

Untersuchungen zur Pathobiochemie
der extrazellulären Matrix bei
Pseudoxanthoma elasticum (PXE)

Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
an der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Ralf Zarbock
aus Lüneburg

Bielefeld / Bad Oeynhausen
Dezember 2009

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von

Prof. Dr. med. Knut Kleesiek

am

Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin

Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen

Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum

in Bad Oeynhausen

in der Zeit von

Januar 2007 bis Dezember 2009

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Kleesiek

2. Gutachter: Prof. Dr. T. Dierks

Tag der mündlichen Prüfung: 23. April 2010

Wer will etwas Lebendigs erkennen und beschreiben,
Sucht erst den Geist heraus zu treiben,
Dann hat er die Teile in seiner Hand,
Fehlt, leider! nur das geistige Band.

JOHANN WOLFGANG VON GOETHE, FAUST I

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Knut Kleesiek danke ich für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes sowie für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Thomas Dierks danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Besonders möchte ich Herrn Privatdozent Dr. Christian Götting für viele hilfreiche Ratschläge und die ausgezeichnete Unterstützung meiner Arbeit danken.

Ebenso möchte ich Frau Dr. Doris Hendig für die gute Zusammenarbeit und ihr außergewöhnliches Engagement für die PXE-Forschung danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Prof. Dr. med. Christiane Szliska vom Krankenhaus Bethesda in Freudenberg sowie Herrn Dr. med. Robert Finger von der Universitätsaugenklinik in Bonn für die fruchtbare Zusammenarbeit in der PXE-Forschung.

Ebenfalls herzlich bedanken möchte ich mich bei den Mitgliedern der Selbsthilfegruppe für PXE-Erkrankte Deutschlands 1999 e.V. für ihren unermüdlichen Einsatz und die großartige Unterstützung unserer Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Christian Kaltschmidt und Herrn Dr. Darius Widera, Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld, danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Transformation primärer humaner Zellen.

Meinen Kollegen Michael Ambrosius, Javier Carrera Casanova, Marlen Ewald, Dennis Hinse, Joachim Kuhn, Christoph Lichtenberg, Benjamin Müller, Claudia Pönighaus, Christian Prante, Christina Roch, Melanie Störmer, Anne-Kathrin Vollmer und Tanja Vollmer danke ich für die gute Zusammenarbeit und produktive Arbeitsatmosphäre im Institut.

Meinen ehemaligen Praktikanten und Diplomanden Ulf Diekmann und Leif Krückemeier danke ich für ihre ausgezeichneten Beiträge zum Gelingen dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung danken, ohne die weder mein Studium noch diese Arbeit möglich gewesen wären.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
1. Summary	2
2. Einleitung	3
2.1. <i>Pseudoxanthoma elasticum</i> (PXE)	3
2.1.1. ABCC6 / MRP6.....	4
2.1.2. Klinische Manifestationen von PXE	4
2.1.2.1. Haut	5
2.1.2.2. Herz-Kreislauf-System	5
2.1.2.3. Okulare Manifestationen	6
2.1.2.4. Andere Organe.....	7
2.1.3. Histopathologie	7
2.1.4. Pathophysiologie	8
2.1.5. <i>Vascular endothelial growth factor</i> (VEGF).....	11
2.1.6. „ <i>Modifier</i> “-Gene	11
2.2. Die extrazelluläre Matrix (ECM)	12
2.2.1. Veränderungen der ECM bei PXE	12
2.2.2. Proteoglykane.....	13
2.2.3. Glykosaminoglykane.....	14
2.2.4. Biosynthese von Glykosaminoglykanen	15
2.2.4.1. Xylosyltransferasen	18
2.2.5. Hyaluronsäure	18
2.2.6. Umbau der extrazellulären Matrix.....	19
2.2.6.1. Matrix-Metalloproteinasen	20

2.2.6.2. MMP-2	21
2.2.6.3. MMP-9	22
2.2.6.4. MMP-14	22
2.2.6.5. Gewebeinhibitoren von Matrix-Metalloproteinasen (TIMPs).....	22
2.3. Gen- <i>knockdown</i> mittels siRNA-vermittelter RNA-Interferenz.....	23
2.4. Immortalisierung primärer Zellen	24
2.5. Gegenstand und Ziele der vorliegenden Arbeit.....	25
3. Ergebnisse	26
3.1. Analysen zur Genexpression dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten	26
3.1.1. Optimierung von spezifischen <i>realtime</i> PCRs.....	26
3.1.2. Auswahl konstant exprimierter Haushaltsgene	28
3.1.3. Relative Quantifizierung der Genexpression ausgewählter Proteine der ECM in PXE-Fibroblasten und Kontrollzellen.....	31
3.1.4. Relative Quantifizierung der Genexpression ausgewählter, an der GAG-Biosynthese beteiligter Proteine.....	33
3.1.4.1. Analyse der Expression der an der Synthese des Tetrasaccharid- <i>Linkers</i> beteiligten Gene	35
3.1.4.2. Analyse der Expression der an der Initiation und Verlängerung der GAG-Kette beteiligten Gene	35
3.1.4.3. Analyse der Expression der an der Modifizierung der GAG-Kette beteiligten Gene ..	36
3.1.5. Relative Quantifizierung der Genexpression ausgewählter Metalloproteinasen und Proteinase-Inhibitoren.....	37
3.1.6. Zusammenfassung der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse	38
3.2. Untersuchung der Auswirkungen eines <i>ABCC6-knockdowns</i> auf die Genexpression dermalen PXE-Fibroblasten.....	40
3.2.1. siRNA-vermittelter <i>knockdown</i> von <i>ABCC6</i>	40

3.2.2. Auswirkungen eines <i>ABCC6-knockdowns</i> auf die Genexpression von ECM-Proteinen	43
3.2.3. Auswirkungen eines <i>ABCC6-knockdowns</i> auf die Genexpression der an der GAG-Biosynthese beteiligten Proteine.....	45
3.2.4. Zusammenfassung der Auswirkungen eines <i>ABCC6-knockdowns</i> auf die Genexpression.	49
3.3. Analyse der Glykosaminoglykan-Zusammensetzung in Zellkulturüberstand und Zell-Layer dermaler Fibroblasten von PXE-Patienten und gesunden Kontrollpersonen	50
3.3.1. Vergleich der Δ -Disaccharid-Zusammensetzung der GAGs in Zellkulturüberständen von PXE-Fibroblasten und normalen Kontrollzellen	50
3.3.2. Vergleich der Δ -Disaccharid-Zusammensetzung der GAGs im Zell-Layer von PXE-Fibroblasten und normalen Kontrollzellen	52
3.3.3. Auswirkungen eines <i>ABCC6-knockdowns</i> auf die Δ -Disaccharid-Zusammensetzung der GAGs im Zellkulturüberstand von normalen Kontrollzellen und PXE-Fibroblasten	54
3.3.3.1. Chondroitinsulfat Δ -Disaccharide	54
3.3.3.2. Heparansulfat Δ -Disaccharide	59
3.4. Analyse der Xylosyltransferase-Aktivität dermaler Fibroblasten von PXE-Patienten und Kontrollpersonen	60
3.4.1. Vergleich der Xylosyltransferase-Aktivität in den Zellkulturüberständen von dermalen PXE-Fibroblasten und normalen Kontrollzellen	60
3.4.2. Auswirkungen eines <i>ABCC6-knockdowns</i> auf die Xylosyltransferase-Aktivität.....	61
3.5. Identifizierung von genetischen Kofaktoren für <i>Pseudoxanthoma elasticum</i>	63
3.5.1. Matrix-Metalloproteinase 2	63
3.5.1.1. Haplotypen-Analyse der SNPs im <i>MMP2</i> -Gen.....	65
3.5.1.2. Assoziation von Haplotypen mit PXE.....	65
3.5.2. Matrix-Metalloproteinase 9	67
3.5.3. Matrix-Metalloproteinase 14	67
3.5.3.1. Haplotypen-Analyse der SNPs im <i>MMP14</i> -Gen.....	68
3.5.3.2. Assoziation von Haplotypen mit PXE.....	68

3.5.4. <i>Vascular endothelial growth factor</i>	69
3.5.4.1. Assoziation einzelner SNPs im <i>VEGFA</i> -Gen mit PXE	69
3.5.4.2. Assoziation einzelner SNPs mit dem Schweregrad der Retinopathie	70
3.5.4.3. Multivariate SNP-Analyse.....	71
3.5.4.4. Haplotypen-Analyse	72
3.5.4.5. Assoziation von Haplotypen mit PXE.....	72
3.5.4.6. Auswirkungen von <i>VEGFA</i> -Haplotypen auf die okulare Manifestation	74
3.6. Analyse von Biomarkern der ECM-Remodulierung bei PXE-Patienten	75
3.6.1. Matrix-Metalloproteinase 2 im Serum	75
3.6.2. Matrix-Metalloproteinase 9 im Serum	76
3.7. Generierung und Charakterisierung einer PXE-Dermalfibroblasten-Zelllinie als PXE-Modellsystem	78
3.7.1. Immortalisierung von PXE-Fibroblasten	78
3.7.2. Charakterisierung der immortalisierten PXE-Dermalfibroblasten	78
4. Diskussion	81
4.1. Analysen zur Genexpression dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten	81
4.1.1. Vergleich der Expression ausgewählter ECM-Gene zwischen PXE-Fibroblasten und Kontrollzellen	84
4.1.2. Vergleich der Expression der an der GAG-Biosynthese beteiligten Gene zwischen PXE-Fibroblasten und Kontrollzellen	87
4.1.3. Vergleich der Expression von Matrix-Metalloproteinasen und Proteinase-Inhibitoren zwischen PXE-Fibroblasten und Kontrollzellen	87
4.1.4. Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressionsanalyse und Schlussfolgerungen.....	88
4.2. Untersuchung der Auswirkungen eines <i>ABCC6-knockdowns</i> auf die Genexpression dermalen PXE-Fibroblasten.....	89

4.3. Analyse der Glykosaminoglykan-Zusammensetzung in Zellkulturüberstand und Zell-Layer dermaler Fibroblasten von PXE-Patienten und gesunden Kontrollpersonen.....	91
4.3.1. Vergleich der Δ -Disaccharid-Zusammensetzung der GAGs in Zellkulturüberständen von PXE-Fibroblasten und normalen Kontrollzellen	91
4.3.2. Auswirkungen eines <i>ABCC6-knockdowns</i> auf die Disaccharid-Zusammensetzung	94
4.4. Analyse der Xylosyltransferase-Aktivität dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten und Kontrollpersonen.....	95
4.4.1. Vergleich der Xylosyltransferase-Aktivität in den Zellkulturüberständen von dermalen PXE-Fibroblasten und normalen Kontrollzellen	95
4.4.2. Auswirkungen eines <i>ABCC6-knockdowns</i> auf die Xylosyltransferase-Aktivität.....	95
4.5. Identifizierung von genetischen Kofaktoren für <i>Pseudoxanthoma elasticum</i>	96
4.5.1. Matrix-Metalloproteinase 2	96
4.5.2. Matrix-Metalloproteinase 9	97
4.5.3. Matrix-Metalloproteinase 14	97
4.5.4. Polymorphismen im <i>VEGFA</i> -Gen.....	98
4.6. Analyse von Biomarkern der ECM-Remodulierung bei PXE-Patienten	102
4.7. Generierung und Charakterisierung einer PXE-Dermalfibroblasten-Zelllinie als PXE-Modellsystem.....	105
4.8. Fazit und Ausblick.....	105
5. Methoden.....	107
5.1. Molekularbiologische Methoden.....	107
5.1.1. Isolierung genomischer DNA aus EDTA-Blut.....	107
5.1.2. Isolierung von Gesamt-RNA.....	107
5.1.3. Quantifizierung von Gesamt-RNA.....	107
5.1.4. Agarosegel-Elektrophorese und Größenbestimmung der DNA-Fragmente.....	107
5.1.5. DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	107

5.1.6. Aufreinigung von DNA-Fragmenten	108
5.1.7. Sequenzierung von DNA-Fragmenten	109
5.1.8. Nachweis von Mutationen durch RFLP-Analyse.....	109
5.1.9. Nachweis von Mutationen durch allelspezifische PCR (ARMS).....	112
5.1.10. cDNA-Synthese (reverse Transkription).....	112
5.1.11. <i>realtime</i> PCR	112
5.1.12. Datenauswertung	113
5.2. Zellbiologische Methoden	114
5.2.1. Kultivierung von Säugerzellen.....	114
5.2.2. Passagieren von adhärent wachsenden Zellen.....	114
5.2.3. Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	114
5.2.4. Transfektion primärer humaner Dermalfibroblasten mittels Elektroporation	114
5.2.5. Selektion stabiler Klone	115
5.2.6. Bestimmung von Zellzahl und Vitalität	115
5.2.7. Cryokonservierung und Revitalisierung von primären humanen Dermalfibroblasten.....	115
5.2.8. Transfektion primärer humaner Fibroblasten mit siRNA.....	116
5.2.9. Ernte der revers transfizierten Zellen	116
5.2.10. β -Galaktosidase-Färbung.....	116
5.3. Klinisch-chemische Methoden	117
5.3.1. Radiochemischer XT-Aktivitätstest	117
5.3.1.1. Präparation des Seidenfibroins	117
5.3.1.2. Radiochemischer Aktivitätstest	117
5.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test.....	118
5.3.3. Bestimmung der Konzentration der Matrix-Metalloproteinase 2 im Serum.....	118

5.3.4. Bestimmung der Konzentration der Matrix-Metalloproteinase 9 im Serum.....	118
5.4. Glykosaminoglykan-Analytik	119
5.4.1. Isolierung von Glykosaminoglykanen aus Zellkulturüberständen	119
5.4.2. Isolierung von Glykosaminoglykanen aus kultivierten humanen Dermalfibroblasten	119
5.4.3. Aufspaltung von Glykosaminoglykanen in Δ -Disaccharide	119
5.4.4. Derivatisierung von Δ -Disacchariden mit 2-Aminoacridon.....	120
5.4.5. HPLC-Analytik	120
6. Patienten und Material.....	121
6.1. Patienten- und Kontrollkohorten	121
6.1.1. Kohorten für die molekularbiologischen Untersuchungen.....	121
6.1.2. Kohorten für die Serum-Untersuchungen.....	122
6.2. Chemikalien und Reagenzien.....	123
6.3. Puffer und Lösungen	125
6.4. Medien und Reagenzien für die Zellkultur.....	126
6.5. Enzyme.....	126
6.6. Geräte	127
6.7. Kommerzielle Reaktions- und Nachweissysteme	128
6.8. Längen- und Größenstandards.....	128
6.9. Oligonucleotide	129
6.9.1. siRNAs für den <i>ABCC6-knockdown</i>	129
6.9.2. Primer für die Analyse von Polymorphismen	129
6.9.3. Primer für die <i>realtime</i> RT-PCR	131
6.10. Software und Datenbanken.....	137
6.11. Zellen.....	137

6.12. Plasmide	138
6.13. Sonstige Materialien.....	139
7. Abkürzungen	140
8. Literatur.....	142
9. Publikationen und Präsentationen	160
9.1. Publikationen.....	160
9.2. Kongressbeiträge.....	161
10. Anhang	162

1. Zusammenfassung

Pseudoxanthoma elasticum (PXE) ist eine seltene vererbare Erkrankung, die durch eine umfangreiche Umstrukturierung der extrazellulären Matrix (ECM) charakterisiert ist. Mutationen im *ABCC6*-Gen wurden als PXE-verursachend identifiziert. Ein eindeutiger pathophysiologischer Zusammenhang zwischen *ABCC6* und den klinischen Symptomen der Krankheit konnte bis heute nicht hergestellt werden. Insbesondere ist unklar, welche molekularen Mechanismen zum beobachteten Umbau der ECM führen. Der Verlauf von PXE sowie die Schwere der Symptomatik sind sehr heterogen. Neben Umweltfaktoren beeinflussen auch genetische Kofaktoren das individuelle Krankheitsbild der Patienten.

Zur Identifizierung genetischer Kofaktoren wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 29 Polymorphismen in den vier Kandidatengen *MMP2*, *MMP9*, *MMP14* und *VEGFA* untersucht. Der Vergleich der Allelfrequenzen ergab eine signifikante Assoziation der Polymorphismen c.-1575G>A, c.-1306C>T und c.-790T>G im Promotor des *MMP2*-Gens mit PXE. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Polymorphismen im *VEGFA*-Gen mit dem Schweregrad der mit PXE regelmäßig einhergehenden Retinopathie assoziiert sind und dass die *VEGFA*-Allele c.-460T und c.674C unabhängige Risikofaktoren für einen schweren Verlauf der Retinopathie darstellen.

Um die Veränderung der ECM zu charakterisieren, wurde mittels *realtime* RT-PCR eine umfangreiche vergleichende Analyse der Genexpression dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten und gesunden Spendern durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen signifikante Veränderungen der Expression bei PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Zellen gesunder Spender für eine Reihe von Genen, die ECM-Proteine codieren sowie für Gene, die an der Synthese von Glykosaminoglykanen (GAGs) beteiligt sind. Weiterhin konnte eine Veränderung des Genexpressionsmusters der PXE-Fibroblasten im Verlauf der Kultivierung nachgewiesen werden. Anhand einer in normalen Fibroblasten unter Verwendung von siRNA induzierten *ABCC6*-Defizienz konnten die gefundenen Expressions-Veränderungen im wesentlichen reproduziert und somit in einen direkten Zusammenhang mit einem *ABCC6*-Mangel gestellt werden.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit konnte durch eine Analyse der von GAGs abgeleiteten Δ -Disaccharide mittels einer HPLC-Methode eine verstärkte Synthese von GAGs durch PXE-Fibroblasten im Vergleich zu Zellen gesunder Spender demonstriert werden, die auch von einer erhöhten Aktivität der Xylosyltransferase, des initialen Enzyms der GAG-Biosynthese, begleitet wurde. Sowohl die veränderte GAG-Synthese als auch die Erhöhung der Xylosyltransferase-Aktivität bei PXE-Fibroblasten konnte in normalen dermalen Fibroblasten durch eine siRNA-induzierte *ABCC6*-Defizienz reproduziert werden. Damit gelang es, einen direkten Zusammenhang zwischen einem Mangel an *ABCC6* und der bei PXE veränderten Synthese von GAGs herzustellen.

Im Rahmen der Suche nach Biomarkern für eine nichtinvasive Erfassung der Remodulierung der ECM bei PXE konnten in dieser Arbeit erstmals signifikant erhöhte Konzentrationen von MMP-2 und MMP-9 im Serum von PXE-Patienten nachgewiesen werden. Damit gelang es, die Hypothese einer Beteiligung von Matrix-Metalloproteinasen an der Degeneration von ECM-Strukturen bei PXE entscheidend zu untermauern.

Schließlich konnten durch Transfektion mit einem Telomerase-codierenden Plasmid primäre dermale Fibroblasten von PXE-Patienten immortalisiert und so eine PXE-Dermalfibroblasten-Zelllinie etabliert werden, die nun für Studien der Auswirkungen einer *ABCC6*-Defizienz zur Verfügung steht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit gewähren neue Einsichten in die molekularen Mechanismen der ECM-Umstrukturierung, die das hervorstechende Merkmal von PXE ist, sowie in die genetischen Faktoren, die die Ausprägung des klinischen Phänotyps beeinflussen.

1. Summary

Pseudoxanthoma elasticum (PXE) is a rare inheritable disorder that is characterized by extensive remodelling of the extracellular matrix (ECM). PXE is caused by mutations in the *ABCC6* gene. By now, no conclusive pathophysiological connection between *ABCC6* and the clinical findings of the disease could be established. Particularly, the molecular mechanisms leading to the ECM alterations are unknown. The clinical picture of PXE is highly variable, with age at disease onset and the number and magnitude of its symptoms differing considerably among patients. The individual disease phenotype is believed to be determined by environmental and genetic factors.

In order to identify genetic cofactors of PXE, 29 polymorphisms in four candidate genes, namely *MMP2*, *MMP9*, *MMP14* and *VEGFA*, have been examined in this study. Comparison of allelic frequencies showed association of the polymorphisms c.-1575G>A, c.-1306C>T and c.-790T>G in the promoter of the *MMP2* gene with PXE. Additionally, polymorphisms in the *VEGFA* gene could be shown to be associated with the retinopathy frequently accompanying PXE. Moreover, logistic regression analysis identified the c.-460T and the c.674C alleles of *VEGFA* as independent risk factors for the development of severe retinopathy.

An extensive analysis of the expression of ECM genes by dermal fibroblasts from PXE patients was performed and the data were compared with gene expression data of fibroblasts originating from healthy donors. The results showed significant alterations of the expression of several ECM genes as well as of genes connected to glycosaminoglycan (GAG) synthesis in PXE patients. Furthermore, a variation of the gene expression profile during prolonged in vitro cultivation could be demonstrated. Using siRNA mediated gene knockdown, *ABCC6* deficiency was induced in normal dermal fibroblasts. In this model, gene expression variations that had been found in cells from PXE patients could be reproduced, thereby establishing a direct connection with lack of *ABCC6* activity.

In another part of this work, Δ -disaccharides derived from GAGs produced by PXE fibroblasts were analyzed using a HPLC method and compared with the Δ -disaccharide composition of GAGs produced by normal dermal fibroblasts. The results showed an increased GAG synthesis by PXE fibroblasts which was accompanied by increased activity of xylosyltransferase, the initial enzyme in GAG biosynthesis. Both findings also occurred in normal dermal fibroblasts treated with siRNA against *ABCC6*. These findings point towards a direct interaction between *ABCC6* deficiency and modified GAG synthesis.

Analysis of serum concentrations of matrix metalloproteinases in PXE patients and healthy control subjects showed significantly increased levels of MMP-2 and MMP-9 in the serum of PXE patients. For the first time, these results show an increased proteolytic potential in the serum of PXE patients, thereby corroborating the involvement of matrix metalloproteinases in PXE pathogenesis.

Finally, by transfection with a plasmid coding for the catalytic subunit of human telomerase, fibroblasts from PXE patients were immortalized and a PXE fibroblast cell line was established, which is ready to be used as a cell model for studying consequences of *ABCC6* deficiency.

In summary, the results of the present work provide new insights into the mechanisms and genes involved in ECM remodelling, which is the hallmark of PXE.

2. Einleitung

2.1. *Pseudoxanthoma elasticum* (PXE)

Pseudoxanthoma elasticum (PXE; Groenblad-Strandberg-Syndrom; OMIM 264800, 177850) ist eine vererbte Erkrankung, bei der es zu einer Anreicherung mineralisierter und fragmentierter elastischer Fasern in der Haut, der Bruch-Membran des Auges und den Gefäßwänden kommt [1]. Das klinische Erscheinungsbild von PXE ist gekennzeichnet durch charakteristische Veränderungen der Haut (weiche elfenbeinfarbene Papeln, besonders im Bereich des Halses), des Augenhintergrundes (*Peau d'orange*, angioide Streifen und sekundäre Neovaskularisationen) und des kardiovaskulären Systems (periphere arterielle Verschlusskrankheit, Erkrankungen der Herzkranzgefäße, gastrointestinale Blutungen) [2, 3]. Die klinische Ausprägung von PXE ist hochgradig heterogen, mit einer hohen Variabilität im Erkrankungsalter, Verlauf und Schwere der Symptomatik, selbst innerhalb von Familien [4].

Im Jahr 2000 konnten Mutationen im *ABCC6*-Gen auf Chromosom 16p13.1 als ursächlich für PXE identifiziert werden [5-7]. *ABCC6* codiert für einen ATP-abhängigen Membrantransporter, der zur Familie der *multidrug resistance associated proteins* (MRP-Proteine) gehört. Es wird vermutet, dass eine Einschränkung der Funktion von *ABCC6* aufgrund von Mutationen bzw. das völlige Fehlen eines Genprodukts als Folge von *nonsense-mediated decay* in einem reduzierten oder fehlenden Transport von bislang unbekanntem Substraten resultiert. Epigenetische Mechanismen könnten ebenfalls zu einer reduzierten Expression von *ABCC6* führen [8].

PXE scheint in der gesamten Weltbevölkerung verbreitet zu sein, die Prävalenz wird auf mindestens 1:70.000 geschätzt [9, 10]. Neueren Erkenntnissen zufolge wird PXE ausschließlich autosomal-rezessiv vererbt. Es treten jedoch vereinzelt pseudodominante Erbgänge auf [11]. Frauen sind offenbar häufiger von der Erkrankung betroffen, eine Erklärung dafür gibt es bislang nicht [9]. Eine Anzahl von heterozygoten Trägern zeigt milde Symptome der Krankheit [12]. Offenbar genügt schon das Vorliegen einer Mutation in einer Kopie des *ABCC6*-Gens, um eine Veränderung der elastischen Fasern zu bewirken [13]. Die in Europa am häufigsten vorkommende Mutation p.R1141X führt jedoch nach einer Studie von Wegman *et al.* bei heterozygoten Trägern gewöhnlich nicht zu einem Auftreten von PXE-Symptomen [14]. Jüngste Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass bei heterozygoten Mutationsträgern das Vorhandensein einer weiteren Mutation in einem anderen Gen zur Manifestation eines PXE-ähnlichen Phänotyps führen kann [15].

2.1.1. ABCC6 / MRP6

ABCC6 gehört zur Subfamilie C der Transporter mit ATP-bindender Kassette (ABC-Transporter). Diese Proteinfamilie ist beteiligt an einer großen Vielfalt unterschiedlicher physiologischer Funktionen, darunter Signaltransduktion, Proteinsekretion, Resistenz gegenüber Medikamenten und Antigenpräsentation [16]. Das humane *ABCC6*-Gen umfasst 31 Exons und etwa 75 kb genomischer DNA auf Chromosom 16p13.1. Diese Region enthält auch zwei eng verwandte, aber nicht funktionelle Pseudogene mit der Bezeichnung *ABCC6-ψ1* und *ABCC6-ψ2*, die den Exons 1 bis 9 bzw. 1 bis 4 des codierenden Gens entsprechen [17]. Die große Ähnlichkeit der Sequenz zwischen codierendem Gen und den beiden Pseudogenen erschwert die Mutationsdetektion. Die *ABCC6*-mRNA ist ungefähr 6 kb lang und enthält ein offenes Leseraster von 4,5 kb, welches für das *Multidrug resistance associated protein 6* (MRP6) codiert [18]. *ABCC6*/MRP6 umfasst 1503 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 165 kDa und beinhaltet 17 Transmembranhelices und zwei evolutionär konservierte intrazelluläre Nukleotidbindungsdomänen (Abbildung 2-1). Diese enthalten Walker A- und B-Motive sowie ein C-Motiv, das entscheidend ist für die Bindung von ATP und für die Transportfunktion. *ABCC6* wird hauptsächlich in Leber und Niere stark exprimiert [6, 19]. Obwohl gezeigt werden konnte, dass unter *in vitro* Bedingungen das anionische Zyklopentapeptid BQ-123, ein strukturelles Analogon des Neuropeptids Endothelin, sowie Glutathion-Konjugate organischer Anionen wie Leukotrien C4 von *ABCC6* transportiert werden [20], sind die genaue physiologische Funktion und das von *ABCC6* *in vivo* transportierte Substrat unbekannt. Das Protein ist jedoch wahrscheinlich beteiligt am aktiven Transport von intrazellulären Stoffen in die extrazelluläre Umgebung. Mutationen, die zu einem Funktionsverlust von *ABCC6* führen, sind ursächlich für PXE. Bis heute konnten über 300 verschiedene, PXE-verursachende Mutationen im *ABCC6*-Gen bei Patienten unterschiedlicher Herkunft identifiziert werden [21, 22]. Darunter sind *nonsense*- und *missense*-Mutationen, Spleißstellenalterationen, Insertionen und Deletionen, teilweise des kompletten Gens. Die bei PXE-Patienten kaukasischen Ursprungs am häufigsten auftretenden Mutationen sind p.R1141X in Exon 24 mit einer Prävalenz von etwa 30 % sowie eine Deletion der Exons 23 bis 29 (p.A999-S1403del), die bei etwa 20 % der US-amerikanischen und 12 % der europäischen Patienten auf mindestens einem Allel vorliegt [23]. Es wurde spekuliert, dass *nonsense*-Mutationen häufiger mit einer schwereren Krankheitsausprägung assoziiert sind [24]. Bisher konnte jedoch keine eindeutige Korrelation zwischen dem *ABCC6*-Genotyp und dem beobachteten Phänotyp hergestellt werden [23, 25-27].

2.1.2. Klinische Manifestationen von PXE

Die klinischen Manifestationen konzentrieren sich auf drei Hauptorgansysteme des Körpers: die Haut, die Augen und das kardiovaskuläre System. Darüber hinaus gibt es vereinzelte Berichte über Manifestationen in anderen Organen.



Abbildung 2-2: Von PXE betroffene Hautpartien am Hals einer weiblichen Patientin (links; [2]) und eines männlichen Patienten (rechts; [28]) mit charakteristischen Papeln und exzessiver Faltenbildung.

2.1.2.3. Okulare Manifestationen

So gut wie alle von PXE betroffenen Patienten entwickeln okulare Manifestationen, die in den meisten Fällen die Symptome sein dürften, die das Leben der Patienten am schwerwiegendsten beeinträchtigen [29]. Häufige Befunde sind *Peau d'orange*, angioide Streifen und choroidale Neovaskularisation (CNV) [2]. Während für die *Peau d'orange* bisher kein histologisches Korrelat bekannt ist, handelt es sich bei den angioden Streifen offenbar um Risse in der Bruch-Membran des Auges. CNV tritt als Komplikation der angioden Streifen bei vielen Patienten auf und führt im Verlauf der Krankheit häufig zu erheblichen Visus-Beeinträchtigungen bis hin zum kompletten Verlust des zentralen Sehvermögens.

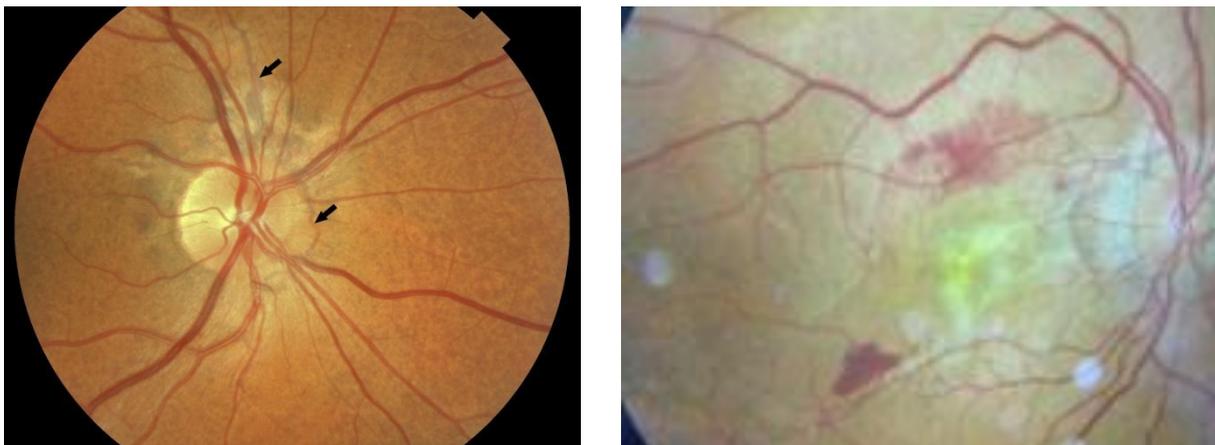


Abbildung 2-3: Fundusfotografien von PXE-Patienten. Auf dem linken Bild [22] markieren die Pfeile angioide Streifen, die starke Ähnlichkeit mit Blutgefäßen aufweisen. Das rechte Bild [28] zeigt ein fortgeschrittenes Stadium der Retinopathie mit Einblutungen als Folge der choroidalen Neovaskularisation.

Es existieren gewisse Parallelen zwischen der mit PXE assoziierten Retinopathie und anderen, mit pathologischer Neovaskularisation einhergehenden Augenerkrankungen wie der feuchten Form der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) und der proliferativen diabetischen Retinopathie (PDR). Basierend auf diesen Parallelen scheint es naheliegend anzunehmen, dass diese Erkrankungen gewisse Pathomechanismen mit der PXE-assozierten Retinopathie gemeinsam haben. Tatsächlich zeigte der anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab, der zur Behandlung der AMD eingesetzt wird, eine gewisse Wirksamkeit im Einsatz bei PXE-Patienten mit ausgeprägter Retinopathie [29, 30]

2.1.2.4. Andere Organe

Offenbar sind sämtliche Organe von den für PXE typischen Veränderungen der elastischen Fasern betroffen, auch wenn dies nicht in allen Fällen zu funktionalen Einschränkungen führt [31]. Kalzifizierungen in abdominalen Organen, den Nieren sowie in Brüsten und Hoden sind in der Literatur beschrieben [32, 33].

2.1.3. Histopathologie

Histologisch kann PXE charakterisiert werden durch eine fortschreitende Degeneration der elastischen Fasern mit begleitender Kalzifizierung und eine massive Akkumulation von Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix (Abbildung 2-4). Die Degeneration der elastischen Fasern betrifft alle weichen Bindegewebe, auch in Abwesenheit von klinischen Manifestationen [31, 34]. Die Lokalisation der Veränderungen legt die Vermutung nahe, dass Fibroblasten in die Pathogenese der Erkrankung involviert sind. Für PXE typisch sind das Vorliegen von polymorphen, fragmentierten und mineralisierten elastischen Fasern, kaum organisierte Kollagenbündel, Ablagerungen von Fadenähnlichem Material in den mineralisierten Bereichen, zahlreiche Fibroblasten mit hypertrophem endoplasmatischem Retikulum sowie das Vorhandensein von Makrophagen in der Nähe der kalzifizierten Bereiche [31].

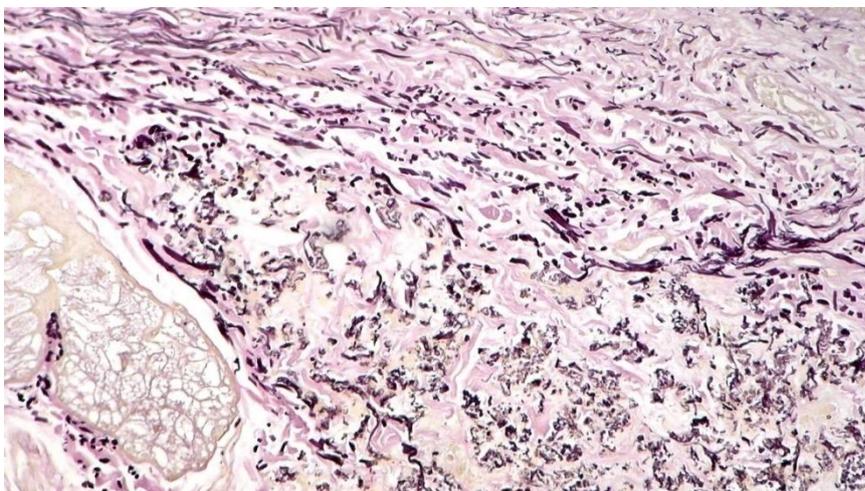


Abbildung 2-4: Histologischer Befund bei PXE [28]. Die Abbildung zeigt eine Hautbiopsie aus einer PXE-Läsion nach Weigert- und von Kossa-Färbung. Man sieht kurze, fragmentierte und ausgefransete elastische Fasern und mikroskopische, granuläre Ablagerungen von Calcium als schwarze Punkte entlang der Fasern.

Bei den bei PXE beobachteten Calciumphosphat-Präzipitaten handelt es sich zum einen um feine Ablagerungen im Kern der elastischen Fasern, zum anderen um große Präzipitate, die die elastischen Fasern deformieren und zu deren Bruch führen. In den Gefäßwänden finden sich ebenfalls mineralische Ablagerungen, die denen in der Haut sehr ähnlich sind, sich von den für den atherosklerotischen Prozess typischen aber deutlich unterscheiden [34].

2.1.4. Pathophysiologie

Die Identifizierung von *ABCC6* als das PXE-verursachende Gen im Jahre 2000 war überraschend, da zuvor eine Assoziation von PXE mit Genen, die in Verbindung mit der extrazellulären Matrix stehen, vermutet worden war. Seitdem wird versucht, eine Verbindung zwischen dem Defekt in *ABCC6* und der Umstrukturierung der extrazellulären Matrix, die bei PXE offenbar als Folge einer *ABCC6*-Defizienz auftritt, herzustellen. Zwei mögliche Hypothesen, die sich nicht notwendigerweise ausschließen müssen, wurden zur Deutung der gemachten Beobachtungen aufgestellt.

Die sogenannte „metabolische Hypothese“ geht davon aus, dass es sich bei PXE um eine Stoffwechselkrankheit handelt (Abbildung 2-5). *ABCC6* wird stark in der Leber und der Niere sowie in einem geringen Umfang in einer Anzahl weiterer Gewebe exprimiert [6, 18]. Offenbar zeigen aber weder die Leber noch die Niere in nennenswertem Ausmaß die für PXE typischen pathologischen Veränderungen. In den besonders von PXE betroffenen Geweben der Haut, der Gefäßwände und der Bruch-Membran des Auges hingegen wird *ABCC6* nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß exprimiert. Mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern gegen *ABCC6* konnte gezeigt werden, dass *ABCC6* auf der basolateralen Oberfläche der Hepatozyten und den basolateralen Membranen der proximalen *Tubuli* der Niere lokalisiert ist, was auf eine Funktion beim Rücktransport von intrazellulären Molekülen in das Blut hinweist [35]. Von Le Saux *et al.* durchgeführte Versuche, bei denen kultivierte Fibroblasten von PXE-Patienten und Kontrollpersonen mit Serum von PXE-Patienten und normalem humanem Serum behandelt wurden, unterstützen die metabolische Hypothese [36]. In der Anwesenheit von normalem humanem Serum war die Struktur der von PXE-Fibroblasten gebildeten elastischen Fasern normal. Bei Behandlung mit PXE-Serum lagerten sowohl PXE-Fibroblasten als auch normale Kontrollzellen abnorme Aggregate von elastischen Fasern ab. Die Autoren interpretieren ihre Ergebnisse dahingehend, dass ein im PXE-Serum enthaltener Faktor mit der Synthese der elastischen Fasern interferiert. Weiterhin konnte *in vitro* an Glattmuskelzellen demonstriert werden, dass Serum sowohl von PXE-Patienten als auch von *Abcc6*^{-/-}-Mäusen die Fähigkeit fehlt, die Präzipitation von Calciumphosphat zu verhindern [37]. Schließlich unterstützen kürzlich durchgeführte Experimente mit Hauttransplantaten an Wildtyp- und *Abcc6*^{-/-}-Mäusen die Vermutung, dass zirkulierende Faktoren entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß der Kalzifizierung in der Haut ausüben [38].

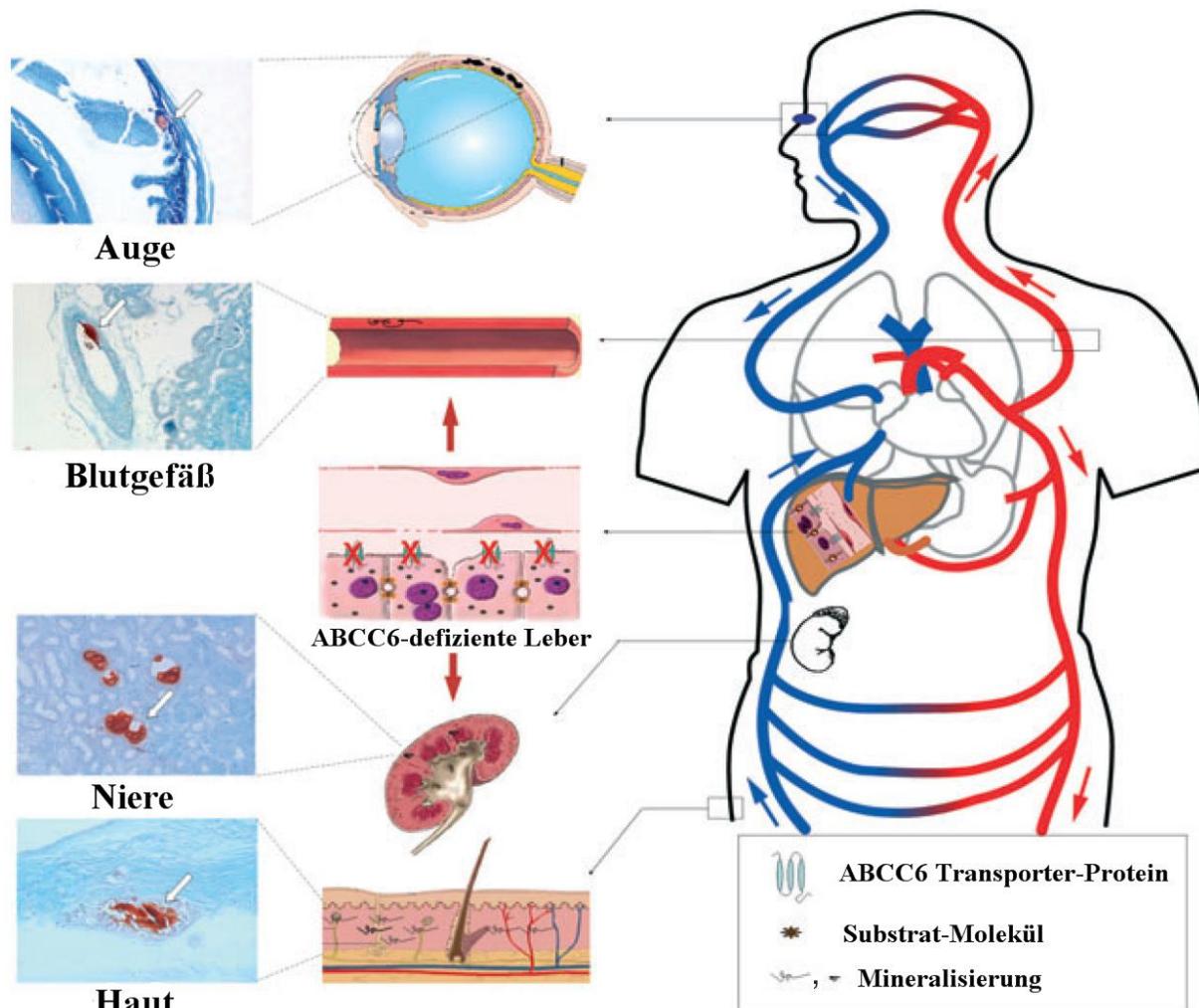


Abbildung 2-5: Illustration der metabolischen Hypothese der PXE-Pathogenese (modifiziert nach [3]). Das in der Leber stark exprimierte ABCC6 transportiert bestimmte kritische Metabolite aus den Hepatozyten in die Zirkulation (rechte Seite). Fehlt die Transporteraktivität von ABCC6 in der Leber, verändert sich die Konzentration seiner Substratmoleküle in der Zirkulation, was schließlich zur Mineralisierung einer Reihe von Geweben wie dem Auge, den arteriellen Blutgefäßen, der Niere und der Haut führt (Mitte). Die Mineralisierung dieser Gewebe wurde in der *Abcc6*^{-/-} Maus mittels Alizarin-Rot Färbung nachgewiesen (linke Seite).

In der Leber funktioniert ABCC6 wahrscheinlich, ähnlich wie die anderen Mitglieder der MRP-Familie, als Effluxpumpe, die den Transport von Substraten aus den Hepatozyten in den Blutkreislauf durchführt. Ein Funktionsverlust von ABCC6 würde zu einer Verarmung des Serums an bisher unbekanntem Faktoren führen. Solche Faktoren könnten Einfluss auf die Expression von Proteinen haben, die den Stoffwechsel der extrazellulären Matrix regulieren und z.B. deren Kalzifizierung inhibieren. In diesem Zusammenhang wurden für im Serum von PXE-Patienten erniedrigte Werte der Kalzifizierungsinhibitoren Fetuin-A und Matrix Gla-Protein gefunden [39, 40]. Die Identifizierung von Faktoren, die im Serum von PXE-Patienten reduziert sind oder fehlen, würde ein Bindeglied liefern zwischen den Mutationen in einem Gen, das hauptsächlich in der Leber exprimiert wird, und dem beobachteten klinischen Phänotyp.

Die alternative Hypothese zur PXE-Pathogenese ist die sogenannte „PXE-Zell-Hypothese“. Diese nimmt an, dass PXE durch einen Defekt hervorgerufen wird, dessen Auswirkungen direkt an den Stellen auftreten, an denen sich die Symptome der Krankheit manifestieren. Für diese Annahme spricht die Tatsache, dass Fibroblasten von PXE-Patienten in der Zellkultur Auffälligkeiten zeigen, z.B. veränderte Adhäsionseigenschaften und Proliferationsraten, verstärkte Synthese von Komponenten des Bindegewebes wie Elastin, Kollagen und Proteoglykanen sowie eine verstärkte proteolytische Aktivität [14, 41-43]. Außerdem zeigen histopathologische und ultrastrukturelle Befunde, dass die elastischen Strukturen in der Haut von PXE-Patienten schon vor dem Auftreten der Kalzifizierung Anomalitäten aufweisen, die möglicherweise die Entstehung der mineralischen Ablagerungen fördern bzw. überhaupt erst ermöglichen [31, 44, 45]. Diese Beobachtungen lassen sich durch eine ausschließlich systemische Ursache nur schwer erklären. Eine ABCC6-Defizienz im Bindegewebe würde demnach zu metabolischen Konsequenzen führen, die – möglicherweise anders als in anderen Geweben – nicht von anderen Transportern ausgeglichen werden können, was für eine wichtige Rolle von ABCC6 in Fibroblasten sprechen würde.

Vor einiger Zeit konnte chronischer oxidativer Stress in PXE-Fibroblasten *in vitro* nachgewiesen werden, der möglicherweise für viele der Symptome der Krankheit zumindest zum Teil verantwortlich sein könnte [41]. Seitdem haben sich die Hinweise darauf verdichtet, dass ein milder, chronischer oxidativer Stress bei PXE-Patienten vorhanden ist und eine Rolle bei der Krankheitsentwicklung spielt [46, 47]. Gestützt wird die These einer Beteiligung von oxidativem Stress auch durch PXE-ähnliche okulare und kutane Veränderungen bei Patienten mit β -Thalassämie und Sichelzellanämie, Krankheiten die ebenfalls durch das Vorliegen von oxidativem Stress gekennzeichnet sind [48–50]. Schließlich zeigt die *Abcc6*^{-/-}-Maus ebenfalls Anzeichen von chronischem oxidativen Stress [51]. Oxidativer Stress ist eine Schlüsselkomponente in Entzündungsreaktionen und wurde mit einer Vielzahl pathologischer Zustände in Verbindung gebracht, darunter Krebs, Atherosklerose, Osteoarthritis und neurodegenerative Erkrankungen wie etwa die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) [52]. Oxidativer Stress ist durch eine unphysiologisch hohe Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gekennzeichnet. ROS entstehen in *aerob* lebenden Organismen fortwährend im Rahmen des normalen Metabolismus sowie als Reaktion auf interne und externe Stimuli [53]. Während geringe Konzentrationen von ROS für viele physiologische Prozesse von Zellproliferation bis hin zu Apoptose unverzichtbar sind, sind hohe ROS-Spiegel und ihre ineffiziente Entfernung potenziell toxisch für die Zelle. So können im Überschuss gebildete ROS eine Kaskade aus der Bildung freier Radikale und daraus folgender Schäden an Makromolekülen wie etwa Lipiden der Plasmamembran auslösen. ROS sind natürlicher Bestandteil vieler Signaltransduktionswege, so dass eine Veränderung ihrer Konzentration vielfältige Effekte hervorrufen kann. Beispielsweise aktivieren ROS zytoplasmatische Signaltransduktionswege, die mit Wachstum, Differenzierung und Alterung sowie Produktion und Abbau von Bindegewebe zusammenhängen [54, 55].

2.1.5. *Vascular endothelial growth factor* (VEGF)

An der Entwicklung einer pathologischen Neovaskularisation ist eine Reihe von Faktoren beteiligt, die zu einer Neubildung von Gefäßen führen. Der wichtigste unter ihnen ist der *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Der vom *VEGFA*-Gen codierte VEGF ist ein hochkonserviertes, homodimeres Glykoprotein und verfügt über eine starke angiogene Wirkung [56]. Außerdem erhöht VEGF die mikrovaskuläre Permeabilität, dilatiert Arterien und zieht Monozyten chemotaktisch an [57]. Durch alternatives Spleißen entstehen verschiedene Isoformen von VEGF, die wichtigsten sind VEGF₁₈₉, VEGF₁₆₅ und VEGF₁₂₁ [56]. Es wurden auch inhibitorische Isoformen von VEGF beschrieben, die als VEGF_{xxx}b bezeichnet werden [58, 59]. So enthält VEGF_{165b} zum Beispiel dieselbe Anzahl von Aminosäuren wie VEGF₁₆₅, hat aber einen anderen C-Terminus und anti-angiogene Eigenschaften. Das *VEGFA*-Gen ist hochgradig polymorph [60, 61]. Für einige Sequenzvariationen konnte gezeigt werden, dass sie die Expression von VEGF beeinflussen [57, 60, 62]. Studien haben gezeigt, dass Polymorphismen im *VEGFA*-Gen mit einer Anzahl von Krankheiten in Verbindung stehen, in deren Verlauf es zu einer pathologischen Gefäßneubildung kommt, darunter AMD und PDR [62–66].

2.1.6. „*Modifier*“-Gene

Um die Variabilität des PXE-Phänotyps, der sich sogar zwischen betroffenen Zwillingen deutlich unterscheiden kann, zu erklären wurde spekuliert, dass neben Umweltfaktoren auch andere Gene außer *ABCC6* einen Einfluss auf die Ausprägung der Krankheitssymptome nehmen könnten [24]. Diese Gene werden als „*modifier*-Gene“ bezeichnet. Dabei wird angenommen, dass die Produkte dieser Gene an den pathologischen Prozessen teilhaben, die schlussendlich zu den beobachteten klinischen Merkmalen von PXE führen. Weiterhin wird davon ausgegangen, dass gewisse Allele der *modifier*-Gene, die einen Einfluss auf die Aktivität der betreffenden Proteine haben, vermittels dieses Einflusses ebenfalls den Ablauf der pathologischen Prozesse, die bei PXE ablaufen, verändern. Somit hängt schließlich die Ausprägung des Phänotyps maßgeblich vom gesamten genetischen Hintergrund des jeweiligen Individuums ab. Tatsächlich wurden etwa im Fall der cystischen Fibrose, einer Erbkrankheit, die ebenfalls von Mutationen in einem Gen der ABC-Transporter Familie verursacht wird, solche *modifier*-Gene gefunden [67]. Im Falle von PXE konnten ebenfalls bereits *modifier*-Gene nachgewiesen werden. Dies sind Gene, die eine Rolle spielen bei der Biosynthese von Glykosaminoglykanen, bei der Regulation der biologischen Kalzifizierung sowie bei der Antwort auf oxidativen Stress, alles Vorgänge, deren Beteiligung an der PXE-Pathogenese bekannt ist bzw. angenommen wird [46, 68, 69].

