, D., Croce, A., Tiozzo, R., Pasquali Ronchetti, I., 2000. Abnormal phenotype of in vitro dermal fibroblasts from patients with Pseudoxanthoma elasticum (PXE). *Biochim. Biophys. Acta* 1501, 51–62.
- Quaglino, D., Sartor, L., Garbisa, S., Boraldi, F., Croce, A., Passi, A., De Luca, G., Tiozzo, R., Pasquali-Ronchetti, I., 2005. Dermal fibroblasts from pseudoxanthoma elasticum patients have raised MMP-2 degradative potential. *Biochim. Biophys. Acta* 1741, 42–47.
- Rajamannan, N.M., Subramaniam, M., Stock, S.R., Stone, N.J., Springett, M., Ignatiev, K.I., McConnell, J.P., Singh, R.J., Bonow, R.O., Spelsberg, T.C., 2005. Atorvastatin inhibits calcification and enhances nitric oxide synthase production in the hypercholesterolaemic aortic valve. *Heart Br. Card. Soc.* 91, 806–810.

- Ran, Y., Zheng, A., Thibodeau, P.H., 2018. Structural analysis reveals pathomechanisms associated with pseudoxanthoma elasticum-causing mutations in the ABCC6 transporter. *J. Biol. Chem.* 293, 15855–15866.
- Rebello-Marques, A., De Sousa Lages, A., Andrade, R., Ribeiro, C.F., Mota-Pinto, A., Carrilho, F., Espregueira-Mendes, J., 2018. Aging Hallmarks: The Benefits of Physical Exercise. *Front. Endocrinol.* 9, 258.
- Rhinn, M., Ritschka, B., Keyes, W.M., 2019. Cellular senescence in development, regeneration and disease. *Development* 146, dev151837.
- Ringpfeil, F., Lebwohl, M.G., Christiano, A.M., Uitto, J., 2000. Pseudoxanthoma elasticum: mutations in the MRP6 gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6001–6006.
- Rodriguez, S., Coppedè, F., Sagelius, H., Eriksson, M., 2009. Increased expression of the Hutchinson–Gilford progeria syndrome truncated lamin A transcript during cell aging. *Eur. J. Hum. Genet.* 17, 928–937.
- Rubinsztein, D.C., Mariño, G., Kroemer, G., 2011. Autophagy and Aging. *Cell* 146, 682–695.
- Russell, R.G.G., 2006. Bisphosphonates: from bench to bedside. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1068, 367–401.
- Santra, M., Dill, K.A., de Graff, A.M.R., 2019. Proteostasis collapse is a driver of cell aging and death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 22173–22178.
- Schachter, M., 2005. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 19, 117–125.
- Scheffer, G.L., Hu, X., Pijnenborg, A.C.L.M., Wijnholds, J., Bergen, A.A.B., Scheper, R.J., 2002. MRP6 (ABCC6) detection in normal human tissues and tumors. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 82, 515–518.
- Sene, A., Khan, A.A., Cox, D., Nakamura, R.E.I., Santeford, A., Kim, B.M., Sidhu, R., Onken, M.D., Harbour, J.W., Hagbi-Levi, S., Chowers, I., Edwards, P.A., Baldan, A., Parks, J.S., Ory, D.S., Apte, R.S., 2013. Impaired Cholesterol Efflux in Senescent Macrophages Promotes Age-Related Macular Degeneration. *Cell Metab.* 17, 549–561.
- Shaw, P., Brown, J., 2012. Nucleoli: Composition, Function, and Dynamics. *Plant Physiol.* 158, 44–51.
- Shelton, D.N., Chang, E., Whittier, P.S., Choi, D., Funk, W.D., 1999. Microarray analysis of replicative senescence. *Curr. Biol.* 9, 939–945.
- Shi, Y., Liu, J.-P., 2011. Gdf11 facilitates temporal progression of neurogenesis in the developing spinal cord. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 883–893.
- Shimi, T., Butin-Israeli, V., Adam, S.A., Hamanaka, R.B., Goldman, A.E., Lucas, C.A., Shumaker, D.K., Kosak, S.T., Chandel, N.S., Goldman, R.D., 2011. The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence. *Genes Dev.* 25, 2579–2593.