2.2. Die extrazelluläre Matrix (ECM)

Als extrazelluläre Matrix (ECM) bezeichnet man das komplexe makromolekulare Netzwerk, das die Zellen im Gewebeverband umgibt (Abbildung 2-6). Die Hauptbestandteile der ECM sind Kollagene, Laminin, Elastin und Proteoglykane. Die ECM besitzt nicht nur passive strukturelle Funktionen, sondern ist auch ein entscheidender Modulator einer Vielzahl von biologischen Prozessen, darunter Zelladhäsion und Migration, Differenzierung und Entwicklung. Diese Funktionen werden vermittelt über die Interaktion von ECM-Proteinen mit Zelloberflächenrezeptoren wie z.B. den Integrinen. Die ECM besitzt darüber hinaus eine Funktion als Reservoir von Cytokinen und Wachstumsfaktoren wie etwa dem *transforming growth factor* β (TGF- β), dem *platelet derived growth factor* (PDGF) oder dem VEGF, welche wiederum eine Wirkung auf die Synthese und den Katabolismus der ECM haben.

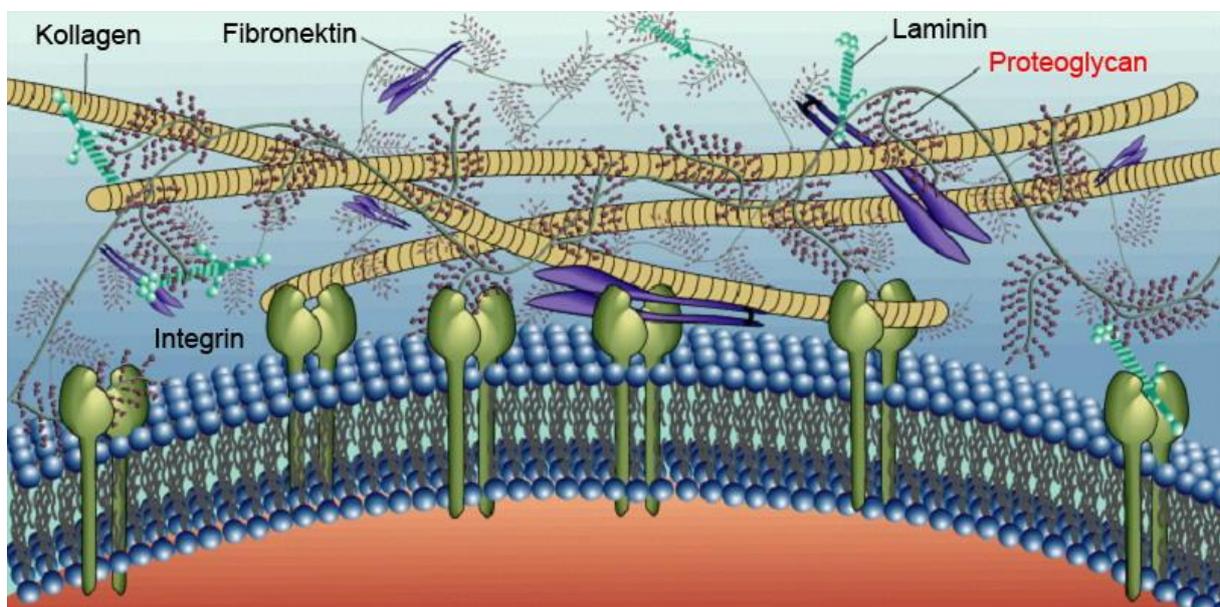


Abbildung 2.6: Modell der extrazellulären Matrix [70]. Dargestellt sind die wichtigsten Komponenten der ECM – Kollagen, Laminin, Proteoglykane und Fibronectin – und die Interaktion der ECM-Komponenten mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Integrine).

2.2.1. Veränderungen der ECM bei PXE

PXE zeichnet sich durch die vermehrte Ablagerung einer auch strukturell veränderten ECM durch Fibroblasten ab [43]. Die gesamte ECM-Homöostase ist bei PXE offenbar empfindlich gestört, neben den elastischen Fasern ist auch Kollagen von den Veränderungen betroffen [31, 44]. Die mineralischen Ablagerungen in den elastischen Fasern sind assoziiert mit Matrixproteinen, die eine hohe Affinität für Calcium besitzen, darunter Osteopontin und Vitronectin [44]. Neben den mit elastischen Fasern assoziierten mineralischen Ablagerungen fanden sich in der Dermis von PXE-Patienten eigenartige Aggregate von Mikrofilamenten, die in der Haut von gesunden Personen nicht vorkommen und große Mengen von Osteonektin und Fibronectin zusammen mit Vitronectin enthalten.

Bei PXE ist auch der Metabolismus der Proteoglykane gestört, abnorme Mengen an Proteoglykanen wurden in der Nähe von und in den mineralisierten elastischen Fasern gefunden [43, 71]. PXE-Fibroblasten produzieren *in vitro* größere Mengen Proteoglykane enthaltender Aggregate als normale Fibroblasten [72]. Die PXE-Fibroblasten sezernieren einen signifikant erhöhten Anteil an Proteoglykanen mit hohem Molekulargewicht. Die von PXE-Fibroblasten produzierten Proteoglykane weisen stärker anionische Eigenschaften auf als die von Kontrollzellen produzierten, besonders diejenigen, die ins Kulturmedium abgegeben werden [14]. Diese Proteoglykane zeichneten sich zusätzlich durch eine erhöhte hydrodynamische Größe und eine veränderte Aggregationstendenz aus. Proben aus PXE-Hautläsionen enthalten signifikant mehr Dermatansulfat und Hyaluronsäure als Kontrollproben von gesunden Spendern [73, 74]. Der gesamte Glykosaminoglykan-Gehalt ist ebenfalls signifikant erhöht [75].

2.2.2. Proteoglykane

Proteoglykane sind ein wesentlicher Bestandteil der ECM und spielen eine Rolle bei zellulären Prozessen wie Zelladhäsion, -beweglichkeit, -proliferation, -differenzierung und Gewebemorphogenese. Darüber hinaus sind sie essentiell für die strukturelle Integrität verschiedener Gewebe und die Assemblierung der ECM sowie die Bildung elastischer Fasern [71]. Proteoglykane sind glykosylierte Proteine mit Glykosaminoglykanen (GAGs) als Kohlenhydratkomponenten.

Die Proteinkomponente der Proteoglykane wird auch als *Core*-Protein bezeichnet und kann in ihrer Größe zwischen 10 kDa und mehr als 500 kDa variieren. An das *Core*-Protein können zwischen einer und mehr als 100 GAG-Ketten gebunden sein [76]. Außerdem können in einer Reihe von Proteoglykanen GAG-Seitenketten verschiedener Typen innerhalb eines Moleküls vorkommen. Proteoglykane kommen sowohl in direkter Bindung an die Zellmembran als auch als Bestandteil der ECM vor, deren Eigenschaften sie maßgeblich beeinflussen. So sind etwa die Syndekane Typ 1-Transmembranproteine, die sowohl Heparansulfat- als auch Chondroitinsulfat-Glykosaminoglykanketten tragen und auf der Oberfläche aller adhärent wachsenden Zellen exprimiert werden [77, 78]. Hingegen sind Proteoglykane wie Agrin, Kollagen Typ XVIII, Perlecan und Aggrecan Bestandteile der ECM. Aggrecan etwa wird hauptsächlich von Chondrozyten synthetisiert und ist das vorherrschende Proteoglykan im Gelenkknorpel [79]. Dort interagiert es nicht-kovalent mit Hyaluronsäure, die ebenfalls ein wesentlicher Bestandteil des Knorpels und hauptsächlich für seine mechanischen Eigenschaften verantwortlich ist [80].

Zu der Gruppe der kleinen, Leucin-reichen Proteoglykane gehören Decorin und Biglycan [81]. Sie spielen eine Rolle bei der Kollagen-Fibrillogenese und der Mineralisierung der Knochenmatrix. Decorin ist ein Dermatansulfat-Proteoglykan und verfügt über die Fähigkeit, Typ I-Kollagen zu binden [82]. Es ist beteiligt an der Formierung der Kollagenmatrix der Knochen und reguliert deren Kalzifizierung [81]. Ein Fehlen von Decorin führt im Mausmodell zur Bildung abnormer Kollagen-Fibrillen in der Haut [83]. Die Funktionen von Decorin und Biglycan scheinen teilweise redundant zu

sein, ein Doppel-*Knockout* führt bei Mäusen jedoch zu schwerwiegender Osteopenie [81]. Im Zellkultursystem hat die Konzentration von Decorin einen Einfluss auf den zeitlichen Verlauf und das Ausmaß der Mineralisierung der Matrix, wahrscheinlich vermittelt seiner Interaktion mit Kollagen.

Versican ist das am häufigsten vorhandene große, extrazelluläre Chondroitinsulfat-Proteoglykan und wird von Zellen aus einer Reihe von Bindegeweben exprimiert [84]. Es gehört zu einer Familie von strukturell verwandten Proteoglykanen, die Hyalektine oder Lekticane genannt werden. Versican zeigt Affinität für Hyaluronsäure [85]. Mit Versican eng verwandt ist das ebenfalls Hyaluronan bindende Hyaluronektin. Von Versican existieren verschiedene Isoformen, die durch alternatives Spleißen der mRNA entstehen und unterschiedlich viele Glykosaminoglykanketten tragen [84]. Eine Versican-Isoform ohne Anheftungsstellen wurde ebenfalls beschrieben und Versican aufgrund dessen als „Teilzeit-Proteoglykan“ bezeichnet [86].

2.2.3. Glykosaminoglykane

Glykosaminoglykane (GAGs) sind negativ geladene, lineare Heteropolysaccharide, die als Bestandteile von Proteoglykanen hauptsächlich in der extrazellulären Matrix des Bindegewebes zu finden sind, sich aber auch auf Zelloberflächen, Basalmembranen und in intrazellulären Granula bestimmter Zellen befinden [76]. Der überwiegende Teil, wenn nicht alle Zelltypen von Wirbeltieren produzieren GAGs in unterschiedlichem Ausmaß. GAGs in der Matrix haben überwiegend strukturelle Funktionen, während solche auf Zelloberflächen offenbar hauptsächlich als Rezeptoren agieren. GAGs bestehen aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten, die Anzahl der Wiederholungen ist sehr variabel und kann bis über 100 betragen [87]. Die stark negative Ladung resultiert aus dem Vorhandensein von sauren Zuckerresten und Sulfatgruppen. GAGs können große Mengen an Wasser binden, hydratisierte GAGs erlauben es Geweben, große Druckveränderungen zu absorbieren. Die Disaccharide ihrerseits setzen sich zusammen aus einer Uronsäure (D-Glukuronsäure oder D-Iduronsäure) oder Galaktose und einem Aminozucker (D-Galaktosamin oder D-Glukosamin). Zusätzlich können die Disaccharid-Einheiten noch an verschiedenen Positionen ein- oder mehrfach sulfatiert sein.

Bei Chondroitinsulfat (CS) und Dermatan-sulfat (DS) ist der enthaltene Aminozucker *N*-Acetylgalaktosamin, bei Heparansulfat (HS) und Heparin ist es *N*-Acetylglukosamin. Keratansulfat (KS) enthält ebenfalls *N*-Acetylglukosamin, jedoch anstelle von Glukuronsäure den Zucker Galaktose. CS unterscheidet sich von DS und HS unterscheidet sich von Heparin durch das Ausmaß der Epimerisierung von Glukuronsäure zu Iduronsäure sowie das Sulfatierungsmuster der Disaccharide. Eine Übersicht über die Strukturen der verschiedenen GAG-Ketten gibt die Abbildung 2-7.

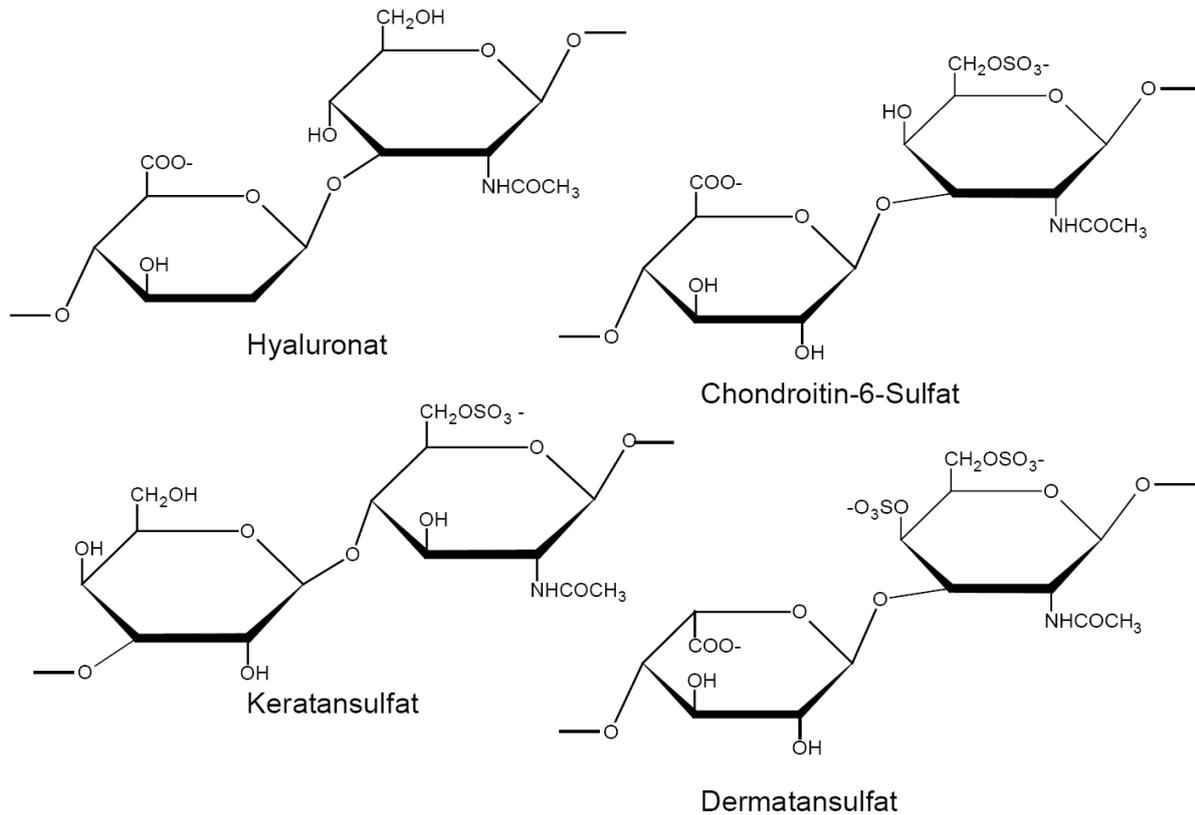


Abbildung 2-7: Darstellung der Disaccharideinheiten wichtiger Glykosaminoglykane.

2.2.4. Biosynthese von Glykosaminoglykanen

Die Biosynthese von GAGs, die aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten aufgebaut sind, geht von spezifischen Akzeptoroligosacchariden aus, die an das *Core*-Protein angehängt werden. Bei allen GAG-Typen mit Ausnahme von KS ist der Akzeptor ein Tetrasaccharid (GlcA-Gal-Gal-Xyl), das mit einem Serinrest des *Core*-Proteins verbunden ist und als *Linker* bezeichnet wird. Die Enzyme, die den *Linker* aufbauen, sind für CS / DS und HS / Heparin die gleichen [87]. Die Xylosyltransferase-I (XylT-I; *XYLT1*) katalysiert den einleitenden Schritt bei der Synthese des Tetrasaccharid-*Linkers*, die Übertragung eines Xyloserestes von UDP-Xylose auf ein Serin des *Core*-Proteins. Die Xylosyltransferase-II (XylT-II; *XYLT2*) überträgt ebenfalls einen Xyloserest auf Serin, ihre Substratspezifität ist jedoch von der der XylT-I verschieden. Zwei Galaktosyltransferasen (GalT-I und GalT-II, codiert von den Genen *B4GALT7* und *B3GALT6*) und eine Glukuronyltransferase (GlcAT-I; *B3GAT3*) übertragen dann nacheinander zwei Galaktose- und einen Glukuronsäurerest auf die wachsende Kette, womit die Synthese des *Linkers* vollständig ist.

Mit der Addition des nächsten Zuckers beginnt die Synthese der eigentlichen GAG-Kette, dabei entscheidet die Art des übertragenen Restes darüber, ob CS / DS oder HS / Heparin gebildet werden. Die Übertragung von *N*-Acetylgalaktosamin auf die Glukuronsäure des *Linkers* durch die CS-*N*-Acetylgalaktosaminyltransferase-I (CS-GalNAcT-I; *CSGALNACT1*) leitet die Synthese von Chondroitinsulfat ein [88]. Das Enzym bevorzugt im Gegensatz zur CS-GalNAcT-II den

Tetrasaccharid-*Linker* als Akzeptor und ist somit für die Initiation der Chondroitin- bzw. Dermatan-sulfat-Biosynthese verantwortlich [89]. Hervorzuheben ist, dass sowohl im Falle von CS / DS als auch von HS / Heparin die Übertragung des ersten Restes auf den Tetrasaccharid-*Linker* und die Addition weiterer *N*-Acetylgalaktosamin- bzw. *N*-Acetylglukosamin-Einheiten auf die wachsende GAG-Kette durch unterschiedliche Enzyme katalysiert werden. Zweiter Bestandteil der sich wiederholenden Disaccharideinheit im CS ist Glukuronsäure, durch deren von der Glukuronsäure-C5-Epimerase (*GLCE*) katalysierte Epimerisierung zu Iduronsäure Dermatan-sulfat gebildet wird. Glukuronsäure-C5-Epimerase ist das Schlüsselenzym sowohl beim Wechsel von Chondroitin- zu Dermatan-sulfat als auch von Heparan-sulfat zu Heparin. Für die Verlängerung der CS-Kette ist eine Reihe von Enzymen verantwortlich, die als Chondroitin-Synthasen bezeichnet werden [87]. Chondroitinsynthase-1 (*CHSY1*) verfügt auf einem Polypeptid über beide für die Kettenpolymerisierung erforderlichen Glykosyltransferase-Aktivitäten [90]. Ihre volle Aktivität erlangt die Chondroitinsynthase-1 jedoch erst durch die Interaktion mit dem Chondroitin-Polymerisierungsfaktor (*CHPF*), der vermutlich als Chaperon wirkt [91]. Es existiert außerdem noch eine Chondroitinsynthase-2 (*CHSY3*), die ebenfalls über eine duale Enzymaktivität verfügt und auch im Komplex mit dem Chondroitin-Polymerisierungsfaktor vorkommt [92]. Möglicherweise können die beiden Chondroitinsynthasen auch miteinander ein Heterodimer bilden, das ebenfalls enzymatische Aktivität aufweist. Die von der Chondroitinsynthase-2 produzierten CS-Ketten sind offenbar kürzer als die von der Chondroitinsynthase-1 gebildeten [93]. Neben den Chondroitinsynthasen sind noch zwei weitere Enzyme an der Verlängerung von CS-Ketten beteiligt, die CS-*N*-Acetylgalaktosaminyltransferase II (*CSGALNACT2*) und die CS-Glukuronyltransferase (*CHPF2*) [94, 95].

Die Sulfatierung der GAG-Kette findet schon statt, während diese noch verlängert wird. Die *N*-Acetylgalaktosamin-Reste werden in variierendem Ausmaß an der 4- und / oder der 6-Hydroxyl-Position sulfatiert [96]. GAG-Ketten können auch verschieden große Anteile von unsulfatiertem *N*-Acetylgalaktosamin beinhalten. Zu einem geringeren Teil werden auch Glukuronsäure-Reste sulfatiert, hauptsächlich an der 2- und sehr selten auch an der 3-Hydroxyl-Position. Im Gegensatz dazu ist die 2-Sulfatierung von Iduronsäure im Dermatan-sulfat relativ häufig. Die bei HS häufig anzutreffende *N*-Sulfatierung findet weder bei CS noch bei DS statt. Die Sulfatierung ist von großer Bedeutung für die Funktion der GAGs und ihre Interaktionen mit anderen Molekülen wie Wachstumsfaktoren, Cytokinen und Matrixkomponenten. 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS) ist der Sulfatdonor für alle an der GAG-Biosynthese beteiligten Sulfotransferasen.

Die Biosynthese von Heparan-sulfat beginnt mit der Übertragung von *N*-Acetylglukosamin auf den *Linker* durch die *N*-Acetylglukosaminyltransferase-I (GlcNAcT-I; *EXTL2*, *EXTL3*), die damit das initiale Enzym bei der Synthese von Heparan-sulfat und Heparin darstellt. Bei der weiteren

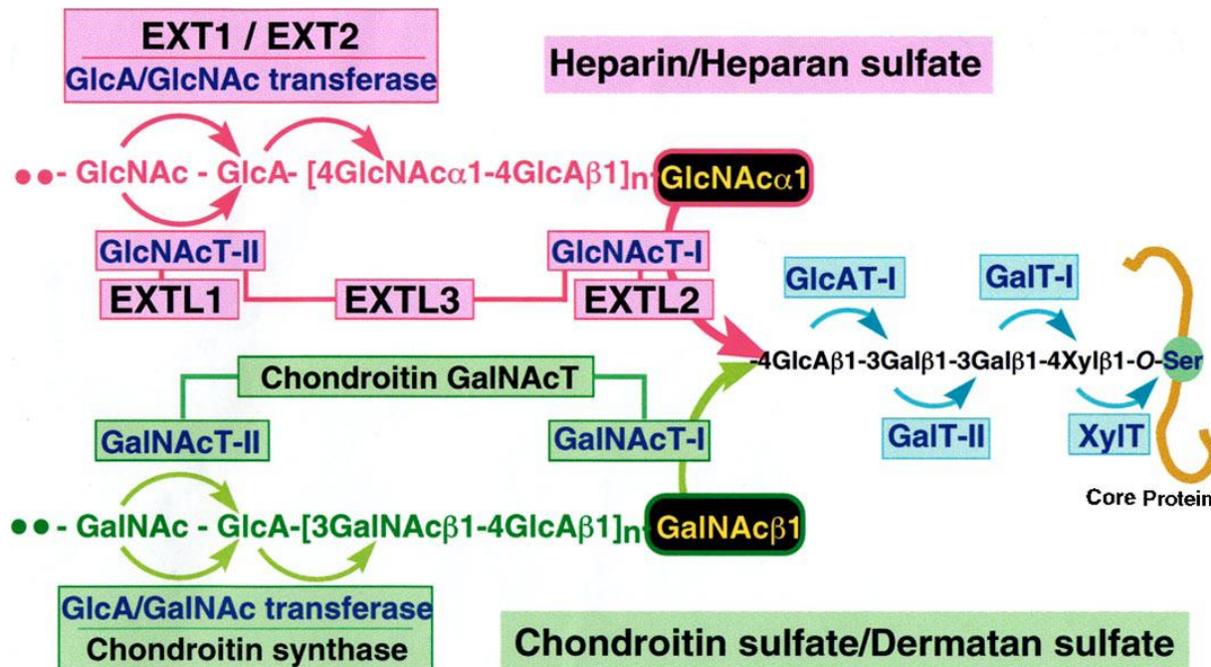


Abbildung 2-6: Biosynthese von sulfatierten Glykosaminoglykanen [97]. HS, Heparin, CS und DS verfügen über einen gemeinsamen Tetrasaccharid-Linker. Die Synthese des Linkers beginnt mit der Übertragung von Xylose auf bestimmte Serin-Reste des Core-Proteins, gefolgt von der Addition zweier Galaktose-Reste und wird komplettiert durch die Anknüpfung einer Glukuronsäure. Jede dieser Reaktionen wird von unterschiedlichen Enzymen katalysiert. Die GAG-Ketten entstehen basierend auf diesem Linker durch die abwechselnde Addition von N-Acetylhexosamin- und Glukuronsäure-Resten. Die Synthese von HS/Heparin startet mit dem Transfer von N-Acetylglukosamin auf den Linker durch die N-Acetylglukosaminyltransferase-I (GlcNAcT-I). CS/DS wird gebildet beginnend mit der Übertragung von N-Acetylgalaktosamin durch die N-Acetylgalaktosaminyltransferase-I (GalNAcT-I).

Verlängerung der HS-Kette sind zwei Proteine beteiligt, die Produkte der Tumorsuppressorgene *EXT1* und *EXT2* sind [98]. Obwohl beide Proteine sowohl über GlcNAc-Transferase- als auch GlcA-Transferaseaktivität verfügen, liegen sie analog zu den Chondroitin-Synthasen *in vivo* als Komplex vor [97]. Die Länge der gebildeten HS-Ketten ist offenbar abhängig von der Menge an verfügbaren EXT1/EXT2-Komplexen [99]. Die Modifikation der HS-Kette beginnt mit der N-Deacetylierung und N-Sulfatierung von Glukosaminresten, die von dem bifunktionalen Enzym N-Deacetylase / N-Sulfotransferase (*NDST1*, *NDST2*) katalysiert werden. Die N-Deacetylierung / N-Sulfatierung ist der regulatorische Schlüsselschritt, weil die nachfolgenden Reaktionen wie die Epimerisierung von Glukuronsäureresten zu Iduronsäure sowie verschiedene Sulfatierungsreaktionen offenbar nur in der Nähe von N-Sulfatgruppen stattfinden können. Die Sulfatierungsreaktionen umfassen die 2-O-Sulfatierung von Iduronsäure und die 6-O-Sulfatierung von N-acetylierten und N-sulfatierten Glukosaminresten. Vereinzelt kommt es auch zu einer 3-O-Sulfatierung von N-sulfatiertem Glukosamin und einer 2-O-Sulfatierung von Glukuronsäure. Die übertragenen Sulfatgruppen sind nicht gleichmäßig über die HS-Kette verteilt, vielmehr existiert eine Domänenstruktur, in der sich sulfatierte Domänen mit Regionen abwechseln, in denen praktisch keine Sulfatgruppen vorkommen [96].

2.2.4.1. Xylosyltransferasen

Die Xylosyltransferase-I (XylT-I; *XYLT1*) katalysiert den initialen und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Synthese des gemeinsamen Tetrasaccharid-*Linkers*. Sie überträgt Xylosereste vom Donor UDP-Xylose auf Serinreste des *Core*-Proteins, wobei jedoch nur spezifische Serinreste xylosyliert werden [100]. Verschiedene, zum Teil pathologische Prozesse, die mit einer Umstrukturierung der extrazellulären Matrix verbunden sind, werden von einer veränderten Aktivität der Xylosyltransferase begleitet, die aufgrund dessen als biochemischer Marker von Bedeutung ist [101–103]. So wurden auch bei PXE-Patienten erhöhte XT-Aktivitäten im Serum beschrieben [104].

Das menschliche Genom enthält ein weiteres homologes Gen, das für die Xylosyltransferase-II (XylT-2; *XYLT2*) codiert [100]. Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von XylT-I und XylT-II beträgt 55%. XylT-II überträgt ebenfalls Xylosereste auf Serin [105]. Obwohl also XylT-I und XylT-II redundante Funktionen haben, unterscheiden sie sich offenbar in ihren Akzeptoreigenschaften und ihrem Expressionsmuster. Polymorphismen in den Xylosyltransferase-Genen sind bei PXE-Patienten mit einer erhöhten XT-Aktivität im Serum sowie einem schwereren Krankheitsverlauf assoziiert [69].

2.2.5. Hyaluronsäure

Obwohl auch die Hyaluronsäure (HA) zu den GAGs gezählt wird, unterscheidet sie sich von diesen in mehreren wichtigen Punkten [80]. Die HA-Ketten sind nicht kovalent an Core-Proteine gebunden und werden nicht durch Sulfatierung modifiziert. Wie die übrigen GAGs ist HA ein lineares Polymer und besteht aus Disaccharideinheiten, deren monomere Bausteine Glukuronsäure und *N*-Acetylglukosamin sind [106]. Die HA-Ketten sind deutlich größer als die der anderen GAGs, ihre Größe kann 10^7 Da erreichen [107]. Während die Biosynthese der übrigen GAGs im Golgi-Apparat stattfindet, sind für die Bildung von HA drei eng verwandte Enzyme verantwortlich, die an der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert sind und Hyaluronansynthasen genannt werden [106, 108]. Die Hyaluronansynthasen HAS1, HAS2 und HAS3 unterscheiden sich in ihren K_M -Werten sowie durch die Länge der von ihnen synthetisierten HA-Ketten. Der Transport der HA aus der Zelle erfolgt durch ein Mitglied der ABC-Transporterfamilie, das ABCC5 / MRP5 [109]. HA ist in praktisch allen Geweben vorhanden, die höchsten Konzentrationen werden in der Nabelschnur, der Synovialflüssigkeit, der Haut und dem Glaskörper des Auges gefunden [80, 85]. Lunge, Niere, Gehirn und Muskeln enthalten ebenfalls größere HA-Konzentrationen, während die Konzentration im Serum unter normalen Umständen sehr gering ist. Die Haut enthält die größte Menge HA im Körper, sie macht ungefähr 75% der in der Haut enthaltenen GAGs aus [110, 111]. HA kann große Mengen Wasser binden und dient als biologisches „Schmiermittel“, etwa in Gelenken. Während der Großteil des HA ungebunden vorliegt, ist ein geringer Anteil nicht-kovalent über sogenannte Hyaladherine an Zelloberflächen gebunden [80]. Zu den HA-bindenden Proteinen gehören neben dem HA-Rezeptor CD44 auch Matrixmoleküle wie Aggrecan und Versican [85, 112]. Die Halbwertszeit von HA ist in

vielen Geweben relativ kurz, der *Turnover* ist unter inflammatorischen Bedingungen stark erhöht [80, 114]. HA gelangt über die Lymphbahnen in die Zirkulation und wird schließlich in der Leber abgebaut. Offenbar wird ein Teil der HA aber auch lokal im Gewebe bzw. in den regionalen Lymphknoten katabolisiert [115]. HA wird dabei von im Gewebe vorhandenen Hyaluronidasen zunächst zu kleineren Fragmenten abgebaut [113]. Es gibt jedoch offenbar keine Enzyme, die in der Lage wären, HA extrazellulär bei neutralem pH-Wert komplett abzubauen. Stattdessen gelangen HA-Fragmente über Bindung an CD44 und anschließende Internalisierung in Lysosomen, wo sie weiter degradiert werden [107, 115].

HA akkumuliert nach einer Verletzung im Gewebe, schon eine milde inflammatorische Reaktion führt zu einem starken Anstieg der HA-Konzentration [112]. Dabei kommt es nach einer Gewebeverletzung zur vermehrten Bildung von HA-Fragmenten mit geringem Molekulargewicht [107]. Diese Fragmente wirken angiogen und können die Expression inflammatorischer Gene in Makrophagen sowie die Produktion von Matrix-Metalloproteinasen durch dendritische Zellen, Tumorzellen und Fibroblasten induzieren [107, 114, 116]. Im Gegensatz dazu wirkt hochmolekulares HA anti-angiogen und anti-inflammatorisch [85, 113]. Ein erhöhter HA-Gehalt in Geweben führt zu verringerter Kontaktinhibition und verstärkter Zellproliferation und -migration [84, 106]. Die Synthese von HA wird von einer Reihe von Wachstumsfaktoren und Cytokinen stimuliert, darunter der *epidermal growth factor* (EGF) und Interleukin-1 β [117]. PDGF und TGF- β führen ebenfalls zu einer Akkumulation von HA, wobei unklar ist, ob diese aus verstärkter Synthese oder verminderter Degradation beruht [107].

Viele Tumore weisen erhöhte HA-Gehalte auf, zudem sind bei Krebspatienten oft die Serumkonzentrationen von HA erhöht [85]. Plasma-HA-Spiegel können bei einer Vielzahl von Krankheiten erhöht sein [80]. Haut von PXE-Patienten mit den typischen Läsionen weist einen deutlich gesteigerten HA-Gehalt auf [73, 74]. Gleiches wurde für die Haut von Patienten mit Sklerodermie gefunden [111].

2.2.6. Umbau der extrazellulären Matrix

Der Umbau von Bindegeweben findet zum Beispiel bei Entzündungsprozessen, der Wundheilung oder der Tumorinvasion statt [118]. Die Umformung der ECM erfordert die Aktivität verschiedener Proteasen, die von Zellen des Immunsystems, Fibroblasten und Tumorzellen produziert werden. Matrix-Metalloproteinasen und ihre endogenen Inhibitoren, die Gewebeinhibitoren von Matrix-Metalloproteinasen (*tissue inhibitors of matrix metalloproteases*, TIMPs), sind wichtige Mediatoren des ECM-Turnovers [119].

2.2.6.1. Matrix-Metalloproteinasen

Die Matrix-Metalloproteinasen bilden eine Familie von mehr als 20 zinkabhängigen extrazellulären Endopeptidasen [120]. Die Mitglieder dieser Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Interaktion von Zellen mit der sie umgebenden Matrix [121]. Sie sind beteiligt an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen im Rahmen von normalem Wachstum und Entwicklung sowie auch an Neoplasie, Metastasierung, Angiogenese und Gewebsfibrose. In ihrer Gesamtheit können die MMPs einen Großteil der ECM abbauen [122]. Außerdem spalten MMPs auch eine Reihe von Nicht-Matrix-Substraten wie den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Plasminogen und Endothelin [123–125].

MMPs lassen sich in drei Hauptgruppen unterteilen, die interstitiellen Kollagenasen, die Typ IV-Kollagenasen oder Gelatinasen und die Stromelysine [118]. Die Gelatinasen und Stromelysin zeigen elastolytische Aktivität. Sie initiieren die Degradation von Elastin, die eine Voraussetzung für die Ablagerung von Calciumphosphat bei der Kalzifizierung der Media ist [126]. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die MMPs eine kausative Rolle bei der ektopen Kalzifizierung in dermalen Geweben spielen [127]. In einem dermalen Implantationsmodell in Ratten konnte gezeigt werden, dass der MMP-vermittelte Abbau von Elastin der initiale Schritt bei der Elastin-Kalzifizierung ist und dass eine Inhibierung der MMP-Aktivität die Kalzifizierung signifikant reduziert [128].

Die Expression von MMPs ist in normalen Geweben niedrig. Die meisten MMPs werden erst nach Stimulation durch Cytokine exprimiert [129]. Dasselbe Cytokin kann dabei sowohl einen induzierenden als auch einen unterdrückenden Effekt haben, abhängig vom Zelltyp. Sowohl vaskuläre als auch inflammatorische Zellen exprimieren MMPs, das Spektrum der basal bzw. nach Stimulation sezernierten MMPs unterscheidet sich jedoch zwischen den Zelltypen [120]. Viele Studien haben außerdem gezeigt, dass reaktive Sauerstoffspezies sowohl die Expression als auch die Aktivierung von MMPs vorantreiben [130, 131]. Oxidierte Lipide erhöhen die Produktion von MMPs durch Makrophagen und vaskuläre Zellen [120]. Von Makrophagen abgeleitete Schaumzellen wurden als Hauptquelle von MMPs in atherosklerotischen Plaques identifiziert. Calciumphosphat-Kristalle können ebenfalls die Expression von MMPs in Fibroblasten induzieren [132].

Die Aktivität von MMPs wird auf verschiedenen Ebenen strikt reguliert. Dieses sind die Regulation der Genexpression auf der Ebene der Transkription, die Sekretion von inaktivem Proenzym, die Aktivierung des Proenzym etwa durch membrangebundene MMPs (MT-MMPs) sowie die Interaktion der aktiven Enzyme mit ihren Inhibitoren, den TIMPs [120, 133]. Alle MMPs werden als inaktive Zymogene (pro-MMPs) sezerniert und anschließend extrazellulär durch eine Reihe von proteolytischen Spaltungen und Konformationsänderungen aktiviert [134]. Dabei wird das aminoternale Propeptid durch Serin-Proteasen wie Plasmin abgespalten, wodurch es zu einer Veränderung der Tertiärstruktur kommt und das aktive Zentrum des Enzyms zugänglich wird. Die weitere Prozessierung erfolgt dann entweder durch Autoprotolyse oder mit Hilfe einer verwandten Metalloprotease wie Stromelysin.

Die Gelatinasen A und B, MMP-2 und MMP-9, sind von besonderem Interesse, weil sie Typ IV-Kollagen abbauen, einen wesentlichen Bestandteil von Basalmembranen [135]. Die Gelatinasen ermöglichen so die Migration von vaskulären Endothelzellen durch die Basalmembran, ein Prozess, der von entscheidender Bedeutung für die Bildung neuer Blutgefäße, die sogenannte Angiogenese, ist [133]. MMP-2 und MMP-9 fördern die Entwicklung einer choroidalen Neovaskularisation [136].

Der Abbau von ECM-Proteinen durch MMPs kann zu einer Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie etwa dem VEGF führen, die in der ECM gespeichert sind. Auf diese Weise können MMPs ebenfalls zur Angiogenese beitragen [133]. Ein Zusammenspiel von MMPs und VEGF findet ebenfalls bei Metastasierung von Eierstockkrebs statt [137]. Auch Cytokine können durch MMPs aus extrazellulären Depots freigesetzt werden. So führt etwa die Spaltung von Decorin durch MMP-2, -3 oder -7 zu einer Freisetzung von TGF- β [138].

MMPs wurden mit zahlreichen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Erhöhte mRNA- sowie Protein-Konzentrationen verschiedener MMPs wurden in den Gefäßwänden von Patienten mit abdominalen Aortenaneurysmen gefunden [139, 140]. Die Hinweise erharteten sich, dass MMPs an der Initiation und Progression von Atherosklerose beteiligt sind [141]. So ermöglicht die Matrix-abbauende Aktivität der MMPs die Migration und Proliferation von vaskulären Glattmuskelzellen (VSMCs), die eine wichtige Rolle bei der Genese atherosklerotischer Veränderungen spielen [142]. Darüber hinaus gibt es ebenfalls Hinweise darauf, dass die Aktivität von MMPs zu einer Instabilität atherosklerotischer Plaques führt, die schließlich in einer Ruptur der Läsion resultiert. Die Bestimmung von MMPs und ihren physiologischen Inhibitoren, den TIMPs, in der Zirkulation erlaubt ein nicht-invasives Erfassen des ECM-Umbaus [119].

2.2.6.2. MMP-2

MMP-2 ist die am häufigsten in adulten Geweben exprimierte Metalloproteinase und wird von vaskulären Zellen konstitutiv exprimiert [130]. Das invasive Potential von Tumorzellen korreliert mit der MMP-2 Expression [118]. Das Substratspektrum von MMP-2 umfasst Chondroitinsulfat-Proteoglykane, Decorin, Fibronectin, Osteonectin, Laminin und Interleukin-1 β [120]. Außerdem degradiert MMP-2 dermales Kollagen und Elastinfasern während der Hautalterung und begünstigt die Entwicklung kalzifizierter Aortenstenosen. Quaglino *et al.* konnten sowohl eine signifikant erhöhte Expression der *MMP2*-mRNA als auch eine erhöhte enzymatische Aktivität von MMP-2 in PXE-Fibroblasten zeigen [42]. Der Promotorbereich des humanen *MMP2*-Gens enthält diverse Polymorphismen [143]. Darunter befindet sich eine Transition von C nach T an Position -1306, die eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp1 zerstört und die Promotoraktivität verringert. Ein weiterer C/T-Polymorphismus an Position -735 unterbricht möglicherweise ebenfalls eine Transkriptionsfaktorbindungsstelle [144]. Ein Polymorphismus im codierenden Bereich übt offenbar einen protektiven Effekt bei der AMD aus [145].

2.2.6.3. MMP-9

Während viele Zelltypen MMP-2 konstitutiv sezernieren, wird MMP-9 nur nach Stimulation abgegeben [146]. Zu den Cytokinen, die eine Expression von *MMP9* induzieren können, zählen Interleukin-1 β und TNF- α [129, 147]. Die zirkulierende Konzentration von MMP-9 ist ein Prädiktor für Schweregrad und Prognose bei koronarer Herzkrankheit, peripherer arterieller Verschlusskrankheit und Bluthochdruck [119]. Eine starke Expression von *MMP9* in atherosklerotischen Plaques trägt vermutlich zu deren Instabilität bei [142]. Erhöhte Plasmaspiegel von MMP-9 wurden bei Patienten mit proliferativer diabetischer Retinopathie gefunden [148]. In vielen Studien wurde eine wichtige Rolle von MMP-9 bei der Tumordinvasion und Metastasierung gezeigt [149]. Neben Kollagen und Elastin ist MMP-9 auch in der Lage, die Proformen von TGF- β und Interleukin-1 β in die aktiven Formen zu spalten [150, 151]. Der Promotor des *MMP9*-Gens enthält einen Polymorphismus, der in einem Austausch von C gegen T an der Position -1562 relativ zum Transkriptionsstart besteht. Das T-Allel führt *in vitro* zu einer erhöhten Promotoraktivität, eine Auswirkung auf den Plasmaspiegel von MMP-9 scheint jedoch nicht vorhanden zu sein [142, 148]

2.2.6.4. MMP-14

Eine wichtige Funktion von MMP-14, auch bezeichnet als MT1-MMP, ist die Aktivierung von proMMP-2 an der Zelloberfläche. Dazu bindet MMP-14 TIMP-2 und bildet mit diesem einen Komplex, der wiederum proMMP-2 binden und aktivieren kann [134]. Es wird angenommen, dass MMP-14 wegen der Fähigkeit, proMMP-2 zu aktivieren, eine wichtige Rolle bei der MMP-vermittelten Degradation der ECM spielt. Darüber hinaus kann MMP-14 jedoch auch direkt ECM-Komponenten wie Fibronectin, Vitronectin, Laminin und Kollagen vom Typ I spalten [130, 146]. *MMP14* wird von endothelialen Zellen und Glattmuskelzellen in Reaktion auf Cytokine wie TNF- α und Interleukin-1 β sowie auf oxidierte Lipoproteine verstärkt exprimiert [120, 141]. Wie *MMP2* ist auch *MMP14* durch Östrogen induzierbar [152]. proMMP-9 wird durch MMP-14 offenbar nicht aktiviert [153]. In einer Studie konnte eine Assoziation von MMP-14 mit der chronischen obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) gezeigt werden [154].

2.2.6.5. Gewebeinhibitoren von Matrix-Metalloproteinasen (TIMPs)

Zu der Familie der *tissue inhibitor of matrix metalloproteinases* gehören unter anderem TIMP-1 und TIMP-2. Sie können die Aktivitäten aller bekannten MMPs inhibieren und spielen eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der Balance zwischen Auf- und Abbau der ECM im Rahmen verschiedener physiologischer Prozesse [155]. TIMPs sind wichtige Kontrollfaktoren der Aktivität von MMPs [129]. TIMP-2 spielt eine Rolle bei der Aktivierung von proMMP-2 durch MMP-14, in hohen Konzentrationen blockiert es diese allerdings. Ein Ungleichgewicht zwischen der degradativen Aktivität der MMPs und der inhibitorischen Wirkung der TIMPs führt zu einer pathologischen Gewebeerstörung in Krankheiten wie rheumatoider Arthritis oder Osteoarthritis [155]. Auch bei abdominalen Aortenaneurysmen scheint eine Dysbalance zwischen MMPs und TIMPs vorzuliegen, das Verhältnis ist zugunsten der Proteasen verschoben [140, 156].

2.3. Gen-*knockdown* mittels siRNA-vermittelter RNA-Interferenz

Das Phänomen der RNA-Interferenz (RNAi) ist ein zuerst in Pflanzen entdeckter, durch die Aktivierung eines sequenzspezifischen RNA-Degradationsprozesses (*posttranscriptional gene silencing* (PTGS)) regulatorisch wirkender, Mechanismus. Wahrscheinlich sollte dieser Mechanismus das Genom der Pflanzen vor fremdem mobilem genetischem Material, wie z.B. Viren oder Transposons, schützen. Kurz nach der Entdeckung der RNAi in Pflanzen wurden auch in fast allen anderen Organismen RNAi-abhängige Prozesse nachgewiesen. Vor allem bei eukaryontischen Organismen scheint die RNAi bei der Regulation des Entwicklungsprozesses eine entscheidende Rolle zu spielen [157]. Dabei rücken die von den Zellen produzierten mikro-RNAs (miRNAs) immer stärker als Regulatoren in den Vordergrund, weil diese ähnlich den *small interfering* RNAs (siRNAs) die Expression von Genen spezifisch hemmen können.

Im Jahre 1998 konnte erstmals gezeigt werden, dass beim Fadenwurm *C. elegans* durch die Injektion von doppelsträngiger RNA (dsRNA) die Expression des zur dsRNA komplementären Gens gehemmt wird [158]. Eine Anwendung der langen dsRNA-Moleküle in Wirbeltieren zum *knockdown* eines Gens war wegen der unspezifischen Interferonantwort nicht möglich [159]. Nähere Untersuchungen in *C. elegans* und der Fruchtfliege *Drosophila* zeigten schließlich, dass schon ca. 21-23 Nucleotide lange dsRNA-Moleküle für die Suppression eines Gens ausreichen. Diese kurzen dsRNA-Moleküle müssen für ihre Funktion über ein 5'-Phosphat-Ende, ein 3'-Hydroxyl-Ende und einen Überhang von zwei bis drei Nucleotiden am 3'-Ende verfügen [160]. Solche kurzen dsRNA-Moleküle, die in der Lage sind, einen *knockdown* zu induzieren, werden als *small interfering RNA* (siRNA) bezeichnet. Da die siRNA-Moleküle keine Interferonantwort in Wirbeltieren hervorrufen und synthetisch hergestellt werden können, ist es möglich geworden, fast jedes beliebige Gen sequenzspezifisch auszuschalten.

Aufgrund der siRNA-Struktur ergab sich die Vermutung, dass ein Enzym der RNaseIII-Familie an der Prozessierung von langen dsRNA-Molekülen beteiligt sein könnte. Im Jahre 2001 konnte in *Drosophila melanogaster* das evolutionär konservierte Enzym DICER identifiziert werden, welches aus einer Helicase-Domäne, zwei RNaseIII-Motiven und einer dsRNA-Bindedomäne aufgebaut ist. Als Dimer ist es, in Verbindung mit anderen Proteinen, an der Spaltung von langer dsRNA in die kurzen siRNA-Moleküle beteiligt [157]. Die prozessierten oder direkt transfizierten siRNA-Moleküle werden in den Multienzymkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) als Einzelstrang aufgenommen [161]. Dabei wird immer der Strang in den RISC aufgenommen, der am 5'-Ende die niedrigere Basenpaarungsenergie aufweist [162]. Ist ein einzelsträngiges RNA-Molekül (*antisense*-Strang) in dem RISC gebunden, so kann dieser die zur gebundenen RNA komplementäre mRNA in der Mitte der Erkennungsstelle spalten. Ein weiterer Abbau der degradierten mRNA findet wahrscheinlich durch Exoribonucleasen statt [163].

Für diese Arbeit wurden synthetische siRNA-Moleküle mittels reverser Transfektion in die Zellen eingeschleust. Da die Wirkung einer solchen Transformation mit siRNA zeitlich begrenzt ist, wurden auch Vektor-basierte Techniken zur dauerhaften RNA-Interferenz entwickelt. Eine Möglichkeit ist die Verwendung von *small hairpin* RNA-codierenden Vektoren. Die transkribierte RNA dieser Vektoren bildet durch die sense- und antisense-Sequenz eine partielle dsRNA-Struktur, wobei zwischen den homologen Sequenzen eine Sequenz für die Haarnadelstruktur (*hairpin*) lokalisiert ist. Bindet diese shRNA an DICER, so wird sie zur „reifen“ siRNA prozessiert, welche wiederum mit dem RISC interagiert, wodurch es schließlich zur Degradation der komplementären mRNA kommt.

Anwendungen für die siRNA-Technik sind zum Einen die Identifizierung von Funktionen bestimmter Gene und zum Anderen die mögliche therapeutische Nutzung. Für einen möglichen therapeutischen Einsatz der siRNA-Technik müssen allerdings noch einige Probleme, wie z.B. die RNA-Instabilität, die spezifische Applikation oder auch die effiziente Aufnahme in verschiedene Zelltypen, gelöst werden.

2.4. Immortalisierung primärer Zellen

Ein wesentliches Hindernis bei der Immortalisierung primärer humaner Zellen und der Etablierung von humanen Zelllinien stellt die über Telomere kontrollierte zelluläre Seneszenz dar [164]. Zelluläre Seneszenz wird durch die Verkürzung der Telomere an den Enden der Chromosomen verursacht. Die DNA-Polymerase ist nicht in der Lage, die Enden der linearen DNA-Moleküle vollständig zu replizieren, so dass die Telomere mit jeder Teilung somatischer Zellen kürzer werden. Das Enzym Telomerase kann den Abbau der Telomere sowie das Einsetzen der Seneszenz verhindern, seine Expression ist jedoch auf die frühen Phasen der Embryonalentwicklung beschränkt. Im adulten Individuum exprimieren nur sehr wenige Zellen in Blut, Haut und Verdauungstrakt eine funktionelle Telomerase. Die RNA-Komponente der Telomerase wird jedoch in vielen Zellen in geringem Maß exprimiert. Durch den Transfer exogener hTERT-cDNA, die für katalytische Untereinheit der humanen Telomerase codiert, kann eine funktionelle Telomerase rekonstituiert, die Verkürzung der Telomere und der Eintritt in die zelluläre Seneszenz verhindert und so primäre humane Zellen immortalisiert werden [165]. Durch hTERT können Zellen immortalisiert werden, ohne dass mit der Krebsentstehung verbundene Veränderungen oder ein abweichender zellulärer Phänotyp entstehen [166, 167]. Immortalisierte primäre Zellen können Tumorzellen für die Verwendung in zellbiologischen Studien ablösen und stellen ein Modellsystem zur Verfügung, das den Eigenschaften der Ursprungszellen eher entspricht als Tumorzellen.

2.5. Gegenstand und Ziele der vorliegenden Arbeit

PXE ist eine Erkrankung, die durch eine ausgesprochene Variabilität des klinischen Phänotyps charakterisiert ist. Trotz der Identifizierung einiger Gene, die offenbar einen Einfluss auf Krankheitsausbruch und Schweregrad haben, sind noch längst nicht alle Faktoren bekannt, die die große Bandbreite verschiedener Ausprägungen von PXE bestimmen. Weiterhin kann die Identifizierung von Genen, die einen Einfluss auf die Pathogenese von PXE nehmen, auch dazu beitragen, die pathobiochemischen Vorgänge aufzuklären, die schließlich zur Manifestation der PXE-Symptome führen und die noch in weiten Teilen unbekannt sind. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag daher auf der Identifizierung weiterer genetischer Kofaktoren für PXE. Besonderes Augenmerk lag dabei auf solchen Genen, die möglicherweise einen Einfluss auf die regelmäßig mit PXE einhergehende Retinopathie ausüben

Obgleich eine Vielzahl von Beobachtungen zu Veränderungen der extrazellulären Matrix bei PXE vorliegt, ist wenig darüber bekannt, welche molekularen Mechanismen etwa zur Veränderung von elastischen Fasern oder der Akkumulation von Proteoglykanen führen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher zunächst im Zellkulturmodell an Fibroblasten die Veränderungen im Aufbau der ECM möglichst genau charakterisiert werden. Der Schwerpunkt sollte dabei auf die Proteoglykane und besonders die Biosynthese ihrer GAG-Seitenketten gelegt werden. Anschließend sollte durch ein gezieltes Ausschalten des *ABCC6*-Gens in normalen dermalen Fibroblasten überprüft werden, ob die gefundenen Veränderungen auf eine *ABCC6*-Defizienz zurückzuführen sind.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit sollten Marker gefunden werden, die sich für eine nicht-invasive Charakterisierung des Matrix-Umbaus in den betroffenen Geweben von PXE-Patienten eignen, um so die Krankheitsaktivität erfassen und eventuell den Erfolg therapeutischer Maßnahmen ermitteln zu können.

Schließlich sollte durch Immortalisierung primärer dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten ein Modellsystem geschaffen werden, das sich für zellbiologische Untersuchungen der Konsequenzen einer *ABCC6*-Defizienz eignet, ohne den für primären Zellen typischen Einschränkungen bezüglich der Kultivierung zu unterliegen.

3. Ergebnisse

3.1. Analysen zur Genexpression dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die mRNA-Expression ausgewählter Gene des Biosynthesewegs der Glykosaminoglykane, von Genen, die für Proteine der extrazellulären Matrix codieren, sowie von Genen bestimmter Metalloproteinasen und deren Inhibitoren in dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten (N = 5) untersucht werden. Dermale Fibroblasten von gesunden Spendern (N = 5) dienten als Kontrolle. Für die Genexpressionsanalysen wurden dermale Fibroblasten von PXE-Patienten und Kontrollen (alle zwischen der 2. und 4. Passage) in jeweils zwei Kulturschalen parallel für zehn Tage kultiviert. Nach diesem Zeitraum wurden die Zellkulturüberstände zur Bestimmung der Xylosyltransferase-Aktivität abgenommen und bei -20°C gelagert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert. Von jeder Probe wurde jeweils 1 µg RNA in cDNA revers transkribiert. Um zu eruieren, ob die gefundenen Veränderungen bei fortgesetzter Kultivierung persistieren oder ob es sich um transiente Effekte handelt, wurde die Kultivierung mit Zellen von Patienten und Kontrollen, die sich zwischen der 5. und 7. Passage befanden, wiederholt.

Die Quantifizierung der relativen Genexpression der Zielgene erfolgte mittels *realtime* RT-PCR. Dazu wurden die cDNA-Proben im Verhältnis von 1:20 mit Wasser verdünnt und in Dreifachbestimmung gemessen. Um möglichst vergleichbare Messwerte für die zu analysierenden Ziel- und Haushaltsgene zu erhalten, wurde die mRNA-Expression in allen Proben, die miteinander verglichen werden sollten, in einem PCR-Lauf quantifiziert. Die Normalisierung der gewonnenen Rohdaten erfolgte unter Verwendung von als konstant angenommenen Referenzgenen, sogenannten Haushaltsgenen. Dazu wurde zunächst die Expression einiger Kandidaten-Haushaltsgene in sämtlichen cDNA-Proben bestimmt. Die stabilsten Haushaltsgene wurden ausgewählt und zu einem Index kombiniert. Die Berechnung der normalisierten Expression erfolgte mit der $\Delta\Delta$ - c_t -Methode [168]. Die Expressionsdaten wurden schließlich reskaliert, indem der Wert der höchsten Expression gleich eins gesetzt wurde.

3.1.1. Optimierung von spezifischen *realtime* PCRs

Im Vorfeld wurden *realtime* PCR-Anwendungen für die zu analysierenden Ziel- und Haushaltsgene auf dem *Mastercycler*-System der Firma Eppendorf etabliert und optimiert. Für jedes Zielgen wurden verschiedene *Primer*-Paare getestet und das am besten geeignete *Primer*-Paar für die Verwendung mit dem *Mastercycler*-System optimiert. Das Vorgehen bei der Optimierung der spezifischen *realtime* PCRs wird im Folgenden exemplarisch am Beispiel der für die MMP-2-cDNA spezifischen *realtime* PCR erläutert. Für die Quantifizierung der Matrix-Metalloproteinase 2 wurden zunächst drei verschiedene *Primer*-Paare getestet. Dazu wurde eine PCR auf einem herkömmlichen *Thermocycler* durchgeführt, wobei gepoolte cDNA von PXE-Patienten und Kontrollen als *Template* zum Einsatz kam. Die Funktionsfähigkeit der *Primer*-Paare und die Amplifikation eines spezifischen Produkts

wurden dann durch Auftrennung der PCR-Produkte auf einem Agarosegel überprüft. Eines der *Primer*-Paare lieferte ein spezifisches Produkt, das sich durch das Auftreten einer einzelnen starken Bande auf dem Agarosegel auszeichnete.

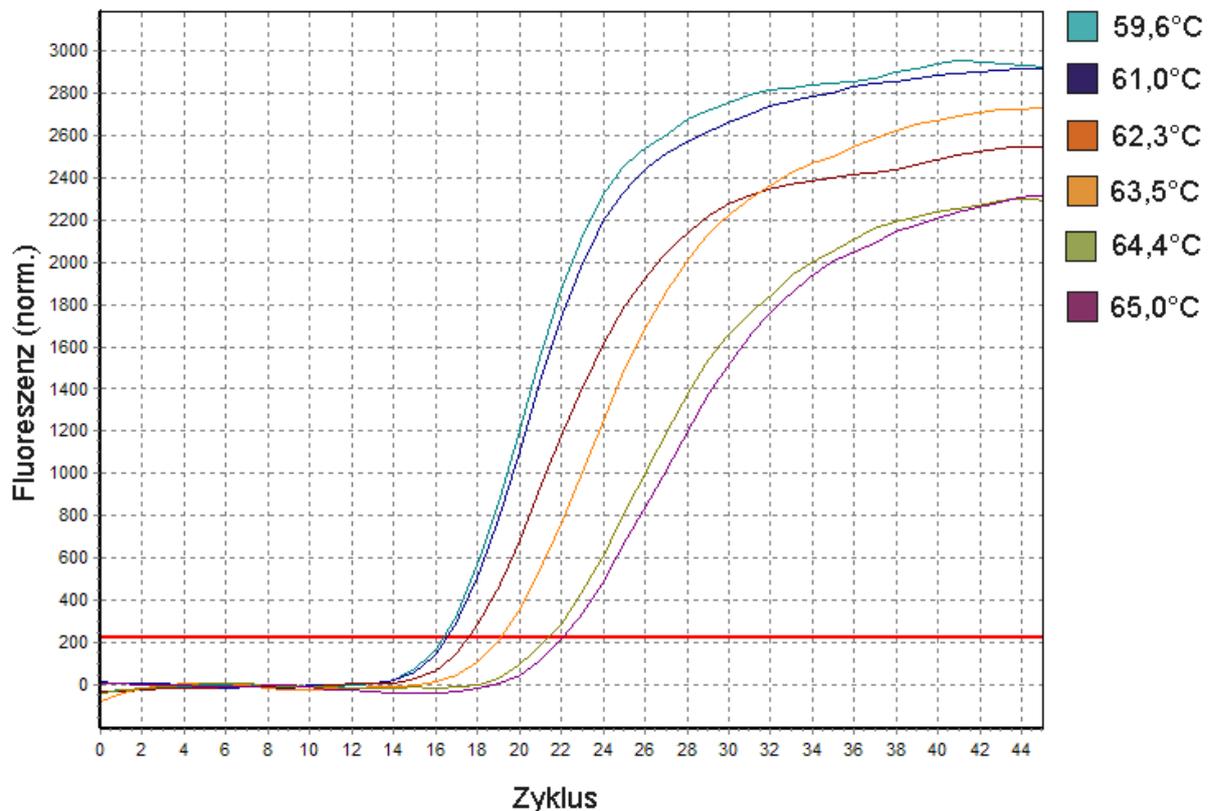


Abbildung 3-1: Optimierung der *Annealing*-Temperatur eines *Primer*-Paares zur Quantifizierung der mRNA-Expression der Matrix-Metalloproteinase 2. Die PCR wurde mit einem Temperaturgradienten durchgeführt. Die Kurven beschreiben den Verlauf der PCR bei verschiedenen Temperaturen. Sowohl der c_t -Wert als auch die erreichte Endkonzentration und die Reaktionseffizienz, angezeigt durch die Steigung der Kurven, hängen empfindlich von der jeweiligen *Annealing*-Temperatur ab. Für das untersuchte *Primer*-Paar wurde eine Temperatur von 59,6°C als optimal bestimmt.

Dieses *Primer*-Paar wurde dann mit einer Temperaturgradienten-PCR auf dem *Mastercycler*-System getestet und die optimale *Annealing*-Temperatur für die *realtime* PCR wurde ermittelt (Abbildung 3-1). Um sicherzustellen, dass bei der *realtime* PCR nur ein spezifisches Produkt amplifiziert und quantifiziert wurde, umfasste jedes PCR-Programm die Aufnahme einer Schmelzkurve (Abbildung 3-2). Die Identität der Amplifikate wurde zusätzlich durch direktes Sequenzieren verifiziert. Bei der Messung der cDNA mit dem ausgewählten *Primer*-Paar zeigten sich jedoch erhebliche Abweichungen zwischen den Triplikaten, vermutlich aufgrund einer instabilen PCR. Dies fällt bei der Optimierung der PCR nicht unbedingt auf, sondern zeigt sich unter Umständen erst bei Messungen an Proben mit sehr unterschiedlichen *Template*-Konzentrationen. Daraufhin wurden drei weitere *Primer*-Paare wie beschrieben getestet und mit dem geeignetsten wiederum die Expression bestimmt. Bei diesem Paar zeigten sich keine größeren Abweichungen zwischen den Triplikaten, so dass die Messwerte verwendet werden konnten.

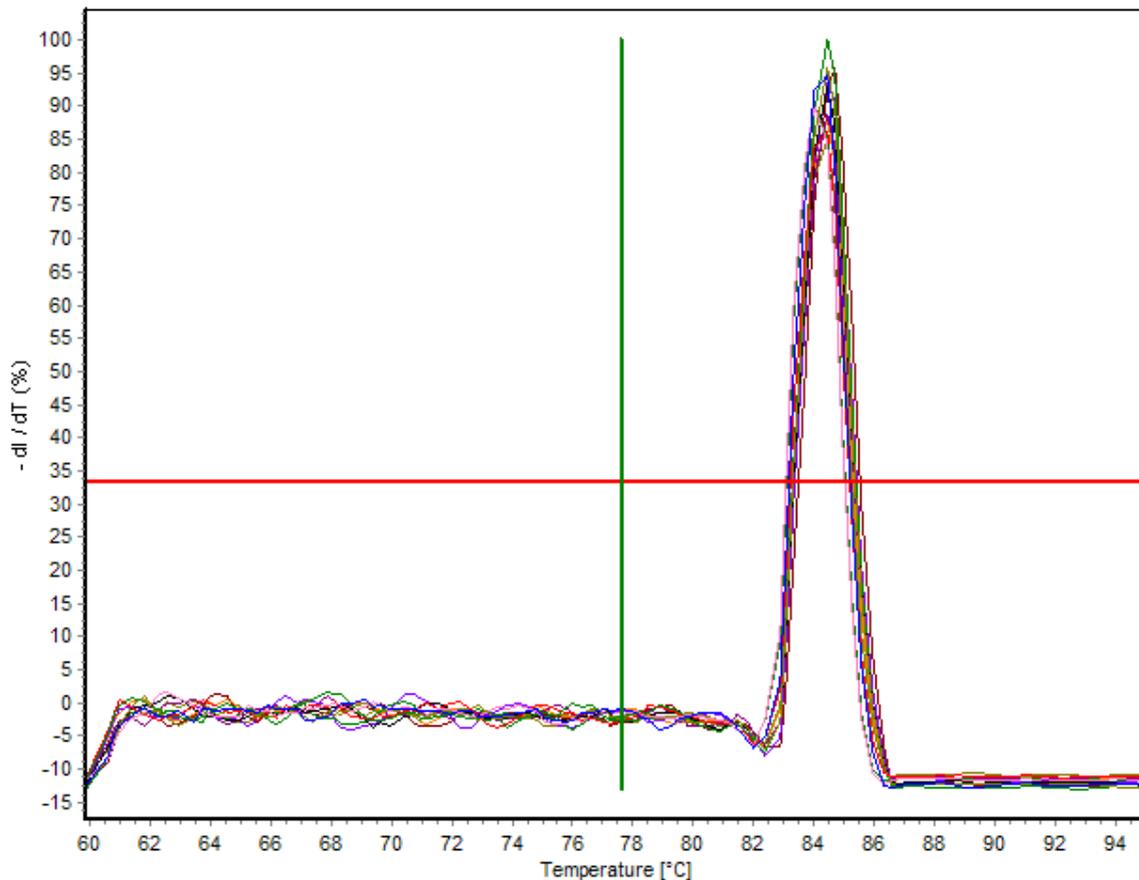


Abbildung 3-2: Überprüfung der Spezifität einer PCR durch Schmelzkurven-Analyse. Die Graphen beschreiben die Veränderungsrate der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur. Ein einziger scharfer Peak zeigt das Vorliegen eines einzigen, definierten Produkts.

3.1.2. Auswahl konstant exprimierter Haushaltsgene

Zur Ermittlung von geeigneten Haushaltsgenen für die Normalisierung der gewonnenen Expressionsdaten wurden zunächst die in Tabelle 3-1 aufgeführten Gene, von denen eine annähernd konstante Expression in dermalen Fibroblasten erwarten werden konnte, in den cDNA-Proben quantifiziert. Die Haushaltsgen-Kandidaten wurden dann mit dem Programm geNorm [169] auf ihre Expressionsstabilität hin untersucht. Dieses Programm analysiert paarweise Korrelationen zwischen den einzelnen Haushaltsgenen und berechnet daraus das Stabilitätsmaß M , anhand dessen sich die getesteten Gene nach der Stabilität ihrer Expression ordnen lassen. Die stabilsten Haushaltsgene, d.h. die mit dem niedrigsten Wert von M , werden dann zu einem Index verknüpft, indem der geometrische Durchschnitt berechnet wird.

Tabelle 3-1: Auf ihre Eignung als Haushaltsgen hin untersuchte Gene.

<i>Symbol</i>	<i>Referenz-sequenz</i>	<i>Name</i>	<i>Funktion</i>
<i>ACTB</i>	NM_001101	β -Actin	Bestandteil des Cytoskeletts
<i>B2M</i>	NM_004048	β 2-Mikroglobulin	β -Kette von MHC I-Molekülen
<i>HPRT1</i>	NM_000194	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1	Katalyse der Umwandlung von Hypoxanthin zu Inosinmonophosphat
<i>RPL13A</i>	NM_012423	Ribosomales Protein L13a	Struktureller Bestandteil der großen 60S ribosomalen Untereinheit
<i>SDHA</i>	NM_004168	Succinatdehydrogenasekomplex Untereinheit A, Flavoprotein	Katalytische Untereinheit der Succinat-Ubiquinon-Oxidoreduktase
<i>TUBA1</i>	NM_006000	α 1-Tubulin	Bestandteil des Cytoskeletts
<i>YWHAZ</i>	NM_003406	Tyrosin-3-monooxygenase/ Tryptophan-5-monooxygenase Aktivierungsprotein, ζ -Polypeptid	Signaltransduktion über Bindung an phosphorylierte Serinreste in einer Reihe von Signalmolekülen

Wie der Tabelle 3-2 zu entnehmen ist, war die Expressionsstabilität in allen Proben bei *HPRT1* am größten und bei *YWHAZ* am geringsten ($M = 0,92$ bzw. $M = 1,67$). Abbildung 3-3 zeigt die Stabilität eines aus den relativen Expressionen der Kandidatengene berechneten Index. Zur Ermittlung der optimalen Anzahl von Haushaltsgenen wurden anschließend die Abweichungen zwischen jeweils zwei

Tabelle 3-2: Deskriptive Statistik der getesteten Haushaltsgene und des daraus errechneten Index.

<i>Faktor</i>	<i>ACTB</i>	<i>B2M</i>	<i>HPRT1</i>	<i>RPL13A</i>	<i>SDHA</i>	<i>TUBA1</i>	<i>YWHAZ</i>	<i>Index</i>
N	96	96	96	96	96	96	96	96
GM [c_i]	17,16	17,08	22,71	18,05	22,51	26,84	21,19	20,42
AM [c_i]	17,17	17,08	22,72	18,09	22,53	26,86	21,24	20,43
Min [c_i]	15,49	15,70	21,38	15,30	20,94	22,26	19,03	19,31
Max [c_i]	18,33	18,35	24,30	20,56	25,10	30,25	29,57	22,05
SD [$\pm c_i$]	0,5615	0,5186	0,5477	1,160	1,027	1,033	1,615	0,4897
CV [% c_i]	3,27	3,04	2,41	6,41	4,56	3,85	7,60	2,40
M	0,957	0,983	0,920	1,285	1,144	1,123	1,667	0,760

GM: geometrischer Durchschnitt; AM: arithmetischer Durchschnitt; Min: kleinster c_i -Wert; Max: größter c_i -Wert; SD: Standardabweichung; CV: Varianz; M: Stabilitätsmaß.

Normalisierungsfaktoren mit einer zunehmenden Anzahl von Genen betrachtet (Abbildung 3-4). Eine große Varianz bedeutet, dass das hinzugefügte Gen einen signifikanten Effekt hat und zur Berechnung des Normalisierungsfaktors mit herangezogen werden sollte. Im Falle der für diese Arbeit untersuchten Haushaltsgene ergibt diese Analyse eine optimale Anzahl von sechs Genen.

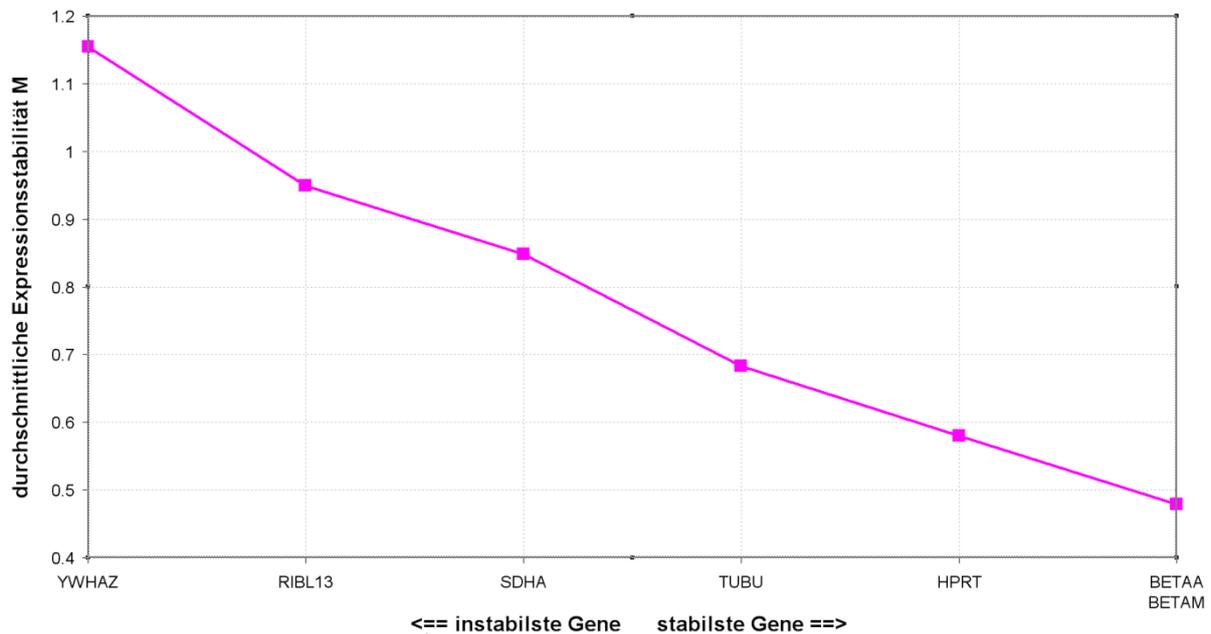


Abbildung 3-3: Durchschnittliche Stabilität der verbleibenden Haushaltsgene nach sukzessiver Entfernung der Gene mit der geringsten Expressionsstabilität

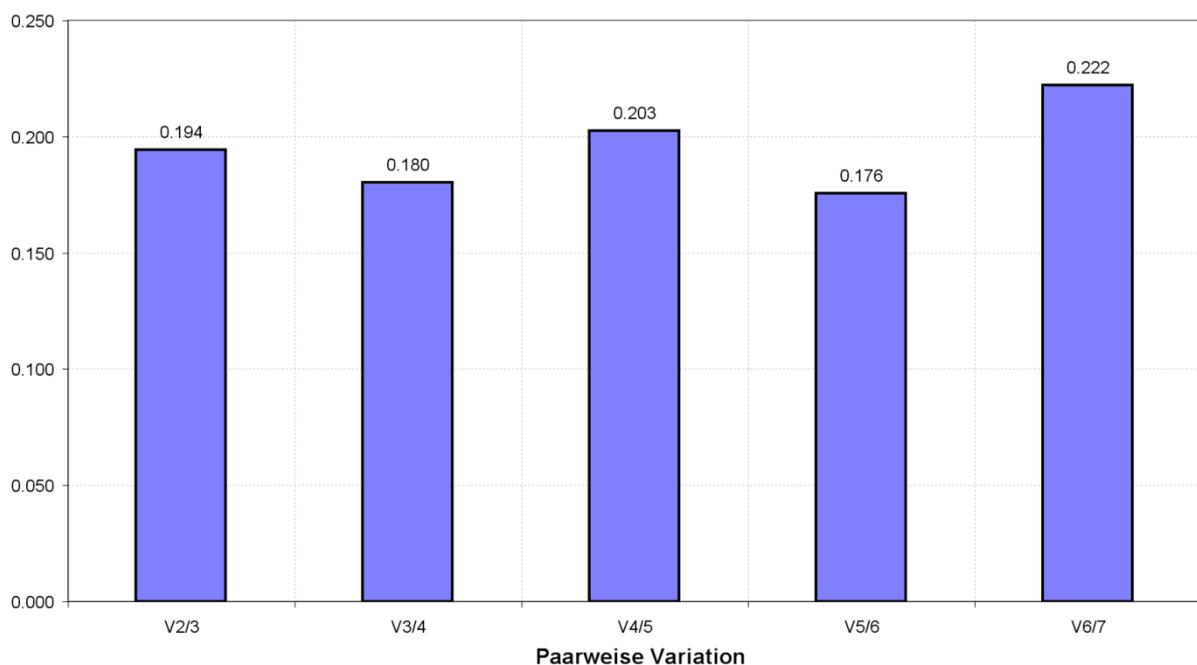


Abbildung 3-4: Ermittlung der optimalen Anzahl an Haushaltsgenen zur Normalisierung der Zielgen-Expression. Bei einer Anzahl von sechs Haushaltsgenen hat das Hinzufügen weiterer Gene keinen signifikanten Effekt auf den berechneten Normalisierungsfaktor mehr.

3.1.3. Relative Quantifizierung der Genexpression ausgewählter Proteine der ECM in PXE-Fibroblasten und Kontrollzellen

Zur Expressionsanalyse wurden Gene ausgesucht, die entweder in direktem pathogenetischen Zusammenhang mit PXE stehen bzw. solche, für die sich dies vermuten lässt (Tabelle 3-3). Für einige dieser Gene wurde bereits zuvor eine veränderte Expression bei PXE berichtet [44, 170].

Tabelle 3-3: Gene der ECM-Proteine, deren Expression quantifiziert wurde.

<i>Symbol</i>	<i>Referenzsequenz</i>	<i>Name</i>	<i>Funktion</i>
<i>ACAN</i>	NM_001135	Aggrecan Chondroitinsulfat Proteoglykan 1	Wesentlicher Bestandteil der ECM des Knorpels
<i>ACTA2</i>	NM_001613	α 2 Actin <i>smooth muscle actin</i>	Bestandteil der glatten Muskulatur der Blutgefäße
<i>BGN</i>	NM_001711	Biglycan Dermatansulfat Proteoglykan 1	Kollagen-Fibrillogenese
<i>CD44</i>	NM_000610	CD44 Antigen Hermes-Antigen	Hyaluronan-Rezeptor Lymphozyten-Aktivierung
<i>DCN</i>	NM_001920	Decorin Dermatansulfat Proteoglykan 2	Matrix-Assemblierung
<i>ELN</i>	NM_000501	Elastin	Bestandteil der elastischen Fasern
<i>FNI</i>	NM_002026	Fibronectin 1	Zelladhäsion und -migration
<i>SPARC</i>	NM_003118	Osteonektin <i>secreted protein, acidic, cysteine rich</i>	Matrix-assoziiertes Protein
<i>SPPI</i>	NM_000582	Osteopontin <i>secreted phosphoprotein 1</i>	Regulation der biologischen Mineralisierung
<i>TNC</i>	NM_002160	Tenascin C	Regulation der Migration von Fibroblasten nach Gewebeverletzungen
<i>VCAN</i>	NM_004385	Versican	Gewebsmorphogenese und Homöostase
<i>VTN</i>	NM_000638	Vitronectin	Zelladhäsion, Komplement-Inhibierung

Beim Vergleich der Expressionen zwischen aus PXE-Patienten stammenden Proben und solchen aus gesunden Kontrollpersonen zeigten sich für einige der untersuchten Gene Unterschiede, zum überwiegenden Teil jedoch nur bei einer Gruppe der nach Passagen aufgeteilten Proben. So wurden bei den Fibroblasten aus frühen Passagen signifikant erhöhte Expressionen des Fibronectin 1-, des Biglycan- und des Elastin-Gens sowie eine signifikant erniedrigte Expression des CD44-Gens bei Proben von PXE-Patienten im Vergleich zu den Kontrollpersonen gefunden. Deutlich, aber nicht signifikant verringert war außerdem die Expression des α 2-Actin-, des Aggrecan- und des Vitronektin-Gens. Die Fibroblasten aus späteren Passagen zeigten eine stark verringerte Expression der Gene von Aggrecan, Biglycan, Elastin und Osteonektin, eine verringerte Expression des Osteopontin-, Fibronectin- und des Vitronektin-Gens sowie eine erhöhte Expression des Tenascin C- und des Decorin-Gens. Alle beschriebenen Veränderungen waren statistisch signifikant ($P < 0,05$). Die Ergebnisse der Expressionsanalyse sind in Tabelle 3-4 zusammengefasst.

Tabelle 3-4: Ergebnisse der Expressionsanalyse der Gene der ECM-Proteine. Signifikante Unterschiede sind hervorgehoben, eine signifikante Verringerung der Genexpression bei PXE-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen ist zusätzlich rot markiert.

<i>Gen</i>	<i>Relative Expression (Passagen 2 – 4)</i>			<i>Relative Expression (Passagen 5 - 7)</i>		
	<i>PXE^a</i>	<i>Kontrollen^a</i>	<i>P^b</i>	<i>PXE^a</i>	<i>Kontrollen^a</i>	<i>P^b</i>
<i>ACAN</i>	0,202 ± 0,194	0,405 ± 0,357	0,117	0,003 ± 0,004	0,333 ± 0,352	0,0002
<i>ACTA2</i>	0,0764 ± 0,072	0,152 ± 0,043	0,115	0,126 ± 0,194	0,290 ± 0,331	0,085
<i>BGN</i>	0,468 ± 0,284	0,160 ± 0,287	0,0230	0,159 ± 0,099	0,452 ± 0,289	0,0002
<i>CD44</i>	0,122 ± 0,012	0,307 ± 0,084	0,0222	0,329 ± 0,193	0,259 ± 0,116	0,267
<i>DCN</i>	0,169 ± 0,029	0,272 ± 0,093	0,254	0,384 ± 0,225	0,153 ± 0,051	0,0015
<i>ELN</i>	0,465 ± 0,330	0,102 ± 0,127	0,0041	0,083 ± 0,069	0,369 ± 0,284	0,0001
<i>FNI</i>	0,472 ± 0,292	0,226 ± 0,232	0,0471	0,259 ± 0,140	0,453 ± 0,327	0,0264
<i>SPARC</i>	0,216 ± 0,132	0,406 ± 0,295	0,0673	0,242 ± 0,085	0,527 ± 0,237	< 0,0001
<i>SPPI</i>	0,080 ± 0,095	0,266 ± 0,384	0,135	0,139 ± 0,124	0,286 ± 0,272	0,045
<i>TNC</i>	0,354 ± 0,107	0,371 ± 0,399	0,897	0,371 ± 0,179	0,170 ± 0,135	0,0022
<i>VCAN</i>	0,247 ± 0,136	0,380 ± 0,311	0,213	0,155 ± 0,231	0,115 ± 0,067	0,565
<i>VTN</i>	0,078 ± 0,015	0,225 ± 0,129	0,163	0,037 ± 0,062	0,274 ± 0,407	0,0149

^a Mittelwert ± Standardabweichung

^b t-Test für die Gleichheit der Mittelwerte

3.1.4. Relative Quantifizierung der Genexpression ausgewählter, an der GAG-Biosynthese beteiligter Proteine

Tabelle 3-5 zeigt die in dieser Arbeit untersuchten Gene an der GAG-Biosynthese beteiligter Proteine. Darunter befinden sich Gene mit einer Funktion beim Aufbau des Tetrasaccharid-*Linkers*, der die GAG-Ketten mit dem Core-Protein verbindet, Gene, deren Produkte eine Rolle beim Aufbau der eigentlichen GAG-Kette aus sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten spielen, sowie Gene, die für Enzyme codieren, die Modifikationen an der GAG-Kette durchführen.

Tabelle 3-5: Gene der an der GAG-Biosynthese beteiligten Enzyme, deren Expression quantifiziert wurde.

<i>Symbol</i>	<i>Referenzsequenz</i>	<i>Name</i>	<i>Funktion</i>
<i>XYLT1</i>	NM_022166	Xylosyltransferase I (XylT-I)	Übertragung von Xyloseresten von UDP-Xylose auf ein Akzeptorprotein
<i>XYLT2</i>	NM_022167	Xylosyltransferase II (XylT-II)	Übertragung von Xyloseresten von UDP-Xylose auf ein Akzeptorprotein
<i>B4GALT7</i>	NM_007255	Xylosylprotein β -1,4-Galactosyltransferase Polypeptid 7	Übertragung des ersten Galaktose-Rests während des Aufbaus des <i>Linkers</i>
<i>B3GALT6</i>	NM_080605	UDP-Gal: β -Gal β -1,3-Galactosyltransferase Polypeptid 6	Übertragung des zweiten Galaktose-Rests während des Aufbaus des <i>Linkers</i>
<i>B3GAT3</i>	NM_012200	β -1,3-Glucuronyltransferase 3	Transfer der terminalen Glukuronsäure auf den <i>Linker</i>
<i>CSGALNACT1</i>	NM_018371	Chondroitinsulfat <i>N</i> -Acetyl-galaktosaminyltransferase I	Transfer von <i>N</i> -Acetylgalaktosamin auf Glukuronsäure-Reste
<i>CSGALNACT2</i>	NM_018590	Chondroitinsulfat <i>N</i> -Acetyl-galaktosaminyltransferase II	Transfer von <i>N</i> -Acetylgalaktosamin auf Glukuronsäure-Reste
<i>EXTL1</i>	NM_004455	Glukuronosyl- <i>N</i> -acetylglukosaminyl-proteoglykan 4- α - <i>N</i> -acetylglucosaminyltransferase	Kettenverlängerung von Heparansulfat
<i>EXTL2</i>	NM_001439	α -1,4- <i>N</i> -Acetylglucosaminyltransferase	Übertragung von <i>N</i> -Acetylglukosamin auf den Tetrasaccharid- <i>Linker</i> bei der Proteoglykan-Biosynthese

<i>Symbol</i>	<i>Referenz-sequenz</i>	<i>Name</i>	<i>Funktion</i>
<i>EXTL3</i>	NM_001440	Glukuronyl-galaktosyl-proteoglykan 4- α -N-acetylglucosaminyltransferase	Übertragung von <i>N</i> -Acetylglucosamin auf den Tetrasaccharid- <i>Linker</i> bei der Proteoglykan-Biosynthese
<i>GLCE</i>	NM_015554	Glukuronsäure-C5-Epimerase	Epimerisierung von D-Glukuronsäure-Resten zu L-Iduronsäure
<i>EXT1</i>	NM_000127	Exostosin 1	Kettenverlängerung von Heparansulfat
<i>EXT2</i>	NM_000401	Exostosin 2	Kettenverlängerung von Heparansulfat
<i>CHSY1</i>	NM_014918	Chondroitinsynthase 1	Chondroitin-Polymerisierung
<i>CHPF</i>	NM_024536	Chondroitin-Polymerisierungsfaktor	Chondroitin-Polymerisierung
<i>CHSY3</i>	NM_175856	Chondroitinsynthase 2	Chondroitin-Polymerisierung
<i>CHPF2</i>	NM_019015	Chondroitin-Polymerisierungsfaktor 2	Chondroitin-Polymerisierung
<i>CHST11</i>	NM_018413	Chondroitin-4-sulfotransferase 1	4-Sulfatierung von Chondroitinsulfat
<i>CHST12</i>	NM_018641	Chondroitin-4-sulfotransferase 2	4-Sulfatierung von Chondroitinsulfat
<i>CHST3</i>	NM_004273	Chondroitin-6-sulfotransferase 1	6-Sulfatierung von Chondroitinsulfat
<i>UST</i>	NM_005715	Uronyl-2-sulfotransferase	2-Sulfatierung von Chondroitinsulfat
<i>NDST2</i>	NM_003635	<i>N</i> -Deacetylase / <i>N</i> -Sulfotransferase 2	Deacetylierung / Sulfatierung von Heparansulfat
<i>HAS1</i>	NM_001523	Hyaluronansynthase-1	Synthese von Hyaluronan
<i>HAS2</i>	NM_005328	Hyaluronansynthase-2	Synthese von Hyaluronan
<i>HAS3</i>	NM_005329	Hyaluronansynthase-3	Synthese von Hyaluronan

3.1.4.1. Analyse der Expression der an der Synthese des Tetrasaccharid-Linkers beteiligten Gene

Die Fibroblasten von PXE-Patienten zeigten in frühen Passagen im Vergleich mit von gesunden Kontrollpersonen stammenden Fibroblasten eine erhöhte Expression aller an der *Linker*-Synthese beteiligten Gene, mit Ausnahme des *B4GALT7*-Gens. Die Veränderungen waren allerdings in keinem Fall statistisch signifikant. Bei den Zellen späterer Passagen war die beschriebene Erhöhung nicht mehr zu beobachten, die Genexpressionen unterschieden sich mit Ausnahme von *XYLT1* und *B3GALT6* nicht zwischen Zellen von PXE-Patienten und Kontrollen. Die Expression des *B3GALT6*-Gens war bei den Zellen von PXE-Patienten in späteren Passagen leicht, die des *XYLT1*-Gens signifikant erniedrigt (Tabelle 3-6).

Tabelle 3-6: Ergebnisse der Expressionsanalyse der an der Synthese des Tetrasaccharid-Linkers beteiligten Gene. Signifikante Unterschiede sind hervorgehoben, eine signifikante Verringerung der Genexpression bei PXE-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen ist zusätzlich rot markiert.

<i>Gen</i>	<i>Relative Expression (Passagen 2 - 4)</i>			<i>Relative Expression (Passagen 5 - 7)</i>		
	<i>PXE^a</i>	<i>Kontrollen^a</i>	<i>P^b</i>	<i>PXE^a</i>	<i>Kontrollen^a</i>	<i>P^b</i>
<i>XYLT1</i>	0,511 ± 0,281	0,368 ± 0,170	0,180	0,183 ± 0,078	0,519 ± 0,326	0,0049
<i>XYLT2</i>	0,494 ± 0,259	0,373 ± 0,246	0,288	0,154 ± 0,134	0,219 ± 0,252	0,348
<i>B4GALT7</i>	0,582 ± 0,141	0,699 ± 0,158	0,0881	0,344 ± 0,243	0,410 ± 0,187	0,422
<i>B3GALT6</i>	0,499 ± 0,324	0,270 ± 0,149	0,125	0,391 ± 0,198	0,548 ± 0,306	0,0865
<i>B3GAT3</i>	0,393 ± 0,415	0,125 ± 0,084	0,060	0,403 ± 0,224	0,376 ± 0,182	0,730

^a Mittelwert ± Standardabweichung

^b t-Test für die Gleichheit der Mittelwerte

3.1.4.2. Analyse der Expression der an der Initiation und Verlängerung der GAG-Kette beteiligten Gene

Beim Vergleich der Expressionen zwischen den von PXE-Patienten stammenden Proben und denen von gesunden Kontrollpersonen zeigte sich bei Fibroblasten von PXE-Patienten in frühen Passagen eine signifikant erhöhte Expression des *CSGALNACT1*- und eine leicht erhöhte Expression des *EXTL2*- und des *EXT2*-Gens. Die Expression des *HAS2*-Gens war signifikant, die des *HAS1*- und des *CHSY3*-Gens leicht erniedrigt. Bei den Zellen aus späteren Passagen wurde eine signifikant erniedrigte Genexpression von *CHPF*, *CHSY3*, *CHPF2* und *HAS1* bei den Fibroblasten aus PXE-Patienten beobachtet. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse sind in Tabelle 3-7 zusammengefasst. Die mRNA von *HAS3* konnte in den dermalen Fibroblasten nicht quantifiziert werden, da die Expression zu gering war.

Tabelle 3-7: Ergebnisse der Expressionsanalyse der an der Initiation und Verlängerung der GAG-Kette beteiligten Gene. Signifikante Unterschiede sind hervorgehoben, eine signifikante Verringerung der Genexpression bei PXE-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen ist zusätzlich rot markiert.

<i>Gen</i>	<i>Relative Expression (Passagen 2 - 4)</i>			<i>Relative Expression (Passagen 5 - 7)</i>		
	<i>PXE^a</i>	<i>Kontrollen^a</i>	<i>P^b</i>	<i>PXE^a</i>	<i>Kontrollen^a</i>	<i>P^b</i>
<i>CSGALNACT1</i>	0,444 ± 0,212	0,179 ± 0,084	0,0039	0,214 ± 0,228	0,198 ± 0,241	0,852
<i>CSGALNACT2</i>	0,483 ± 0,240	0,488 ± 0,276	0,963	0,487 ± 0,267	0,472 ± 0,229	0,870
<i>EXTL2</i>	0,506 ± 0,275	0,327 ± 0,088	0,0639	0,464 ± 0,186	0,494 ± 0,205	0,666
<i>EXTL3</i>	0,651 ± 0,154	0,612 ± 0,261	0,678	0,305 ± 0,235	0,416 ± 0,196	0,180
<i>EXT1</i>	0,526 ± 0,252	0,487 ± 0,219	0,708	0,379 ± 0,188	0,329 ± 0,140	0,434
<i>EXT2</i>	0,612 ± 0,203	0,499 ± 0,154	0,170	0,165 ± 0,100	0,134 ± 0,044	0,328
<i>CHSY1</i>	0,321 ± 0,366	0,294 ± 0,139	0,830	0,342 ± 0,097	0,432 ± 0,248	0,156
<i>CHPF</i>	0,324 ± 0,319	0,337 ± 0,296	0,922	0,233 ± 0,164	0,572 ± 0,255	< 0,0001
<i>CHSY3</i>	0,326 ± 0,172	0,465 ± 0,276	0,176	0,300 ± 0,219	0,459 ± 0,184	0,0436
<i>CHPF2</i>	0,560 ± 0,172	0,586 ± 0,173	0,734	0,366 ± 0,254	0,550 ± 0,195	0,0396
<i>HAS1</i>	0,385 ± 0,211	0,530 ± 0,257	0,182	0,239 ± 0,126	0,513 ± 0,342	0,0028
<i>HAS2</i>	0,256 ± 0,235	0,631 ± 0,350	0,0089	0,244 ± 0,284	0,268 ± 0,238	0,808

^a Mittelwert ± Standardabweichung

^b t-Test für die Gleichheit der Mittelwerte

3.1.4.3. Analyse der Expression der an der Modifizierung der GAG-Kette beteiligten Gene

Die Analyse der Expression der an der Modifizierung der GAG-Kette beteiligten Gene ergab eine leichte, nicht statistisch signifikante Erhöhung der Expression der Gene der Chondroitin-4-sulfotransferase *CHST12* und der Chondroitin-6-sulfotransferase *CHST3* bei Fibroblasten von PXE-Patienten in einer frühen Passage im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Expression von *CHST11* war tendenziell ebenfalls erhöht. Bei den Zellen in späten Passagen fand sich eine leicht erhöhte Expression von *CHST12* und *CHST3*. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse sind in Tabelle 3-8 zusammengefasst.

Tabelle 3-8: Ergebnisse der Expressionsanalyse der an Modifizierung der GAG-Kette beteiligten Gene.

<i>Gen</i>	<i>Relative Expression (Passagen 2 – 4)</i>			<i>Relative Expression (Passagen 5 - 7)</i>		
	<i>PXE^a</i>	<i>Kontrollen^a</i>	<i>P^b</i>	<i>PXE^b</i>	<i>Kontrollen^b</i>	<i>P^b</i>
<i>GLCE</i>	0,457 ± 0,345	0,414 ± 0,185	0,728	0,192 ± 0,262	0,218 ± 0,291	0,796
<i>CHST11</i>	0,479 ± 0,234	0,364 ± 0,149	0,200	0,415 ± 0,310	0,364 ± 0,270	0,644
<i>CHST12</i>	0,472 ± 0,319	0,305 ± 0,165	0,159	0,290 ± 0,216	0,161 ± 0,095	0,060
<i>CHST3</i>	0,496 ± 0,262	0,349 ± 0,239	0,064	0,266 ± 0,235	0,157 ± 0,133	0,152
<i>UST</i>	0,543 ± 0,219	0,559 ± 0,241	0,873	0,403 ± 0,228	0,458 ± 0,264	0,538
<i>NDST2</i>	0,412 ± 0,280	0,444 ± 0,204	0,768	0,381 ± 0,269	0,468 ± 0,220	0,352

^a Mittelwert ± Standardabweichung^b t-Test für die Gleichheit der Mittelwerte

3.1.5. Relative Quantifizierung der Genexpression ausgewählter Metalloproteinasen und Proteinase-Inhibitoren

Untersucht wurde die Genexpression der Matrix-Metalloproteinasen *MMP2*, *MMP9* sowie der membrangebundenen Metalloproteinasen *MMP14*, die für die Aktivierung von proMMP-2 verantwortlich ist. Außerdem wurde die Expression der Gene der beiden Matrixmetalloproteinasen-Inhibitoren *TIMP1* und *TIMP2* quantifiziert.

Tabelle 3-9: Gene der Metalloproteinasen und Protease-Inhibitoren, deren Expression quantifiziert wurde.

<i>Symbol</i>	<i>Referenzsequenz</i>	<i>Name</i>	<i>Funktion</i>
<i>MMP2</i>	NM_004530	Matrix-Metalloproteinase 2 Gelatinase A	Abbau der ECM
<i>MMP9</i>	NM_004994	Matrix-Metalloproteinase 9 Gelatinase B	Abbau der ECM
<i>MMP14</i>	NM_004995	Matrix-Metalloproteinase 14 Membran-Typ 1 MMP	Aktivierung von proMMP-2
<i>TIMP1</i>	NM_003254	Metalloproteinasen-Inhibitor 1	Inhibition verschiedener MMPs
<i>TIMP2</i>	NM_003255	Metalloproteinasen-Inhibitor 2	Inhibition verschiedener MMPs Unterdrückung der Proliferation endothelialer Zellen

Die MMP-9-mRNA konnte in den untersuchten Fibroblasten nicht quantifiziert werden. Bei den übrigen untersuchten Genen konnte in keinem Fall eine signifikante Veränderung der Expression festgestellt werden (Tabelle 3-10). Bei den Zellen in den späten Passagen zeigte sich jedoch eine leicht verringerte Expression des *TIMP1*-Gens und eine leicht erhöhte Expression des *TIMP2*-Gens in Fibroblasten von PXE-Patienten im Vergleich zu den Kontrollzellen. Tendenziell waren diese Veränderungen auch in den Zellen aus frühen Passagen zu beobachten.

Tabelle 3-10: Ergebnisse der Expressionsanalyse der Metalloproteinasen und Proteinase-Inhibitoren.

<i>Gen</i>	<i>Relative Expression (Passagen 2 - 4)</i>			<i>Relative Expression (Passagen 5 - 7)</i>		
	<i>PXE^a</i>	<i>Kontrollen^a</i>	<i>P^b</i>	<i>PXE^a</i>	<i>Kontrollen^a</i>	<i>P^b</i>
<i>MMP2</i>	0,268 ± 0,280	0,310 ± 0,259	0,727	0,432 ± 0,276	0,469 ± 0,226	0,697
<i>MMP14</i>	0,356 ± 0,251	0,246 ± 0,256	0,193	0,209 ± 0,101	0,274 ± 0,251	0,308
<i>TIMP1</i>	0,534 ± 0,220	0,628 ± 0,287	0,405	0,480 ± 0,185	0,589 ± 0,242	0,159
<i>TIMP2</i>	0,608 ± 0,177	0,469 ± 0,305	0,211	0,504 ± 0,231	0,382 ± 0,143	0,111

^a Mittelwert ± Standardabweichung

^b t-Test für die Gleichheit der Mittelwerte

3.1.6. Zusammenfassung der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse

Die Analyse der Genexpression der ECM-Proteine zeigte bei einem Großteil der Gene eine signifikant reduzierte Expression bei den Fibroblasten der PXE-Patienten aus späten Passagen im Vergleich mit den sich ebenfalls in späten Passagen befindlichen Fibroblasten von gesunden Kontrollpersonen. Dies betraf die Genexpression von Aggrecan, Elastin, Fibronectin, Osteonektin, Osteopontin und Vitronectin. Aus dieser Gruppe wiesen Elastin und Fibronectin in Zellen aus frühen Passagen noch eine relativ zu den Kontrollzellen signifikant erhöhte Genexpression auf. Anders als bei den meisten anderen Genen fand sich bei Decorin und Tenascin-C in den Fibroblasten der späten Passagen eine im Vergleich mit den Zellen gesunder Spender signifikant erhöhte Expression. Im Gegensatz zum Decorin zeigte das Biglycan-Gen eine signifikant verminderte Expression in den Zellen der späten Passagen, nachdem in den Zellen der frühen Passagen eine erhöhte Expression zu verzeichnen war. Schließlich ergab die Quantifizierung der Genexpression von CD44 nur in den Fibroblasten aus frühen Passagen eine signifikante Reduktion, verglichen mit den Zellen gesunder Spender. Bemerkenswert ist noch die deutlich, wenn auch nicht signifikant verringerte Expression des $\alpha 2$ -Actin-Gens bei den Fibroblasten von PXE-Patienten, die sowohl in Zellen aus frühen als auch aus späten Passagen beobachtet wurde.

Bei den an der Biosynthese von GAGs beteiligten Genen fiel bei Fibroblasten aus frühen Passagen eine deutlich erhöhte Expression von *EXTL2* und eine sehr stark erhöhte Expression von *CSGALNACT1* bei den Zellen der PXE-Patienten im Vergleich zu den Zellen der gesunden Spender auf. Beide Gene sind an der Initiation der GAG-Kettensynthese beteiligt. Im Gegensatz dazu fand sich bei den Genen, die an der Kettenverlängerung beteiligt sind, keine Veränderung der Expression. Nur die mRNA-Konzentration des an der Polymerisierung von HS-Ketten beteiligten *EXT2*-Gens war leicht erhöht. Während die Expression der an der Initiation beteiligten Gene sich bei Fibroblasten später Passagen nicht mehr zwischen Patienten- und Kontrollzellen unterschied, war bei den an der Kettenverlängerung beteiligten Genen eine teilweise dramatisch verringerte Expression bei den PXE-Fibroblasten zu verzeichnen. Auch das Expressionsmuster der Hyaluronansynthesen wies deutliche Unterschiede zwischen frühen und späten Passagen auf. Während zunächst die Expression von *HAS2* bei PXE-Fibroblasten stark erniedrigt war, war diese später bei Patienten- und Kontrollzellen praktisch gleich, während dann die Expression von *HAS1* stark erniedrigt war. Schließlich ergab die Expressionsanalyse der an der Kettenmodifikation beteiligten Gene bei den Fibroblasten aus frühen Passagen im Fall der beiden Chondroitin-4-sulfotransferasen *CHST11* und *CHST12* sowie der Chondroitin-6-sulfotransferase *CHST3* eine Erhöhung der mRNA-Konzentration bei den Zellen der PXE-Patienten im Vergleich mit den Kontrollen. Dabei blieb die Expression von *CHST12* und *CHST3* auch in späten Passagen erhöht.

Die Analyse der Expression der Matrix-Metalloproteinasen und Proteinase-Inhibitoren zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Zellen von PXE-Patienten und denen der gesunden Spender. Bemerkenswert war allerdings eine leicht erhöhte Expression des *MMP14*- und des *TIMP2*-Gens, die beide an der Aktivierung von proMMP-2 beteiligt sind.

3.2. Untersuchung der Auswirkungen eines *ABCC6*-knockdowns auf die Genexpression dermalen PXE-Fibroblasten

Um zu untersuchen, ob die beim Vergleich zwischen Fibroblasten von PXE-Patienten und Kontrollpersonen gefundenen Veränderungen der Genexpression im Zusammenhang mit der bei PXE-Fibroblasten vorhandenen *ABCC6*-Defizienz stehen, sollten die Auswirkungen einer induzierten *ABCC6*-Defizienz auf die Expression anderer Gene mittels eines siRNA-vermittelten *knockdowns* des *ABCC6*-Gens in normalen humanen Dermalfibroblasten analysiert werden. Dabei sollte die Expression solcher Gene quantifiziert werden, bei denen sich signifikante Unterschiede zwischen PXE- und Kontrollfibroblasten bezüglich ihrer Expression gezeigt hatten. Um zu verifizieren, dass es sich bei den durch den *knockdown* verursachten Veränderungen tatsächlich um Auswirkungen der induzierten *ABCC6*-Defizienz handelt, wurden die *knockdown*-Experimente parallel mit Dermalfibroblasten aus zwei verschiedenen gesunden Spendern sowie mit Fibroblasten eines PXE-Patienten durchgeführt.