- Simoni-Nieves, A., Gerardo-Ramírez, M., Pedraza-Vázquez, G., Chávez-Rodríguez, L., Bucio, L., Souza, V., Miranda-Labra, R.U., Gomez-Quiroz, L.E., Gutiérrez-Ruiz, M.C., 2019. GDF11 Implications in Cancer Biology and Metabolism. Facts and Controversies. *Front. Oncol.* 9, 1039.
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., Czaja, M.J., 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458, 1131–1135.
- Sinha, M., Jang, Y.C., Oh, J., Khong, D., Wu, E.Y., Manohar, R., Miller, C., Regalado, S.G., Loffredo, F.S., Pancoast, J.R., Hirshman, M.F., Lebowitz, J., Shadrach, J.L., Cerletti, M., Kim, M.-J., Serwold, T., Goodyear, L.J., Rosner, B., Lee, R.T., Wagers, A.J., 2014. Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle. *Science* 344, 649–652.
- Sirri, V., Roussel, P., Gendron, M.C., Hernandez-Verdun, D., 1997. Amount of the two major Ag-NOR proteins, nucleolin, and protein B23 is cell-cycle dependent. *Cytometry* 28, 147–156.
- Sjögren, K., Liu, J.L., Blad, K., Skrtic, S., Vidal, O., Wallenius, V., LeRoith, D., Törnell, J., Isaksson, O.G., Jansson, J.O., Ohlsson, C., 1999. Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7088–7092.
- Spörri, B., Müller, K.M., Wiesmann, U., Bickel, M., 1999. Soluble IL-6 receptor induces calcium flux and selectively modulates chemokine expression in human dermal fibroblasts. *Int. Immunol.* 11, 1053–1058.
- Stone, N.J., Robinson, J.G., Lichtenstein, A.H., Bairey Merz, C.N., Blum, C.B., Eckel, R.H., Goldberg, A.C., Gordon, D., Levy, D., Lloyd-Jones, D.M., McBride, P., Schwartz, J.S., Shero, S.T., Smith, S.C., Watson, K., Wilson, P.W.F., 2014. 2013 ACC/AHA Guideline on the Treatment of Blood Cholesterol to Reduce Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 129, S1–S45.
- Strandberg J, 1929. Pseudoxanthoma elasticum. *Z Haut Geschlechtskr* 31 689–94.
- Szabó, Z., Váradi, A., Li, Q., Uitto, J., 2011. ABCC6 does not transport adenosine — Relevance to pathomechanism of pseudoxanthoma elasticum. *Mol. Genet. Metab.* 104, 421.
- Tiku, V., Jain, C., Raz, Y., Nakamura, S., Heestand, B., Liu, W., Späth, M., Suchiman, H.Eka.D., Müller, R.-U., Slagboom, P.E., Partridge, L., Antebi, A., 2017. Small nucleoli are a cellular hallmark of longevity. *Nat. Commun.* 8, 16083.
- Toth, J.I., Yang, S.H., Qiao, X., Beigneux, A.P., Gelb, M.H., Moulson, C.L., Miner, J.H., Young, S.G., Fong, L.G., 2005. Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear shape in fibroblasts from humans with progeroid syndromes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 12873–12878.
- Uitto, J., Li, Q., Jiang, Q., 2010. Pseudoxanthoma Elasticum: Molecular Genetics and Putative Pathomechanisms. *J. Invest. Dermatol.* 130, 661–670.