Pro Zellkulturschale (10 cm Durchmesser) wurden 1×10^6 Zellen zur reversen Transfektion eingesetzt. Als Zeitpunkte für eine Analyse der Genexpressionen wurden 48h, 96h und 168h nach Transfektion ausgewählt. Zur Minimierung von Schwankungen in der Genexpression wurde je Analysezeitpunkt eine Doppelbestimmung aus zwei Zellkulturschalen durchgeführt. Die zu den jeweiligen Analysezeitpunkten abgenommenen Zellkulturüberstände wurden für eine spätere Bestimmung der XT-Aktivität und eine Analyse der GAG-Zusammensetzung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert, je Probe $2\text{ }\mu\text{g}$ RNA in cDNA revers transkribiert und diese als 1:5 Verdünnung (nur für das *ABCC6*-Gen) oder als 1:10 Verdünnung zur Analyse der Genexpression mittels *realtime* RT-PCR eingesetzt.

3.2.1. siRNA-vermittelter *knockdown* von *ABCC6*

Eine Analyse der Effektivität des *knockdowns* erfolgte durch die Bestimmung der Genexpression von *ABCC6*, welche bei einem erfolgreichen *knockdown* verringert sein muss. Abbildung 3-5 zeigt bei den

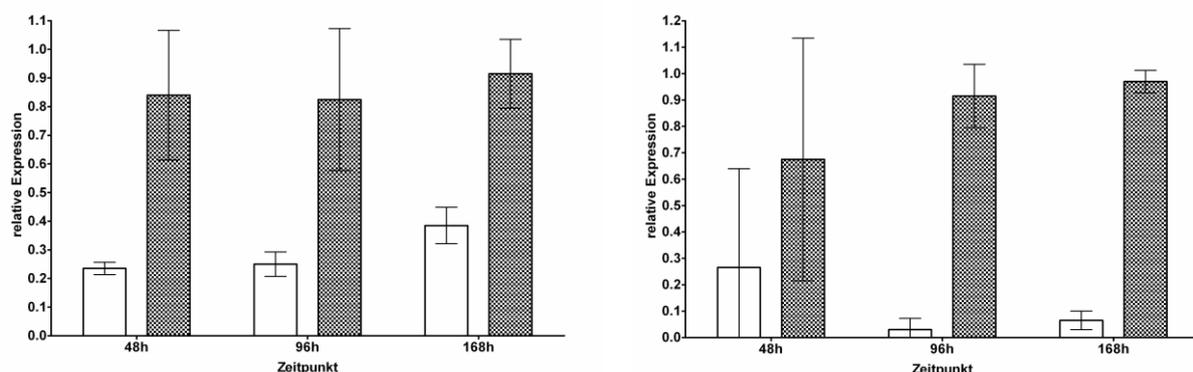


Abbildung 3-5: Expression des *ABCC6*-Gens nach siRNA-vermitteltem *knockdown* in den Zellen der gesunden Spender M45D (links) und M56D (rechts). Die ungefüllten Balken zeigen die Expression bei mit siRNA transfizierten Zellen, die gefüllten Balken die Expression bei mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen. Die Fehlerbalken geben Mittelwert und Standardabweichung an.

Zellen beider Spender und zu allen Zeitpunkten eine deutlich reduzierte Expression von *ABCC6* bei mit siRNA transfizierten Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit einem Kontroll-Oligonucleotid transfiziert wurden. Die Daten zeigen eine Reduktion der *ABCC6*-Expression um etwa 70% bei den Fibroblasten des Spenders M45D und um über 90% bei den Fibroblasten des Spenders M56D.

Das Elastin diente als *Marker-Gen*, weil schon zuvor eine ausgeprägte Induktion dieses Gens in Reaktion auf einen *ABCC6-knockdown* gezeigt werden konnte [170]. Wie Abbildung 3-6 zeigt, konnte eine deutliche Steigerung der Elastin-Expression nach *ABCC6-knockdown* beobachtet werden. Hervorzuheben ist, dass der Effekt auf die Elastin-Expression bei den Fibroblasten des Spenders M56D, bei denen der *knockdown* effektiver war, deutlich stärker ausgeprägt war.

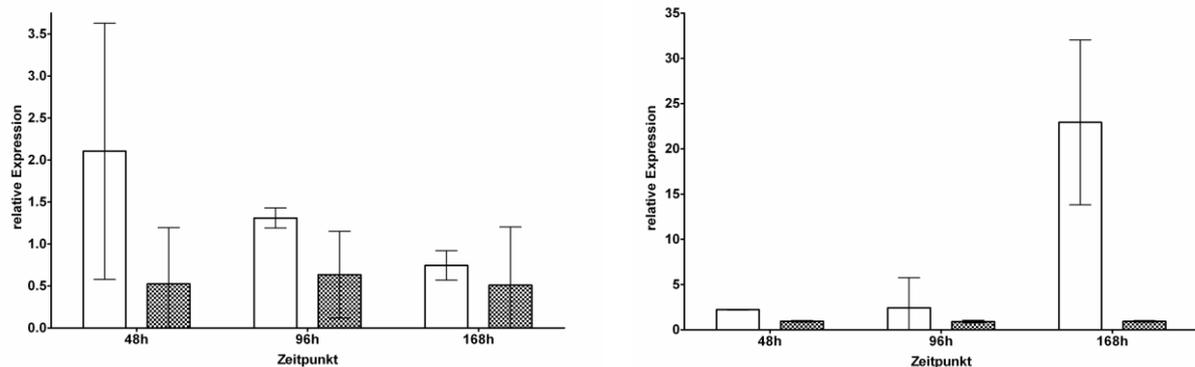


Abbildung 3-6: Expression des Elastin-Gens nach siRNA-vermitteltem *knockdown* von *ABCC6* in den Zellen der gesunden Spender M45D (links) und M56D (rechts). Die ungefüllten Balken zeigen die Expression bei mit siRNA transfizierten Zellen, die gefüllten Balken die Expression bei mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen. Die Fehlerbalken geben Mittelwert und Standardabweichung an.

Wie zu erwarten war, zeigte der siRNA-vermittelte *knockdown* keinen Effekt auf die Expression von *ABCC6* in Fibroblasten des PXE-Patienten P52M (Abbildung 3-7, linke Seite). Es zeigte sich jedoch bei den Zellen des Patienten auch eine starke Induktion des Elastin-Gens zum Zeitpunkt $t = 96h$ (Abbildung 3-7, rechte Seite).

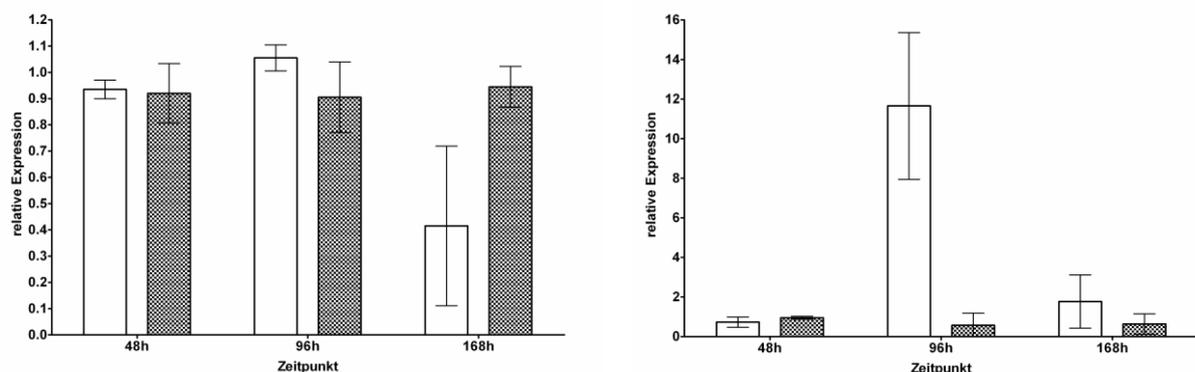


Abbildung 3-7: Expression des *ABCC6*-Gens (links) und des Elastin-Gens (rechts) in Zellen des PXE-Patienten P52M. Die ungefüllten Balken zeigen die Expression bei mit siRNA transfizierten Zellen, die gefüllten Balken die Expression bei mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen. Die Fehlerbalken geben Mittelwert und Standardabweichung an.

Das verwendete Kontroll-Oligonucleotid ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) gekoppelt, welcher eine fluoreszenzmikroskopische Kontrolle der durchgeführten Transfektion erlaubt. Abbildung 3-8 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme 24 Stunden nach Transfektion. Als grünlich leuchtende Punkte sind die FAM-markierten Kontroll-Oligonucleotide zu erkennen, welche sich sowohl in den Zellen (länglicher leicht grünlich scheinender Umriss) als auch auf der Oberfläche der Zellkulturschale befinden.

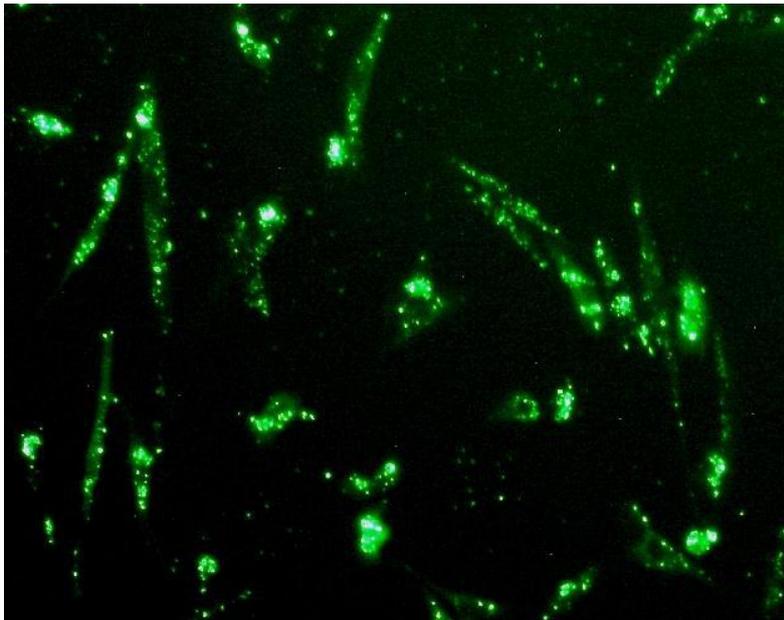


Abbildung 3-8:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Fibroblasten des gesunden Spenders M56D 24 Stunden nach Transfektion mit FAM-markierter Kontroll-siRNA. Die kleinen fluoreszierenden Punkte zeigen an, dass die Zellen die FAM-markierte Kontroll-siRNA effizient aufgenommen haben.

3.2.2. Auswirkungen eines *ABCC6*-knockdowns auf die Genexpression von ECM-Proteinen

Untersucht wurden die Auswirkungen eines *ABCC6*-knockdowns auf die Expression des Decorin-, Fibronectin-, CD44-, Tenascin-C- und des Biglycan-Gens. Wie die Abbildung 3-9 zeigt, waren im Falle des Fibronectin-Gens die beobachteten Expressionsveränderungen in Zellen der verschiedenen Spender inkonsistent. In einem Fall zeigt sich eine Induktion des Gens, im anderen Fall eine Reduktion der Expression. Die Genexpression in den Zellen des PXE-Patienten P52M war nicht signifikant verändert.

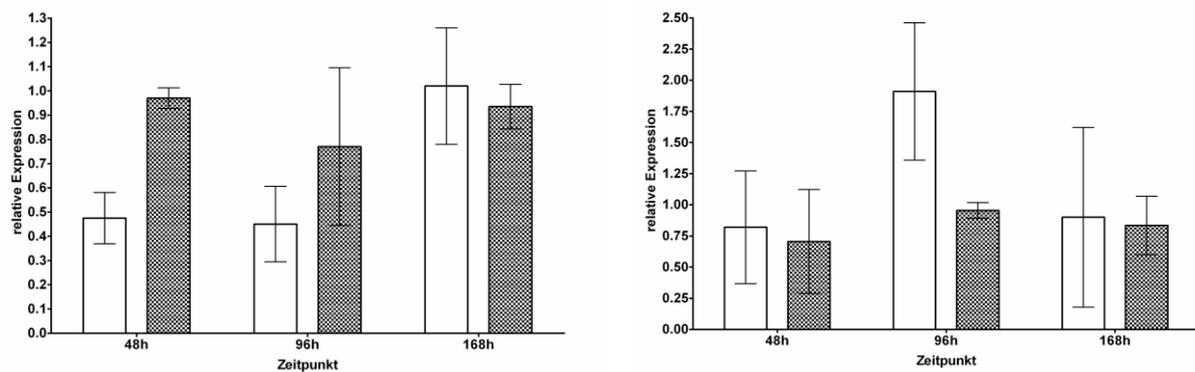


Abbildung 3-9: Expression des Fibronectin-Gens nach *ABCC6*-knockdown in Fibroblasten der gesunden Spender M45D (links) und M56D (rechts). Die ungefüllten Balken zeigen die Expression bei mit siRNA transfizierten Zellen, die gefüllten Balken die Expression bei mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen. Die Fehlerbalken geben Mittelwert und Standardabweichung an.

Für das Decorin-Gen zeigten sich nach *ABCC6*-knockdown keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression zwischen den mit siRNA und den mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen der beiden gesunden Spender M45D und M56D. Gleiches gilt für die Zellen des PXE-Patienten P52M. Beim *CD44*-Gen war in den Fibroblasten des Spenders M45D eine Induktion zu allen analysierten Zeitpunkten zu sehen (Abbildung 3-10). Dieses Ergebnis konnte jedoch in Zellen des Spenders M56D nicht reproduziert werden. Bei den Zellen des PXE-Patienten P52M war die Genexpression von *CD44* nicht signifikant verändert.

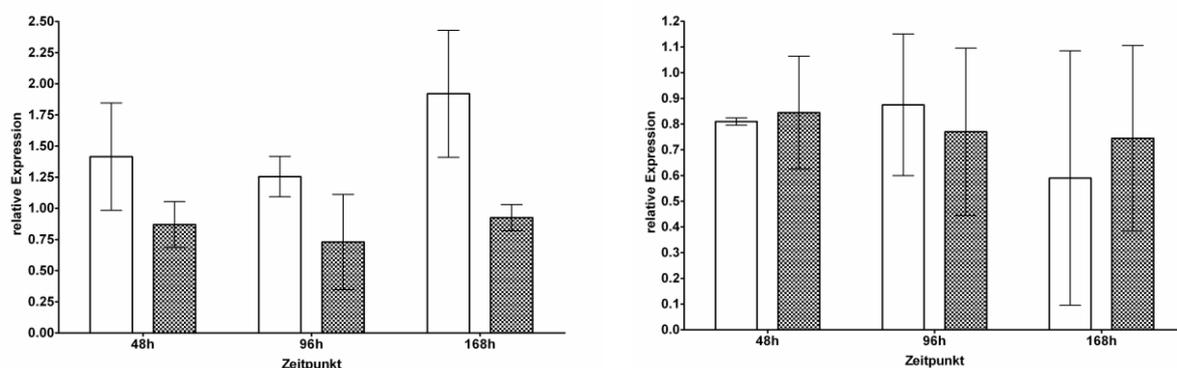


Abbildung 3-10: Expression des *CD44*-Gens nach *ABCC6*-knockdown in M45D (links) und M56D (rechts). Die ungefüllten Balken zeigen die Expression bei mit siRNA transfizierten Zellen, die gefüllten Balken die Expression bei mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen. Die Fehlerbalken geben Mittelwert und Standardabweichung an.

Beim Biglycan-Gen zeigte sich bei den Zellen des gesunden Spenders M45D eine signifikant reduzierte Expression in den mit siRNA transfizierten Zellen zum Zeitpunkt $t = 96$ h, nach 168 Stunden war dann aber eine ebenfalls signifikante Induktion des Gens zu verzeichnen (Abbildung 3-11). Bei Zellen des Spenders M56D dagegen wurde nach 96 Stunden eine erhöhte Biglycan-Expression gemessen, die dann jedoch nach 168 Stunden nicht mehr vorhanden war. Die Fibroblasten des PXE-Patienten P52M zeigten ebenfalls zum Zeitpunkt $t = 48$ h eine erhöhte Biglycan-Expression.

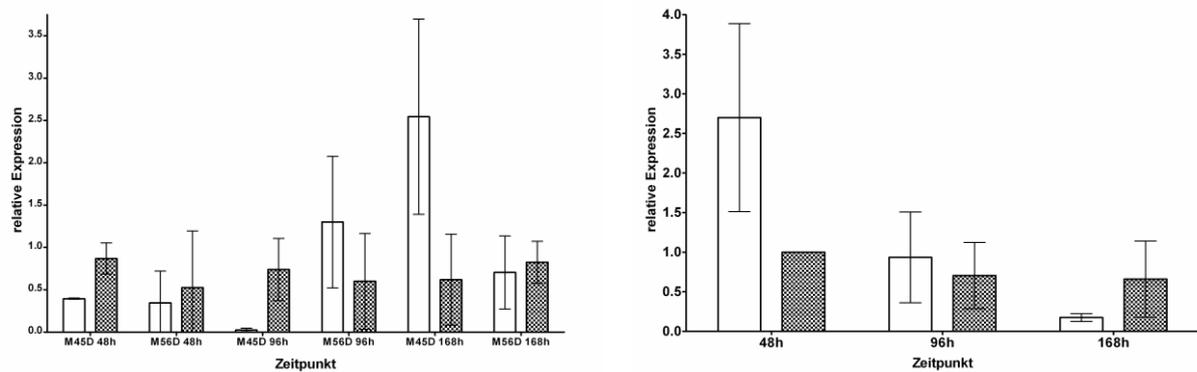


Abbildung 3-11: Expression des Biglycan-Gens nach *ABCC6-knockdown* in Fibroblasten der gesunden Spender M45D und M56D (links) und des PXE-Patienten P52M (rechts). Die ungefüllten Balken zeigen die Expression bei mit siRNA transfizierten Zellen, die gefüllten Balken die Expression bei mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen. Die Fehlerbalken geben Mittelwert und Standardabweichung an.

Die Expression des Tenascin-C-Gens war in Fibroblasten des Donors M45D zunächst bis zum Zeitpunkt $t = 96$ h gegenüber der Negativkontrolle verringert, zum Endpunkt der Kultivierung nach 168 Stunden jedoch deutlich erhöht (Abbildung 3-12). Bei den Fibroblasten des Donors M56D war die Expression von Tenascin-C schon nach 96 Stunden signifikant erhöht, ebenfalls noch nach 168 Stunden. Die Induktion des Gens war bei M56D deutlich stärker als bei M45D.

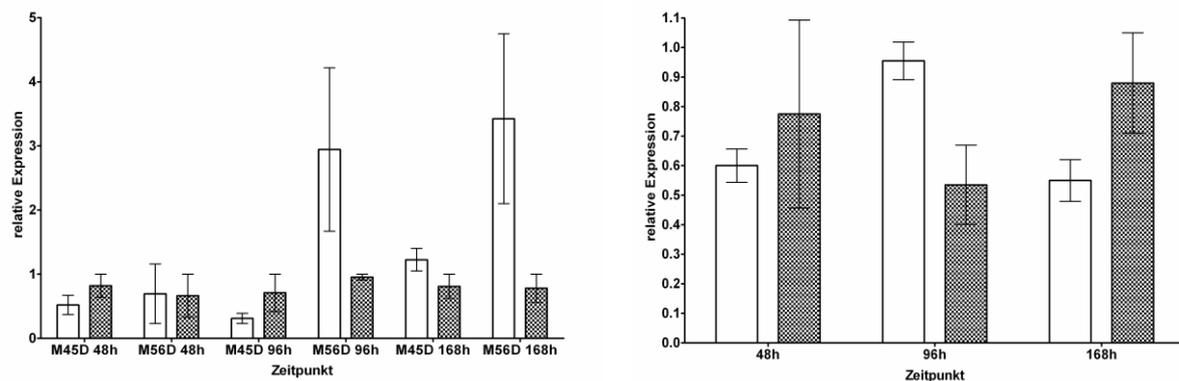


Abbildung 3-12: Expression des Tenascin-C-Gens nach *ABCC6-knockdown* in den Zellen der gesunden Spender M45D und M56D (links) sowie des PXE-Patienten P52M (rechts). Die ungefüllten Balken zeigen die Expression bei mit siRNA transfizierten Zellen, die gefüllten Balken die Expression bei mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen. Die Fehlerbalken geben Mittelwert und Standardabweichung an.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die mit den gesunden Kontrollfibroblasten gewonnen wurden, zeigte sich bei den Fibroblasten des Patienten P52M nach 168h eine signifikante Reduktion der Tenascin-C Expression bei den mit siRNA transfizierten Zellen im Vergleich mit den Kontrollen, nachdem zuvor zum Zeitpunkt $t = 96$ h eine signifikante Induktion des Tenascin-C Gens beobachtet

worden war. Der Effekt war allerdings deutlich schwächer ausgeprägt als bei den Zellen des Spenders M56D.

3.2.3. Auswirkungen eines *ABCC6*-knockdowns auf die Genexpression der an der GAG-Biosynthese beteiligten Proteine

Die Abbildung 3-13 zeigt die Ergebnisse der Genexpressionsmessung für die beiden Enzyme, die den ersten Schritt in der Biosynthese des Tetrasaccharid-*Linkers* katalysieren, die Übertragung von Xylose auf Serinreste der *Core*-Proteine. Die Expression von *XYLT1* war in den Zellen des Spenders M56D nach 48 Stunden sowie nach 96 Stunden leicht um etwa 25 % erhöht. Bei den Zellen des Spenders M45D zeigte sich nach 168 Stunden eine leichte Erhöhung. Für *XYLT2* zeigte sich bei den Fibroblasten beider gesunder Spender eine im Maximum um etwa das 1,5-fache erhöhte Genexpression nach 96 bzw. 168 Stunden. Bei den Fibroblasten des PXE-Patienten P52M wurde eine im wesentlichen unveränderte Expression des *XYLT1*-Gens nach dem *ABCC6*-knockdown beobachtet, die Expression von *XYLT2* hingegen war in den mit siRNA transfizierten Zellen deutlich erhöht.

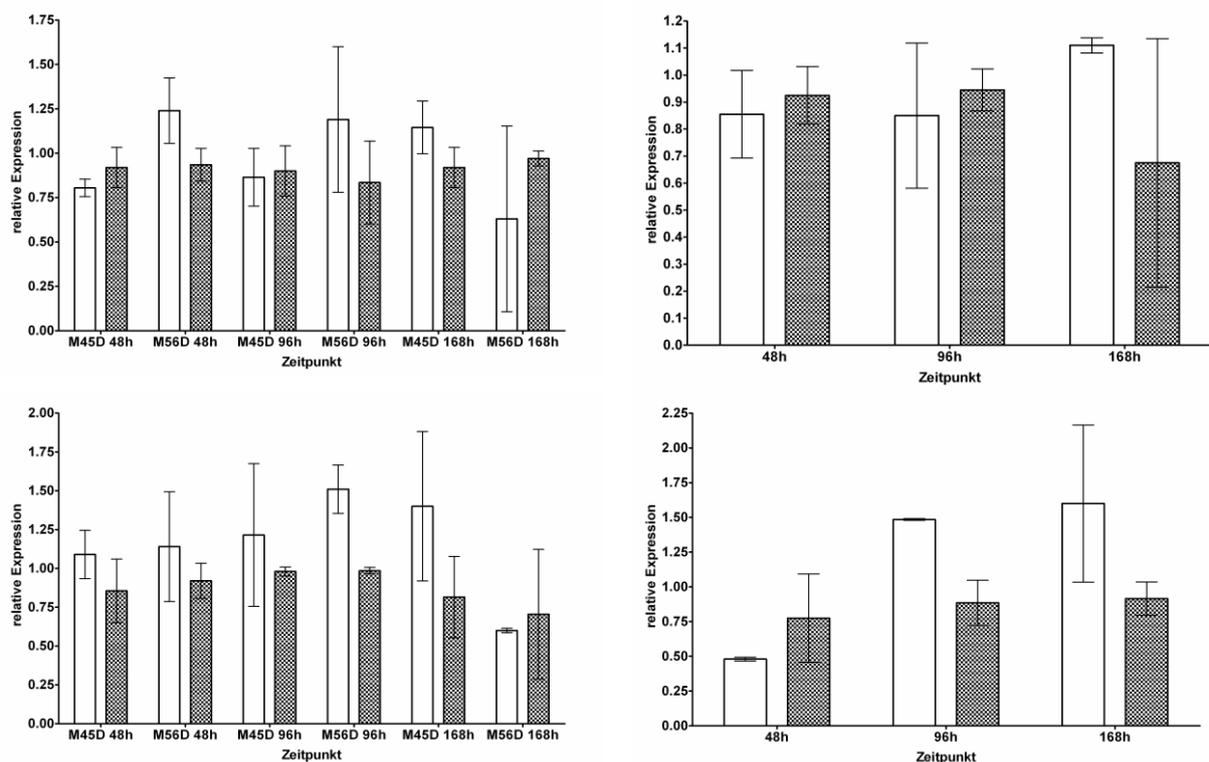


Abbildung 3-13: Expression von *XYLT1* (oben) und *XYLT2* (unten) nach *ABCC6*-knockdown in den Zellen der Spender M45D und M56D (links) sowie des PXE-Patienten P52M (rechts). Die ungefüllten Balken zeigen die Expression bei mit siRNA transfizierten Zellen, die gefüllten Balken die Expression bei mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen. Die Fehlerbalken geben Mittelwert und Standardabweichung an.

Die Abbildung 3-14 zeigt die Expression der drei weiteren, an der Biosynthese des Tetrasaccharid-*Linkers* beteiligten Gene. Bei Zellen von beiden gesunden Spendern war eine erhöhte Expression von *B4GALT7* und *B3GAT3* zu beobachten. Das Maximum der Induktion lag jedoch bei unterschiedlichen Zeitpunkten, bei M45D nach 96 Stunden und bei M56D nach 168 Stunden. Bemerkenswert ist der sehr ähnliche zeitliche Verlauf der Expression dieser beiden Gene. Das *B3GALT6*-Gen wies eine

tendenziell leicht verringerte Expression auf, allerdings mit einem Ausreißer nach oben. Die Fibroblasten des PXE-Patienten P52M zeigten ein ähnliches Expressionsmuster wie die Zellen der gesunden Spender, es gab eine deutliche Erhöhung der Expression von *B4GALT7* und *B3GAT3*, die am stärksten nach 96 Stunden ausgeprägt war, sowie eine verringerte Expression von *B3GALT6*. Wiederum zeigte sich bei *B4GALT7* und *B3GAT3* ein sehr ähnliches Muster der Veränderungen.

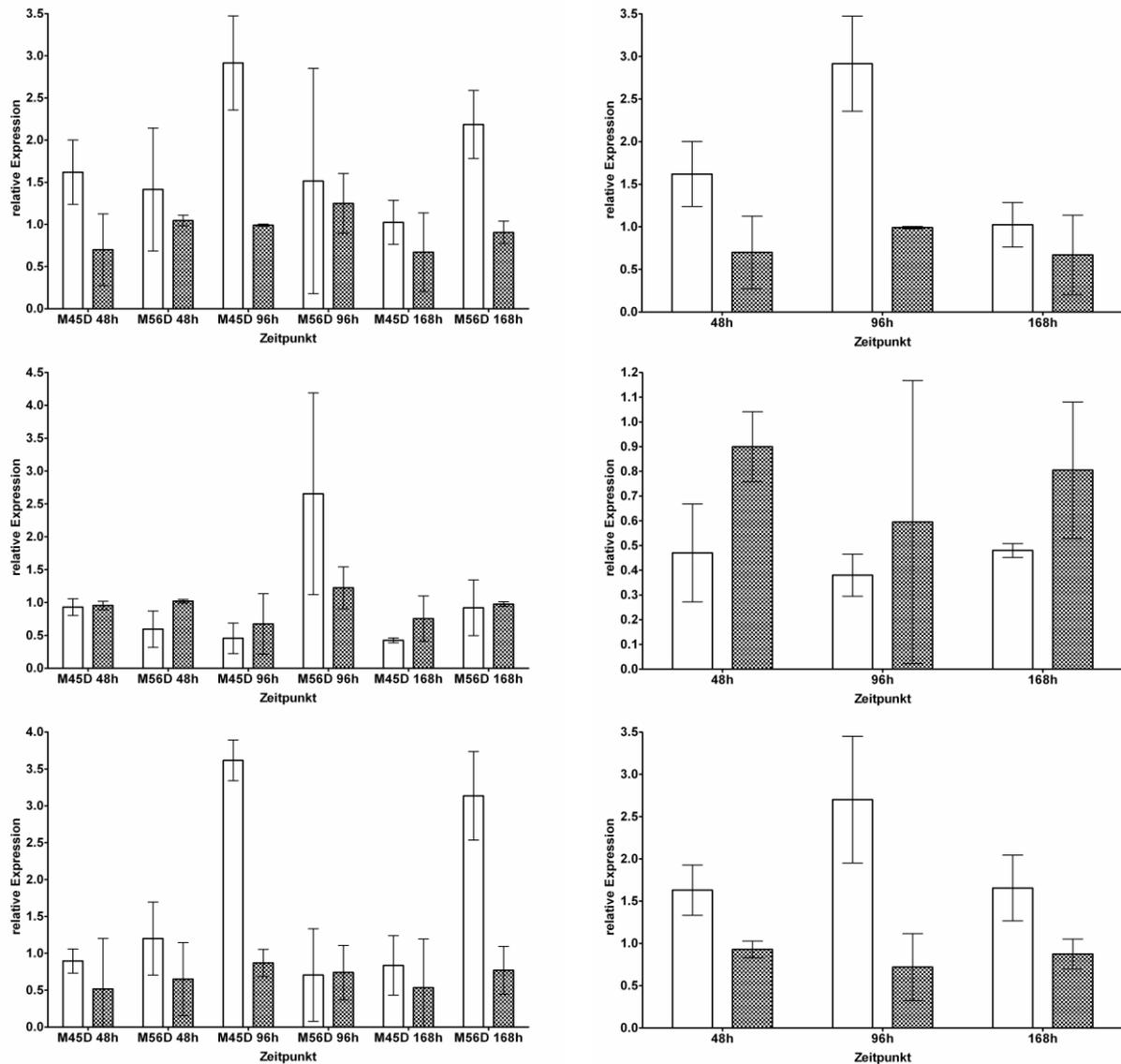


Abbildung 3-14: Expression von *B4GALT7* (oben), *B3GALT6* (Mitte) und *B3GAT3* (unten) nach *ABCC6*-knockdown in den Zellen der gesunden Spender M45D und M56D (links) sowie des PXE-Patienten P52M (rechts). Die ungefüllten Balken zeigen die Expression bei mit siRNA transfizierten Zellen, die gefüllten Balken die Expression bei mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen. Die Fehlerbalken geben Mittelwert und Standardabweichung an.

Die Untersuchung der an der Initiation der GAG-Ketten beteiligten Gene *CSGALNACT1* und *EXTL2* zeigte eine um etwa das 1,5-fache erhöhte Expression der beiden Gene in den mit siRNA transfizierten Zellen beider gesunder Spender (Abbildung 3-15). Wiederum war zu beobachten, dass sich der Zeitpunkt der stärksten Induktion zwischen den verschiedenen Zellen unterscheidet. Bei den Fibroblasten des PXE-Patienten P52M wurde eine ebenfalls erhöhte Expression des *EXTL2*-, nicht jedoch des *CSGALNACT1*-Gens gefunden.

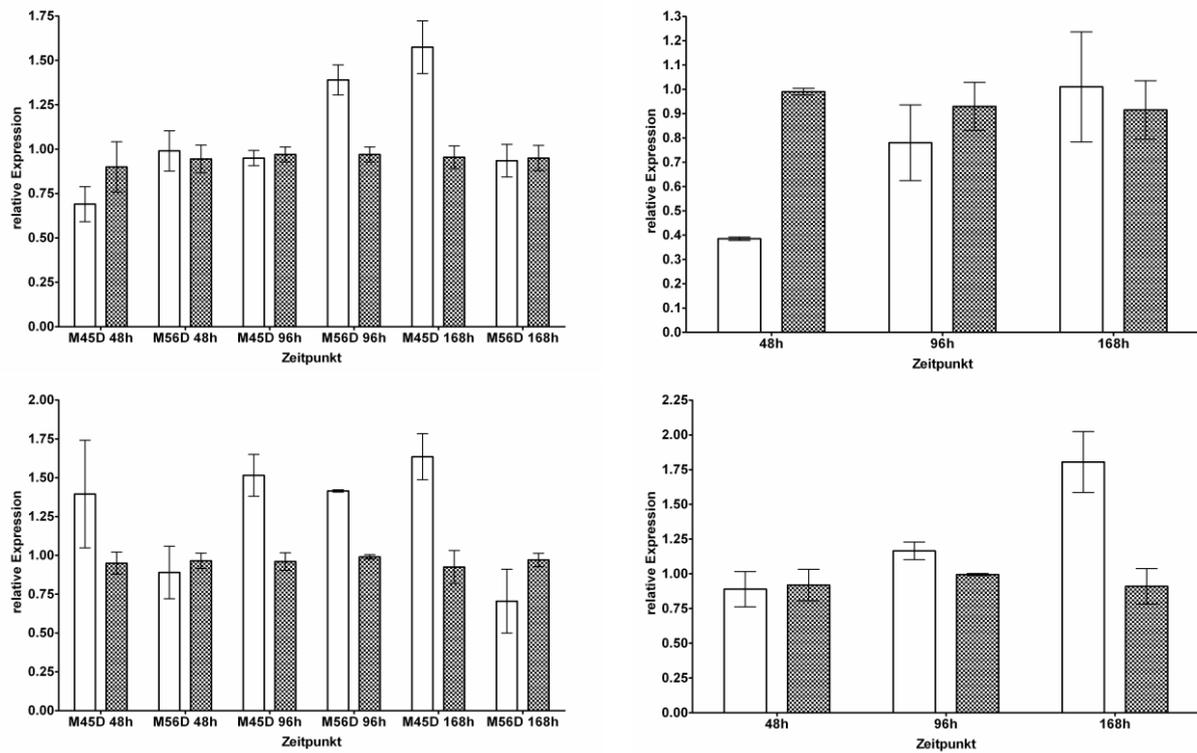


Abbildung 3-15: Expression von *CSGALNACT1* (oben) und *EXTL2* (unten) nach *ABCC6*-knockdown in Fibroblasten der gesunden Spender M45D und M56D (links) sowie des PXE-Patienten P52M (rechts). Die ungefüllten Balken zeigen die Expression bei mit siRNA transfizierten Zellen, die gefüllten Balken die Expression bei mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen. Die Fehlerbalken geben Mittelwert und Standardabweichung an.

Die Genexpression der Hyaluronansynthase-2 war bei den mit siRNA transfizierten Fibroblasten des Donors M45D signifikant reduziert (Abbildung 3-16). Ein ähnliches Ergebnis ergab die Quantifizierung der Genexpression nach dem *ABCC6*-knockdown in Zellen des Donors M56D, obgleich die Unterschiede nicht signifikant waren. Eine reduzierte Expression der Hyaluronansynthase-2 wurde auch in Zellen des PXE-Patienten P52M gefunden, die mit siRNA transfiziert worden waren. Bei den Zellen der gesunden Spender war die maximal erzielte Reduktion jedoch deutlich größer (ca. 85 % gegenüber ca. 55 % bei den Zellen des Patienten P52M).

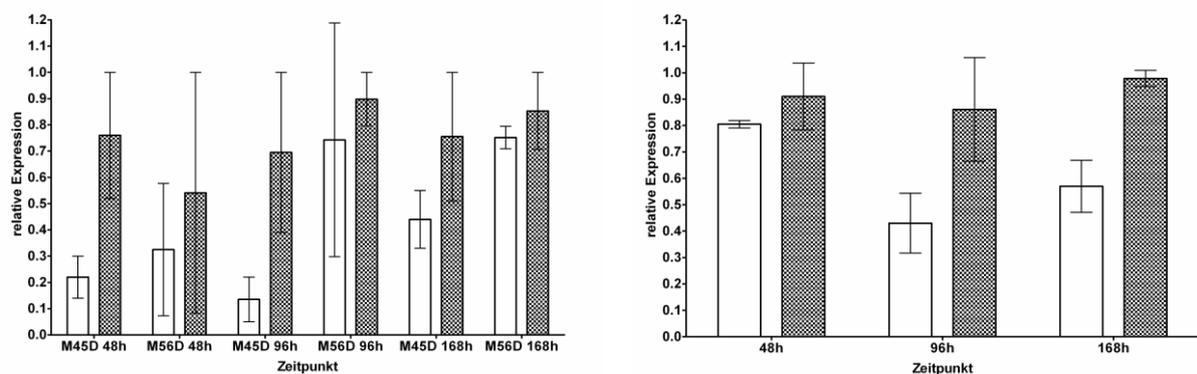


Abbildung 3-16: Expression des Gens der Hyaluronansynthase-2 nach *ABCC6*-knockdown in den Fibroblasten der gesunden Spender M45D und M56D (links) sowie des PXE-Patienten P52M (rechts). Die ungefüllten Balken zeigen die Expression bei mit siRNA transfizierten Zellen, die gefüllten Balken die Expression bei mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen. Die Fehlerbalken geben Mittelwert und Standardabweichung an.

Bei der Untersuchung der Expression der Sulfotransferase-Gene *CHST11*, *CHST12* und *CHST3* zeigte sich eine erhöhte Expression von *CHST11* und *CHST12* in Fibroblasten beider gesunder Spender, bei *CHST11* in den Zellen von M56D allerdings deutlich stärker ausgeprägt (Abbildung 3-17). Im Fall von *CHST12* wurde wiederum ein Unterschied beim Zeitpunkt der stärksten Induktion beobachtet, bei M45D erfolgte diese nach 96 h, bei M56D erst nach 168 h. Die Expression von *CHST3* war bei M56D zum Zeitpunkt $t = 96$ h deutlich erhöht. Hingegen ließ sich bei den Zellen des Spenders M45D keine Induktion des *CHST3*-Gens beobachten. Bei den Zellen des PXE-Patienten P52M zeigte sich ebenfalls eine Erhöhung der mRNA-Konzentration von *CHST11* und *CHST12*, die allerdings weniger stark war. Die Expression von *CHST3* war nur nach 168 Stunden leicht erhöht.

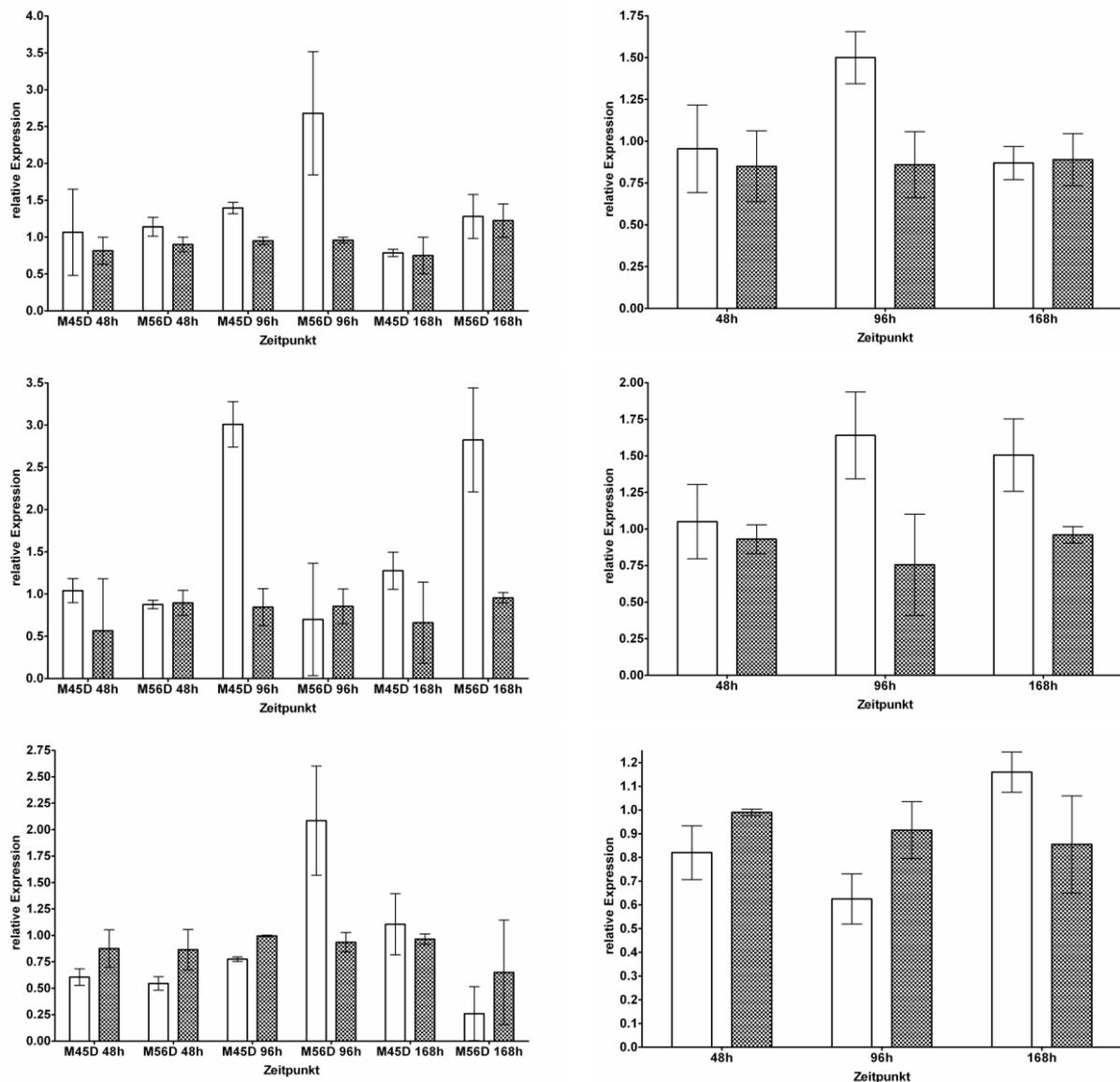


Abbildung 3-17: Expression von *CHST11* (oben), *CHST12* (Mitte) und *CHST3* (unten) nach *ABCC6*-knockdown in den Fibroblasten der gesunden Spender M45D und M56D (links) sowie des PXE-Patienten P52M (rechts). Die ungefüllten Balken zeigen die Expression bei mit siRNA transfizierten Zellen, die gefüllten Balken die Expression bei mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen. Die Fehlerbalken geben Mittelwert und Standardabweichung an.

3.2.4. Zusammenfassung der Auswirkungen eines *ABCC6*-knockdowns auf die Genexpression

Zunächst ist festzuhalten, dass die Analyse der Genexpressionsveränderungen nach einem siRNA-induzierten *knockdown* von *ABCC6* in vielen Fällen stark differierende Ergebnisse lieferte, wenn Zellen verschiedener Spender analysiert wurden. Im Fall von Elastin war schon zuvor beschrieben worden, dass sich die bei PXE-Fibroblasten beschriebene verstärkte Expression durch einen *ABCC6*-*knockdown* reproduzieren lässt. Dieses Ergebnis konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Die bei der Untersuchung von Fibroblasten von PXE-Patienten in dieser Arbeit gefundenen Expressionsunterschiede ließen sich hingegen in vielen Fällen nicht durch den *knockdown* von *ABCC6* induzieren. Entweder wurde kein Effekt beobachtet oder die Veränderung der Expression ging in die entgegengesetzte Richtung. Im Fall von Tenascin-C wurde allerdings übereinstimmend in beiden Kontrollzelltypen eine Induktion um etwa das dreifache beobachtet, was mit dem Ergebnis der Expressionsmessung in den Fibroblasten später Passagen übereinstimmt. Bei den Fibroblasten des PXE-Patienten P52M zeigte sich auch ein Effekt der siRNA auf die Expression des Tenascin-C-Gens, dieser war aber deutlich schwächer ausgeprägt. Beim Biglycan-Gen zeigte sich ebenfalls bei den Zellen beider gesunder Spender eine Steigerung der Expression um das 1,5- bis 2,5-fache in den mit siRNA transfizierten Zellen. Im Fall von Fibronectin schließlich war bei den Zellen des Spenders M56D eine etwa zweifache Induktion in den mit siRNA transfizierten Zellen zu beobachten, allerdings war der Effekt in den Zellen des Spenders M45D nicht so klar ausgeprägt.

Bei der Analyse der an der GAG-Biosynthese beteiligten Gene zeigte sich eine gesteigerte Expression aller in den Aufbau des *Linkers* involvierten Gene, die bei *B3GAT3* am stärksten ausgeprägt war. Gleichmaßen erhöht war die Expression der an der Initiation der GAG-Kette beteiligten Gene *EXTL2* und *CSGALNACT1*. Außerdem wurde bei den mit siRNA transfizierten Zellen eine Induktion der Sulfotransferasen *CHST11*, *CHST12* und *CHST3* um das 2- bis 4-fache beobachtet, jedoch im Fall von *CHST3* nur bei den Zellen des Spenders M56D. Die Expression der Hyaluronansynthase-2, deren Expression in den Fibroblasten der PXE-Patienten aus frühen Passagen signifikant erniedrigt war, war auch in den mit siRNA transfizierten Zellen um etwa 80 % reduziert.

3.3. Analyse der Glykosaminoglykan-Zusammensetzung in Zellkulturüberstand und Zell-Layer dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten und gesunden Kontrollpersonen

Die Zusammensetzung der Glykosaminoglykane in der Zellschicht und dem Zellkulturüberstand von dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten und gesunden Spendern wurde analysiert. Dazu wurden die Glykosaminoglykane zunächst aus den biologischen Proben isoliert und anschließend durch den Einsatz von Chondroitinase ABC bzw. den Heparinasen 1-3 in die ungesättigten Δ -Disaccharide gespalten. Diese wurden mit dem Fluorophor 2-Aminoacridon derivatisiert und mittels einer *reversed phase* HPLC-Methode chromatographisch aufgetrennt und quantifiziert [171].

3.3.1. Vergleich der Δ -Disaccharid-Zusammensetzung der GAGs in Zellkulturüberständen von PXE-Fibroblasten und normalen Kontrollzellen

Die Gesamtmenge der vom Chondroitinsulfat abgeleiteten Δ -Disaccharide war im Überstand der PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Zellen gesunder Spender deutlich, jedoch nicht signifikant erhöht (Abbildung 3-18).

Beim Vergleich der Konzentrationen der einzelnen Δ -Disaccharide zeigte sich ein signifikant erhöhter Gehalt an Chondroitin-2-sulfat und Chondroitin-6-sulfat sowie des von der Hyaluronsäure abgeleiteten Δ -Disaccharids (Tabelle 3-11).

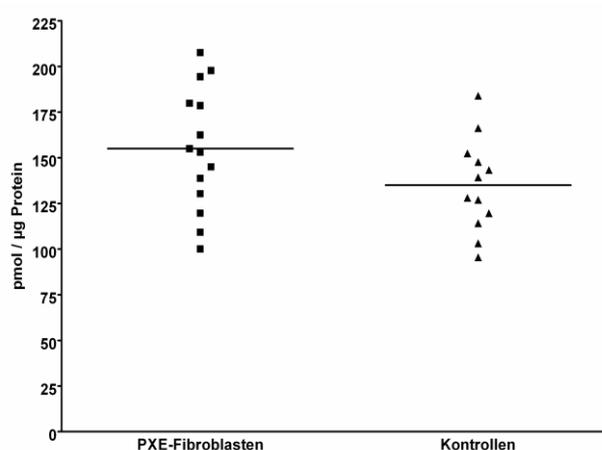


Abbildung 3-18: Gehalt an Chondroitinsulfat- Δ -Disacchariden in den Zellkulturüberständen von PXE-Fibroblasten und Kontrollzellen.

Tabelle 3-11: Stoffmengen der Chondroitinsulfat-Disaccharide in den Zellkulturüberständen von PXE-Fibroblasten und Kontrollen.

<i>A</i> -Disaccharid	PXE-Fibroblasten ^a [nmol/mg]	Kontrollzellen ^a [nmol/mg]	<i>P</i> ^b
Δ di-mono4S _{CS}	34,7 ± 11,3	37,7 ± 7,21	0,4289
Δ di-mono2S _{CS}	30,3 ± 5,07	24,1 ± 5,56	0,0070
Δ di-mono6S _{CS}	65,0 ± 11,0	50,5 ± 10,1	0,0019
Δ di-0S _{CS}	25,1 ± 9,38	22,7 ± 6,11	0,4556
Summe CS Δ -Disaccharide	155 ± 33,6	135 ± 25,7	0,1057
Δ di-0S _{HA}	35,7 ± 6,05	29,7 ± 5,78	0,0172

^a Mittelwert ± Standardabweichung

^b t-Test für die Gleichheit der Mittelwerte

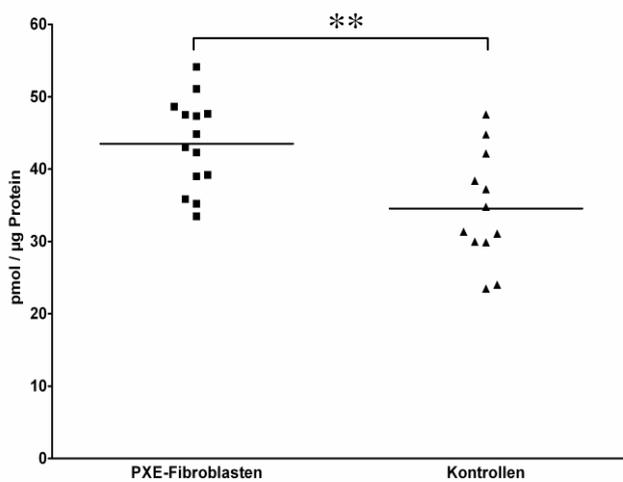


Abbildung 3-19: Gehalt an Heparansulfat- Δ -Disacchariden in den Zellkulturüberständen von PXE-Fibroblasten und Kontrollzellen.
** P < 0,01

Die Gesamtmenge der Heparansulfat- Δ -Disaccharide war im Überstand der PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Zellen gesunder Spender deutlich erhöht, der Unterschied war statistisch signifikant ($p = 0,0033$) (Abbildung 3-19). Das bisulfatierte Disaccharid Δ di-di(6, N) S_{HS} konnte nicht in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden und wurde deshalb bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Beim Vergleich der Konzentrationen der einzelnen Δ -Disaccharide zeigte sich ein signifikant erhöhter Gehalt aller vom Heparansulfat abgeleiteten Disaccharide (Tabelle 3-12).

Tabelle 3-12: Stoffmengen der Heparansulfat- Δ -Disaccharide in den Zellkulturüberständen von PXE-Fibroblasten und Kontrollen.

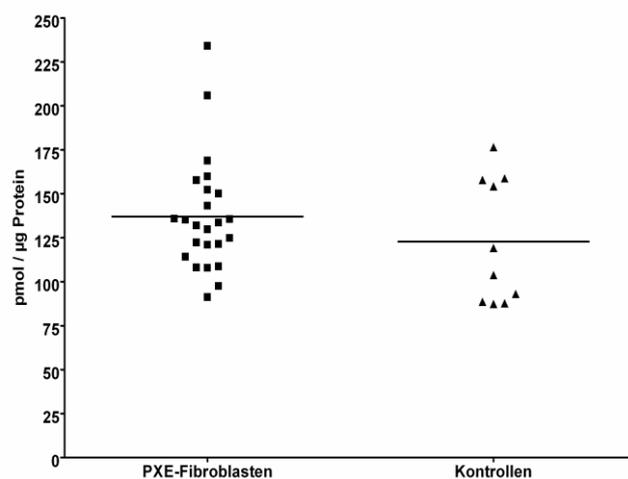
<i>Δ-Disaccharid</i>	<i>PXE-Fibroblasten^a</i> <i>[nmol/mg]</i>	<i>Kontrollzellen^a</i> <i>[nmol/mg]</i>	<i>P^b</i>
Δ di-di(2, N) S_{HS}	2,48 \pm 0,351	1,91 \pm 0,399	0,0008
Δ di-monoN S_{HS}	9,57 \pm 1,32	7,88 \pm 1,54	0,0061
Δ di-di(2, 6) S_{HS}	4,16 \pm 0,597	3,47 \pm 0,891	0,0277
Δ di-mono6 S_{HS}	6,40 \pm 1,16	5,21 \pm 1,39	0,0265
Δ di-mono2 S_{HS}	8,95 \pm 1,19	6,97 \pm 1,71	0,0020
Δ di-0 S_{HS}	10,7 \pm 2,55	7,81 \pm 2,82	0,0108
Summe HS Δ -Disaccharide	43,5 \pm 6,29	34,6 \pm 7,70	0,0033

^a Mittelwert \pm Standardabweichung

^b t-Test für die Gleichheit der Mittelwerte

3.3.2. Vergleich der Δ -Disaccharid-Zusammensetzung der GAGs im Zell-Layer von PXE-Fibroblasten und normalen Kontrollzellen

Die Gesamtmenge der Chondroitinsulfat- Δ -Disaccharide war im Zell-Layer der PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Zellen gesunder Spender nur leicht erhöht (Abbildung 3-20).



Beim Vergleich der Konzentrationen der einzelnen Δ -Disaccharide zeigte sich bei keinem Disaccharid ein signifikant erhöhter Gehalt. Es wurde jedoch eine leichte Erhöhung der Konzentration von Chondroitin-6-sulfat sowie des von der Hyaluronsäure abgeleiteten Disaccharids beobachtet (Tabelle 3-13).

Abbildung 3-20: Gehalt an Chondroitinsulfat- Δ -Disacchariden im Zell-Layer von PXE-Fibroblasten und Kontrollzellen.

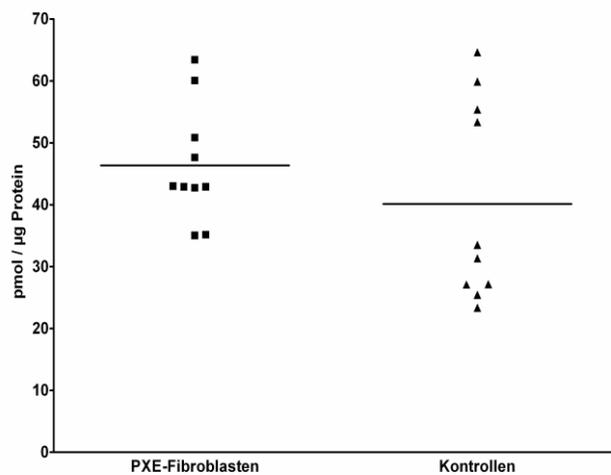
Tabelle 3-13: Stoffmengen der Chondroitinsulfat-Disaccharide im Zell-Layer von PXE-Fibroblasten und Kontrollzellen.

<i>Δ-Disaccharid</i>	<i>PXE-Fibroblasten^a</i> <i>[nmol/mg]</i>	<i>Kontrollzellen^a</i> <i>[nmol/mg]</i>	<i>P^b</i>
Δ di-mono4S _{CS}	20,4 ± 4,41	18,6 ± 6,35	0,3568
Δ di-mono2S _{CS}	29,7 ± 6,83	26,5 ± 10,1	0,2888
Δ di-mono6S _{CS}	58,0 ± 12,7	50,1 ± 15,7	0,1377
Δ di-0S _{CS}	29,1 ± 10,4	27,5 ± 5,94	0,6501
Summe CS Δ -Disaccharide	137 ± 32,4	123 ± 35,4	0,2591
Δ di-0S _{HA}	34,5 ± 7,22	30,8 ± 8,03	0,1961

^a Mittelwert ± Standardabweichung

^b t-Test für die Gleichheit der Mittelwerte

Die Gesamtmenge der Heparansulfat-Disaccharide war im Zell-Layer der PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Zellen gesunder Spender nur leicht erhöht (Abbildung 3-21).



Beim Vergleich der Konzentrationen der einzelnen Δ -Disaccharide zeigte sich bei keinem Disaccharid ein signifikant erhöhter Gehalt. Es wurde jedoch eine leichte Erhöhung der Konzentration des unsulfatierten HS- Δ -Disaccharids sowie des 2-monosulfatierten HS- Δ -Disaccharids beobachtet (Tabelle 3-14). Das bisulfatierte Disaccharid Δ di-di(6, N) S_{HS} konnte in den untersuchten Proben nicht nachgewiesen werden.

Abbildung 3-21: Gehalt an Heparansulfat- Δ -Disacchariden im Zell-Layer von PXE-Fibroblasten und Kontrollzellen.

Tabelle 3-14: Stoffmengen der Heparansulfat- Δ -Disaccharide in den Zellkulturüberständen von PXE-Fibroblasten und Kontrollen.

<i>Δ-Disaccharid</i>	<i>PXE-Fibroblasten^a</i> <i>[nmol/mg]</i>	<i>Kontrollzellen^a</i> <i>[nmol/mg]</i>	<i>P^b</i>
Δ di-di(2, N) S_{HS}	2,80 ± 0,585	2,46 ± 1,07	0,3847
Δ di-monoN S_{HS}	9,40 ± 1,68	8,30 ± 2,42	0,2557
Δ di-di(2, 6) S_{HS}	4,90 ± 1,06	4,26 ± 1,82	0,3545
Δ di-mono6 S_{HS}	6,99 ± 1,54	6,61 ± 2,78	0,7221
Δ di-mono2 S_{HS}	8,79 ± 2,91	7,00 ± 3,07	0,1974
Δ di-0 S_{HS}	12,8 ± 2,53	10,3 ± 5,03	0,1858
Summe HS Δ -	42,1 ± 8,03	40,1 ± 16,2	0,6409

^a Mittelwert ± Standardabweichung

^b t-Test für die Gleichheit der Mittelwerte

3.3.3. Auswirkungen eines *ABCC6*-knockdowns auf die Δ -Disaccharid-Zusammensetzung der GAGs im Zellkulturüberstand von normalen Kontrollzellen und PXE-Fibroblasten

Dermale Fibroblasten der gesunden Spender F42A, M45D und M56D sowie Zellen der PXE-Patienten P52M, P59M und P63F wurden mit siRNA gegen *ABCC6* bzw. mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfiziert. Nach 48, 96 und 168 Stunden wurde dann jeweils die Δ -Disaccharid-Zusammensetzung der im Zellkulturüberstand enthaltenen GAGs analysiert.

3.3.3.1. Chondroitinsulfat Δ -Disaccharide

Die Ergebnisse zeigen bei Zellen der beiden untersuchten gesunden Spender M45D und M56D eine tendenziell reduzierte Menge an Chondroitinsulfat- Δ -Disacchariden im Überstand der mit siRNA transfizierten Zellen, verglichen mit den Negativkontrollen (Abbildung 3-22, Tabelle 3-15). Der Effekt war jedoch nur marginal. Im Überstand der Zellen der gesunden Spenderin F42A zeigte sich 168 Stunden nach Transfektion jedoch eine signifikant erhöhte Menge an Chondroitinsulfat- Δ -Disacchariden in den mit siRNA behandelten Zellen.

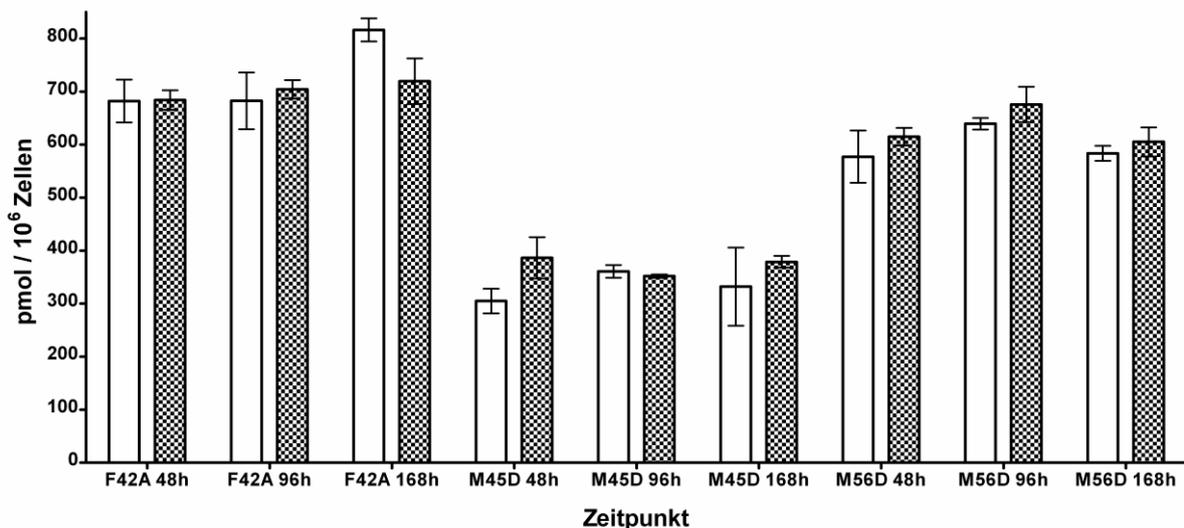


Abbildung 3-22: Gehalt an Chondroitinsulfat- Δ -Disacchariden im Zellkulturüberstand der Fibroblasten der Spender F42A, M45D und M56D. Die ungefüllten Balken zeigen die Stoffmenge der Δ -Disaccharide bei mit siRNA transfizierten Zellen, die gefüllten Balken die Stoffmenge bei mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen. Die Fehlerbalken geben Mittelwert und Standardabweichung an.

Bei den mit siRNA transfizierten Fibroblasten der PXE-Patienten P52M, P59M und P63F fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtmenge der Δ -Disaccharide im Zellkulturüberstand zwischen den mit siRNA und den mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen (Abbildung 3-23, Tabelle 3-15). Tendenziell zeigten sich allerdings auch bei den PXE-Fibroblasten leicht verringerte Disaccharid-Gesamtmengen in den mit siRNA transfizierten Zellen. Bemerkenswert war, dass die höchsten Disaccharid-Mengen jeweils bei den Fibroblasten gemessen wurden, die aus weiblichen Individuen stammten.

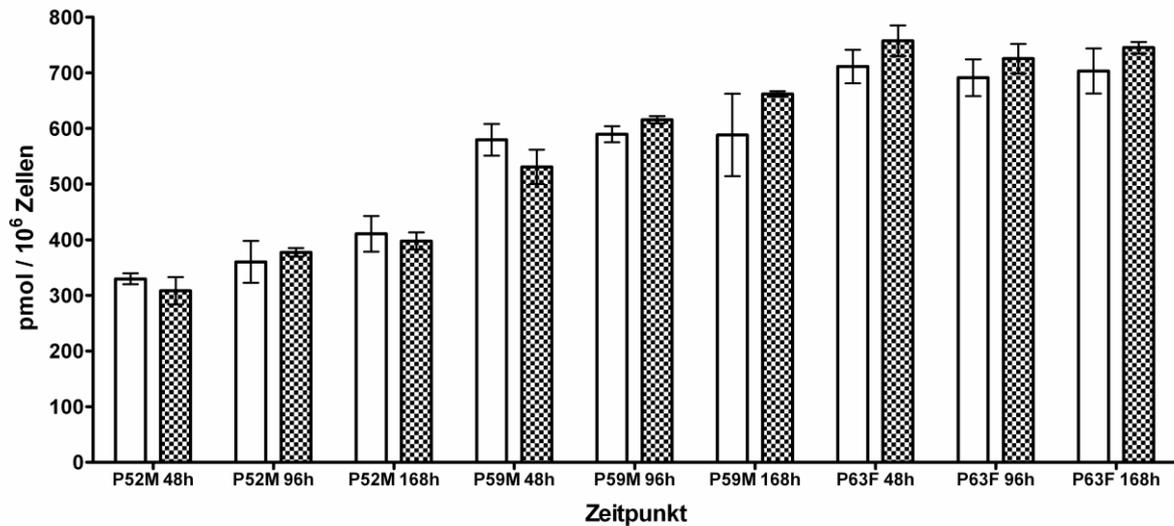


Abbildung 3-23: Gehalt an Chondroitinsulfat- Δ -Disacchariden im Zellkulturüberstand der Fibroblasten der PXE-Patienten P52M, P59M und P63F. Die ungefüllten Balken zeigen die Stoffmenge der Δ -Disaccharide bei mit siRNA transfizierten Zellen, die gefüllten Balken die Stoffmenge bei mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen. Die Fehlerbalken geben Mittelwert und Standardabweichung an.

Beim Vergleich der Stoffmengen der einzelnen CS- Δ -Disaccharide fiel eine im Gegensatz zur tendenziell reduzierten Gesamtmenge aller Disaccharide signifikant erhöhte Menge des 4-monosulfatierten CS- Δ -Disaccharids im Überstand der mit siRNA transfizierten Zellen des gesunden Spenders M45D zum Zeitpunkt $t = 168$ h auf. (Abbildung 3-24, Tabelle 3-15). Bei den Zellen der Spender F42A und M56D fand sich ebenfalls nach 96 und 168 Stunden eine erhöhte Menge an 4-monosulfatiertem CS- Δ -Disaccharid im Überstand, die Erhöhung war allerdings nicht signifikant.

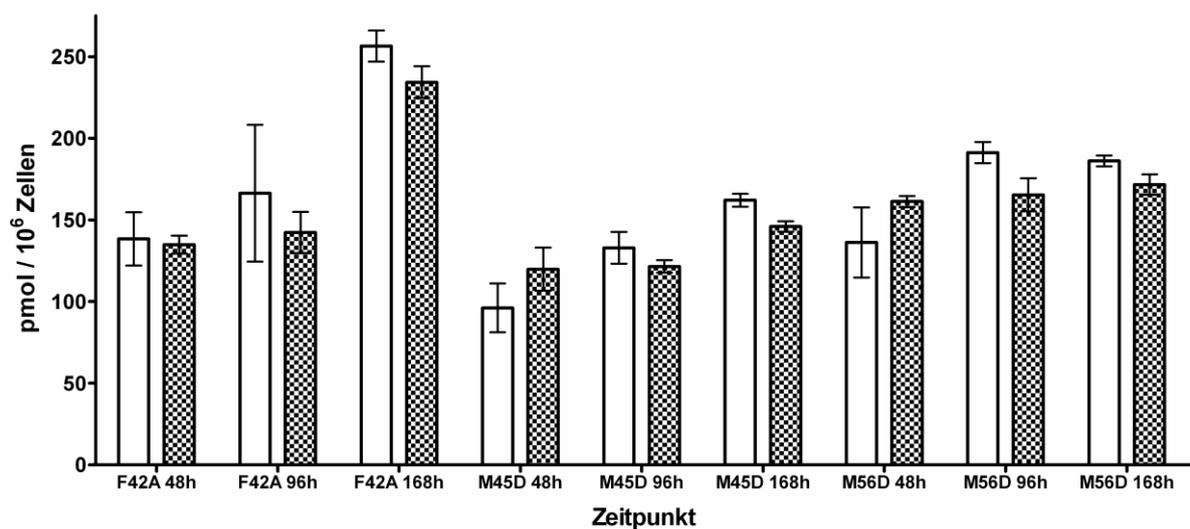


Abbildung 3-24: Gehalt an Δ di-mono4SCS im Zellkulturüberstand der Fibroblasten der gesunden Spender F42A, M45D und M56D. Die ungefüllten Balken zeigen die Stoffmenge der Δ -Disaccharide bei mit siRNA transfizierten Zellen, die gefüllten Balken die Stoffmenge bei mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen. Die Fehlerbalken geben Mittelwert und Standardabweichung an.

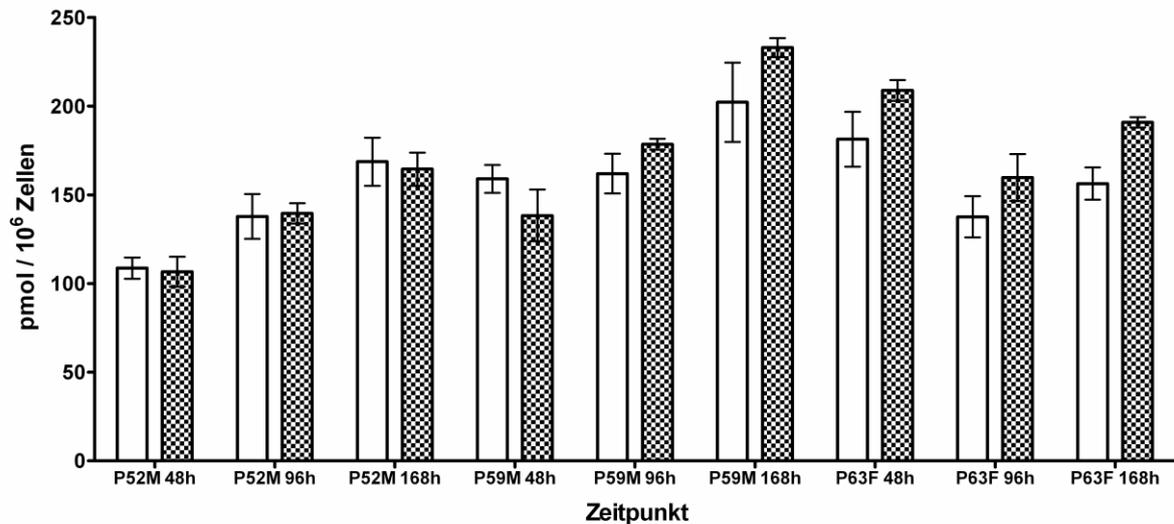


Abbildung 3-25: Gehalt an Δ -di-mono $4S_{CS}$ im Zellkulturüberstand der Fibroblasten der PXE-Patienten P52M, P59M und P63F. Die ungefüllten Balken zeigen die Stoffmenge der Δ -Disaccharide bei mit siRNA transfizierten Zellen, die gefüllten Balken die Stoffmenge bei mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen. Die Fehlerbalken geben Mittelwert und Standardabweichung an.

Die bei den mit siRNA transfizierten Fibroblasten der gesunden Spender beobachtete Steigerung der Menge an 4-monosulfatiertem CS- Δ -Disaccharid im Zellkulturüberstand war bei den Zellen der PXE-Patienten P52M, P59M und P63F nicht vorhanden (Abbildung 3-25). Bei den Zellen der PXE-Patientin P63F zeigte sich im Gegenteil sogar eine signifikant verringerte Menge des 4-monosulfatierten CS- Δ -Disaccharids nach 168 Stunden.

Tabelle 3-15: Gesamt-Stoffmengen von CS- Δ -Disacchariden im Zellkulturüberstand von transfizierten Fibroblasten.

Spender		Δ -Disaccharide (48 h) ^a	<i>P</i> ^b	Δ -Disaccharide (96 h) ^a	<i>P</i> ^b	Δ -Disaccharide (168 h) ^a	<i>P</i> ^b
F42A	siRNA	682 ± 40,3	0,952	683 ± 53,4	0,526	816 ± 21,9	0,0123
	siNK	684 ± 37,1		704 ± 35,0		704 ± 59,9	
M45D	siRNA	305 ± 23,2	0,0948	361 ± 12,0	0,289	332 ± 73,7	0,270
	siNK	386 ± 55,1		352 ± 5,98		379 ± 22,1	
M56D	siRNA	577 ± 49,3	0,294	639 ± 11,0	0,402	584 ± 14,1	0,419
	siNK	615 ± 28,7		676 ± 47,5		605 ± 47,6	
P52M	siRNA	330 ± 9,94	0,425	360 ± 37,8	0,499	411 ± 32,0	0,575
	siNK	308 ± 48,7		377 ± 13,3		398 ± 30,4	
P59M	siRNA	580 ± 28,5	0,174	590 ± 14,6	0,0521	588 ± 74,1	0,162
	siNK	531 ± 53,4		616 ± 11,4		662 ± 8,35	
P63F	siRNA	711 ± 30,0	0,229	691 ± 33,0	0,310	703 ± 40,4	0,130
	siNK	757 ± 47,6		726 ± 37,4		745 ± 21,2	

^a Mittelwert [pmol] ± Standardabweichung

^b t-Test für die Gleichheit der Mittelwerte

Tabelle 3-16: Stoffmengen von Δ di-mono4S_{CS} im Zellkulturüberstand von transfizierten Fibroblasten.

Spender		Δ di-mono4S _{CS} (48 h) ^a	P ^b	Δ di-mono4S _{CS} (96 h) ^a	P ^b	Δ di-mono4S _{CS} (168 h) ^a	P ^b
F42A	siRNA	138 ± 16,3	0,7337	166 ± 41,9	0,3633	257 ± 9,54	0,0760
	siNK	135 ± 11,1		142 ± 25,2		234 ± 16,9	
M45D	siRNA	96,1 ± 15,0	0,2088	133 ± 9,71	0,1163	162 ± 3,98	0,0346
	siNK	120 ± 23,0		122 ± 7,65		146 ± 6,44	
M56D	siRNA	136 ± 21,5	0,1129	191 ± 6,49	0,1447	186 ± 3,31	0,1134
	siNK	161 ± 5,92		141 ± 43,1		172 ± 12,5	
P52M	siRNA	109 ± 6,05	0,8078	138 ± 12,7	0,8552	169 ± 13,5	0,7284
	siNK	107 ± 14,6		140 ± 9,91		164 ± 18,7	
P59M	siRNA	159 ± 7,87	0,1746	162 ± 11,2	0,0675	202 ± 22,4	0,0920
	siNK	138 ± 25,2		179 ± 5,33		233 ± 9,20	
P63F	siRNA	181 ± 15,5	0,0615	138 ± 11,7	0,1368	156 ± 9,13	0,0016
	siNK	209 ± 10,1		160 ± 18,7		191 ± 5,86	

^a Mittelwert [pmol] ± Standardabweichung

^b t-Test für die Gleichheit der Mittelwerte

Die Menge des von Hyaluronsäure abgeleiteten Δ -Disaccharids war im Zellkulturüberstand der mit siRNA transfizierten Fibroblasten des gesunden Spenders M45D im Vergleich zu den mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen zu den Zeitpunkten t = 48 h und t = 96 h signifikant reduziert (Tabelle 3-17; Abbildung 3-26). Bei Fibroblasten des Spenders M56D zeigte sich ebenfalls eine Reduktion von Δ di-OS_{HA} im Zellkulturüberstand bei den mit siRNA transfizierten Zellen, jedoch war diese Abweichung nicht signifikant. Im Gegensatz dazu wurde bei den Zellen der Spenderin F42A

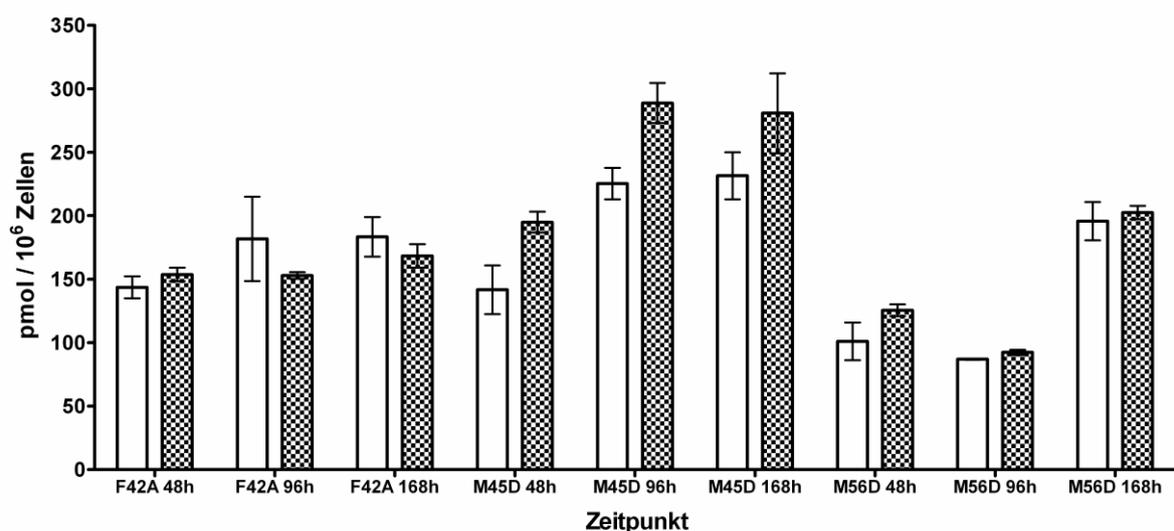


Abbildung 3-26: Gehalt an Δ di-OS_{HA} im Zellkulturüberstand der Fibroblasten der gesunden Spender M45D, M56D und F42A. Die ungefüllten Balken zeigen den Δ di-OS_{HA}-Gehalt bei mit siRNA transfizierten Zellen, die gefüllten Balken den Δ di-OS_{HA}-Gehalt bei mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen. Die Fehlerbalken geben Mittelwert und Standardabweichung an.

eine Erhöhung der Menge an $\Delta di-OS_{HA}$ bei den Messungen 96 und 168 Stunden nach der Transfektion festgestellt, die aber ebenfalls nicht signifikant war. Im Überstand der Fibroblasten der PXE-Patienten P52M und P63F wurde eine reduzierte Menge an $\Delta di-OS_{HA}$ gemessen, die jeweils zu mindestens einem der untersuchten Zeitpunkte auch statistisch signifikant war. Im starken Kontrast dazu zeigte sich beim PXE-Patienten P59M eine sehr ausgeprägte, zu den Zeitpunkten $t = 96 \text{ h}$ und $t = 168 \text{ h}$ statistisch hochsignifikante Erhöhung des $\Delta di-OS_{HA}$ -Gehalts.

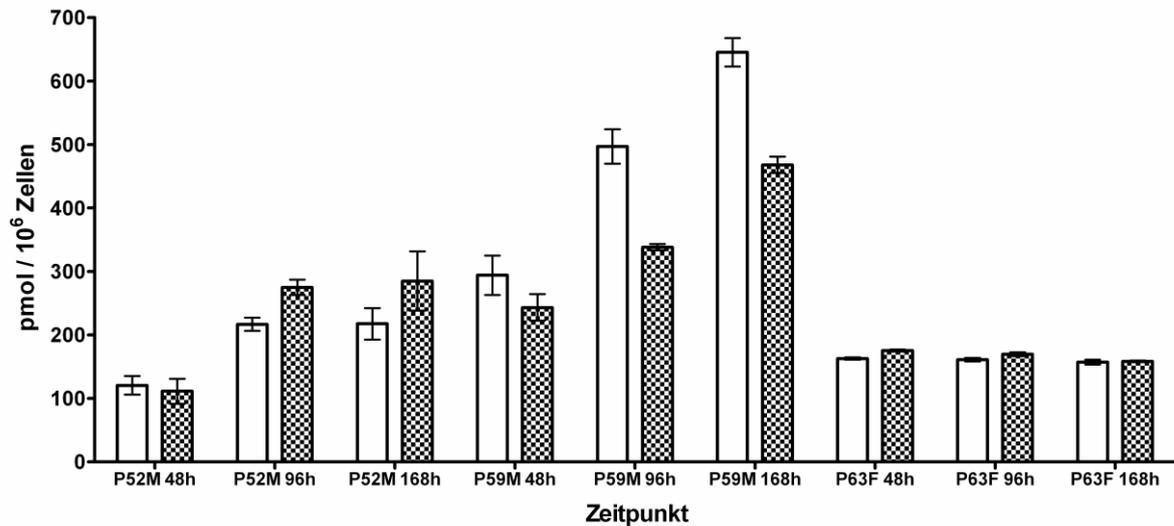


Abbildung 3-27: Gehalt an $\Delta di-OS_{HA}$ im Zellkulturüberstand der Fibroblasten der PXE-Patienten P52M, P59M und P63F. Die ungefüllten Balken zeigen den $\Delta di-OS_{HA}$ -Gehalt bei mit siRNA transfizierten Zellen, die gefüllten Balken den $\Delta di-OS_{HA}$ -Gehalt bei mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen. Die Fehlerbalken geben Mittelwert und Standardabweichung an.

Tabelle 3-17: Stoffmengen von $\Delta di-OS_{HA}$ im Zellkulturüberstand von transfizierten Fibroblasten.

Spender		$\Delta di-OS_{HA}$ (48 h) ^a	P^b	$\Delta di-OS_{HA}$ (96 h) ^a	P^b	$\Delta di-OS_{HA}$ (168 h) ^a	P^b
F42A	siRNA	144 ± 8,68	0,1926	182 ± 33,3	0,1379	183 ± 15,6	0,2694
	siNK	154 ± 10,6		153 ± 5,35		168 ± 16,2	
M45D	siRNA	142 ± 11,1	0,0181	225 ± 12,4	0,0098	232 ± 18,5	0,3608
	siNK	195 ± 8,23		289 ± 31,7		281 ± 62,8	
M56D	siRNA	101 ± 14,9	0,0516	86,9 ± 0,477	0,1218	196 ± 15,1	0,5627
	siNK	126 ± 8,16		92,3 ± 3,38		203 ± 9,13	
P52M	siRNA	121 ± 14,8	0,6726	217 ± 10,4	0,0043	218 ± 24,9	0,2148
	siNK	111 ± 39,4		275 ± 20,8		285 ± 93,7	
P59M	siRNA	294 ± 31,1	0,1002	497 ± 27,0	0,0002	645 ± 22,5	0,0006
	siNK	243 ± 42,0		338 ± 8,97		468 ± 22,4	
P63F	siRNA	163 ± 1,77	0,0039	161 ± 2,84	0,0372	157 ± 3,90	0,6520
	siNK	175 ± 3,15		170 ± 4,18		158 ± 2,63	

^a Mittelwert [pmol] ± Standardabweichung

^b t-Test für die Gleichheit der Mittelwerte

3.3.3.2. Heparansulfat Δ -Disaccharide

Die Ergebnisse zeigten bei Zellen der untersuchten gesunden Spender F42A, M45D und M56D eine tendenziell erhöhte Menge an Heparansulfat- Δ -Disacchariden im Überstand der mit siRNA transfizierten Zellen, verglichen mit den Negativkontrollen (Abbildung 3-28, Tabelle 3-18). Der Effekt war jedoch in den meisten Fällen gering, nur der Zellkulturüberstand der Fibroblasten des Spenders

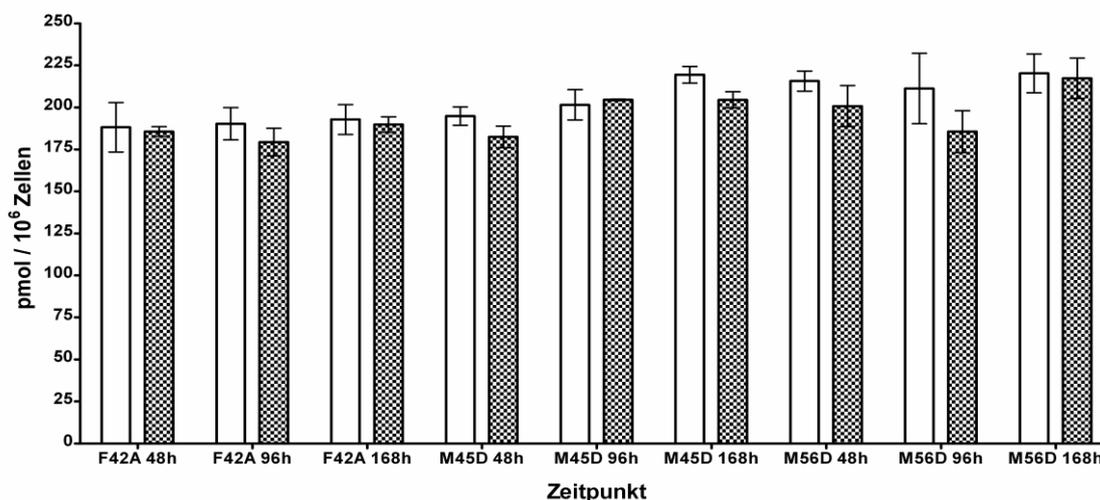


Abbildung 3-28: Gehalt an Heparansulfat- Δ -Disacchariden im Zellkulturüberstand der Fibroblasten der Spender F42A, M45D und M56D. Die ungefüllten Balken zeigen die Stoffmenge der Δ -Disaccharide bei mit siRNA transfizierten Zellen, die gefüllten Balken die Stoffmenge bei mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen. Die Fehlerbalken geben Mittelwert und Standardabweichung an.

M45D enthielt nach 168 Stunden eine signifikant erhöhte Disaccharid Menge (siehe Tabelle 10-2). Bei den Zellen der PXE-Patienten P52M, P59M und P63F fanden sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Veränderung zwischen den mit siRNA und den mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen,

Tabelle 3-18: Gesamt-Stoffmengen von HS- Δ -Disacchariden im Zellkulturüberstand von transfizierten Fibroblasten.

Spender		Δ -Disaccharide (48 h) ^a	<i>p</i> ^b	Δ -Disaccharide (96 h) ^a	<i>p</i> ^b	Δ -Disaccharide (168 h) ^a	<i>p</i> ^b
F42A	siRNA	188 ± 14,7	0,757	190 ± 4,81	0,295	193 ± 8,87	0,665
	siNK	186 ± 5,74		179 ± 8,20		190 ± 8,03	
M45D	siRNA	195 ± 5,43	0,105	202 ± 9,00	0,600	219 ± 4,94	0,0326
	siNK	183 ± 11,2		205 ± 0,826		205 ± 9,60	
M56D	siRNA	216 ± 6,06	0,165	211 ± 21,0	0,165	220 ± 11,6	0,836
	siNK	201 ± 17,2		186 ± 24,9		217 ± 23,9	
P52M	siRNA	202 ± 16,8	0,684	186 ± 4,25	0,126	206 ± 19,9	0,442
	siNK	198 ± 8,38		198 ± 12,7		198 ± 4,42	
P59M	siRNA	199 ± 9,88	0,124	189 ± 13,2	0,886	197 ± 14,8	0,212
	siNK	186 ± 9,63		188 ± 9,34		210 ± 11,0	
P63F	siRNA	180 ± 2,74	0,120	194 ± 12,0	0,101	179 ± 6,38	0,438
	siNK	189 ± 9,57		182 ± 2,50		201 ± 52,5	

^a Mittelwert [pmol] ± Standardabweichung

^b t-Test für die Gleichheit der Mittelwerte

die Messwerte ließen auch keinen deutlichen Trend erkennen. Die Analyse der einzelnen Heparansulfat- Δ -Disaccharide ergab in einzelnen Fällen signifikante Unterschiede zwischen mit siRNA transfizierten Zellen und Kontrollzellen. So zeigte sich etwa im Überstand der Zellen der Spenderin F42A nach 168 Stunden eine erhöhte Menge an Δ di-monoNS_{HS}. Die Unterschiede traten allerdings nur sporadisch auf und waren jeweils nur bei Zellen eines Spenders zu beobachten. Die Ergebnisse sind im Einzelnen im Anhang aufgeführt.

3.4. Analyse der Xylosyltransferase-Aktivität dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten und Kontrollpersonen

Aus einem Aliquot des Zellkulturüberstandes der für die Glykosaminoglykan-Analytik kultivierten Fibroblasten von PXE-Patienten und gesunden Kontrollpersonen wurde eine Bestimmung der Xylosyltransferase-Aktivität unter Verwendung eines radiochemischen Aktivitätstests durchgeführt. Außerdem wurde die Xylosyltransferase-Aktivität in den Überständen der mit siRNA gegen das *ABCC6*-Gen transfizierten Fibroblasten bestimmt, um die Auswirkungen des *ABCC6-knockdowns* auf die Aktivität der Xylosyltransferase zu untersuchen. Die gemessenen Aktivitäten wurden jeweils auf den Proteingehalt des Zell-Layers normalisiert.

3.4.1. Vergleich der Xylosyltransferase-Aktivität in den Zellkulturüberständen von dermalen PXE-Fibroblasten und normalen Kontrollzellen

Abbildung 3-29 zeigt das Ergebnis der Xylosyltransferase-Aktivitätsmessung in den Überständen der kultivierten Fibroblasten von PXE-Patienten und gesunden Spendern. Die Xylosyltransferase-Aktivität war in den Überständen der PXE-Fibroblasten im Vergleich zu den Zellen der gesunden Spender geringfügig erhöht, der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

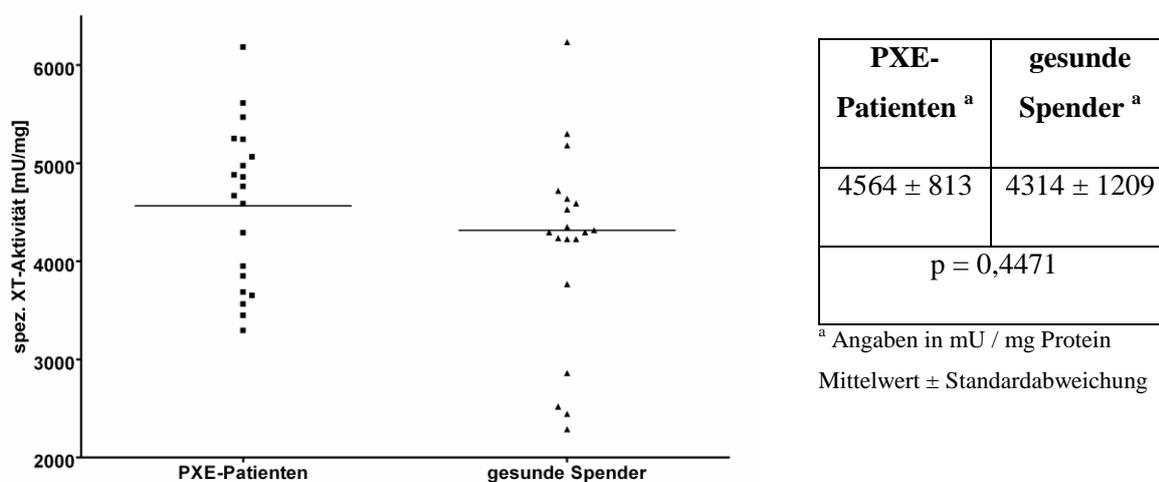


Abbildung 3-29: Spezifische Xylosyltransferase-Aktivität in den Zellkulturüberständen von PXE-Fibroblasten und Kontrollzellen.

3.4.2. Auswirkungen eines *ABCC6*-knockdowns auf die Xylosyltransferase-Aktivität

Die Xylosyltransferase-Aktivität wurde in den Zellkulturüberständen der mit siRNA gegen das *ABCC6*-Gen bzw. mit einem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Fibroblasten von drei gesunden Spendern und drei PXE-Patienten bestimmt. Die XylT-Aktivität war in den Überständen der Fibroblasten der beiden gesunden Spender M45D und M56D erhöht, der Unterschied war bei M56D zu allen Zeitpunkten statistisch signifikant, bei M45D zu den Zeitpunkten $t = 96$ h und $t = 168$ h (Abbildung 3-30, Tabelle 3-17).

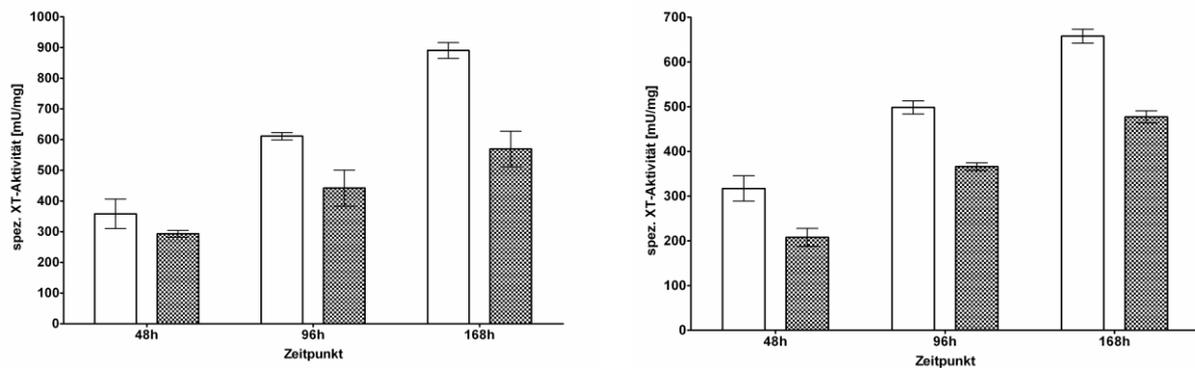


Abbildung 3-30: Spezifische Xylosyltransferase-Aktivität in den Zellkulturüberständen von Fibroblasten der Spender M45D (links) und M56D (rechts). Die ungefüllten Balken zeigen die XT-Aktivität bei mit siRNA transfizierten Zellen, die gefüllten Balken die XT-Aktivität bei mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen. Die Fehlerbalken geben Mittelwert und Standardabweichung an.

Im Überstand der von dem PXE-Patienten P52M stammenden Fibroblasten war die XT-Aktivität bei den mit siRNA transfizierten Zellen 96 und 168 Stunden nach Transfektion im Vergleich zu den mit dem Kontrolloligonucleotid transfizierten Zellen signifikant erhöht. Hingegen war bei den Fibroblasten des PXE-Patienten P59M zu diesen Zeitpunkten keine signifikante Veränderung der XylT-Aktivität zu beobachten (Abbildung 3-31).

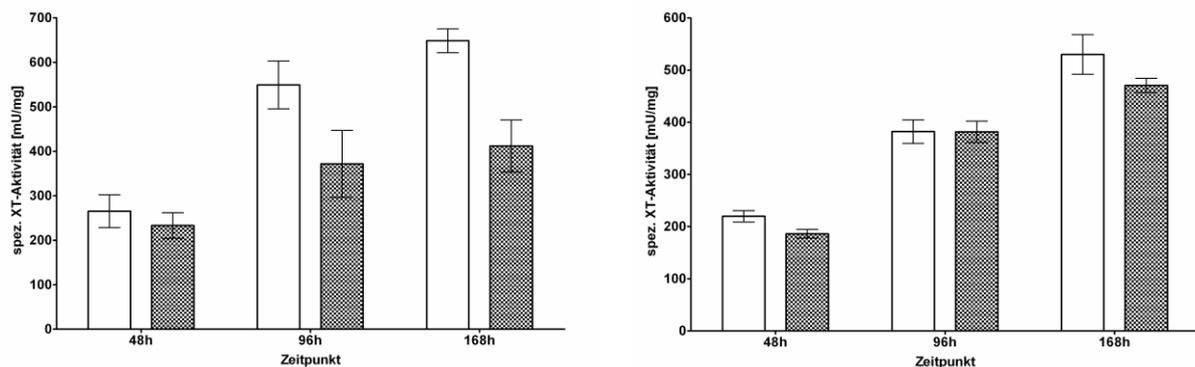


Abbildung 3-31: Spezifische Xylosyltransferase-Aktivität in den Zellkulturüberständen von Fibroblasten der PXE-Patienten P52M (links) und P59M (rechts). Die ungefüllten Balken zeigen die XT-Aktivität bei mit siRNA transfizierten Zellen, die gefüllten Balken die XT-Aktivität bei mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen. Die Fehlerbalken geben Mittelwert und Standardabweichung an.

Tabelle 3-19: XT-Aktivität in den Zellkulturüberständen der transfizierten Fibroblasten.

<i>Spender</i>		<i>XT-Aktivität</i> (48 h) ^a	<i>P</i> _{korrigiert} ^b	<i>XT-Aktivität</i> (96 h) ^a	<i>P</i> _{korrigiert} ^b	<i>XT-Aktivität</i> (168 h) ^a	<i>P</i> _{korrigiert} ^b
F42A	siRNA	299 ± 26,9	0,2355	665 ± 29,6	0,0005	1056 ± 25,4	<0,0001
	siNK	278 ± 14,0		400 ± 11,4		556 ± 13,4	
M45D	siRNA	358 ± 48,3	0,0784	611 ± 11,9	0,0110	890 ± 25,5	0,0127
	siNK	293 ± 10,8		442 ± 58,7		569 ± 58,0	
M56D	siRNA	317 ± 28,5	0,0015	498 ± 14,6	<0,0001	658 ± 15,8	<0,0001
	siNK	208 ± 20,1		366 ± 8,63		477 ± 13,4	
P52M	siRNA	265 ± 37,0	0,2180	549 ± 53,7	0,0121	648 ± 26,7	0,0018
	siNK	233 ± 29,1		372 ± 75,1		412 ± 58,4	
P59M	siRNA	220 ± 10,8	0,0044	382 ± 22,4	0,9741	530 ± 38,0	0,060
	siNK	186 ± 8,27		382 ± 20,5		471 ± 13,6	
P63F	siRNA	239 ± 8,09	0,5272	353 ± 14,8	0,4436	434 ± 10,9	0,0475
	siNK	233 ± 15,9		342 ± 21,5		416 ± 2,96	

^a Mittelwert [mU / mg] ± Standardabweichung

^b t-Test für die Gleichheit der Mittelwerte mit Welch-Korrektur für ungleiche Varianzen

Beim Vergleich der Xylosyltransferase-Aktivität in den Überständen der Fibroblasten der gesunden Spenderin F42A und der PXE-Patientin P63F war eine signifikant erhöhte XT-Aktivität im Überstand der mit siRNA behandelten Zellen nur bei F42A nach 96 und 168 Stunden festzustellen, bei P63F war die XT-Aktivität bei den mit siRNA und den mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen annähernd gleich (Abbildung 3-32).

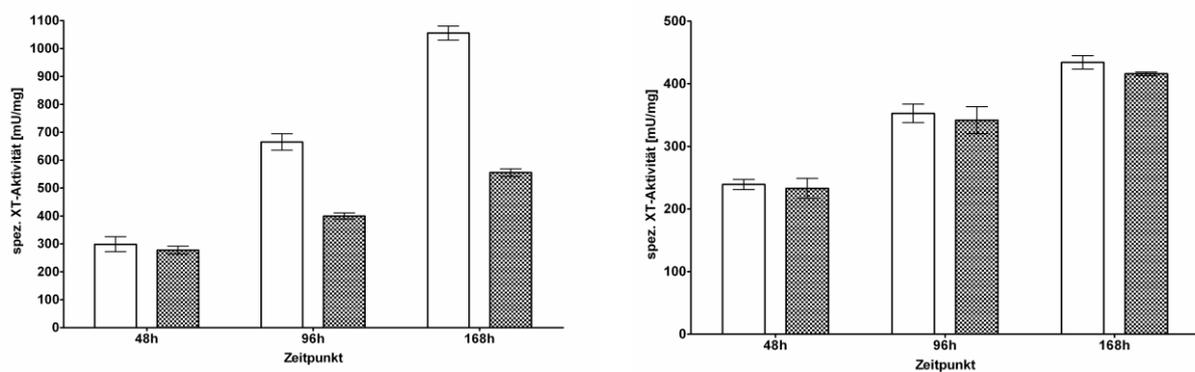


Abbildung 3-32: Spezifische Xylosyltransferase-Aktivität in den Zellkulturüberständen von Fibroblasten der gesunden Spenderin F42A (links) und der PXE-Patientin P63F (rechts). Die ungefüllten Balken zeigen die XT-Aktivität bei mit siRNA transfizierten Zellen, die gefüllten Balken die XT-Aktivität bei mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen. Die Balken geben Mittelwert und Standardabweichung an.

3.5. Identifizierung von genetischen Kofaktoren für *Pseudoxanthoma elasticum*

Zur Aufklärung einer möglichen Rolle genetischer Kofaktoren bei PXE wurden im Rahmen dieser Arbeit ausgewählte Polymorphismen in Kandidatengenen untersucht, die als mögliche genetische Kofaktoren für PXE in Frage kommen könnten. Als Kandidatengene wurden solche ausgewählt, deren Produkte eine Rolle spielen bei den bei PXE ablaufenden pathologischen Prozessen, insbesondere dem Umbau der extrazellulären Matrix und der Bildung neuer Blutgefäße bei der PXE begleitenden Retinopathie. Wegen der Bedeutung von Haplotypen bei genetischen Assoziationen wurden für jedes untersuchte Gen mit Ausnahme von *MMP9* mehrere SNPs untersucht und die vorliegenden Allele unter Verwendung der Software Haploview rekonstruiert [172].