- Vanakker, O.M., Hosen, M.J., Paepe, A.D., 2013. The ABCC6 transporter: what lessons can be learnt from other ATP-binding cassette transporters? *Front. Genet.* 4, 203.
- Vanakker, O.M., Martin, L., Gheduzzi, D., Leroy, B.P., Loeys, B.L., Guerci, V.I., Matthys, D., Terry, S.F., Coucke, P.J., Pasquali-Ronchetti, I., De Paepe, A., 2007. Pseudoxanthoma elasticum-like phenotype with cutis laxa and multiple coagulation factor deficiency represents a separate genetic entity. *J. Invest. Dermatol.* 127, 581–587.
- Váradi, A., Szabó, Z., Pomozi, V., de Boussac, H., Fülöp, K., Arányi, T., 2011. ABCC6 as a target in pseudoxanthoma elasticum. *Curr. Drug Targets* 12, 671–682.
- Varela, I., Pereira, S., Ugalde, A.P., Navarro, C.L., Suárez, M.F., Cau, P., Cadiñanos, J., Osorio, F.G., Foray, N., Cobo, J., de Carlos, F., Lévy, N., Freije, J.M.P., López-Otín, C., 2008. Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nat. Med.* 14, 767–772.
- Viljoen, D.L., Bloch, C., Beighton, P., 1990. Plastic surgery in pseudoxanthoma elasticum: experience in nine patients. *Plast. Reconstr. Surg.* 85, 233–238.
- Villa-Bellocosta, R., Rivera-Torres, J., Osorio, F.G., Acín-Pérez, R., Enriquez, J.A., López-Otín, C., Andrés, V., 2013. Defective extracellular pyrophosphate metabolism promotes vascular calcification in a mouse model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome that is ameliorated on pyrophosphate treatment. *Circulation* 127, 2442–2451.
- Villeda, S.A., Luo, J., Mosher, K.I., Zou, B., Britschgi, M., Bieri, G., Stan, T.M., Fainberg, N., Ding, Z., Eggel, A., Lucin, K.M., Czirr, E., Park, J.-S., Couillard-Després, S., Aigner, L., Li, G., Peskind, E.R., Kaye, J.A., Quinn, J.F., Galasko, D.R., Xie, X.S., Rando, T.A., Wyss-Coray, T., 2011. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 477, 90–94.
- Walter, M., 2009. Interrelationships among HDL metabolism, aging, and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1244–1250.
- Wang, A.S., Ong, P.F., Chojnowski, A., Clavel, C., Dreesen, O., 2017. Loss of lamin B1 is a biomarker to quantify cellular senescence in photoaged skin. *Sci. Rep.* 7, 15678.
- Watanabe, R., Fujita, N., Sato, Y., Kobayashi, T., Morita, M., Oike, T., Miyamoto, K., Kuro-o, M., Michigami, T., Fukumoto, S., Tsuji, T., Toyama, Y., Nakamura, M., Matsumoto, M., Miyamoto, T., 2017. Enpp1 is an anti-aging factor that regulates Klotho under phosphate overload conditions. *Sci. Rep.* 7, 7786.
- Watanabe, S., Kawamoto, S., Ohtani, N., Hara, E., 2017. Impact of senescence-associated secretory phenotype and its potential as a therapeutic target for senescence-associated diseases. *Cancer Sci.* 108, 563–569.
- Watson, K.E., Abrolat, M.L., Malone, L.L., Hoeg, J.M., Doherty, T., Detrano, R., Demer, L.L., 1997. Active serum vitamin D levels are inversely correlated with coronary calcification. *Circulation* 96, 1755–1760.
- Weinberg, R.A., 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323–330.

- Wheaton, K., Campuzano, D., Ma, W., Sheinis, M., Ho, B., Brown, G.W., Benchimol, S., 2017. Progerin-Induced Replication Stress Facilitates Premature Senescence in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Mol. Cell. Biol.* 37.
- Xu, K., Yang, Y., Yan, M., Zhan, J., Fu, X., Zheng, X., 2010. Autophagy plays a protective role in free cholesterol overload-induced death of smooth muscle cells. *J. Lipid Res.* 51, 2581–2590.
- Yang, S.H., Bergo, M.O., Toth, J.I., Qiao, X., Hu, Y., Sandoval, S., Meta, M., Bendale, P., Gelb, M.H., Young, S.G., Fong, L.G., 2005. Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear blebbing in mouse fibroblasts with a targeted Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 10291–10296.
- Yang, S.H., Qiao, X., Fong, L.G., Young, S.G., 2008. Treatment with a farnesyltransferase inhibitor improves survival in mice with a Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *Biochim. Biophys. Acta* 1781, 36–39.
- Yoon, I.K., Kim, H.K., Kim, Y.K., Song, I.-H., Kim, W., Kim, S., Baek, S.-H., Kim, J.H., Kim, J.-R., 2004. Exploration of replicative senescence-associated genes in human dermal fibroblasts by cDNA microarray technology. *Exp. Gerontol.* 39, 1369–1378.
- Zarbock, R., Hendig, D., Szliska, C., Kleesiek, K., Götting, C., 2010. Analysis of MMP2 promoter polymorphisms in patients with pseudoxanthoma elasticum. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 411, 1487–1490.
- Zhang, Y., Shao, J., Wang, Z., Yang, T., Liu, S., Liu, Y., Fan, X., Ye, W., 2015. Growth differentiation factor 11 is a protective factor for osteoblastogenesis by targeting PPARgamma. *Gene* 557, 209–214.
- Zhao, J., Kingman, J., Sundberg, J.P., Uitto, J., Li, Q., 2017. Plasma PPi Deficiency Is the Major, but Not the Exclusive, Cause of Ectopic Mineralization in an *Abcc6*^{-/-} Mouse Model of PXE. *J. Invest. Dermatol.* 137, 2336–2343.
- Zineh, I., Luo, X., Welder, G.J., Debella, A.E., Wessel, T.R., Arant, C.B., Schofield, R.S., Chegini, N., 2006. Modulatory effects of atorvastatin on endothelial cell-derived chemokines, cytokines, and angiogenic factors. *Pharmacotherapy* 26, 333–340.