Für die in dieser Arbeit durchgeführten genetischen Analysen stand Material aus einer Sammlung von Blutproben von derzeit fast 200 an PXE erkrankten Patienten zur Verfügung. Die zur Genotypisierung der SNPs genutzte Kohorte wurde während der Durchführung ständig erweitert, so dass sich die Anzahl der Personen zwischen den einzelnen untersuchten Genen unterscheidet. Als gesunde Kontrollkohorte dienten jeweils Blutspender, die in Alter und Geschlecht mit den PXE-Patienten möglichst gut übereinstimmten. Insgesamt wurde die Häufigkeit von 30 Sequenzvariationen in vier Kandidatengenen bestimmt und verglichen. Der Nachweis der Sequenzvariationen erfolgte entweder mittels Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP)-Analyse oder mittels allelspezifischer PCR nach dem ARMS-System [173]. Für die RFLP-Analyse wurde ein Fragment der genomischen DNA, das den zu untersuchenden Polymorphismus enthielt, durch eine PCR amplifiziert und das gewonnene Produkt im Anschluss einem Restriktionsverdau unterworfen. Der Restriktionsansatz wurde dann in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und der Genotyp durch Inspektion der sich ergebenden Bandenmuster festgestellt. Die Identität des PCR-Produkts wurde durch direktes Sequenzieren sichergestellt. In einigen Fällen konnte kein vollständiger Restriktionsverdau erreicht werden, so dass eine eindeutige Feststellung des Genotyps nicht möglich war. Für die Analyse der entsprechenden Polymorphismen wurde daher eine allelspezifische PCR etabliert, die eine Identifizierung des Genotyps ermöglicht, ohne einen Restriktionsverdau zu erfordern.

3.5.1. Matrix-Metalloproteinase 2

Für die Analyse des *MMP2*-Gens wurde ein *tag*-SNP-Ansatz verwendet. Dieser beruht auf dem Vorhandensein von Blöcken mit hohem *linkage disequilibrium* (LD). Dieses erlaubt es, komplette Blöcke von SNPs über die Genotypisierung eines einzelnen SNPs zu erfassen. Dazu wurden unter Verwendung von LD-Daten aus dem internationalen HapMap-Projekt 14 SNPs ausgewählt, mit denen alle bekannten SNPs im codierenden Bereich sowie im Promotor des *MMP2*-Gens erfasst wurden [174]. Zwischen den genotypisierten SNPs – den sogenannten „tag-SNPs“ – und den übrigen SNPs bestand ein LD von mindestens $r^2 = 0,8$.

Tabelle 3-20 zeigt die Allelverteilung der Polymorphismen im *MMP2*-Gen. Alle Genotyp-Verteilungen befanden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Das G-Allel von rs243866, das C-Allel von rs243865 sowie das T-Allel von rs243864 waren signifikant mit der PXE-Gruppe assoziiert.

Tabelle 3-20: Allelfrequenzen der Polymorphismen im *MMP2*-Gen bei PXE-Patienten und Kontrollen.

SNP	Allel	PXE-Patienten ^a (n = 368)	Kontrollen ^a (n = 368)	OR (95% CI) ^b	P ^c
rs243866	G	297 (80,7)	270 (73,4)	1,52 (1,07 – 2,15)	0,0180
	A	71 (19,3)	98 (26,6)		
rs243865	C	297 (80,7)	271 (73,6)	1,50 (1,06 – 2,12)	0,0224
	T	71 (19,3)	97 (26,4)		
rs243864	T	294 (79,9)	269 (73,1)	1,46 (1,04 – 2,06)	0,0298
	G	74 (20,1)	99 (26,9)		
rs2285053	C	327 (88,9)	319 (86,7)	1,23 (0,79 – 1,91)	0,3681
	T	41 (11,1)	49 (13,3)		
rs17859829	G	343 (93,2)	338 (91,8)	1,22 (0,70 – 2,11)	0,4834
	T	25 (6,8)	30 (8,2)		
rs865094	G	76 (20,7)	63 (17,1)	1,26 (0,87 – 1,83)	0,2208
	A	292 (79,3)	305 (82,9)		
rs11646643	A	254 (69,0)	239 (64,9)	1,20 (0,88 – 1,64)	0,2397
	G	114 (31,0)	129 (35,1)		
rs1053605	C	331 (89,9)	338 (91,8)	1,26 (0,76 – 2,09)	0,3697
	T	37 (10,1)	30 (8,2)		
rs2241146	G	363 (98,6)	359 (97,6)	1,82 (0,60 – 5,49)	0,2804
	A	5 (1,4)	9 (2,4)		
rs243847	T	225 (61,1)	218 (59,2)	1,08 (0,81 – 1,46)	0,5981
	C	143 (38,9)	150 (40,8)		
rs2287074	G	222 (60,3)	210 (57,1)	1,14 (0,85 – 1,54)	0,3690
	A	146 (39,7)	158 (42,9)		
rs11639960	A	257 (69,8)	246 (66,8)	1,15 (0,84 – 1,57)	0,3834
	G	111 (30,2)	122 (33,2)		
rs243832	C	188 (51,1)	170 (46,2)	1,22 (0,91 – 1,63)	0,1844
	G	180 (48,9)	198 (53,8)		
rs243831	G	29 (7,9)	29 (7,9)	1,00 (0,58 – 1,71)	1,0000
	T	339 (92,1)	339 (92,1)		

^a Allele (Prozent)

^b Odds Ratio und 95% Konfidenzintervall

^c χ^2 -Test

3.5.1.1. Haplotypen-Analyse der SNPs im *MMP2*-Gen

Die LD-Struktur des *MMP2*-Gens wurde aus insgesamt 736 Allelen von Patienten und Kontrollen mit der Haploview-Software ermittelt. LD-Muster und Haplotyp-Blöcke wurden gemäß der Einstellung „spline of LD“ in der Haploview-Software ermittelt, die auf einem D' -Wert $> 0,8$ für die äußeren Marker jedes Blocks basiert [172].

Die Analyse ergab drei getrennte LD-Blöcke im *MMP2*-Gen (Abbildung 3-33). Der erste Block erstreckt sich von rs243866 bis rs17859829 und umfasst den Promotor *MMP2*-Gens. Der zweite Block umfasst die SNPs von rs865094 bis rs11639960 und der dritte die SNPs rs243832 und rs243831 am 3'-Ende der codierenden Region. Der höchste paarweise r^2 -Wert wurde zwischen rs243866 und rs243865 im ersten Block beobachtet.



Abbildung 3-33: Von Haploview ermittelte LD-Struktur des *MMP2*-Gens. Schwarze Felder markieren ein vollständiges LD ($r^2 = 1$), weiße kein LD ($r^2 = 0$). Dazwischen liegende LD-Werte sind als Grauschattierungen visualisiert.

3.5.1.2. Assoziation von Haplotypen mit PXE

Tabelle 3-21 zeigt die von Haploview ermittelten Haplotypen und ihre Verteilung bei PXE-Patienten und Kontrollpersonen. Der Haplotyp GCTCG im ersten Block war signifikant mit der Patientengruppe assoziiert ($p = 0,0047$), während der Haplotyp ATGCG im ersten Block signifikant mit der Kontrollgruppe assoziiert war ($p = 0,0224$).

Tabelle 3-21: Prognostizierte *MMP2*-Haplotypen bei PXE-Patienten und Kontrollen.

<i>Haplotyp</i>	<i>Frequenz</i>	<i>Anzahl PXE; Kontrollen</i>	<i>Frequenzen PXE; Kontrollen</i>	<i>OR (95% CI)^a</i>	<i>P^b</i>
<u>Block 1</u>					
GCTCG	0,568	228:140; 190:178	0,620; 0,516	1,53 (1,14 – 2,05)	0,0047
ATGCG	0,228	71:297; 97:271	0,193; 0,264	0,67 (0,47 – 0,95)	0,0224
GCTTG	0,122	41:327; 49:319	0,111; 0,133	0,82 (0,52 – 1,27)	0,3681
GCTCT	0,075	25:343; 30:338	0,068; 0,082	0,82 (0,47 – 1,43)	0,4834
<u>Block 2</u>					
AACGCGA	0,355	130:238; 131:237	0,353; 0,356	0,99 (0,73 – 1,34)	0,9386
AGCGTAG	0,278	97:271; 108:260	0,264; 0,293	0,86 (0,62 – 1,19)	0,3657
GACGTGA	0,166	70:298; 52:316	0,190; 0,142	1,43 (0,96 – 2,11)	0,0744
AATGTAA	0,088	37:331; 28:340	0,100; 0,076	1,36 (0,81 – 2,27)	0,2617
AGCGTAA	0,032	8:360; 15:353	0,023; 0,041	0,52 (0,22 – 1,25)	0,1381
GACACGA	0,019	5:363; 9:359	0,014; 0,024	0,55 (0,18 – 1,66)	0,2804
AACGCGG	0,012	4:364; 5:363	0,011; 0,012	0,80 (0,22 – 3,00)	0,7373
AACGTGA	0,011	3:365; 5:363	0,008; 0,014	0,60 (0,14 – 2,52)	0,4405
AGCGTGG	0,011	5:363; 3:365	0,013; 0,008	1,68 (0,40 – 7,07)	0,4771
AACGCAG	0,010	4:364; 3:365	0,011; 0,009	1,34 (0,30 – 6,02)	0,7041
<u>Block 3</u>					
GT	0,486	188:180; 170:198	0,511; 0,462	1,22 (0,91 – 1,63)	0,1844
CT	0,435	151:217; 169:199	0,410; 0,459	0,82 (0,61 – 1,10)	0,1808
CG	0,079	29:339; 29:339	0,079; 0,079	1,00 (0,58 – 1,71)	1,0000

^a Odds Ratio und 95% Konfidenzintervall^b χ^2 -Test

3.5.2. Matrix-Metalloproteinase 9

Im *MMP9*-Gen wurde der im Promotor lokalisierte Polymorphismus c.-1562C>T analysiert. Dazu wurden in DNA-Proben von PXE-Patienten und Kontrollen die Genotypen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-22 gezeigt. Die gefundenen Genotyp-Frequenzen lagen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Die Häufigkeiten der Genotypen von PXE-Patienten und Kontrollpersonen unterschieden sich nicht signifikant.

Tabelle 3-22: Genotyp-Frequenzen des Polymorphismus c.-1562C>T bei PXE-Patienten und Kontrollen.

<i>Allel</i>	<i>PXE-Patienten</i> ^a	<i>Kontrollen</i> ^a	<i>OR (95% CI)</i> ^b	<i>P</i> ^c
C	327 (87,9)	293 (86,7)	1,12 (0,72 – 1,74)	0,653
T	45 (12,1)	45 (13,3)		

^a Anzahl (Prozent)

^b *Odds Ratio* und 95% Konfidenzintervall

^c χ^2 -Test

3.5.3. Matrix-Metalloproteinase 14

Im *MMP14*-Gen wurden insgesamt vier SNPs untersucht. Die beobachteten Allelverteilungen lagen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Die Häufigkeiten der Allele unterschieden sich in keinem Fall signifikant zwischen der Gruppe der PXE-Patienten und den Kontrollen (Tabelle 3-23).

Tabelle 3-23: Allelfrequenzen der Polymorphismen im *MMP14*-Gen bei PXE-Patienten und Kontrollen.

<i>SNP</i>	<i>rs-Nummer</i>	<i>Allel</i>	<i>PXE-Patienten</i> ^a (<i>n</i> = 366)	<i>Kontrollen</i> ^a (<i>n</i> = 340)	<i>OR (95% CI)</i> ^b	<i>P</i> ^c
c.-165G>T	rs1003349	G	254 (69,4)	228 (67,1)	1,11 (0,81 – 1,53)	0,5044
		T	112 (30,6)	112 (32,9)		
c.221C>T	rs1042703	C	310 (84,7)	281 (82,6)	1,16 (0,78 – 1,73)	0,4606
		T	56 (15,3)	59 (17,4)		
c.6727C>G	rs2236302	C	326 (89,1)	313 (92,1)	1,44 (0,85 – 2,37)	0,1759
		G	40 (10,9)	27 (7,9)		
c.7096T>C	rs2236307	T	277 (75,7)	271 (79,7)	1,26 (0,88 – 1,80)	0,2000
		C	89 (24,3)	69 (20,3)		

^a Anzahl (Prozent)

^b *Odds Ratio* und 95% Konfidenzintervall

^c χ^2 -Test

3.5.3.1. Haplotypen-Analyse der SNPs im *MMP14*-Gen

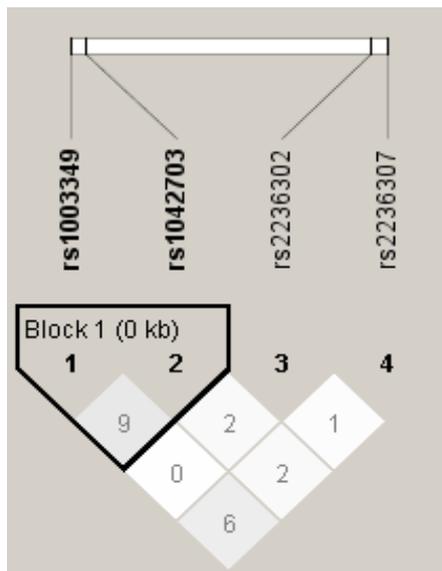


Abbildung 3-34: Von Haploview ermittelte LD-Struktur des *MMP14*-Gens. Schwarze Felder markieren ein vollständiges LD ($r^2 = 1$), weiße kein LD ($r^2 = 0$). Dazwischenliegende LD-Werte sind als Grauschattierungen visualisiert.

Die LD-Struktur des *MMP14*-Gens wurde aus insgesamt 706 Allelen von Patienten und Kontrollen mit der Haploview-Software ermittelt. LD-Muster und Haplotyp-Blöcke wurden gemäß der Einstellung „spline of LD“ in der Haploview-Software ermittelt, die auf einem D' -Wert $> 0,8$ für die äußeren Marker jedes Blocks basiert [172].

Die Analyse ergab einen LD-Block im *MMP14*-Gen (Abbildung 3-34). Dieser Block umfasst rs1003349 und rs1042703.

3.5.3.2. Assoziation von Haplotypen mit PXE

Tabelle 3-24 zeigt die von Haploview ermittelten Haplotypen und ihre Verteilung bei PXE-Patienten und Kontrollpersonen. Der Haplotyp TTGT im ersten Block war mit der Patientengruppe assoziiert, die Assoziation war an der Grenze der statistischen Signifikanz.

Tabelle 3-24: Prognostizierte *MMP14*-Haplotypen bei PXE-Patienten und Kontrollen.

Haplotyp	Frequenz	Anzahl PXE; Kontrollen	Frequenzen PXE; Kontrollen	OR (95% CI) ^a	P ^b
TTCT	0,271	89:277; 102:238	0,243; 0,300	0,75 (0,54 – 1,05)	0,0881
GTCT	0,266	100:266; 88:252	0,272; 0,260	1,08 (0,77 – 1,50)	0,6654
GTCC	0,186	73:293; 58:282	0,199; 0,172	1,21 (0,82 – 1,77)	0,3242
GCCT	0,152	52:314; 56:284	0,141; 0,164	0,84 (0,56 – 1,27)	0,3913
GTGT	0,059	22:344; 20:320	0,061; 0,058	1,02 (0,55 – 1,91)	0,9425
TTGT	0,027	14:352; 5:335	0,039; 0,014	2,67 (0,95 – 7,48)	0,0534
TTCC	0,019	9:357; 5:335	0,023; 0,015	1,69 (0,56 – 5,09)	0,3466
GCCC	0,010	4:362; 3:337	0,012; 0,009	1,24 (0,28 – 5,59)	0,7779

^a Odds Ratio und 95% Konfidenzintervall

^b χ^2 -Test

3.5.4. Vascular endothelial growth factor

3.5.4.1. Assoziation einzelner SNPs im VEGFA-Gen mit PXE

Zehn SNPs im Promotor und der codierenden Region des VEGFA-Gens wurden untersucht. Die Allelverteilung ist in Tabelle 3-25 angegeben. Kein einzelner Polymorphismus war signifikant mit der PXE-Gruppe oder der Kontrollgruppe assoziiert. Alle Genotyp-Verteilungen befanden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Tabelle 3-25: Allelfrequenzen der Polymorphismen im VEGFA-Gen bei PXE-Patienten und Kontrollen.

SNP	rs-Nummer	Allel	PXE-Patienten ^a (n = 326)	Kontrollen ^a (n = 326)	OR (95% CI) ^b	P ^c
c.-1540A>C	rs699947	A	158 (48.5)	164 (50.3)	1.08 (0.79-1.46)	0.638
		C	168 (51.5)	162 (49.7)		
c.-460C>T	rs833061	C	160 (49.1)	172 (52.8)	1.16 (0.85-1.58)	0.347
		T	166 (50.9)	154 (47.2)		
c.-152G>A	rs13207351	G	164 (50.3)	156 (47.9)	1.10 (0.81-1.50)	0.531
		A	162 (49.7)	170 (52.1)		
c.405C>G	rs2010963	C	91 (27.9)	109 (33.4)	1.30 (0.93-1.81)	0.126
		G	235 (72.1)	217 (66.6)		
c.674C>T	rs1413711	C	168 (51.5)	161 (49.4)	1.09 (0.80-1.48)	0.584
		T	158 (48.5)	165 (50.6)		
c.1032C>T	rs25648	C	261 (80.1)	273 (83.7)	1.28 (0.86-1.92)	0.222
		T	65 (19.9)	53 (16.3)		
c.4618C>T	rs735286	C	238 (73.0)	222 (68.1)	1.26 (0.89-1.76)	0.169
		T	88 (27.0)	104 (31.9)		
c.5092C>A	rs2146323	C	223 (68.4)	203 (62.3)	1.31 (0.95-1.81)	0.100
		A	103 (31.6)	123 (37.7)		
c.9109C>T	rs3025020	C	233 (71.5)	215 (66.0)	1.27 (0.91-1.77)	0.128
		T	93 (28.5)	111 (34.0)		
c.9162C>T	rs3025021	C	214 (65.6)	210 (64.4)	1.04 (0.75-1.43)	0.743
		T	112 (34.4)	116 (35.6)		

^a Allele (Prozent)

^b Odds Ratio und 95% Konfidenzintervall

^c χ^2 -Test

3.5.4.2. Assoziation einzelner SNPs mit dem Schweregrad der Retinopathie

Für 97 der 163 untersuchten PXE-Patienten waren die Ergebnisse einer ophthalmologischen Untersuchung verfügbar. Diese Patienten wurden in Abhängigkeit vom Schweregrad ihrer okularen Manifestationen in zwei Gruppen eingeteilt, deren Eigenschaften in Tabelle 3-26 aufgeführt sind.

Tabelle 3-26: Eigenschaften der nach okularem Phänotyp eingeteilten Gruppen.

<i>Eigenschaft</i>	<i>Gruppe A^c</i>	<i>Gruppe B^d</i>	<i>Total</i>	<i>P</i>
N	31	66	97	/
Männer (Frauen)	9 (22)	21 (45)	30 (67)	0.819
Alter in Jahren ^a	37.0 ± 12.7	53.4 ± 12.9	48.2 ± 14.9	<0.001
Diagnosealter ^a	23.5 ± 11.9	34.6 ± 15.9	31.1 ± 15.6	0.002
Krankheitsdauer ^a	13.3 ± 11.9	18.8 ± 13.3	17.1 ± 13.1	0.038
Bluthochdruck ^b	2 (6.5%)	27 (40.9%)	29 (29.9%)	0.0003
Raucher ^b	12 (38.7%)	13 (19.7%)	25 (25.8%)	0.080

^a Durchschnitt ± Standardabweichung.

^b Gesamtzahl (Prozent).

^c PXE-Patienten ohne Retinopathie oder mit milder Retinopathie, aber ohne Einschränkungen des Sehvermögens, definiert als entweder ohne Fundusbefund oder mit Diagnose von *Peau d'orange* und / oder angioiden Streifen

^d PXE-Patienten mit schwerer Retinopathie, die von Einschränkungen des Sehvermögens begleitet ist, definiert als Sehvermögen von weniger als 100% in mindestens einem Auge.

Die Verteilung der Allele auf die Gruppen ist in Tabelle 3-27 angegeben. Für acht der zehn SNPs wurde eine signifikante Assoziation ($p < 0,05$) mit einer schwerwiegenden Augenbeteiligung festgestellt. Nach der Korrektur für multiples Testen blieben die SNPs c.-1540A>C (rs699947), c.-460C>T (rs833061), c.-152G>A (rs13207351), c.674C>T (rs1413711) und c.1032C>T (rs25648) signifikant mit schwerer Retinopathie assoziiert.

Tabelle 3-27: Allelfrequenzen der Polymorphismen im *VEGFA*-Gen bei den nach okularem Phänotyp eingeteilten Patientengruppen.

SNP	rs-Nummer	Allel	Gruppe A ^a	Gruppe B ^a	OR (95% CI) ^b	P _{korrigiert} ^c
c.-1540A>C	rs699947	A	40 (64.5)	51 (38.6)	2.89 (1.54-5.41)	0.011
		C	22 (35.5)	81 (61.4)		
c.-460C>T	rs833061	C	43 (69.4)	49 (37.1)	3.83 (2.01-7.31)	0.0003
		T	19 (30.6)	83 (62.9)		
c.-152G>A	rs13207351	G	19 (30.6)	82 (62.1)	3.71 (1.95-7.07)	0.0004
		A	43 (69.4)	50 (37.9)		
c.405C>G	rs2010963	C	11 (17.7)	46 (34.8)	2.48 (1.18-5.22)	0.147
		G	51 (82.3)	86 (65.2)		
c.674C>T	rs1413711	C	21 (33.9)	82 (62.1)	3.21 (1.70-6.02)	0.004
		T	41 (66.1)	50 (37.9)		
c.1032C>T	rs25648	C	42 (67.7)	114 (86.4)	3.02 (1.46-6.25)	0.023
		T	20 (32.3)	18 (13.6)		
c.4618C>T	rs735286	C	51 (82.3)	88 (66.7)	2.32 (1.10-4.89)	0.246
		T	11 (17.7)	44 (33.3)		
c.5092C>A	rs2146323	C	36 (58.1)	99 (75.0)	2.17 (1.14-4.12)	0.168
		A	26 (41.9)	33 (25.0)		
c.9109C>T	rs3025020	C	40 (64.5)	97 (73.5)	1.52 (0.80-2.91)	1.000
		T	22 (35.5)	35 (26.5)		
c.9162C>T	rs3025021	C	45 (72.6)	85 (64.4)	1.42 (0.73-2.75)	1.000
		T	17 (27.4)	47 (35.6)		

^a Allele (Prozent)

^b Odds Ratio und 95% Konfidenzintervall

^c χ^2 -Test, p-Werte nach Bonferroni-Korrektur für n = 10

3.5.4.3. Multivariate SNP-Analyse

Der Zusammenhang zwischen *VEGFA*-Polymorphismen und der mit PXE assoziierten Retinopathie wurde weiter mittels logistischer Regressionsanalyse untersucht. Dabei wurden einige klinische Parameter sowie die assoziierten *VEGFA*-Allele als Kovariaten benutzt. Wegen des hohen paarweisen LDs zwischen c.-460C>T und c.-152G>A wurde letzterer von der Analyse ausgeschlossen. Durch Vorwärts- und Rückwärtsselektion wurden dann die Kovariaten ermittelt, die einen signifikanten Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer schweren Retinopathie hatten. Die Ergebnisse der logistischen Regressionsanalyse sind in Tabelle 3-28 angegeben. Sowohl Alter und Blutdruck als auch das Tragen der Allele c.-460T und c.674C wurden so im Vorwärts- und auch im Rückwärtsmodell als unabhängige Risikoprädiktoren ermittelt. Das Vorhandensein eines der beiden Allele bedeutet ein signifikant erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer schweren Visusbeeinträchtigung, beide sind unabhängige Risikofaktoren für eine schwere Retinopathie.

Tabelle 3-28: Mittels logarithmischer Regressionsanalyse adjustierte *Odds Ratios* für die Assoziation mit der Gruppe mit schwerer Retinopathie.

<i>Variable</i>	<i>Odds Ratio (95% Konfidenzintervall)</i>	<i>P</i>
Alter	1.10 (1.06-1.14)	1.84x10 ⁻⁷
Weibliches Geschlecht	1.31 (0.52-3.29)	0.564
Bluthochdruck	7.97 (2.13-29.9)	0.0021
Rauchstatus	0.63 (0.26-1.54)	0.310
c.-460T Genotyp	6.97 (2.81-17.3)	0.00004
c.674C Genotyp	5.21 (2.18-12.5)	0.00021

3.5.4.4. Haplotypen-Analyse

Die LD-Struktur des *VEGFA*-Gens wurde aus insgesamt 652 Allelen von Patienten und Kontrollen mit der Haploview-Software ermittelt. LD-Muster und Haplotyp-Blöcke wurden gemäß der Einstellung „spline of LD“ in der Haploview-Software ermittelt, die auf einem D'-Wert > 0,8 für die äußeren Marker jedes Blocks basiert [172]. Die Analyse ergab zwei getrennte LD-Blöcke im *VEGFA*-Gen, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen früherer Studien [65, 175] (Abbildung 3-37). Der erste Block erstreckt sich von c.-1540A>C bis c.5092C>A und umfasst den Promotor und die 5'-kodierende Region des *VEGFA*-Gens. Der zweite Block umfasst die SNPs c.9109C>T und c.9162C>T. Der höchste paarweise r²-Wert wurde zwischen c.-460C>T und c.-152G>A im ersten Block beobachtet.

3.5.4.5. Assoziation von Haplotypen mit PXE

Tabelle 3-29 zeigt die von Haploview ermittelten Haplotypen und ihre Verteilung bei PXE-Patienten und Kontrollpersonen. Der Block 1-Haplotyp CTGGCCCC war signifikant mit der Patientengruppe assoziiert (p = 0,013 nach Korrektur). Für den Haplotyp ACAGTCCA zeigte sich eine Assoziation mit der Kontrollgruppe, die jedoch nach der Korrektur für multiples Testen nicht mehr statistisch signifikant war (p = 0,066).

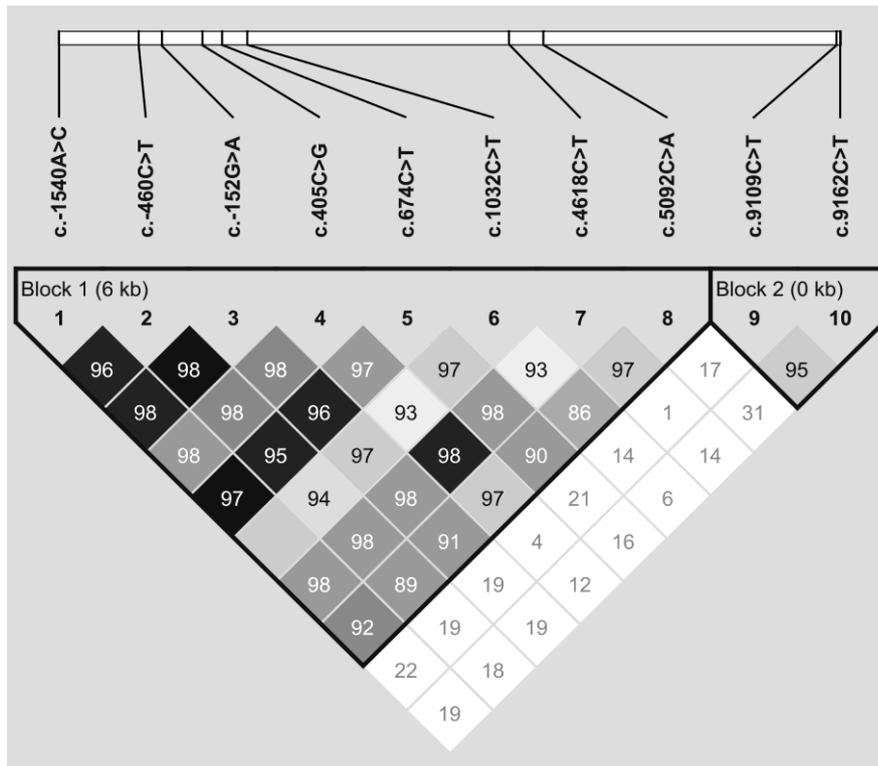


Abbildung 3-35: Von Haploview ermittelte LD-Struktur des *VEGFA*-Gens. Schwarze Felder markieren ein perfektes LD ($r^2 = 1$), weiße kein LD ($r^2 = 0$). Dazwischenliegende LD-Werte sind als Grauschattierungen visualisiert.

Tabelle 3-29: Prognostizierte *VEGFA*-Haplotypen bei PXE-Patienten und Kontrollen

<i>Haplotyp</i>	<i>Frequenz</i>	<i>Anzahl PXE, Kontrollen</i>	<i>Frequenzen PXE, Kontrollen</i>	<i>OR (95% CI)^a</i>	<i>P_{korrigiert}^b</i>
<u>Block 1</u>					
CTGCCCTC	0.289	86:238, 102:224	0.265, 0.312	0.79 (0.57-1.12)	1.000
ACAGCTCA	0.165	41:283, 67:259	0.126, 0.205	0.56 (1.17-2.72)	0.066
CTGGCCCC	0.165	69:255, 38:288	0.212, 0.118	2.05 (1.33-3.15)	0.013
ACAGTTCA	0.157	57:268, 46:280	0.174, 0.140	1.30 (0.85-1.98)	1.000
ACAGCTCC	0.146	50:274, 45:281	0.154, 0.138	1.14 (0.74-1.76)	1.000
CCAGCCCC	0.013	4:320, 4:322	0.014, 0.012	1.01 (0.25-4.06)	1.000
CTGCCCCC	0.011	4:320, 3:323	0.012, 0.010	1.35 (0.30-6.06)	1.000
<u>Block 2</u>					
CT	0.346	112:212, 113:213	0.344, 0.348	1.00 (0.72-1.38)	1.000
CC	0.343	122:202, 102:224	0.375, 0.312	1.33 (0.96-1.84)	0.889
TC	0.306	91:233, 108:218	0.279, 0.3332	0.79 (0.56-1.10)	1.000

^a Odds Ratio und 95% Konfidenzintervall

^b χ^2 -Test, p-Werte nach Bonferroni-Korrektur für $n = 10$

3.5.4.6. Auswirkungen von VEGFA-Haplotypen auf die okuläre Manifestation

Es wurde ebenfalls eine Haplotypen-Analyse für die nach Schweregrad der Augenbeteiligung eingeteilten Patientengruppen durchgeführt, die Ergebnisse sind in Tabelle 3-30 zusammengefasst. Der Block 1-Haplotyp ACAGTTCA war deutlich häufiger in der Gruppe mit mildem okularem Phänotyp vertreten, auch wenn die Assoziation nach der Korrektur für multiples Testen nur grenzwertig signifikant war ($p = 0,051$).

Tabelle 3-30: Prognostizierte Haplotypen in den nach okulärer Beteiligung eingeteilten Patientengruppen.

<i>Haplotyp</i>	<i>Frequenz</i>	<i>Anzahl Gruppe A, B</i>	<i>Frequenzen Gruppe A, B</i>	<i>OR (95% CI)^a</i>	<i>P_{korrigiert}^b</i>
<u>Block 1</u>					
CTGCCCTC	0.284	44:88, 11:51	0.333, 0.177	2.32 (1.10-4.89)	0.246
CTGGCCCC	0.206	33:99, 7:55	0.250, 0.113	2.62 (1.09-6.31)	0.276
ACAGTTCA	0.180	17:115, 18:44	0.127, 0.293	0.36 (0.17-0.76)	0.051
ACAGCTCC	0.160	17:115, 14:48	0.130, 0.223	0.51 (0.23-1.11)	0.997
ACAGCTCA	0.103	13:119, 7:55	0.098, 0.113	0.86 (0.32-2.27)	1.000
CCAGCCCC	0.016	1:131, 2:60	0.006, 0.039	0.23 (0.02-2.58)	0.997
CTGCCCCC	0.010	2:130, 0:62	0.015, 0.000	2.40 (0.11-50.7)	1.000
<u>Block 2</u>					
CC	0.376	50:82, 23:39	0.379, 0.371	1.03 (0.55-1.93)	1.000
CT	0.330	47:85, 17:45	0.356, 0.274	1.46 (0.76-2.84)	1.000
TC	0.294	35:97, 22:40	0.265, 0.355	0.66 (0.34-1.25)	1.000

^a Odds Ratio und 95% Konfidenzintervall

^b χ^2 -Test, p-Werte nach Bonferroni-Korrektur für $n = 10$

3.6. Analyse von Biomarkern der ECM-Remodulierung bei PXE-Patienten

3.6.1. Matrix-Metalloproteinase 2 im Serum

Für die Proben der drei Kohorten mit Patienten, Angehörigen und gesunden Kontrollpersonen wurde die jeweilige Serumkonzentration an MMP2 unter Verwendung des kommerziellen *sandwich*-ELISA Quantikine Human MMP2 (total) der Firma R&D Systems bestimmt. Dazu wurden die Proben, wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben, 1:10 verdünnt und für den Test eingesetzt.

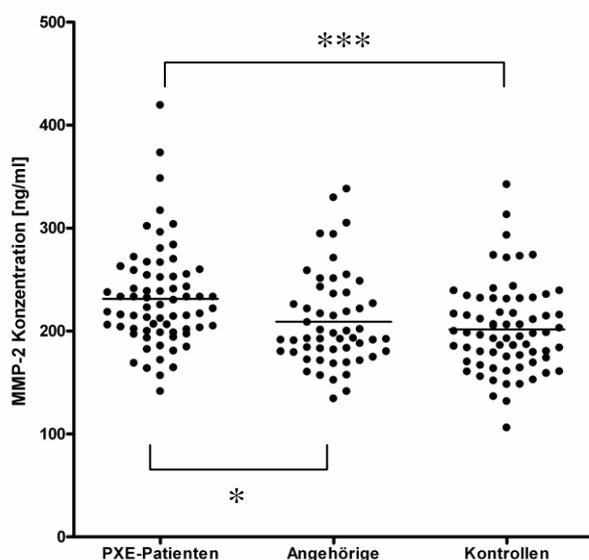


Abbildung 3-36: Der *Scatter*-Plot zeigt die MMP-2-Konzentrationen in den drei untersuchten Kohorten. *** $P < 0,001$, * $P < 0,05$

Wie die Abbildung 3-36 zeigt, wurden für die Kohorte der PXE-Patienten die höchsten MMP2-Konzentrationen beobachtet. Die niedrigsten Konzentrationen wurden im Serum der gesunden Kontrollpersonen gefunden, die Gruppe der Angehörigen wies Konzentrationen auf, die sich zwischen denen der Patienten- und der Kontrollkohorte befanden.

Die gemessenen Konzentrationen waren in allen untersuchten Kohorten normalverteilt. Die Mittelwerte der MMP2-Konzentrationen für die analysierten Kohorten sind in der Tabelle 3-31 angegeben. Eine statistische Analyse unter Verwendung des t-Tests

ergab eine signifikant erhöhte MMP2-Konzentration bei PXE-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen ($P = 0.0002$) sowie beim Vergleich zwischen PXE-Patienten und Angehörigen ($P = 0.0112$). Keine statistisch signifikanten Unterschiede wurden zwischen der Angehörigenkohorte und den Kontrollpersonen gefunden ($P = 0.349$).

Tabelle 3-31: Mittelwerte der MMP2-Konzentration in den untersuchten Kohorten.

Kohorte	N (männlich)	Konzentration MMP-2 [ng/ml] ^a		
		Gesamt	Männer	Frauen
PXE-Patienten	69 (32)	231 ± 48,9	228 ± 54,0	234 ± 44,6
Angehörige	54 (27)	209 ± 45,6	212 ± 52,6	206 ± 38,2
Kontrollen	69 (32)	202 ± 42,9	207 ± 49,3	197 ± 36,5

^a Mittelwert ± Standardabweichung

Eine geschlechtsspezifische Analyse zeigte eine signifikant erhöhte Konzentration von MMP-2 in weiblichen PXE-Patienten verglichen mit gesunden weiblichen Kontrollpersonen ($P = 0,0002$) sowie mit weiblichen Angehörigen ($P = 0,0112$), nicht jedoch bei männlichen PXE-Patienten im Vergleich zu männlichen gesunden Kontrollpersonen ($P = 0,115$) oder männlichen Angehörigen ($P = 0,249$) (Abbildung 3-37).

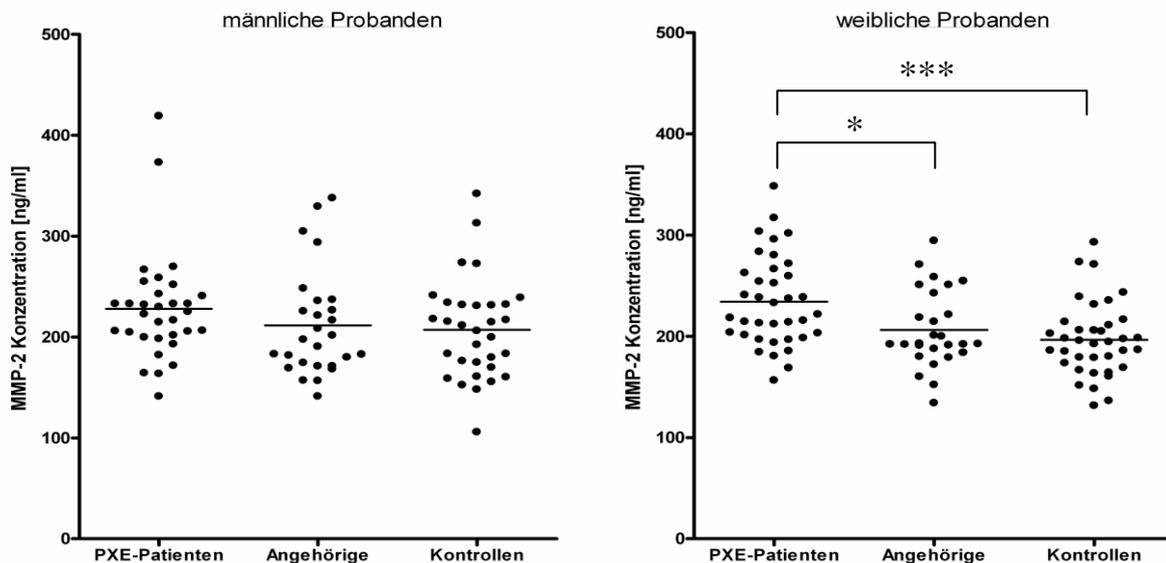


Abbildung 3-37: Die *Scatter*-Plots zeigen die MMP-2-Konzentrationen in den drei untersuchten Kohorten bei männlichen und weiblichen Probanden. *** $P < 0,001$, * $P < 0,05$

3.6.2. Matrix-Metalloproteinase 9 im Serum

Alle Proben wurden zunächst im Verhältnis 1:100 verdünnt und anschließend mittels des *sandwich*-ELISA Quantikine Human MMP9 (total) die MMP-9-Konzentrationen bestimmt. Auf Grund von Problemen bei der Konzentrationsbestimmung des MMP-9 in hämolytischen Proben konnten nur nicht hämolytische Proben zur weiteren Analyse genutzt werden. Die Ergebnisse der Messung sind in Abbildung 3-38 dargestellt. Die höchste mittlere MMP-9-Konzentration wurde in der Kohorte der

Tabelle 3-32: Mittelwerte der MMP-9-Konzentration in den untersuchten Kohorten.

<i>Kohorte</i>	<i>N (männlich)</i>	<i>Konzentration MMP-9 [ng/ml]^a</i>		
		<i>Gesamt</i>	<i>Männer</i>	<i>Frauen</i>
PXE-Patienten	58 (27)	946 ± 430	999 ± 453	900 ± 412
Angehörige	35 (14)	812 ± 530	911 ± 531	825 ± 496
Kontrollen	69 (32)	537 ± 256	503 ± 235	565 ± 273

^a Mittelwert ± Standardabweichung

PXE-Patienten gefunden, gefolgt von der Kohorte der Angehörigen und der Kohorte der Kontrollen. Die mittleren MMP9-Konzentrationen sind in der Tabelle 3-32 angegeben.

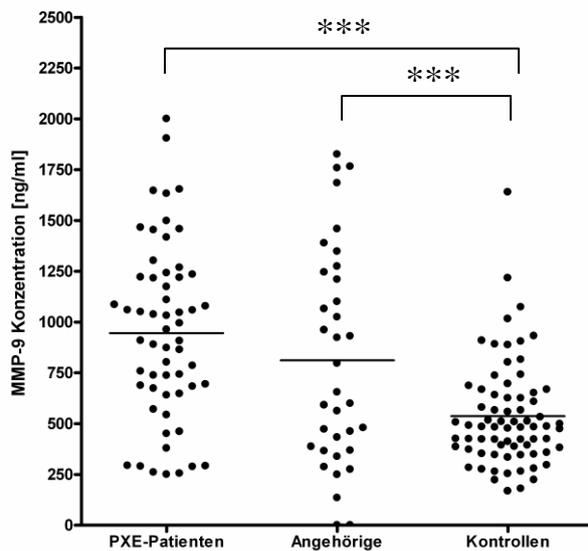


Abbildung 3-38: Der *Scatter*-Plot zeigt die MMP-9-Konzentrationen in den drei untersuchten Kohorten. *** $P < 0,001$

im Vergleich mit Kontrollpersonen ($P = 0,006$ bzw. $P = 0,0127$), nicht jedoch bei männlichen oder weiblichen PXE-Patienten im Vergleich zu Angehörigen ($P = 0,579$ bzw. $P = 0,563$) (Abbildung 3-39).

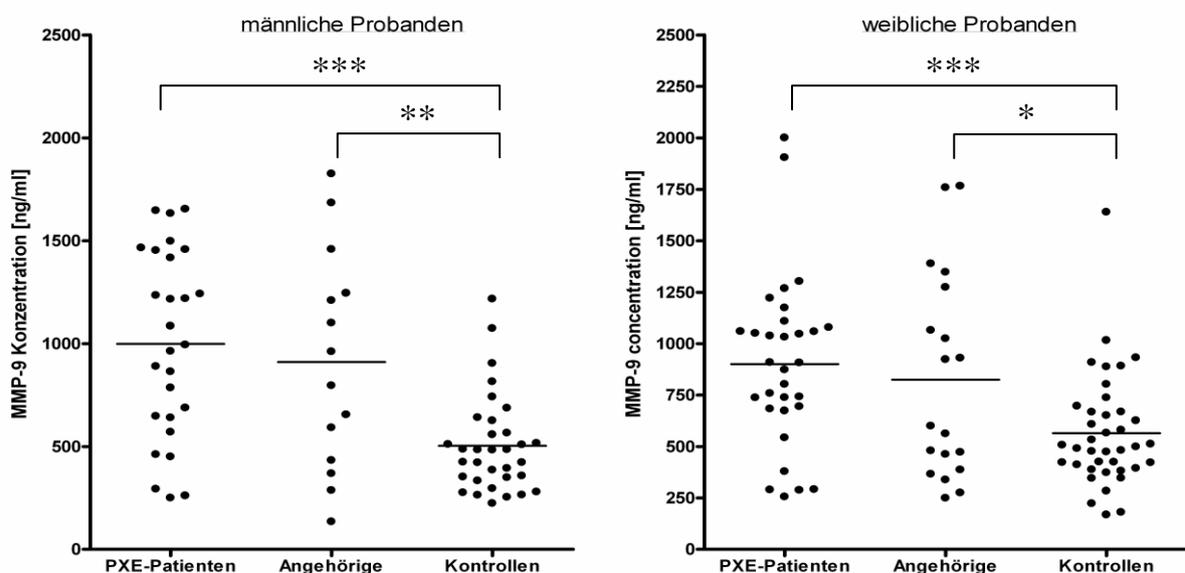


Abbildung 3-39: Die *Scatter*-Plots zeigen die MMP-9-Konzentrationen in den drei untersuchten Kohorten bei männlichen und weiblichen Probanden. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$

Zwischen der mittleren MMP-9-Konzentration in der Kohorte der PXE-Patienten und der Kontrollkohorte sowie zwischen Angehörigen- und Kontrollkohorte gab es einen statistisch signifikanten Unterschied ($P < 0,0001$ bzw. $P = 0,0004$). Keinen signifikanten Unterschied gab es zwischen der PXE- und der Angehörigenkohorte ($P = 0,185$). Eine geschlechtsspezifische Analyse zeigte eine signifikant erhöhte Konzentration von MMP-9 sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen PXE-Patienten, verglichen mit Kontrollpersonen desselben Geschlechts (jeweils $P < 0,0001$), bei männlichen und weiblichen Angehörigen

3.7. Generierung und Charakterisierung einer PXE-Dermalfibroblasten-Zelllinie als PXE-Modellsystem

3.7.1. Immortalisierung von PXE-Fibroblasten

Zur Immortalisierung wurden dermale Fibroblasten der beiden PXE-Patienten P52M und P63F mit einem Plasmid transfiziert, das die cDNA der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase (hTERT) enthielt. Die Transfektion wurde mit dem *Nucleofector* der Firma Amaxa durchgeführt, nachdem der Einsatz mehrerer auf Liposomen basierender Transfektions-Reagenzien bei den schwierig zu transfizierenden primären Dermalfibroblasten nicht zum Erfolg geführt hatte. Mit dem auf Elektroporation beruhenden *Nucleofector* konnte schließlich eine Transfektionseffizienz von über 50 Prozent erzielt werden. Das transfizierte Plasmid verlieh den Zellen außerdem auch eine Resistenz gegenüber dem Zytostatikum Geneticin, so dass durch die Kultivierung der transfizierten Zellen mit Geneticin stabile Klone selektioniert werden konnten. Die entstandenen Klone wiesen eine starke Expression der hTERT-mRNA auf, wie durch eine RT-PCR mit hTERT-spezifischen Primern gezeigt werden konnte (Abbildung 3-40). Die hTERT-Expression der generierten Klone entsprach derjenigen von kommerziell erhältlichen hTERT-immortalisierten Fibroblasten (hTERT BJ1, *Clonetech*).

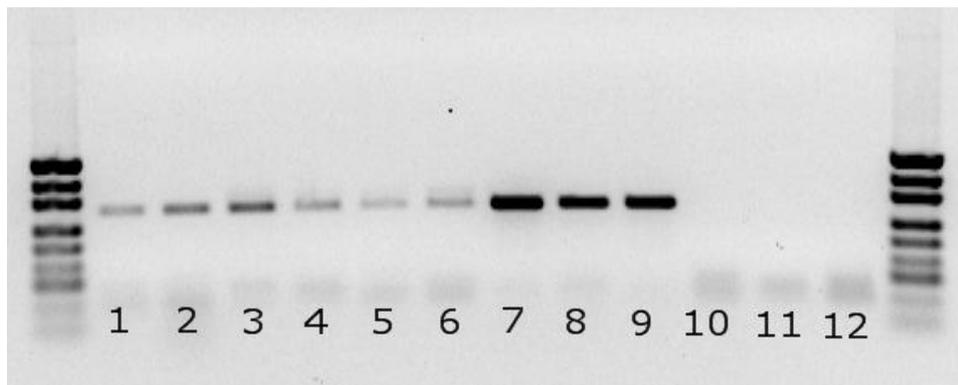


Abbildung 3-40: Die Gelfotographie zeigt die Produkte der RT-PCR mit hTERT-spezifischen Primern. Als Template diente die isolierte Gesamt-RNA aus den mit hTERT-Plasmid transfizierten Fibroblasten (Spur 8+9), den nicht transfizierten Fibroblasten (Spur 10+11), kommerziellen hTERT-immortalisierten Fibroblasten (Spur 7) sowie aus einigen humanen Tumorzelllinien (Spur 1+2: P52MK293, Spur 3+4: THP1, Spur 5+6: HeLa). Spur 12: Negativkontrolle.

3.7.2. Charakterisierung der immortalisierten PXE-Dermalfibroblasten

Die immortalisierten Fibroblasten der beiden PXE-Patienten wurden für über 100 Passagen kultiviert, während die parallel weiter kultivierten Ursprungszellen nach ca. 25 Passagen die Teilungsaktivität weitgehend eingestellt hatten. Die nicht-immortalisierten Zellen wiesen zu diesem Zeitpunkt eine deutliche Aktivität von β -Galaktosidase auf, die als Marker für die zelluläre Seneszenz gilt [176]. Bei den immortalisierten Fibroblasten wurde keine durch die β -Galaktosidase-Aktivität verursachte Blaufärbung beobachtet (Abbildung 3-41).

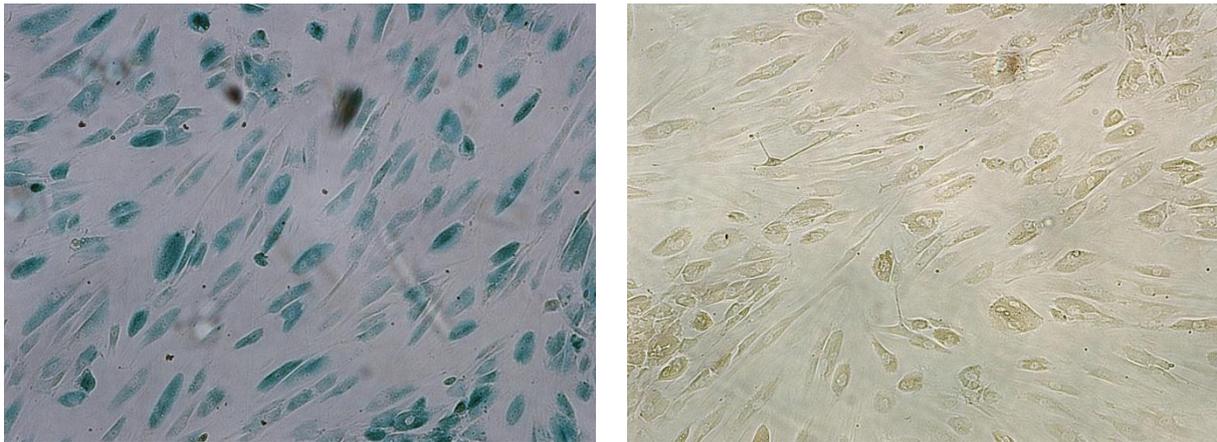


Abbildung 3-41: Die Photographien zeigen nicht-immortalisierte (links) und immortalisierte (rechts) Fibroblasten des PXE-Patienten P52M nach Färbung für β -Galaktosidase-Aktivität. Die Fibroblasten wurden für 25 Passagen kultiviert.

Die immortalisierten PXE-Fibroblasten zeigten über viele Passagen hohe Proliferationsraten. Diese waren deutlich höher als bei nicht-immortalisierten Fibroblasten aus frühen Passagen (Abbildung 3-42). Außerdem erreichten die immortalisierten Fibroblasten bei fortgesetzter Kultivierung eine deutlich höhere Zelldichte. Die die Zellen umgebende Matrix war zudem deutlich reduziert.

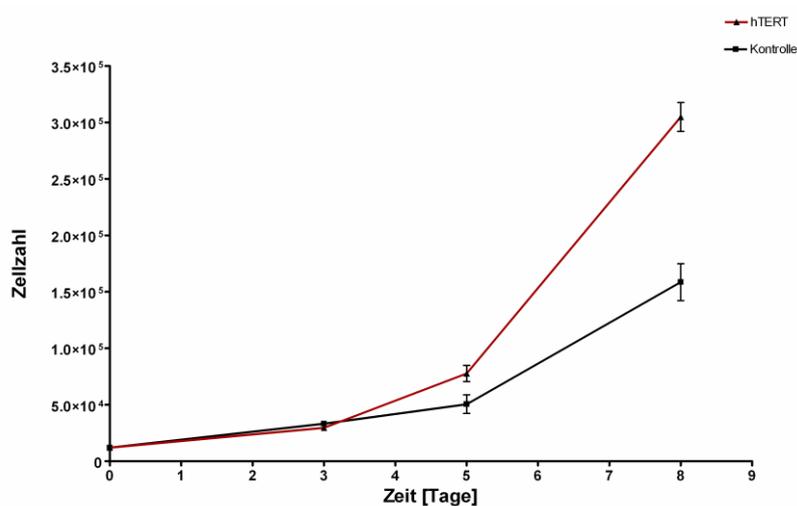


Abbildung 3-42: Wachstum von immortalisierten und nicht-immortalisierten PXE-Fibroblasten. Je 2×10^4 Zellen wurden ausgesät und kultiviert. Nach 3, 5 und 8 Tagen wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und unter Verwendung einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Der Versuch wurde in Dreifach-Bestimmung durchgeführt.

Zur Charakterisierung der Genexpression der immortalisierten Fibroblasten wurde die Expression einiger im Kontext von PXE bedeutender Gene in immortalisierten Fibroblasten beider PXE-Patienten aus verschiedenen Passagen mittels *realtime* RT-PCR gemessen und mit der Expression in nicht-immortalisierten Fibroblasten dieser Patienten verglichen. Die Expression der an der GAG-Biosynthese beteiligten Gene *XYLT1* und *XYLT2* war bei den immortalisierten Zellen im Vergleich zu den nicht immortalisierten Zellen nicht wesentlich verändert. Abbildung 3-43 zeigt exemplarisch die Expression von *XYLT1*.

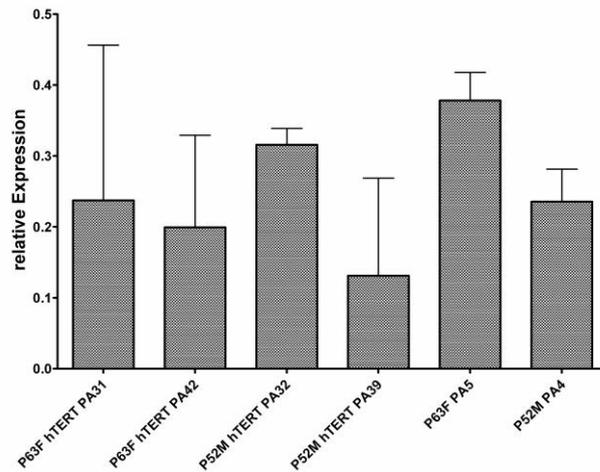


Abbildung 3-43: Expression von *XYLTI* in immortalisierten und nicht-immortalisierten Fibroblasten der PXE-Patienten P63F und P52M. Die Fehlerbalken geben Mittelwerte und Standardabweichung an.

Die Expression einer Reihe von Genen, die für wichtige Proteine der ECM codieren, und deren Expression bei den Fibroblasten von PXE-Patienten in späteren Passagen gegenüber Zellen von gesunden Spendern stark reduziert war, war bei den immortalisierten PXE-Fibroblasten ebenfalls deutlich reduziert. Abbildung 3-44 zeigt exemplarisch die Expression von Osteonektin. Besonders ausgeprägt war die reduzierte Expression beim Elastin-Gen, dessen mRNA-Konzentration in den immortalisierten Zellen weniger als ein Hundertstel der Konzentration in den nicht-immortalisierten Zellen betrug.

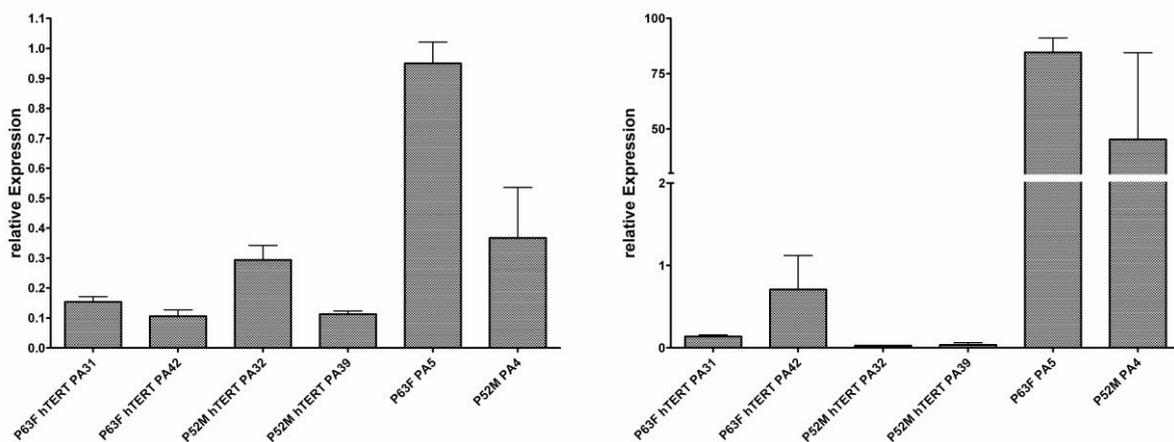


Abbildung 3-44: Expression von Osteonektin (links) und Elastin (rechts) in immortalisierten und nicht-immortalisierten Fibroblasten der PXE-Patienten P63F und P52M. Die Fehlerbalken geben Mittelwerte und Standardabweichung an.

4. Diskussion

4.1. Analysen zur Genexpression dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten

Um die komplexen Veränderungen bei der Homöostase der extrazellulären Matrix, die im Verlauf von PXE auftreten, zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit in dermalen Fibroblasten die mRNA-Expression einer Reihe von Genen analysiert, die am Auf-, Um- oder Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind. Fibroblasten bieten sich für die Expressionsanalyse an, weil sie hauptsächlich für die Synthese und Remodellierung der extrazellulären Matrix in Geweben verantwortlich sind [177]. PXE-Fibroblasten zeigen ein in vielen Aspekten von dem normaler dermalen Fibroblasten abweichendes Verhalten. Sie weisen unter anderem erhöhte Proliferationsraten und Adhäsionseigenschaften sowie eine veränderte Proteoglykan-Biosynthese und erhöhte proteolytische und elastolytische Aktivität auf [42-44, 72].

Für die Analyse der Genexpression musste zunächst ein geeignetes Verfahren zur Erfassung der mutmaßlich relativ geringen zu erwartenden Expressionsveränderungen gefunden werden. Die Methode der Wahl zur Quantifizierung von mRNA ist derzeit die *realtime* RT-PCR. Diese stellt eine hochempfindliche Methode dar, die die Quantifizierung von seltenen Transkripten sowie kleiner Veränderungen in der Genexpression erlaubt. Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten der Quantifizierung, die bei der *realtime* RT-PCR Anwendung finden, die relative und die absolute Quantifizierung [178]. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des eigentlichen Zielgens relativ zu einem Referenzgen betrachtet, während die absolute Quantifizierung auf der Verwendung einer internen oder externen Kalibrationskurve basiert. Aufgrund der sehr aufwändigen Herstellung von Standards für die Generierung externer Kalibrationskurven und der Vielzahl der zu quantifizierenden Gene kam in der vorliegenden Arbeit die relative Quantifizierung zum Einsatz.

Für die genaue Quantifizierung der Genexpression sind geeignete Normalisierungsstrategien erforderlich, um die experimentellen Fehler zu kontrollieren, die während des mehrstufigen Prozesses der Extraktion und Verarbeitung von RNA auftreten [179]. Diese Fehler resultieren aus der inhärenten Variabilität von RNA, unterschiedlichen Extraktionsverfahren, dem Vorkommen von Inhibitoren in den Extrakten sowie variierenden Effizienzen von reverser Transkription und PCR. Für die Normalisierung steht eine Reihe von Strategien zur Auswahl, z.B. Normalisierung über die Probengröße, über die Gesamt-RNA-Menge oder auf eine interne Referenz bzw. ein Haushaltsgen. Die Anwendung einer geeigneten Methode ist von großer Bedeutung für die Gewinnung biologisch relevanter Ergebnisse, so dass die Normalisierung eine der anspruchsvollsten Aufgaben bei der *realtime* RT-PCR darstellt. Ein wesentlicher Vorteil bei der Nutzung von Haushaltsgenen, also Genen mit konstanter Expression, zur Normalisierung besteht darin, dass alle Schritte bis zur abschließenden *realtime* PCR kontrolliert werden können. Auch der Einsatz verschiedener RNA-Mengen zur reversen Transkription kann kompensiert werden. Die mRNAs von Ziel- und Haushaltsgen sind während der gesamten Prozedur in der Probe vorhanden, so dass beide denselben Einflüssen unterworfen sind. Bei

den als Referenzgene für die relative Quantifizierung benutzen, sogenannten Haushaltsgenen geht man davon aus, dass ihre Expression nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß reguliert wird. Die Stabilität der Expression der Haushaltsgene ist eine elementare Voraussetzung für ihre Anwendung zur Normalisierung von Expressionsdaten. Allerdings zeigte sich bei einer Reihe von Genen, die als Haushaltsgene benutzt worden waren, dass diese tatsächlich doch einer Regulation unterlagen und ihre Expression unter experimentellen Bedingungen erheblich variieren konnte [169]. Bevor ein bestimmtes Gen als Haushaltsgen benutzt werden kann muss also sichergestellt sein, dass unter den Versuchsbedingungen keine nennenswerte Regulation stattfindet. Dies kann sich als zirkuläres Problem herausstellen, da die Expressionsdaten eines untersuchten Haushaltsgens wiederum normalisiert werden müssen. Eine mögliche Lösung ist die Verwendung mehrerer Haushaltsgene in Form eines gewichteten Expressionsindex [169, 180]. Die Auswahl der für das jeweilige Messproblem geeigneten Haushaltsgene ist dabei von entscheidender Bedeutung für die Qualität der Ergebnisse, eine unpassende Auswahl kann sich in unzuverlässigen Resultaten niederschlagen [181].

Für die Normalisierung der im Rahmen der Untersuchungen an Fibroblasten gewonnenen Expressionsdaten mussten also zunächst geeignete Haushaltsgene gefunden werden, deren Expression zwischen den Proben möglichst wenig variieren sollte. Dies stellt bei Messungen an Zellen verschiedener Spender, die zudem möglicherweise noch von verschiedenen Körperregionen stammen, ein größeres Problem dar als etwa bei Messungen an Zellen gleicher Herkunft, die lediglich verschiedenen Behandlungen unterzogen wurden [182, 183]. Bei letzteren kann von einer konstanten Expression des Haushaltsgens ausgegangen werden, vorausgesetzt die Behandlung hat keinen Einfluss auf dessen Expression. Bei der Untersuchung der Expression eines Gens in Zellen, die von verschiedenen Personen stammen, ist die Verwendung eines einzelnen Haushaltsgens in der Regel nicht ausreichend, weil die Ergebnisse in Abhängigkeit von dem gewählten Haushaltsgen stark variieren [181].

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten und gesunden Kontrollpersonen zeigten sich bei den analysierten Haushaltsgenen erhebliche Unterschiede in der Expression zwischen den einzelnen Spendern. Bei der Benutzung nur eines einzelnen Haushaltsgens waren die Ergebnisse der Quantifizierung der Zielgene stark abhängig von der Wahl des Haushaltsgens. Zwischen verschiedenen Passagen sowie zwischen einzelnen Kulturschalen zeigten sich zum Teil starke Abweichungen in der Expression. Durch Kombination von mehreren Haushaltsgenen zu einem Index und Normalisierung der Expressionsdaten unter Verwendung dieses Index konnte eine deutliche Reduzierung dieser Variationen erreicht werden. Die Auswahl der am besten geeigneten Haushaltsgene für die Berechnung des Index erfolgte durch die Analyse multipler paarweiser Korrelationen unter Verwendung des Programms geNorm [169]. Durch die Kombination der stabilsten Haushaltsgene war eine deutliche Reduzierung der Variabilität des kombinierten Index im Vergleich zu der Variabilität der einzelnen Haushaltsgene möglich. Obgleich durch das Hinzufügen

weiterer Haushaltsgene möglicherweise eine weitere Verbesserung der Stabilität des Index hätte erreicht werden können, musste bei der Bestimmung der Anzahl der zu testenden Gene auf ein angemessenes Verhältnis zwischen der verlangten experimentellen Genauigkeit und dem zu betreibenden Aufwand geachtet werden.

Ein wichtiger Aspekt bei der Untersuchung pathologischer Veränderungen der Genexpression ist die Frage, ob und in welchem Ausmaß die *in vivo* im Gewebeverband vorhandenen Abweichungen auch unter den artifiziellen Bedingungen der Zellkultur auftreten und ob diese Veränderungen auch während fortgesetzter Kultivierung und nach mehrmaligem Passagieren persistieren. Zu diesen Fragestellungen wurden Untersuchungen an Fibroblasten von Sklerodermie-Patienten durchgeführt [184, 185]. Die Sklerodermie ist eine Bindegewebserkrankung, die ähnlich wie PXE durch überschießende Produktion von Komponenten der extrazellulären Matrix sowie eine Degeneration der elastischen Fasern gekennzeichnet ist [184, 186]. Anders als bei PXE sind bei der Sklerodermie allerdings multiple Autoantikörper nachweisbar, was eine autoimmunologische Genese nahelegt. Aufgrund der fibrotischen Veränderungen wurde schon früh eine Beteiligung von TGF- β an der Pathogenese der Sklerodermie vermutet [187]. Während in Biopsien von Sklerodermie-Patienten viele Zielgene von TGF- β herauf reguliert sind, geht die veränderte Expression bei isolierten Fibroblasten in den meisten Fällen verloren, was darauf hinweist, dass die profibrotischen Faktoren aus Quellen stammen, die in der Kultur nicht mehr vorhanden sind [184]. Allerdings bleibt ein kleiner Teil der Veränderungen bei den isolierten Fibroblasten erhalten, was darauf schließen lässt, dass Fibroblasten die Quelle dieser Veränderungen darstellen. Diese persistierenden Veränderungen definieren ein für Sklerodermie-Fibroblasten typisches Muster von Expressionsveränderungen, das zumindest in frisch isolierten Zellen stabil bleibt.

Zur Frage, ob die veränderte Genexpression *in vitro* stabil bleibt, gibt es ebenfalls interessante Erkenntnisse aus Beobachtungen an Sklerodermie-Fibroblasten. Aus der Haut von Sklerodermie-Patienten isolierte Fibroblasten zeigten zunächst eine stark erhöhte Produktion von Typ I- und Typ III-Kollagen [185]. Wurden Subkulturen dieser Fibroblasten angelegt, so ging die erhöhte Kollagen-Produktion bei den meisten der Kulturen schon nach ein bis drei Passagen verloren, während sie in anderen für eine größere Anzahl von Passagen stabil war. Nach der fünften Passage jedoch unterschied sich die Kollagen-Synthese in den meisten Kulturen nicht mehr von der von Kontroll-Fibroblasten. Dies ist vermutlich die Folge eines Verlustes des Phänotyps während sukzessiver Subkultivierung oder einer Verdrängung der Kollagen überproduzierenden Fibroblasten durch andere Fibroblasten-Populationen. Es besteht nämlich die Möglichkeit, dass beim Entnehmen einer Hautbiopsie verschiedene Fibroblasten-Populationen erfasst werden, die möglicherweise unterschiedliche Phänotypen aufweisen [188]. Subpopulationen von Fibroblasten können sich in Morphologie, ECM-Produktion und Oberflächenantigenen unterscheiden, selbst wenn sie aus der gleichen Entnahmestelle stammen [189]. So zeigen Sklerodermie-Fibroblasten aus verschiedenen Hautschichten eine große

Variation bezüglich der Synthese von Kollagen und anderen Proteinen [185]. Durch unterschiedliche Proliferationsraten kann es im Verlauf der Kultivierung zu Verschiebungen bei der dominanten Fibroblasten-Population und damit auch zu Veränderungen der gesamten Genexpression der Fibroblasten einer Kultur kommen.

Es muss also in Anbetracht der beschriebenen Beobachtungen bei Sklerodermie-Fibroblasten davon ausgegangen werden, dass die veränderte Genexpression auch im Fall von PXE *in vitro* nicht bzw. nur teilweise stabil ist und sich während der Dauer der Kultivierung verändert. Die Veränderung der Genexpression mit der Kulturdauer ist problematisch, da dieses beim Vergleich der Expression zwischen Zellen von Patienten und gesunden Kontrollpersonen zu Verzerrungen führen kann. Um dieses Problem möglichst zu umgehen, wurden für die Expressionsuntersuchungen in der vorliegenden Arbeit Zellen aus den gleichen Passagen verwendet. Um die Stabilität des veränderten Genexpressionsprofils *in vitro* zu untersuchen, wurden die Analysen mit Zellen aus frühen Passagen durchgeführt und zur Kontrolle anschließend noch einmal mit Zellen aus späteren Passagen wiederholt.

Neben der Möglichkeit, bei einer Biopsie unterschiedliche Fibroblasten-Populationen zu erfassen, wird die Variation zwischen Proben verschiedener Spender dadurch weiter erhöht, dass sich das Genexpressionsprofil von Fibroblasten in Abhängigkeit von ihrer anatomischen Herkunft unterscheidet [182]. Der Einfluss dieser topographischen Differenzierung ist sogar so groß, dass diese die wichtigste Quelle der Variation der Genexpression darstellt [183]. Die Differenzierung ist zellautonom und maximal von parakrinen Faktoren abhängig und persistiert damit auch in der Kultur. Beim Vergleich von PXE-Fibroblasten mit Zellen von gesunden Spendern muss also gewährleistet sein, dass die Fibroblasten aus den gleichen Körperregionen stammen. Aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit primärer humaner Zellen von gesunden Personen ist jedoch ein exaktes positionelles *Matching* nur sehr eingeschränkt möglich, was die Aussagekraft vergleichender Genexpressionsstudien erheblich einschränkt.

4.1.1. Vergleich der Expression ausgewählter ECM-Gene zwischen PXE-Fibroblasten und Kontrollzellen

Die Quantifizierung der Expression der Proteoglykan-*Core*-Proteine ergab bei den Zellen in frühen Passagen eine signifikant reduzierte Expression von *CD44* und eine signifikant erhöhte Expression von Biglycan bei den Fibroblasten der PXE-Patienten. Letztere war dann in den Zellen in späten Passagen signifikant reduziert, während die Expression von Decorin stark und signifikant erhöht war. Die Expressionsdaten stehen teilweise im Widerspruch zu Befunden von Passi *et al.*, die mittels Immunfluoreszenz im Vergleich zu normalen Fibroblasten deutlich erhöhte Mengen sowohl von Biglycan als auch von Decorin im Extrazellulärraum von PXE-Fibroblasten gefunden hatten [14]. Diese Diskrepanz könnte allerdings durch die Veränderung der Expression beider Gene im Verlauf der

Kultivierung bedingt sein. Außerdem sind die Veränderungen nicht bei allen Patienten gleich ausgeprägt und Passi *et al.* verwendeten in ihrer Studie nur Fibroblasten von zwei PXE-Patienten.

Decorin und Biglycan gehören zur Familie der kleinen, Leucin-reichen Proteoglykane (*small leucine-rich family of proteoglycans*, SLRPs) [84]. Sie kommen zusammen mit anderen Proteoglykanen in der Haut vor [190]. Elastische Fasern enthalten Decorin und Biglycan [34]. Die SLRPs haben regulatorische Funktionen bei der Assemblierung der ECM. Es wurde spekuliert, dass Veränderungen bei SLRPs ultrastrukturelle Veränderungen der Haut bei PXE, wie etwa die Bildung abnormer Kollagenfasern, erklären könnten [44]. Die bei den Zellen in frühen Passagen beobachtete, leicht verringerte Expression von Decorin tritt auch bei der Sklerodermie auf, genauso wie die erhöhte Expression von Biglycan [184]. Decorin kann wahrscheinlich als Antagonist von TGF- β wirken [191], das für viele der bei der Sklerodermie auftretenden Veränderungen verantwortlich gemacht wird. Während Biglycan durch TGF- β stark induziert wird, geht die Expression von Decorin durch die Einwirkung von TGF- β zurück [192].

Decorin spielt eine wichtige Rolle bei der Organisation von Kollagenfasern und auch bei ihrer Mineralisierung. Auch wenn zwischen Decorin und Biglycan eine hohe Sequenz- und Strukturähnlichkeit besteht, sind ihre Rollen im Mineralisierungsprozess nicht austauschbar [81]. Insbesondere in Bezug auf die Rolle von Decorin bei der Mineralisierung sind die Ergebnisse aus *in vivo* und *in vitro* Studien widersprüchlich. *In vitro* führt Biglycan zu einer erhöhten Bildung von Hydroxylapatit und zu einer Beschleunigung der Mineralisierung, während Decorin das Kristallwachstum inhibiert [81]. Der inhibitorische Effekt von Decorin auf das Wachstum von Hydroxylapatit-Kristallen *in vitro* ist *in vivo* allerdings offenbar ohne Relevanz [191]. Die Decorin-Expression ist *in vitro* invers mit der Matrix-Mineralisierung korreliert, zu Beginn des Prozesses der Mineralisierung der Kollagen-Matrices von Knochen ist die Expression von Decorin sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene reduziert [81]. *In vivo* kommt es während der Phänotyp-Transition bei kalzifizierenden Glattmuskelzellen zu einer Erhöhung der Expression von alkalischer Phosphatase und auch der von Decorin, während gleichzeitig die Expression von Glattmuskel- α -Actin vermindert ist [191]. Die Decorin-Expression in Glattmuskelzellen wird dabei durch Interleukin-1 induziert. Erhöhte Biglycan-Spiegel fördern die Differenzierung von Osteoblasten, vermutlich durch die Fähigkeit von Biglycan, die Aktivität bestimmter Wachstumsfaktoren zu steigern [193]. Die erhöhte Biglycan-Produktion durch PXE-Fibroblasten könnte also die ektopische Kalzifizierung der elastischen Fasern fördern. Die Rolle von Decorin ist nicht klar, es ist aber anzunehmen, dass die erhöhte Expression Teil eines mit der Kalzifizierung assoziierten, spezifischen Expressionsmusters ist.

Die gefundene reduzierte Expression von *CD44* schließlich könnte im Zusammenhang stehen mit dem Anstieg der Konzentration von Hyaluronan sowohl in der Haut von PXE-Patienten als auch im Zellkulturüberstand von PXE-Fibroblasten. *CD44* ist der wichtigste Hyaluronan-Rezeptor an der

Zelloberfläche und spielt eine Rolle bei Aufnahme und Degradation von Hyaluronan [85, 107]. CD44 bindet Hyaluronan und führt zu dessen Internalisierung, auf die schließlich die Degradation in Lysosomen folgt [107, 115].

Die Expressionsanalyse zeigte eine signifikant erhöhte Expression von Elastin und Fibronectin in den Fibroblasten von PXE-Patienten in frühen Passagen und eine signifikant reduzierte Expression von Elastin, Fibronectin, Osteonektin, Osteopontin und Vitronectin sowie eine signifikant gesteigerte Tenascin C-Expression in den PXE-Fibroblasten in späten Passagen. Die gesteigerte Expression von Elastin und Fibronectin korreliert mit entsprechenden Befunden *in vivo*. Ein hoher Elastin-Gehalt wurde in der Haut von PXE-Patienten beobachtet [194]. Durch Immunfluoreszenz wurde gezeigt, dass der Fibronectin-Gehalt von PXE-Läsionen deutlich erhöht ist [195]. Fibronectin ist auch mit den kalzifizierten elastischen Fasern assoziiert [44]. Fibronectin und Vitronectin sind dabei am stärksten konzentriert in den Gebieten der dichten Mineralisierung in den elastischen Fasern [34].

Die gesteigerte Expression von Tenascin-C ist besonders bemerkenswert, weil dieses ECM-Protein mit Kalzifizierungsprozessen assoziiert ist. Tenascin-C ist ein großes hexamerer ECM-Glykoprotein, das in Reaktion auf eine Gewebeverletzung exprimiert wird und die Migration von Fibroblasten in das verletzte Areal fördert [196]. Die fortgesetzte, unphysiologische Expression von Tenascin-C ist mit fibrotischen Erkrankungen wie Sklerodermie, Leberzirrhose und Lungenfibrose assoziiert. Es existiert überdies ein Zusammenhang zwischen der Expression von Tenascin-C und der Kalzifizierung elastischer Fasern [197]. Die Kalzifizierung von Elastin in einem Implantationsmodell an Ratten geht einher mit erhöhter MMP-Aktivität und verstärkter Expression von Tenascin-C [198]. Die Proteolyse der ECM durch MMPs führt zur Aktivierung der Transkription von Tenascin-C, während die Inhibierung der MMP-Aktivität in einer verringerten Expression von Tenascin-C resultiert [197]. Die Produktion von Tenascin-C ist also abhängig von der MMP-Aktivierung und reflektiert möglicherweise die erhöhte proteolytische Aktivität von PXE-Fibroblasten [42].

Die stark verringerte Expression einer Reihe von ECM-Proteinen in den Zellen der späten Passagen ist ein überraschender Befund. So wurden zum Beispiel in den mineralisierten Bereichen der Haut von PXE-Patienten erhöhte Mengen von Osteonektin und Vitronectin gefunden [44]. Es gab daher Grund für die Vermutung, dass die Expression dieser Gene auch bei PXE-Fibroblasten *in vitro* erhöht sein könnte. Ähnlich unerwartet ist auch die im Vergleich zu den Kontrollen stark erniedrigte Expression von Elastin in Fibroblasten später Passagen. Die gesteigerte Expression von Elastin wurde für PXE-Fibroblasten beschrieben [170] und auch an Zellen früher Passagen im Rahmen dieser Arbeit gefunden.

4.1.2. Vergleich der Expression der an der GAG-Biosynthese beteiligten Gene zwischen PXE-Fibroblasten und Kontrollzellen

In dieser Arbeit wurde eine umfangreiche Charakterisierung der Expression eines großen Teils der bekannten, an der Biosynthese von GAGs beteiligten Gene durchgeführt. Obwohl bei keinem der Gene, die an der Synthese des Tetrasaccharid-*Linkers* beteiligt sind, ein signifikanter Unterschied zwischen PXE-Patienten und Kontrollen nachgewiesen werden konnte, wurde doch für alle diese Gene eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Steigerung der Expression gefunden, die auf eine gesteigerte Produktion von *Linker*-Tetrasacchariden und damit auch GAG-Ketten hinweist. Dies steht auch im Einklang mit den gefundenen erhöhten Expressionen der für die Initiation von CS / DS- bzw. HS-Ketten verantwortlichen Gene *CSGALNACT1* und *EXTL2*. Im Fall des CS-Ketten initiiierenden Enzyms CS-GalNAcT-I war die Steigerung der Expression hochsignifikant, was im Zusammenhang mit den gesteigerten mRNA-Konzentrationen der an der Modifizierung von CS-Ketten beteiligten Sulfotransferasen als Hinweis auf verstärkte Produktion von Chondroitinsulfat gedeutet werden kann. Die Expression der für die Polymerisierung von Chondroitinsulfat verantwortlichen Chondroitinsynthasen war bei PXE-Fibroblasten nicht erhöht. Dies kann entweder darauf zurückzuführen sein, dass diese keinen limitierenden Faktor bei der CS-Synthese darstellen und in genügender Menge vorhanden sind, um jedes *Linker*-Tetrasaccharid zu verlängern oder der Regulation der CS-Synthese hin zu einer geringeren Kettenlänge dienen. Zumindest im Fall von Heparansulfat ist die Länge der gebildeten Ketten offenbar abhängig von der Menge an verfügbaren EXT1 / EXT2-Komplexen [99].

Bemerkenswert ist die stark verringerte Expression von *XYLT1* in den Zellen später Passagen, die jedoch im Kontext mit den gefundenen verringerten Expressionen der Core-Proteine sinnvoll erscheint, da die XylT-I das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der GAG-Biosynthese darstellt [199]. Die verringerte *XYLT1*-Expression ist auch begleitet von einer deutlich reduzierten Expression der an der Chondroitin-Polymerisation beteiligten Gene, insbesondere des für die Aktivität der Chondroitinsynthasen erforderlichen Chondroitin-Polymerisierungsfaktors. All dies deutet auf eine ausgeprägte Verminderung der CS-Biosynthese bei den PXE-Fibroblasten in späten Passagen.

4.1.3. Vergleich der Expression von Matrix-Metalloproteinasen und Proteinase-Inhibitoren zwischen PXE-Fibroblasten und Kontrollzellen

Die von Quaglino *et al.* beschriebene Erhöhung der Expression von *MMP2* [42] konnte in dieser Arbeit nicht reproduziert werden. Bezüglich einer etwaigen gesteigerten enzymatischen Aktivität von MMP-2 lässt sich keine Aussage treffen, da die MMP-Aktivität auf multiplen Stufen reguliert wird und keine direkten Aktivitätsmessungen durchgeführt wurden. Ein Hinweis auf eine möglicherweise erhöhte Aktivität könnte allerdings die leicht erhöhte Expression von *MMP14* und *TIMP2* in den Zellen aus frühen Passagen liefern, die beide an der Aktivierung von proMMP-2 beteiligt sind [134]. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Quaglino *et al.* konnte in dieser Arbeit ebenfalls keine *MMP9*-mRNA in dermalen Fibroblasten nachgewiesen werden.

4.1.4. Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressionsanalyse und Schlussfolgerungen

Als Ergebnis der Expressionsanalysen lässt sich zunächst festhalten, dass PXE-Fibroblasten ein spezifisches Genexpressionsmuster aufweisen, das allerdings während fortgesetzter Kultivierung nicht stabil ist. Der PXE-Phänotyp wird diesen Zellen vermutlich im Gewebeverband durch bestimmte Faktoren aufgeprägt und verliert sich in der Zellkultur in Abwesenheit dieser Faktoren. Dies betrifft die PXE-typischen Veränderungen wie etwa die Expression von Elastin und anderer Matrix-Proteine sowie die für die erhöhte GAG-Biosynthese verantwortlichen Gene. Faktoren, die für die Ausbildung eines abweichenden Phänotyps bei den PXE-Fibroblasten in Frage kommen, sind Cytokine [177]. So nehmen etwa Cytokin-stimulierte synoviale Fibroblasten einen Matrix-abbauenden Phänotyp an, der von erhöhter proteolytischer Aktivität gekennzeichnet ist [147]. Die Effekte einiger Cytokine auf Fibroblasten sind ungewöhnlich lang anhaltend [189]. So sind etwa die durch die Stimulation mit TGF- β erhöhten Konzentrationen der Kollagen- und Fibronectin-mRNAs noch vier Tage nach der Entfernung von TGF- β nachweisbar [200]. Die Fibroblasten können also den veränderten Phänotyp *in vitro* über viele Passagen beibehalten, auch in Abwesenheit des induzierenden Faktors [189]. Der Mechanismus hierfür ist unklar. Möglicherweise können Cytokin-stimulierte Fibroblasten selbst zur Cytokin-Produktion angeregt werden und so den induzierten Phänotyp durch auto- bzw. parakrine Effekte aufrecht erhalten [189, 200]. Die Aktivierung von Fibroblasten führt zur Produktion von Cytokinen, Chemokinen und Prostaglandinen [177]. Zum Beispiel sezernieren synoviale Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) Interleukin-6, Interleukin-10 und TNF- α , die Cytokin-Sekretion nimmt mit fortgesetzter Kultivierung ab [201]. Bei synovialen RA-Fibroblasten kommt es durch Cytokin-Einwirkung zu langfristigen Veränderungen, die auch in Abwesenheit von Cytokinen persistieren [202]. Eine andere Möglichkeit für die Aufrechterhaltung eines abweichenden Phänotyps *in vitro* sind epigenetische Mechanismen wie zum Beispiel die DNA-Methylierung [177].

Das überraschendste Ergebnis der Genexpressionsanalysen ist die stark reduzierte Expression vieler Gene der ECM und der GAG-Biosynthese. Gemäß den oben angestellten Überlegungen hätte man annehmen können, dass sich die Genexpression nach dem Ausschleichen des aufgeprägten Phänotyps wieder normalisiert und derjenigen der normalen Fibroblasten annähert. Stattdessen weisen die PXE-Fibroblasten wiederum ein abweichendes Expressionsmuster auf, das allerdings offensichtlich mit dem für PXE typischen kaum Gemeinsamkeiten hat. Als Hypothese zur Erklärung dieses Musters soll an dieser Stelle eine vorzeitig eintretende zelluläre Seneszenz der PXE-Fibroblasten diskutiert werden. Die Ähnlichkeit von PXE-Symptomen mit im Laufe des normalen Alterungsprozess auftretenden Phänomenen wurde schon vor geraumer Zeit erkannt und PXE als Modell für beschleunigtes Altern diskutiert [195, 203].

Eine Reihe von Befunden stützt die Annahme einer vorzeitig einsetzenden Seneszenz als Erklärung für die veränderte Genexpression in den PXE-Fibroblasten nach einer Anzahl von Passagen. So wurde in seneszenten Fibroblasten eine stark verminderte Expression von Elastin beobachtet, in

Übereinstimmung mit der Beobachtung bei länger kultivierten PXE-Fibroblasten [204, 205]. Ähnliches gilt für die beobachtete Steigerung der Decorin-Expression und das Verhältnis von Decorin zu Biglycan. Der Anteil von Decorin in der Haut nimmt mit dem Alter zu, während der von Versican abnimmt [190]. Das Verhältnis des von dermalen Fibroblasten *in vitro* synthetisierten Biglycans zu Decorin ist bei Zellen von jungen Spendern größer als bei Zellen älterer Spender [206]. Auch die verringerte Proteoglykan-Biosynthese findet sich unter den altersabhängigen Veränderungen. Die Proteoglykane der Haut zeigen altersabhängige Veränderungen *in vivo* [207]. Es gibt eine altersabhängige Abnahme der Proteoglykan-Synthese durch Fibroblasten aus Spendern verschiedenen Alters [208]. In einer Untersuchung der von gingivalen Fibroblasten von Spendern im Alter von 12 bis 68 Jahren *in vitro* produzierten Proteoglykane wurden deutliche altersabhängige Veränderungen beobachtet, darunter eine Abnahme des Anteils an großen Proteoglykanen, ein erhöhter Anteil von Heparansulfat und eine Abnahme der gesamten Proteoglykan-Synthese [209]. Außerdem gibt es eine altersabhängige Abnahme bei der Synthese kollagenöser Proteine und bei der mRNA von Typ I- und Typ III-Kollagen, während die gesamte Proteinsynthese sich mit dem Alter nur wenig verändert [208]. Auch eine reduzierte Expression von Fibronectin wurde beobachtet [208].

Die *in vitro* gealterten PXE-Fibroblasten weisen also viele Merkmale auf, die auch seneszente Zellen zeigen. Möglicherweise ist dies die Folge eines beschleunigten Alterungsprozesses und eines vorzeitigen Eintritts in die zelluläre Seneszenz.

4.2. Untersuchung der Auswirkungen eines *ABCC6*-knockdowns auf die Genexpression dermalen PXE-Fibroblasten

Der durch siRNA vermittelte *knockdown* des *ABCC6*-Gens in normalen dermalen Fibroblasten stellt ein Modell dar, um die Auswirkungen einer *ABCC6*-Defizienz *in vitro* zu analysieren. In diesem Modell konnten bereits Auswirkungen eines induzierten *ABCC6*-Mangels auf die Expression anderer Transporter der ABC-Familie gezeigt werden [170]. Auch die erhöhte Expression von Elastin, die PXE-Fibroblasten in der Zellkultur zeigen, konnte in diesem Modell reproduziert werden, was durch die Ergebnisse dieser Arbeit noch einmal bestätigt werden konnte. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nun die Auswirkung einer durch siRNA induzierten *ABCC6*-Defizienz auf die Expression einer Reihe von Genen untersucht werden, die am Aufbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind. Dazu wurde die Genexpression primärer dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten und gesunden Kontrollpersonen zu verschiedenen Zeitpunkten (48 h, 96 h und 168 h) nach der Transfektion der Zellen mit siRNA bzw. einem Kontroll-Oligonucleotid untersucht. Zur Bestimmung der Expression der untersuchten Gene wurde die mRNA durch reverse Transkription mit anschließender *realtime* PCR quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgte wie bei den vergleichenden Expressionsmessungen an PXE-Fibroblasten und Zellen gesunder Spender relativ zu Haushaltsgenen. Wie oben erörtert ist für die relative Quantifizierung der Genexpression prinzipiell ein einzelnes Haushaltsgen ausreichend, wenn nur unterschiedlich behandelte Zellen, die von einem einzigen

Spender stammen, miteinander verglichen werden sollen. Um aber dennoch mögliche Auswirkungen der siRNA auf die Expression von Haushaltsgenen zu kompensieren, wurden zur Normalisierung der Expressionsdaten aus den siRNA-Versuchen drei Haushaltsgene verwendet.

Wie die Expression von *ABCC6* zeigt, konnte ein *knockdown* um etwa 70 % bei den Fibroblasten des Spenders M45D und von über 90 % bei den Zellen des Spenders M56D erreicht werden, der im ersten Fall für mindestens 96 und im zweiten Fall für 168 Stunden stabil blieb. Die Induktion der Elastin-Expression war demgemäß auch in den Zellen des Spenders M56D mit einer Steigerung um etwa das 20-fache deutlich stärker ausgeprägt als bei den Zellen von M45D, bei denen nur eine Steigerung um etwa das doppelte gefunden wurde. Offenbar ist also für eine effiziente Induktion der Elastin-Expression ein möglichst vollständiger *knockdown* von *ABCC6* erforderlich. Bemerkenswert ist, dass die maximale Induktion von Elastin bei den Fibroblasten von M45D schon nach 48 Stunden zu verzeichnen war, im Fall von M56D jedoch erst nach 168 Stunden. Auch bei den Fibroblasten des PXE-Patienten P52M war die *ABCC6*-mRNA nachweisbar, der *knockdown* hatte allerdings kaum einen Effekt auf diese Restexpression. Umso erstaunlicher ist die starke Induktion des Elastin-Gens um einen Faktor von 10 in den Zellen dieses Patienten nach 96 Stunden. Der Patient ist homozygoter Träger der Insertion c.3769_3770insC, die zu einer Leserasterverschiebung und einem vorzeitigen Stopp-Signal in Codon 1277 führt, wodurch es zur Bildung eines verkürzten Proteins kommt, dem der größte Teil der zweiten intrazellulären Nucleotid-bindenden Schleife fehlt. Es muss also davon ausgegangen werden, dass dieses Protein nicht funktionsfähig ist, womit auch ein *knockdown* keinen Einfluss auf die Proteinaktivität haben könnte. Es sollte allerdings erwähnt werden, dass die siRNA auch eine Auswirkung auf die XT-Aktivität im Zellkulturüberstand der Zellen dieses Patienten hatte, während ein solcher Einfluss bei den untersuchten Zellen der beiden anderen Patienten P59M und P63F nicht vorhanden war. Der PXE-Patient P59M ist heterozygoter Träger der Mutation p.R1141X, die Patientin P63F ist Träger der Mutation p.Q378X in Verbindung mit p.R1141X. Bei beiden Patienten kommt es also zu einem Abbruch der Translation von *ABCC6* an einer weiter N-terminal gelegenen Stelle des Proteins.

Die Ergebnisse der Analyse der Genexpression nach dem *ABCC6*-*knockdown* spiegeln zu einem großen Teil die unterschiedliche Effizienz des *knockdowns* in den verwendeten Fibroblasten der beiden Spender wider. So war etwa eine gesteigerte Expression von Fibronectin nur bei den Zellen des Spenders M56D sichtbar. Im Gegensatz dazu wurde eine Induktion von *CD44* nur bei den Fibroblasten des Spenders M45D beobachtet. Um auf einen Effekt des *ABCC6*-*knockdowns* schließen zu können, sollte allerdings der Effekt in den Zellen beider Spender zumindest in dieselbe Richtung gehen. So war etwa im Fall des Tenascin-C Gens die Expression bei M45D und M56D erhöht, wobei der Effekt wie zu erwarten war bei letzteren stärker ausgeprägt war. Beim Biglycan zeigte sich ebenfalls eine Erhöhung der Expression in den Zellen beider Spender.

Die Expression aller an der Biosynthese des Tetrasaccharid-*Linkers* beteiligten Gene war bei den mit siRNA transfizierten Zellen erhöht, mit Ausnahme von *B3GALT6* in den Zellen beider gesunder Spender. Die Induktion war bei den beiden Xylosyltransferasen am schwächsten ausgeprägt, während sie bei den Genen der übrigen, an der *Linker*-Synthese beteiligten Glykosyltransferasen deutlich stärker war. In den Zellen beider Spender erhöht war ebenso die Expression beider an der Initiation von GAG-Ketten beteiligter Gene. Deutlich reduziert nach dem *ABCC6-knockdown* war hingegen die Expression von *HAS2*. Ein deutlich stärkerer Effekt in den Zellen von M56D im Sinne einer Induktion zeigte sich wiederum bei den untersuchten Sulfotransferase-Genen *CHST11* und *CHST3*, während der Effekt auf *CHST12* in Zellen beider Spender gleich stark ausgeprägt war.

Die Veränderung der Expression der an der GAG-Biosynthese beteiligten Gene war in guter Übereinstimmung sowohl mit den Ergebnissen aus der Expressionsanalyse der PXE-Fibroblasten als auch mit der beobachteten erhöhten XT-Aktivität in PXE-Fibroblasten sowie nach dem *ABCC6-knockdown* in normalen dermalen Fibroblasten. Die erhöhte Expression der an der *Linker*-Synthese beteiligten Gene zeigten sowohl PXE-Fibroblasten als auch normale Fibroblasten nach dem *ABCC6-knockdown*. Gleiches gilt für die für die Initiation von GAG-Ketten verantwortlichen Gene *EXTL2* und *CSGALNACT1* und auch für die beteiligten Sulfotransferasen. Aufgrund der sehr ähnlichen Muster lässt sich vermuten, dass die durch den *knockdown* verursachte *ABCC6-Defizienz* einen direkten induzierenden Einfluss auf GAG-Biosynthese ausübt.

4.3. Analyse der Glykosaminoglykan-Zusammensetzung in Zellkulturüberstand und Zell-Layer dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten und gesunden Kontrollpersonen

4.3.1. Vergleich der Δ -Disaccharid-Zusammensetzung der GAGs in Zellkultur-überständen von PXE-Fibroblasten und normalen Kontrollzellen

Die Ergebnisse der Analyse der von Fibroblasten in das Kulturmedium abgegebenen GAGs zeigte eine deutlich, aber nicht signifikant erhöhte Gesamtmenge von Chondroitinsulfat- Δ -Disacchariden sowie eine signifikant erhöhte Menge aller Heparansulfat- Δ -Disaccharide im Überstand der Fibroblasten von PXE-Patienten. Von den Chondroitinsulfat- Δ -Disacchariden waren die Mengen an 2-*O*- und 6-*O*-monosulfatierten Δ -Disaccharid signifikant erhöht, außerdem die Menge des vom Hyaluronan abgeleiteten, unsulfatierten Δ -Disaccharids. Die gefundenen erhöhten GAG-Mengen korrespondieren mit der bei PXE-Fibroblasten beobachteten erhöhten Expression der an der Initiation von GAG-Ketten beteiligten Gene sowie mit der erhöhten Xylosyltransferase-Aktivität im Überstand von PXE-Fibroblasten.

Die in dieser Arbeit *in vitro* gewonnenen Daten befinden sich in guter Übereinstimmung mit Beobachtungen an PXE-Patienten. So ist der GAG-Gehalt in der Haut und im Urin von PXE-Patienten erhöht [74, 75]. Besonders eine Erhöhung von Dermatansulfat und Hyaluronan wurde berichtet [73, 74]. Damit übereinstimmend wurde im Rahmen dieser Arbeit eine signifikante Erhöhung des

2-*O*-sulfatierten Disaccharids beobachtet. Die 2-*O*-Sulfatierung kommt hauptsächlich bei den Iduronsäure-Resten des Dermatansulfats vor, während eine 2-*O*-Sulfatierung von Glukuronsäure im Chondroitinsulfat nur selten und auch nur zusammen mit einer 6-*O*-Sulfatierung des *N*-Acetylgalaktosamins vorkommt [96]. Maccari *et al.* berichteten eine Verringerung der Konzentration von Chondroitinsulfat und eine Erhöhung der Konzentration von Heparansulfat im Urin von PXE-Patienten und gesunden Trägern [210]. Die Autoren beschreiben einen erhöhten Gehalt von Chondroitin-4-sulfat, eine verringerte Konzentration von Chondroitin-6-sulfat und unsulfatiertem Chondroitin sowie eine erhöhte Ladungsdichte des Chondroitinsulfats aus dem Urin von Patienten und gesunden Trägern. Die Autoren gehen davon aus, dass die Veränderungen von Chondroitinsulfat im Urin die Veränderungen bei den von Fibroblasten produzierten GAGs widerspiegeln. Dieser Vermutung scheint zu widersprechen, dass sich keine nennenswerten Mengen Dermatansulfat im Urin fanden [210]. Das Chondroitinsulfat im Plasma von PXE-Patienten ist stärker sulfatiert, da es weniger unsulfatierte Disaccharide enthält. Außerdem enthält es mehr 4-sulfatierte Disaccharide [71].

Die Konzentration von Heparansulfat ist bei PXE-Patienten in Haut und Urin ebenfalls erhöht [14, 210]. Im Urin von PXE-Patienten und gesunden Trägern finden sich weniger *N*-sulfatierte und mehr 6-*O*-sulfatierte Heparansulfat-Disaccharide [210]. Heparansulfat erschien in der Haut von PXE-Patienten besonders im Bereich der Mineralisierungsfront von elastischen Fasern konzentriert zu sein [211]. Heparansulfat enthaltende Proteoglykane sind in der Haut mit Elastinfasern assoziiert, isolierte Heparansulfat-Ketten interagieren *in vitro* mit rekombinantem Tropoelastin [211]. Heparansulfat könnte eine Rolle spielen bei Elastin-Fibrillogenese und bei der Regulation der Elastin-Stabilität im Verlauf von Krankheiten [211]. Neueren Ergebnissen zufolge spielen GAGs wie Heparansulfat und Dermatansulfat offenbar eine Schlüsselrolle bei der Assemblierung von Tropoelastin [212].

In vitro sind ebenfalls Veränderungen der von PXE-Fibroblasten produzierten GAGs beschrieben. PXE-Fibroblasten produzieren eine Proteoglykan-Population mit stärker ausgeprägten anionischen Eigenschaften und erhöhter hydrodynamischer Größe [72]. Das Vorkommen und die Verteilung von Heparansulfat-Proteoglykanen im extrazellulären Raum unterscheiden sich zwischen PXE-Fibroblasten und Kontrollen [14]. Durch Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass elastische Fasern Heparansulfat, Dermatansulfat und unsulfatiertes Chondroitin enthalten [34]. Elastische Fasern von PXE-Patienten enthalten zusätzlich Chondroitin-6-sulfat.

Haut mit PXE-Läsionen enthält signifikant mehr Hyaluronan, erhöhte Hyaluronan-Konzentrationen finden sich auch im Urin von PXE-Patienten [73, 74]. Eine Erhöhung von Hyaluronan wurde auch bei der Sklerodermie beobachtet [111]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine erhöhte Hyaluronan-Konzentration im Überstand der PXE-Fibroblasten, allerdings keine korrespondierende Erhöhung der Expression der Hyaluronan-Synthasen. Möglicherweise resultiert die erhöhte Hyaluronan-Menge aus einem verminderten Abbau. Ein Hinweis darauf ist die beobachtete verringerte Expression von *CD44*. *CD44* bindet HA und führt zu dessen Internalisierung [107]. Internalisiertes HA wird in den

Lysosomen abgebaut [115]. Die verringerte *CD44*-Expression könnte bei den PXE-Fibroblasten also zu einer verminderten Aufnahme von Hyaluronan durch die Zellen führen. Für diese Deutung spricht auch, dass die Konzentration von Hyaluronan vorwiegend auf der Ebene des Katabolismus reguliert zu werden scheint [213]. Der rapide Anstieg von Hyaluronan als Antwort auf Stress zum Beispiel erfolgt nicht über vermehrte Synthese, sondern über die Ausschüttung von Hyaluronidase-Inhibitoren [213]. Die Hyaluronan-Erhöhung bei PXE könnte mitverantwortlich sein für die abweichenden Eigenschaften von PXE-Fibroblasten, da Hyaluronan maßgeblich die strukturellen Eigenschaften der ECM bestimmt [80]. Die Akkumulation von Hyaluronan führt zu einer verringerten Kontaktinhibition und verstärkter Migration [106]. Die Synthese von Hyaluronan wird von einigen Wachstumsfaktoren und Cytokinen wie EGF und Interleukin-1 β stimuliert [117]. Erhöhtes Plasma-Hyaluronan ist für eine Vielzahl von Krankheiten beschrieben [80]. Viele Tumore weisen erhöhte Hyaluronan-Gehalte auf, die Hyaluronan-Konzentrationen sind im Serum von Krebspatienten erhöht [85]. Die biologischen Wirkungen von Hyaluronan hängen von der Molekülgröße ab. Hochmolekulares Hyaluronan wirkt anti-angiogen und anti-inflammatorisch, während Hyaluronan-Fragmente geringerer Größe eher angiogen, pro-inflammatorisch und immunstimulatorisch sind [107, 113]. So stimulieren Hyaluronan-Fragmente die Proliferation von Endothelzellen und wirken dadurch angiogen [85]. Hyaluronan mittlerer Molekülgröße kann die Expression inflammatorischer Gene in Makrophagen induzieren [107]. Hyaluronan-Tetrasaccharide wirken anti-apoptotisch und unterdrücken den Zelltod, wenn Zellen ohne Serum kultiviert werden [113]. Hyaluronan-Fragmente entstehen durch Einwirkung von Hyaluronidasen oder durch oxidative Depolymerisation [107, 113, 213]. Unter inflammatorischen Bedingungen kommt es vermehrt zur Bildung von niedrigmolekularen Hyaluronan-Fragmenten [113], entzündliche Prozesse gehen mit einem gesteigerten Hyaluronan-Turnover einher [112]. Nach einer Gewebeverletzung akkumulieren ebenfalls Hyaluronan-Fragmente mit geringem Molekulargewicht [107]. Verschiedene Cytokine beeinflussen die Synthese von Hyaluronan, durch Cytokine aktivierte Fibroblasten zeigen eine erhöhte Hyaluronan-Synthese [112]. Schon eine milde inflammatorische Reaktion führt zu einem starken Anstieg der Hyaluronan-Konzentration [112].