8. Publikationen und Poster

Publikationen in *peer-review* Zeitschriften

Tiemann, J., Wagner, T., Vanakker, O.M., Gils, M. van, Cabrera, J.-L.B., Ibold, B., Faust, I., Knabbe, C., Hendig, D., 2020. Cellular and Molecular Biomarkers Indicate Premature Aging in Pseudoxanthoma Elasticum Patients. *Aging and disease* 11, 536.

Tiemann, J., Wagner, T., Brodehl, A., Plümers, R., Faust, I., Knabbe, C., Hendig, D. The role of nuclear envelope defects and telomere length in the pathobiochemistry of pseudoxanthoma elasticum. (Manuscript in Vorbereitung)

Tiemann, J., Wagner, T., Brodehl, A., Lindenkamp, C., Plümers, R., Faust, I., Knabbe, C., Hendig, D. Linking ABCC6 deficiency in primary human dermal fibroblasts of PXE patients to p21-mediated premature cellular senescence and the development of a proinflammatory secretory phenotype. (Manuscript in Vorbereitung)

Ibold, B., Faust, I., **Tiemann, J.**, Gorgels, T.G.M.F., Bergen, A.A.B., Knabbe, C., Hendig, D., 2019. Abcc6 deficiency in mice leads to altered ABC transporter gene expression in metabolic active tissues. *Lipids Health Dis.* 18, 2.

Ibold, B., Ceglarek, U., Dittrich, J., Zögner, B., Faust, I., **Tiemann, J.**, Gorgels, Bergen, T. A., Knabbe, C., Hendig, D. Genetic deletion of Abcc6 disturbs cholesterol homeostasis in mice. (Manuscript in Revision)

Kongressbeiträge und Posterpräsentationen

J. Tiemann, T. Wagner, R. Plümers, I. Faust, C. Knabbe, D. Hendig. (2019). The role of telomere attrition and nuclear envelope defects in p21-induced cellular senescence of dermal fibroblasts from pseudoxanthoma elasticum patients.

16. Jahrestagung, Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), Magdeburg, Deutschland.
J Lab Med 2019; 43(4): eA40

J. Tiemann, T. Wagner, T. Ly, B. Ibold, O. Vanakker, I. Faust, C. Knabbe, D. Hendig. (2018). First insights into the senescence associated secretory phenotype and its possible role in pseudoxanthoma elasticum.

15. Jahrestagung, Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), Mannheim, Deutschland.
J Lab Med 2018; 42(4): eA23

9. Lebenslauf

Janina Tiemann M.Sc.

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 14.04.1991
 Geburtsort: Bielefeld
 Nationalität: deutsch

Studium

11/2016 – heute Promotion am Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin des Herz- und Diabeteszentrum NRW

Thema: Analyse zellulärer und molekularer Alterungsprozesse bei Pseudoxanthoma elasticum

10/2013 – 09/2016

Universität Bielefeld

Masterstudiengang: molekulare Biotechnologie

Masterarbeit bei Novo Nordisk A/S in Kopenhagen (Dänemark) zu dem Thema: “Optimizing episomal CHO cell expression of complex proteins”

10/2010 – 09/2013

Universität Bielefeld

Bachelorstudiengang: molekulare Biotechnologie

Bachelorarbeit am Herz- und Diabeteszentrum NRW zu dem Thema: „Einfluss von exogenem Methylglyoxal auf die intrazelluläre Proteinmodifikation und Homöostase der extrazellulären Matrix“

Schulbildung

07/2001 – 06/2010

Widukind-Gymnasium Enger

Abschluss: allgemeine Hochschulreife

10. Erklärung

Hiermit erkläre ich, Janina Tiemann, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Stellen, die ich wörtlich oder dem Sinne nach aus Veröffentlichungen entnommen habe, habe ich als solches kenntlich gemacht.

Bielefeld, 11.02.2020

Ort, Datum

J. Tiemann

Unterschrift