Aufgrund des chronischen oxidativen Stresses, der bei PXE vorliegt, könnte die erhöhte Produktion von Hyaluronan und sulfatierten GAGs einen antioxidativen Mechanismus darstellen. Hyaluronan und Chondroitin-4-sulfat verfügen über antioxidative Eigenschaften [214, 215]. Chondroitin-4-sulfat reduziert die Lipidperoxidation in Folge von oxidativem Stress und stellt das Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs wieder her [216]. Auf der anderen Seite könnte der chronische oxidative Stress zu einer oxidativen Depolymerisation von Hyaluronan führen. Die entstehenden Fragmente wirken wie oben beschrieben proinflammatorisch und können auch die Expression von Matrix-Metalloproteinasen induzieren [213].

4.3.2. Auswirkungen eines *ABCC6*-knockdowns auf die Disaccharid-Zusammensetzung

Die Analyse der Disaccharid-Zusammensetzung der GAGs im Überstand der mit siRNA gegen *ABCC6* transfizierten Fibroblasten lieferte kein eindeutiges Ergebnis. Während bei den Fibroblasten der Spender M45D und M56D im Überstand leicht verringerte Mengen von Chondroitinsulfat-Disacchariden beobachtet wurden, zeigte sich im Überstand der Zellen der Spenderin F42A eine signifikant erhöhte Gesamtkonzentration von Chondroitinsulfat-Disacchariden nach 168 Stunden. Möglicherweise war die Kultivierungsdauer nicht ausreichend, um die Auswirkungen der gesteigerten GAG-Biosynthese sichtbar werden zu lassen. Im Überstand der mit siRNA transfizierten Fibroblasten von PXE-Patienten zeigte sich keine veränderte Disaccharid-Konzentration im Vergleich zu den mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen. Bemerkenswert ist die erhöhte Konzentration an Chondroitin-4-sulfat im Überstand der Zellen der gesunden Spender, die mit siRNA transfiziert wurden. Diese wurde bei den PXE-Fibroblasten nicht gefunden, bei den Zellen der Patientin P63F war die Konzentration von Chondroitin-4-sulfat sogar deutlich verringert. Die gesteigerte Produktion von Chondroitin-4-sulfat durch mit siRNA transfizierte Fibroblasten ist deswegen von Bedeutung, weil eine Erhöhung des 4-O-sulfatierten Chondroitins im Urin und Plasma von PXE-Patienten gefunden wurde [71, 210].

Im Überstand der Fibroblasten der gesunden Spender M45D und M56D wurde eine signifikant verringerte Konzentration des von Hyaluronan abgeleiteten Disaccharids gefunden, nicht jedoch im Überstand der Zellen der Spenderin F42A. Diese Beobachtungen könnten im Zusammenhang stehen mit der durch den knockdown deutlich reduzierten Expression von *HAS2* und der gesteigerten Expression von *CD44*.

Die Ergebnisse zeigten bei Zellen der untersuchten gesunden Spender F42A, M45D und M56D eine tendenziell erhöhte Menge an Heparansulfat- Δ -Disacchariden im Überstand der mit siRNA transfizierten Zellen, verglichen mit den Negativkontrollen. Der Effekt war jedoch in den meisten Fällen gering, nur der Zellkulturüberstand der Fibroblasten des Spenders M45D enthielt nach 168 Stunden eine signifikant erhöhte Disaccharid-Menge. Bei den Zellen der PXE-Patienten P52M, P59M und P63F fanden sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Veränderungen zwischen den mit siRNA und den mit dem Kontroll-Oligonucleotid transfizierten Zellen.

4.4. Analyse der Xylosyltransferase-Aktivität dermalen Fibroblasten von PXE-Patienten und Kontrollpersonen

4.4.1. Vergleich der Xylosyltransferase-Aktivität in den Zellkulturüberständen von dermalen PXE-Fibroblasten und normalen Kontrollzellen

Die Xylosyltransferase-Aktivität im Zellkulturüberstand der Fibroblasten von PXE-Patienten und gesunden Spendern wurde mittels eines radiochemischen Tests bestimmt, der auf der Übertragung radioaktiv markierter Xylose auf Seidenfibronin beruht. Die so gewonnenen Aktivitätsdaten wurden unter Verwendung des Proteingehalts der kultivierten Zellen normalisiert. Die Aktivitätsmessung zeigt eine leicht erhöhte XT-Aktivität in den Zellkulturüberständen der Fibroblasten der PXE-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Dieses Ergebnis passt zu der erhöhten GAG-Produktion durch PXE-Fibroblasten und zu der beobachteten gesteigerten Expression der an der GAG-Biosynthese beteiligten Gene. Bezüglich des geringen Effekts bei der Xylosyltransferase-Aktivität ist zu berücksichtigen, dass sich die für die Messungen verwendeten PXE-Fibroblasten zwischen der vierten und siebten Passage befanden. Es muss also davon ausgegangen werden, dass der Phänotyp der Zellen schon analog zu den bei den Genexpressionsmessungen beobachteten Veränderungen modifiziert und eine mutmaßlich ursprünglich stärker gesteigerte Xylosyltransferase-Aktivität schon zum größten Teil verschwunden war. Bei einer eventuellen Wiederholung der Experimente sollte also darauf geachtet werden, möglichst frisch isolierte Fibroblasten zu verwenden.

4.4.2. Auswirkungen eines *ABCC6-knockdowns* auf die Xylosyltransferase-Aktivität

Der *ABCC6-knockdown* zeigte einen deutlichen Einfluss auf die XT-Aktivität der transfizierten Zellen. Im Überstand der Fibroblasten aller gesunden Spender war nach dem *knockdown* eine signifikant erhöhte XT-Aktivität zu beobachten, wiederum in Übereinstimmung mit der gesteigerten Expression der an der GAG-Synthese beteiligten Gene bei mit siRNA transfizierten Zellen und der im Überstand der mit siRNA transfizierten Fibroblasten gefundenen, tendenziell erhöhten GAG-Konzentrationen. Mit Ausnahme der Zellen des Patienten P52M zeigten sich bei den transfizierten Fibroblasten der PXE-Patienten keine signifikanten Auswirkungen des *knockdowns* auf die XT-Aktivität. Die aus der Reihe fallende Reaktion der Fibroblasten des Patienten P52M auf den *ABCC6-knockdown* wurde schon bei der Messung der Elastin-Expression beobachtet und unter Punkt 4.2. diskutiert

4.5. Identifizierung von genetischen Kofaktoren für *Pseudoxanthoma elasticum*

Zur Identifizierung weiterer möglicher genetischer Kofaktoren bei PXE wurden in der vorliegenden Arbeit Polymorphismen in verschiedenen Genen untersucht, deren Genprodukte mutmaßlich an der Pathogenese von PXE beteiligt sind. PXE ist durch eine hohe Variabilität in der Ausprägung der Erkrankung, dem Auftreten der ersten Symptome sowie dem Krankheitsverlauf gekennzeichnet [4]. Selbst Angehörige derselben Familie, die die gleiche PXE-verursachende Mutation tragen, können unterschiedliche Phänotypen aufweisen. Neben Einflüssen von Umweltfaktoren existieren auch genetische Kofaktoren, die das individuelle Krankheitsbild beeinflussen. So konnte bereits nachgewiesen werden, dass Polymorphismen im Gen der Xylosyltransferase-II, im Osteopontin-Gen sowie in Genen, die an der Detoxifikation reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt sind, mit Erkrankungsalter bzw. Schweregrad von PXE assoziiert sind [46, 68, 69]. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Genotypisierungen stand eine große Sammlung von DNA-Proben von PXE-Patienten zur Verfügung. Als Kontrollkohorte dienten gesunde Blutspender, die bezüglich Alter und Geschlecht der Patientenkohorte möglichst gut entsprachen.

4.5.1. Matrix-Metalloproteinase 2

MMP2 wird von PXE-Fibroblasten in Kultur verstärkt exprimiert [42]. Erhöhte *MMP2*-Konzentrationen im Serum von PXE-Patienten konnten im Rahmen dieser Arbeit erstmals demonstriert werden [217]. Da *MMP2* offenkundig eine Rolle bei der Pathogenese von PXE spielt, lässt sich vermuten, dass Polymorphismen, die die Transkription von *MMP2* beeinflussen, auch eine Auswirkung auf die Manifestation von PXE haben könnten. Aufgrund dieser Überlegung wurde in dieser Arbeit eine umfangreiche Analyse von Polymorphismen im *MMP2*-Gen bei PXE-Patienten durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen eine Assoziation mehrerer SNPs und eines Haplotyps im Promotorbereich von *MMP2* mit PXE, während im Fall der SNPs im codierenden Bereich von *MMP2* keine Assoziationen festgestellt werden konnten. Starkes LD war im *MMP2*-Gen nur im Bereich von -1575 bis -790 relativ zum Transkriptionsstart vorhanden, während der Rest des Gens nur ein schwaches LD aufwies. Zwischen den SNPs rs243866 (c.-1575G>A) und rs243865 (c.-1306C>T) bestand nahezu komplettes LD, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer anderen Studie [148]. Der Promotor-Haplotyp GCTCG war mit 56,8 % der häufigste in der untersuchten Kohorte und signifikant mit PXE assoziiert. Der Haplotyp GCTC, der die ersten vier SNPs des bei PXE-Patienten identifizierten Haplotyps beinhaltet, ist auch mit koronarer Dreifäßerkrankung assoziiert [218]. Es ist zu vermuten, dass die Assoziation der Promotor-SNPs mit PXE auf einer veränderten Promotoraktivität beruht, die möglicherweise zu einer erhöhten Produktion von *MMP2* führt. Zu dieser Erklärung passt die Beobachtung, dass das mit PXE assoziierte Allel c.-1306C *in vitro* zu einer gesteigerten Promotoraktivität führt [143]. Der Austausch von C nach T an dieser Position führt offenbar zur Unterbrechung eines Bindungsmotivs des Transkriptionsfaktors Sp1, so dass dieser nicht mehr an das T-Allel bindet. Der SNP c.-735C>T (rs2285053) betrifft ebenfalls eine Sp1-Bindungsstelle. Eine erhöhte Promotoraktivität führt vermutlich auch dazu, dass Träger des

c.1306C-Allels, besonders in Verbindung mit dem c.-735C-Allel, ein erheblich erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Metastasen bei einer Krebserkrankung haben [144]. Der SNP c.-1575G>A liegt direkt stromaufwärts neben einer potenziellen Bindungsstelle für den Östrogen-Rezeptor [121]. Das mit PXE assoziierte Allel c.-1575G führte *in vitro* zu einer gesteigerten Transkriptionsaktivität bei der Inkubation mit Östrogen. Der SNP c.-790T>G (rs243864) ist nicht funktional, jedoch durch ein hohes LD mit den funktionalen SNPs verbunden [143]. Die Assoziation des Haplotyps GCTCG mit PXE ist offenbar auf die kombinierten Effekte der SNPs c.-1306C>T und c.-735C>T auf die Sp1-gesteuerte Transkription des *MMP2*-Gens zurückzuführen. Die Haplotypen, die statt beider C-Allele ein C- und ein T-Allel enthalten, waren hingegen mit der Kontrollgruppe assoziiert. Bemerkenswert ist auch der protektive Effekt des Haplotyps ATGCG, der das mit verminderter Reaktion auf Östrogen verbundene c.-1575A-Allel enthält.

4.5.2. Matrix-Metalloproteinase 9

Auch für MMP-9 wurden in dieser Arbeit signifikant erhöhte Serumkonzentrationen bei PXE-Patienten gefunden [217]. Daher sollte die Möglichkeit einer Assoziation des *MMP9*-Gens mit PXE untersucht werden. Die Analyse des Polymorphismus c.-1562C>T im *MMP9*-Promotor zeigte jedoch keine Assoziation mit PXE. Der Polymorphismus c.-1562C>T ist funktionell und betrifft vermutlich die Bindungsstelle eines Repressor-Proteins [142]. Die Bindung wird durch den Austausch von C gegen T aufgehoben, was zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivität des T-Allels führt. Zhang *et al.* berichteten eine Assoziation von c.-1562C>T mit koronarer Dreifäßerkrankung [142]. Eine Assoziation von c.-1562C>T mit abdominalen Aortenaneurysmen wurde berichtet, konnte allerdings von einer zweiten Studie nicht bestätigt werden [139, 219].

4.5.3. Matrix-Metalloproteinase 14

MMP-14 auf der Zelloberfläche aktiviert proMMP-2 in Anwesenheit einer geringen Menge an TIMP-2 [146]. Das System aus MMP-2, MMP-14 und TIMP-2 spielt eine wesentliche Rolle in der MMP-vermittelten Degradation der ECM [141]. Polymorphismen im *MMP14*-Gen könnten zu einer verstärkten Aktivierung von MMP-2 führen [154] und daher im Kontext von PXE relevant sein. Es wurde spekuliert, dass der SNP c.-165G>T die transkriptionelle Aktivität von *MMP14* beeinflussen könnte [154]. Eine Dysbalance zwischen Proteinase und Proteinase-Inhibitoren ist wahrscheinlich ein wichtiger Faktor in der Entstehung der chronischen obstruktiven Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD). Der *MMP14*-Haplotyp -165T, 221T, 6727C, 7096C war mit COPD in einer ägyptischen Kohorte assoziiert [154]. Dort lag er bei 12% der Allele der COPD-Patienten und bei 2% der Allele der gesunden Kontrollpersonen vor. In der in dieser Arbeit untersuchten gesunden Kontrollkohorte aus ostwestfälischen Blutspendern betrug die Häufigkeit 1,5 %, während sie bei den PXE-Patienten mit 2,3 % leicht erhöht war. Aufgrund der geringen Häufigkeit der Allele lässt sich über die Signifikanz der Ergebnisse allerdings keine Aussage treffen, ohne die Analyse in wesentlich größeren Kohorten zu wiederholen.

4.5.4. Polymorphismen im VEGF-Gen

PXE betrifft verschiedene Organsysteme und so gut wie alle Betroffenen entwickeln im Verlauf der Krankheit okulare Manifestationen [29]. Bei den schwereren Verläufen kommt es stets zur Ausbildung einer choroidalen Neovaskularisation (CNV), die Schätzungen zufolge in 72 bis 86 Prozent der Fälle auftritt [220]. Die Prognose für die Entwicklung des Sehvermögens hängt entscheidend davon ab, ob sich eine CNV einstellt. VEGF ist der wichtigste Mediator der Angiogenese und spielt eine Rolle in verschiedenen Krankheiten, bei denen es zu einer pathologischen Neovaskularisation kommt. So konnten für die feuchte Form der AMD und die PDR erhöhte VEGF-Spiegel im Serum von Patienten nachgewiesen werden [63, 221]. Parallelen zwischen diesen Erkrankungen und der mit PXE assoziierten Retinopathie führten zu der Annahme, dass VEGF auch bei PXE eine Rolle spielen könnte. Erfolge bei der Behandlung von PXE-Patienten mit dem anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab lieferten eine erste Bestätigung dieser Hypothese [29, 30]. Der Untersuchung von VEGF-Polymorphismen im Rahmen dieser Arbeit liegt die Vermutung zugrunde, dass AMD, PDR und die PXE-assoziierte Retinopathie zumindest teilweise gemeinsame Pathomechanismen aufweisen und dass VEGF eine entscheidende Rolle in allen drei Fällen spielt.

Die PDR ist eine häufige Komplikation von Diabetes, besonders bei Patienten mit einem schlecht eingestellten Blutglukosespiegel. PDR ist die Hauptursache für eine Erblindung bei erwachsenen Diabetikern und ist durch erhöhte vaskuläre Permeabilität, Gefäßverschluss und Ischämie sowie pathologische Angiogenese charakterisiert [65]. Erhöhte VEGF-Spiegel sind bei Patienten mit PDR gefunden worden [62]. Offenbar beeinflussen genetische Faktoren die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer PDR. Verschiedene Autoren berichten von einer Assoziation des *VEGFA*-Gens mit PDR, die Ergebnisse sind allerdings zum Teil widersprüchlich [62, 63, 66, 222]. Das c.405C-Allel ist offenbar ein Risikofaktor für die Entwicklung einer PDR, Haplotypen mit diesem Allel sind mit PDR assoziiert [63, 66]. Dieses Allel war auch in der PXE-Patientengruppe mit Visuseinschränkungen überdurchschnittlich oft vertreten, auch wenn die Differenz nach der Korrektur für mehrfaches Testen nicht mehr signifikant war. Andere Gruppen konnten die Assoziation von c.405C mit PDR allerdings nicht reproduzieren, möglicherweise auf Grund einer abweichenden ethnischen Zusammensetzung ihrer Patientenkohorten [62, 223]. Sughanthalakshmi *et al.* berichteten eine Assoziation des c.-460C- und des c.1032T-Allels mit PDR [222]. Dies steht in scheinbarem Widerspruch mit den Ergebnissen von den PXE-Patienten, welche auf eine Assoziation des c.-460T- und des c.1032C-Allels mit schwerer Retinopathie hindeuten. Dieser Widerspruch lässt sich jedoch teilweise durch die wichtige Rolle auflösen, die Haplotypen im Vergleich zu einzelnen genetischen Markern spielen. Diese wichtige Rolle wird von den Ergebnissen von Awata *et al.* unterstrichen, die zeigen konnten, dass ein Haplotyp mit dem c.-460T- und dem c.1032C-Allel, in Kombination mit dem c.-152G- und dem c.405C-Allel, mit PDR assoziiert ist [63]. Das c.-152G-Allel war auch in der in dieser Arbeit untersuchten Kohorte signifikant mit dem Vorhandensein einer schweren Retinopathie assoziiert, während ein Haplotyp, der das c.-460C-, das c.-152A-, das c.405G- und das c.1032T-Allel beinhaltet,

in der Gruppe mit milder okularer Beteiligung signifikant häufiger auftrat. Wie wichtig die Betrachtung von Haplotypen ist wird auch deutlich, wenn man die widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich der Assoziation des c.460C>T Polymorphismus mit PDR aus verschiedenen Studien betrachtet [63, 223]. Ebenso zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit keine Assoziation eines einzelnen genetischen Markers mit PXE, wohl aber eines 8 SNPs umfassenden Haplotyps. Die Allele c.4618T und c.5092C, die signifikant häufiger bei PXE-Patienten mit ausgeprägter Retinopathie gefunden wurden, sind einer Untersuchung von Churchill *et al.* zufolge ebenfalls mit PDR assoziiert [66].

AMD ist die häufigste Ursache für eine Erblindung in der westlichen Welt und verantwortlich für den Verlust des zentralen Sehvermögens bei etwa 28 Prozent der Menschen im Alter von über 75 Jahren [224-226]. AMD hat eine komplexe Ätiologie, die verschiedene Gene sowie weitere Risikofaktoren wie Rauchen und Bluthochdruck umfasst [175, 227]. Über erhöhte VEGF-Spiegel bei Patienten mit AMD wurde berichtet [221]. Wie im Fall der PDR wurde auch bei der AMD eine Assoziation mehrerer genetischer Einzelmarker sowie Haplotypen im *VEGFA*-Gen mit der Krankheit gefunden. Churchill *et al.* konnten den CC-Genotyp des Polymorphismus c.674C>T als potenziellen Risikofaktor für AMD identifizieren [64]. Außerdem beschrieb diese Gruppe die Assoziation bestimmter Haplotypen im Promotor und der codierenden Region des *VEGFA*-Gens mit AMD. Der von ihnen beschriebene Promotor-Haplotyp enthielt unter anderem die Allele c.-460T, c.-152G und c.-405C, die auch in der in dieser Arbeit untersuchten Patientenkohorte mit einer schwereren Retinopathie einhergingen. Außerdem enthielt einer der Haplotypen, der als mit PXE assoziiert identifiziert werden konnte, das c.-460T- sowie das c.-152G-Allel.

Die Expression von VEGF wird von einer Reihe von Effektoren reguliert, darunter Cytokine, Hormone, Lipopolysaccharide und Hypoxie [60, 61]. Es gibt ausgeprägte interindividuelle Unterschiede bei der Veränderung der VEGF-Spiegel als Reaktion auf spezifische Stimuli [57]. Die VEGF-Expression wird offenbar auch von genetischen Polymorphismen beeinflusst. Buraczynska *et al.* berichteten von erhöhten VEGF-Serumspiegeln bei PDR-Patienten, die homozygote Träger einer Deletion im *VEGFA*-Promotor waren [62]. Diese Deletion befindet sich im perfekten LD mit dem SNP c.-1540A>G, der im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde [61]. Das mit der Deletion korrespondierende Allel c.-1540C wurde signifikant häufiger bei PXE-Patienten mit erheblichen visuellen Einschränkungen gefunden. Watson *et al.* fanden eine Korrelation zwischen dem c.-634G>C Polymorphismus und der Produktion von VEGF durch LPS-stimulierte mononukleare Zellen aus dem peripheren Blut [60]. Der Genotyp GG war dabei mit der stärksten VEGF-Expression assoziiert. Hingegen berichteten Lambrechts *et al.* von einer erhöhten VEGF-Produktion in COS-Zellen beim Vorhandensein des C-Allels [228]. Diese Diskrepanz kann als Hinweis auf eine unterschiedliche Regulation der VEGF-Expression in verschiedenen Zelltypen gedeutet werden. Lambrechts *et al.* zeigten in ihrer Arbeit auch eine Assoziation zweier Haplotypen, die sowohl das c.-634G- als auch das c.-2595A-Allel enthielten, mit verringerten VEGF-Spiegeln bei Patienten mit amyotropher

Lateralsklerose (ALS). Zwei der im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei PXE-Patienten identifizierten Haplotypen, die ebenfalls diese beiden Allele enthalten, waren mit einer mildereren Augenbeteiligung assoziiert.

Die dargestellten Ergebnisse verschiedener Studien lassen eindeutig auf eine Verbindung von VEGF mit Augenerkrankungen schließen, bei denen pathologische Neovaskularisation eine wichtige Rolle spielt, wie etwa die feuchte AMD und die PDR. Die Ergebnisse, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnen werden konnten, zeigen eine Assoziation derselben Allele des *VEGFA*-Gens sowohl mit AMD und PDR als auch mit der Retinopathie, die bei PXE auftritt. Dies ist eine Bestätigung der Annahme, dass die grundlegenden Pathomechanismen aller drei Augenerkrankungen zumindest ähnlich sind. Die Grundlage der beobachteten Assoziationen ist wahrscheinlich die Auswirkung der *VEGFA*-Allele auf die Expression des Wachstumsfaktors.

Parallelen zwischen AMD und der PXE-Retinopathie lassen sich auch auf histologischer Ebene finden und weisen ebenfalls auf einen gemeinsamen Pathomechanismus hin. So gehen etwa beide mit Veränderungen der Bruch-Membran des Auges einher. Die Bruch-Membran besteht aus einer dicken elastischen Struktur, die auf beiden Seiten von einer kollagenösen Schicht sowie einer Basalmembran flankiert wird [229]. Die Bruch-Membran unterliegt im Verlauf des Alterungsprozesses substanziellen Veränderungen wie der Ansammlung von Lipiden und Cholesterin sowie der Entstehung von Ablagerungen zwischen der Bruch-Membran und dem retinalen Pigmentepithel, den sogenannten Drusen [230]. Bei PXE kommt es zu einer Mineralisierung und Fragmentierung der elastischen Fasern der Elastin-reichen Bruch-Membran. Bei den bei quasi allen PXE-Patienten beobachteten angioiden Streifen handelt es sich vermutlich um aus der Fragmentierung resultierende Risse in der Bruch-Membran. Es wird angenommen, dass diese Risse die Grundlage für die Entwicklung einer CNV bilden [231]. Auch wenn Defekte in der Bruch-Membran das Einwachsen fibrovaskulären Gewebes aus der Choroidea durch den Riss begünstigen, führen sie doch nicht automatisch in allen Fällen zu einer pathologischen Gefäßneubildung. Zur Bildung von neuen Gefäßen ist außerdem das Wirken von Wachstumsfaktoren wie VEGF erforderlich. Die Mineralisierung und Fragmentierung der Bruch-Membran, die vor allem die Makula-Region betreffen, treten nicht nur bei PXE auf. Sie werden auch bei AMD beobachtet und könnten eine Rolle bei ihrer Pathogenese spielen [231]. Darüber hinaus ist die Mineralisierung der Bruch-Membran auch ein altersabhängiger Prozess, der gewöhnlich schon ab dem 40. Lebensjahr beginnt [232]. Es wurde spekuliert, dass die Exposition gegenüber infraroter Strahlung für den Kalzifizierungsprozess verantwortlich sein könnte [231].

Während auf der einen Seite Risse in der Bruch-Membran alleine nicht ausreichend sind für die Entwicklung einer Neovaskularisation, ist auf der anderen Seite VEGF allein nicht in der Lage, das Wachstum von Gefäßen durch eine intakte Bruch-Membran zu induzieren [133]. Für eine Gefäßneubildung muss also neben der Aktivität von VEGF auch eine Schädigung der strukturellen Integrität der Bruch-Membran erfolgen. Verschiedene Befunde deuten darauf hin, dass Matrix-

Metalloproteinasen bei der Fragmentierung der Bruch-Membran eine entscheidende Rolle spielen. Anhand eines Mausmodells konnten Lambert *et al.* zeigen, dass frühe Stadien der CNV von einer erhöhten Produktion von MMP-2 und MMP-9 begleitet sind [136]. In für MMP-2 und MMP-9 defizienten Mäusen war die CNV stark vermindert. Ein großer Teil des MMP-9 stammte offenbar von inflammatorischen Zellen, da die Induktion der *MMP9*-Expression im Maus-CNV-Modell zeitlich mit dem Auftreten von Makrophagen zusammentraf [133]. Entzündliche Prozesse könnten auch eine Rolle bei der CNV im Rahmen der AMD spielen, da verschiedene inflammatorische Zellen in neovaskulären Membranen gefunden wurden [227]. MMPs können die Bioverfügbarkeit von VEGF erhöhen, da ein Abbau der ECM zu einer Freisetzung von in der Matrix gespeicherten Wachstumsfaktoren führt. VEGF stimuliert wiederum die Expression von *MMP9*, wodurch es zu einer positiven Rückkopplung kommt [137]. Kürzlich wurden erhöhte MMP-9-Konzentrationen im Plasma von Patienten mit AMD beschrieben, was zeigt, dass MMP-9 bei der Entstehung einer Neovaskularisation beim Menschen von Bedeutung ist [233]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen bei PXE-Patienten ebenfalls eine Erhöhung von MMP-9 [217].

Die beschriebenen Befunde weisen auf einen Mechanismus hin, bei dem die elastischen Fasern der Bruch-Membran durch die Aktivität von MMPs fragmentiert werden, was wiederum das Wachsen neuer Gefäße von der Choroidea durch die Bruch-Membran ermöglicht, welches durch VEGF vorangetrieben wird. Die Wirkungen von MMPs und VEGF verstärken sich dabei gegenseitig. Obwohl der primäre Auslöser für diese Vorgänge unbekannt ist, gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass oxidative Schädigungen daran beteiligt sind [224]. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind in der Lage, die Expression von VEGF zu erhöhen, vermutlich durch eine Stabilisierung der VEGF-mRNA [234]. Die Retina stellt eine ideale Umgebung für die Entstehung von ROS dar, weil sie einen außerordentlich hohen Sauerstoffverbrauch hat und starker elektromagnetischer Strahlung ausgesetzt ist. Dabei ist die Makula größerem oxidativen Stress ausgesetzt als die periphere Region [224]. Die Phagozytose von äußeren Segmenten der Photorezeptoren durch Zellen des retinalen Pigmentepithels ist ebenfalls eine Quelle von ROS. Die Menge von peroxidierten Lipiden in der Bruch-Membran nimmt mit dem Alter exponentiell zu, dabei finden sich hohe Konzentrationen von Lipiden in der Makula-Region und geringere in der Peripherie [227]. Die Belastung durch oxidativen Stress nimmt also mit dem Alter zu und erreicht schließlich ein Niveau, bei dem sie nicht mehr durch endogene anti-oxidative Mechanismen kompensiert werden kann und überschießende ROS-Produktion die CNV-Entwicklung induziert. Das retinale Pigmentepithel (RPE) ist die Hauptquelle von VEGF im Auge, trotz seines außergewöhnlich hohen Sauerstoff-Partialdrucks. Die Exposition der RPE-Zellen gegenüber oxidativem Stress könnte zu einer überhöhten VEGF-Ausschüttung durch diese Zellen führen [227]. Weiterhin ist bekannt, dass ROS die Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen beeinflussen können [131]. Außerdem werden die angesammelten oxidierten Lipide durch sogenannte *Scavenger*-Rezeptoren auf Makrophagen erkannt. Diese setzen daraufhin Matrix-Metalloproteinasen frei, wie Lambert *et al.* es in ihrem Maus-Modell haben zeigen können. Oxidativer Stress spielt

wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Ätiologie von PXE, erhöhte Konzentrationen von ROS konnten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen werden [41, 47]. Der bei PXE offenbar vorliegende, erhöhte oxidative Stress könnte den Prozess der oxidativen Schädigung im Auge beschleunigen. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese oxidative Schädigung auch in Abwesenheit einer PXE-Erkrankung in einigen Fällen zu einem späteren Zeitpunkt im Leben zu einer Visus-Beeinträchtigung geführt hätte. Man kann die PXE-Retinopathie also als eine vorzeitig auftretende und besonders aggressive Form von AMD auffassen.

4.6. Analyse von Biomarkern der ECM-Remodulierung bei PXE-Patienten

Eine massive Umstrukturierung der ECM ist eines der Charakteristika von PXE [1, 31, 34, 43, 44, 194]. Die Bestimmung der zirkulierenden MMPs und ihrer Inhibitoren (TIMPs) erlaubt eine nicht-invasive Erfassung des ECM-Turnovers [235 - 238]. Dabei konnten für Krankheiten wie die rheumatoide Arthritis, bei vaskulären Krankheiten sowie bei der Tumorentwicklung erhöhte Konzentrationen verschiedener MMPs demonstriert werden [119]. Zum ersten Mal konnten nun in dieser Arbeit statistisch signifikant erhöhte Konzentrationen von MMP-2 und MMP-9 im Serum von PXE-Patienten nachgewiesen werden.

MMP-2 und MMP-9 können die Hauptbestandteile von Basalmembranen spalten und ermöglichen so die Migration von Zellen durch ECM-Barrieren [146]. Sie spielen außerdem eine essentielle Rolle bei der Bildung neuer Blutgefäße [136]. Sowohl MMP-2 als auch MMP-9 sind von besonderem Interesse im Bezug auf PXE weil sie die Fähigkeit besitzen, Elastin abzubauen. Elastin ist der Hauptbestandteil der elastischen Fasern, deren Degradation und Kalzifizierung die hervorstechenden histopathologischen Merkmale dieser Krankheit sind. Fragmentierung und Kalzifizierung der elastischen Fasern sind dabei offenbar eng miteinander verbunden. Vyavahare *et al.* konnten zeigen, dass die Inhibition der MMP-Aktivität die Kalzifizierung von Elastin vermindert, das subdermal in Ratten implantiert worden war [197]. Unter Benutzung eines Modells einer Verletzung der Aorta bei Ratten sowie von MMP-*knockout*-Mäusen konnte dieselbe Forschungsgruppe weiterhin demonstrieren, dass die MMP-vermittelte Degradierung von Elastin seiner Kalzifizierung vorausgeht und dass MMP-2 und MMP-9 für die Elastin-Kalzifizierung unabdingbar sind [128, 239].

Es ist schon längere Zeit bekannt, dass dermale Fibroblasten von PXE-Patienten eine erhöhte proteolytische und elastolytische Aktivität aufweisen [240]. Eine Untersuchung von Quaglino *et al.* an PXE-Fibroblasten zeigte erhöhte Konzentrationen der MMP-2-mRNA und gesteigerte enzymatische Aktivität von MMP-2 im Vergleich zu Zellen von gesunden Spendern [42]. Aufgrund dieser Beobachtungen lässt sich vermuten, dass von Fibroblasten produziertes MMP-2 zumindest zum Teil für die gefundenen erhöhten MMP-2-Spiegel im Serum verantwortlich ist. Weil MMP-2 von einer großen Vielfalt von Zellen produziert wird, darunter endotheliale Zellen und Glattmuskelzellen [120, 146], ist es möglich, dass auch vaskuläre Zellen zur Erhöhung des zirkulierenden MMP-2

beiträgt. Dies ist deswegen wahrscheinlich, weil das kardiovaskuläre System von der für PXE typischen Fragmentierung der elastischen Fasern betroffen ist.

Über den Zusammenhang zwischen *ABCC6*-Defizienz und erhöhten MMP-2 Spiegeln kann zurzeit nur spekuliert werden. Viele Faktoren üben einen Einfluss auf die Expression von MMP-2, seine Aktivierung und die Regulierung seiner Aktivität aus, darunter diverse Cytokine, Hormone sowie reaktive Sauerstoffspezies und oxidierte Lipide [120, 121, 129 - 131, 146, 152, 241]. Bemerkenswert ist, dass durch Elastolyse entstehende Elastin-Fragmente, die sogenannten *elastin derived peptides* (EDPs), in Fibroblasten zu einer gesteigerten Produktion von MMP-2 führen, was wiederum zu weiterem Elastin-Abbau in einer sich selbst verstärkenden Schleife führt [242]. Der Einfluss von ROS auf die Expression von *MMP2* ist im Kontext von PXE deswegen von Interesse, weil es Anzeichen für eine Beteiligung von ROS an der Pathogenese der Krankheit gibt. So wurden Anzeichen für chronischen oxidativen Stress bei PXE sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beschrieben [41, 47]. Die Aktivität beeinflussende Polymorphismen in Genen, deren Produkte Teil der körpereigenen Abwehrmechanismen gegenüber oxidativem Stress sind, sind mit dem Alter der Erkrankung an PXE assoziiert [46]. Es könnte demnach ein Zusammenhang zwischen dem bei PXE vorliegenden, chronischen oxidativem Stress und den erhöhten MMP-2-Konzentrationen in der Zirkulation existieren. Die Ergebnisse der Analyse des zirkulierenden MMP-2 zeigte auch einen geschlechtsspezifischen Effekt, eine signifikante Erhöhung im Vergleich mit den Kontrollpersonen wurde nur bei weiblichen PXE-Patienten beobachtet, die auch im Vergleich mit den männlichen Patienten erhöhte Konzentrationen von MMP-2 in der Zirkulation aufwiesen. Diese Abweichungen könnten durch die Wirkung von Sexualhormonen auf die Produktion von MMP-2 verursacht worden sein. Östrogen erhöht die enzymatische Aktivität von MMP-2, möglicherweise durch die Induktion der Expression von MMP-14 [152]. Außerdem konnte eine Steigerung der Freisetzung von MMP-2 durch vaskuläre Glattmuskelzellen als Reaktion auf eine Östrogen-Exposition demonstriert werden [243].

Quaglino *et al.* konnten bei ihren Untersuchungen an PXE-Fibroblasten keine MMP-9-mRNA nachweisen [42]. Auch bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen wurden keine quantifizierbaren Konzentrationen der MMP-9-mRNA gefunden. Aufgrund dessen lässt sich vermuten, dass Fibroblasten keinen signifikanten Beitrag zur erhöhten Konzentration von MMP-9 in der Zirkulation leisten und dass diese Erhöhung anderen Ursprungs sein muss. Im Gegensatz zu MMP-2, welches von vielen Zelltypen konstitutiv exprimiert wird, wird MMP-9 gewöhnlich nur nach Stimulation synthetisiert [150]. So nehmen etwa durch inflammatorische Cytokine aktivierte synoviale Fibroblasten einen Matrix-abbauenden Phänotyp an, der unter anderem durch eine Produktion von MMP-9 gekennzeichnet ist [147]. Die Expression der MMP-9-mRNA wird unter anderem durch TNF- α und Interleukin-1 β induziert [129, 146]. Die Aktivierung von proMMP-9 wird offenbar auch durch Osteopontin ausgelöst [244]. Dies ist im Kontext von PXE deswegen interessant, weil erhöhte Osteopontin-Mengen in Hautbiopsien von PXE-Patienten gefunden wurden [44]. Osteopontin ist ein

Substrat diverser MMPs und ein von Osteopontin abgeleitetes Oligopeptid induziert die Produktion von proMMP-9 in vaskulären Glattmuskelzellen *in vitro* sowie *in vivo* in der Aorta von Mäusen [245, 246]. Wie schon erwähnt wurde, ist auch das bei PXE verstärkt exprimierte Fibronektin in der Lage, die Expression von *MMP9* zu induzieren [247].

Eine weitere mögliche Erklärung für die erhöhten Serumspiegel von MMP-9 bei PXE-Patienten kann möglicherweise aus einer Beobachtung bei Mäusen abgeleitet werden, bei denen nach einer Laser-induzierten choroidalen Neovaskularisation im Auge erhöhte MMP-9 Konzentrationen gemessen wurden [133]. Diese erhöhten Konzentrationen traten gleichzeitig mit dem Erscheinen von Makrophagen am Ort der Gefäßneubildung auf, was darauf hinweist, dass inflammatorische Zellen die wichtigste Quelle von MMP-9 in diesem Modell sind. Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese chronisch inflammatorischer Zustände, darunter auch der Atherosklerose [248]. Von Makrophagen abgeleitete Schaumzellen wurden als eine Hauptquelle von MMPs in atherosklerotischen Plaques identifiziert [120]. Makrophagen wurden auch in der Nähe der von der progressiven Kalzifizierung und Fragmentierung bei PXE betroffenen elastischen Fasern gefunden [31]. Ansammlungen von Makrophagen in der Umgebung kalzifizierter Bereiche gibt es auch bei anderen Krankheiten [248]. Es wurde spekuliert, dass die von Makrophagen ausgeschütteten Proteasen unabdingbar sein könnten für das Fortschreiten der Kalzifizierung elastischer Fasern [126]. Aktivierte Makrophagen könnten also zumindest teilweise für die erhöhte MMP-9-Konzentration im Serum von PXE-Patienten verantwortlich sein. Diese könnten durch die in den von PXE betroffenen Geweben vorhandenen mineralischen Präzipitate aktiviert worden sein [132]. Außerdem können durch chronischen oxidativen Stress veränderte Zellbestandteile wie etwa oxidierte Lipide über die Stimulierung der *Scavenger*-Rezeptoren Makrophagen aktivieren.

Eine Reihe der histopathologischen Charakteristika von PXE könnte auf die Wirkung von MMPs zurückgehen. Beispiele sind der Umbau von ECM-Strukturen und die Fragmentierung der Bruch-Membran des Auges. Neben Elastin ist Typ IV-Kollagen, eine Hauptkomponente von Basalmembranen und auch der subretinalen Bruch-Membran, eines der Substrate sowohl von MMP-2 als auch von MMP-9. MMPs sind höchstwahrscheinlich auch beteiligt an der Entstehung der im Verlauf von PXE oft auftretenden choroidalen Neovaskularisation. Diese wird wie oben erwähnt maßgeblich durch die Wirkung des Wachstumsfaktors VEGF vorangetrieben. MMPs können die Bioverfügbarkeit von VEGF erhöhen, indem sie diesen aus extrazellulären Depots freisetzen [150]. VEGF ist wiederum in der Lage, die Expression von MMP-9 zu induzieren, was zu einer positiven Rückkopplung führen kann [137].

4.7. Generierung und Charakterisierung einer PXE-Dermalfibroblasten-Zelllinie als PXE-Modellsystem

Im Rahmen dieser Arbeit konnten primäre Fibroblasten zweier PXE-Patienten erfolgreich mit einem die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase exprimierenden Plasmid transfiziert werden. So gelang es, immortalisierte PXE-Dermalfibroblasten-Zelllinien herzustellen, die für eine große Anzahl von Passagen kultiviert wurden. Die immortalisierten Fibroblasten weisen hohe Proliferationsraten auf und zeigten bis zum Ende dieser Arbeit keine Anzeichen einer zellulären Seneszenz. Vorherigen Beobachtungen an Telomerase-immortalisierten Fibroblasten entsprechend behielten die Zellen den Fibroblasten-Phänotyp bei und zeigten keine Anzeichen einer Entartung [166, 167]

Die Analyse der Genexpression, insbesondere die sehr geringe Elastin-Expression, zeigte allerdings, dass die immortalisierten Fibroblasten kein PXE-typisches Expressionsmuster aufweisen wie dies die primären Fibroblasten aus PXE-Patienten in frühen Passagen tun. Die ausbleibende Umkehrung der verminderten Elastin-Expression seneszenten Zellen durch eine Immortalisierung ist auch schon in früheren Studien beobachtet worden [249]. Die gegenüber frisch isolierten primären Fibroblasten verringerte Expression der ECM-Gene, die eher der Expression seneszenten Zellen entsprach, zeigt auch, dass die sich mit längerer Kulturdauer einstellenden Veränderungen des Phänotyps durch eine exogene Telomerase nicht vollständig rückgängig gemacht werden können.

4.8. Fazit und Ausblick

Bezüglich der beiden konkurrierenden Hypothesen zur PXE-Pathogenese, der metabolischen, nach der zirkulierende Faktoren für die Entstehung der PXE-Manifestationen in der Peripherie verantwortlich sind, und der lokalen, nach der ein Funktionsverlust von *ABCC6* in den betroffenen Geweben die Symptomatik verursacht, sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig. Während die nach dem *ABCC6-knockdown* beobachteten Veränderungen, die viele Aspekte des PXE-Phänotyps rekapitulieren, klar für einen lokalen Effekt sprechen, deutet der Verlust des PXE-Phänotyps mit fortgesetzter Kultivierung eher auf eine Verursachung durch nicht-lokale Faktoren, die in der Kultur nicht mehr vorhanden sind. In einem solchen Szenario wäre allerdings zu erwarten, dass sich die Genexpression während der fortgesetzten Kultivierung derjenigen von normalen Dermalfibroblasten annähert. Stattdessen zeigt die Expression verschiedener Gene bei den PXE-Fibroblasten, anders als bei den Fibroblasten gesunder Spender, nach fünf bis sieben Passagen deutliche Anzeichen einer zellulären Seneszenz. Viele Aspekte von PXE zeigen Zeichen einer beschleunigten Alterung. So nimmt etwa der mit Faltenbildung einhergehende Funktionsverlust der elastischen Fasern Merkmale der normalen biologischen Alterung vorweg. Die Degeneration der elastischen Fasern der Blutgefäße kann zu kardiovaskulären Komplikationen führen, die normalerweise erst im höheren Alter auftreten. Schließlich zeigt die mit PXE einhergehende Retinopathie große Ähnlichkeit mit der altersabhängigen Makuladegeneration, die jedoch für gewöhnlich Menschen ab dem 60. Lebensjahr betrifft. Es gibt einige Anzeichen dafür, dass sowohl der normale Alterungsprozess als auch Krankheiten, bei denen es

zu einer vorzeitigen Alterung kommt, mit oxidativen Schädigungen von Biomolekülen in Zusammenhang stehen. Chronischer oxidativer Stress kann die Telomere schädigen und zu einem vorzeitigen Eintritt in die zelluläre Seneszenz führen [250]. Anzeichen von mildem chronischem oxidativen Stress finden sich bei PXE sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Dieser Stress, der möglicherweise durch die eingeschränkte Funktion von ABCC6 bedingt ist, könnte sowohl zu den Zeichen vorzeitiger Alterung bei PXE-Patienten als auch zur vorzeitigen zellulären Seneszenz von PXE-Fibroblasten führen.

Zur weiteren Aufklärung der molekularen Mechanismen, die zur Entstehung von PXE-Symptomen führen, sollte das Genexpressionsmuster von PXE-Fibroblasten noch genauer charakterisiert und wenn möglich auch eine Analyse der Genexpression im Gewebe durchgeführt werden. So könnte geklärt werden, welche der Veränderungen der ECM von den Fibroblasten verursacht werden und welche eventuell auf andere Zelltypen zurückgehen. Durch genaue Kenntnis des Expressionsmusters könnte der bzw. die für die Veränderungen ursächlichen Faktoren wie etwa Cytokine identifiziert werden. Außerdem sollten die Veränderungen des Musters im Lauf der Kultivierung genauer definiert und die Rolle von oxidativem Stress abgeklärt werden. Die Auswirkungen des *ABCC6-knockdowns* sollten weiter untersucht werden. Insbesondere ist es notwendig, die Ursache für die Wirkung der siRNA auf PXE-Fibroblasten mit vermeintlich abwesender ABCC6-Transportaktivität zu analysieren. Der Zusammenhang von ABCC6-Defizienz und oxidativem Stress könnte ebenfalls am *knockdown*-Modell untersucht werden.

5. Methoden

5.1. Molekularbiologische Methoden

5.1.1. Isolierung genomischer DNA aus EDTA-Blut

Genomische DNA wird aus 200 μ l EDTA-Blut unter Verwendung des QIAamp Blood Kit nach den Anweisungen des Herstellers isoliert. Die DNA wird in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 eluiert und bei -20°C gelagert.

5.1.2. Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA wird aus kultivierten Zellen unter Verwendung des RNeasy Mini Kit nach Anweisungen des Herstellers isoliert. Die RNA wird in 50 μ l RNase freiem Wasser eluiert. Es werden 2 μ l RNaseOUT zugegeben und die RNA wird bei -80°C gelagert.

5.1.3. Quantifizierung von Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA Konzentration in einer Probe wird photometrisch bestimmt. Hierzu wird die Absorption der RNA-Lösung bei den Wellenlängen $\lambda = 260, 280$ und 320 nm in einer Quarzküvette gegen destilliertes Wasser gemessen. Die RNA-Konzentration wird nach Abzug der gemessenen Absorption bei $\lambda = 320$ nm aus der Absorption bei $\lambda = 260$ nm berechnet. Die Reinheit der Probe lässt sich aus dem Quotienten der um die Absorption bei $\lambda = 320$ nm korrigierten Absorptionen bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm bestimmen. Je reiner die Probe ist, desto näher liegt der Quotient bei 2.

5.1.4. Agarosegel-Elektrophorese und Größenbestimmung der DNA-Fragmente

Für die Auftrennung der DNA-Fragmente wird ein Gel mit einer Agarosekonzentration von 1,5% verwendet. Zur Herstellung des Gels wird Agarose in TBE-Puffer aufgekocht. Die Lösung wird mit Ethidiumbromidlösung versetzt und in einen Gelträger gegossen. Die Proben werden mit Probenpuffer vermischt und in die Taschen des Gels gebracht. Zusätzlich wird ein DNA-Größenstandard aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgt bei einer Spannung von 140 V (110 V) für die Dauer von 35 Minuten (30 Minuten) bei einem großen (kleinen) Gel.

5.1.5. DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) bewirkt die selektive Vervielfältigung (Amplifikation) eines beliebigen Abschnitts eines DNA-Moleküls. Man kann dazu jeden DNA-Bereich auswählen, vorausgesetzt, die Sequenzen an seinen Enden sind bekannt. Dies ist notwendig, weil zu Beginn der PCR zwei kurze, zur DNA-Matrize komplementäre Oligonucleotide mit der DNA hybridisieren müssen, an jedem Strang der Doppelhelix eines. Diese Oligonucleotide mit einer Länge von etwa 20 bis 30 Nucleotiden dienen dann als Primer für die DNA-Polymerase und begrenzen den vervielfältigten Abschnitt. Gewöhnlich benutzt man für die PCR die DNA-Polymerase I aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase). Die Taq-Polymerase ist hitzestabil und wird durch die zur

Tabelle 5-1: Typischer PCR-Reaktionsansatz zur Amplifikation von Fragmenten genomischer DNA

PCR-Ansatz	
Template (1:5)	5,0 µl
5'-Primer (25 µM)	0,5 µl
3'-Primer (25 µM)	0,5 µl
10 x Puffer B	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µl
dNTPs (je 25 mM)	0,25 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,3 µl
steriles Wasser	13,45 µl

Hitzenaturierung der DNA erforderlichen hohen Temperaturen nicht inaktiviert. Die PCR läuft folgendermaßen ab: Die DNA-Matrize wird durch Hitzenaturierung in Einzelstränge aufgetrennt und bei einer Temperatur von etwa 50°C mit den Primern hybridisiert. Nach Zugabe der Polymerase läuft die Synthese der Komplementärstränge ab, dies geschieht im Bereich des Temperaturoptimums der *Taq*-Polymerase bei ca. 72°C. Die Polymerase verlängert dabei die spezifisch mit der DNA hybridisierten Primer in 5'-3'-Richtung unter Verwendung des komplementären Stranges als Matrize. Anschließend werden die neu gebildeten Stränge durch Erhitzen auf 94°C von der Matrize getrennt. Nach erneutem Abkühlen können wiederum Primer an die Einzelstränge hybridisieren und der nächste Syntheszyklus beginnt. Der Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation wird in der Regel 25- bis 30mal wiederholt, bis das gewünschte DNA-Fragment schließlich exponentiell vervielfältigt wurde. Tabelle 5-1 zeigt einen typischen PCR-Reaktionsansatz, Tabelle 5-2 das Standard-PCR-Programm.

Tabelle 5-2: Standardprogramm für eine PCR zur Amplifikation von Fragmenten genomischer DNA

Programmschritt	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Start	15 min	95 °C	1
Denaturierung	1 min	94 °C	35
Annealing	1 min	50-70 °C	
Elongation	1 min	72 °C	
terminale Elongation	10 min	72 °C	1
Kühlen	∞	4 °C	

5.1.6. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Zur enzymatischen Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionsansätzen wird das *ExoSAP*-Verfahren verwendet. Hierzu werden 5 µl Amplifikat mit 1 µl Exonuclease (1U/µl) und 1 µl alkalischer Phosphatase versetzt. Es wird für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und der Ansatz anschließend zur Inaktivierung der Enzyme für 15 Minuten auf 80°C erhitzt und danach auf 4°C abgekühlt.

5.1.7. Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgt mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger. Bei dieser Methode verwendet man Didesoxynukleotide, um an einer zufälligen Stelle in dem von der DNA-Polymerase synthetisierten Strang einen Abbruch der Verlängerung herbeizuführen. Die verwendeten Didesoxynukleotide sind mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, wodurch bei der anschließenden Auftrennung durch Kapillarelektrophorese eine differenzierte Detektion der entstandenen Fragmente möglich ist. Die zu sequenzierenden DNA-Fragmente werden zunächst amplifiziert und danach mittels des *ExoSAP*-Verfahrens aufgereinigt. Die Amplifikation erfolgt in dem in Tabelle 5-3 angegebenen Ansatz. Die Aufreinigung der Produkte der Sequenzierungsreaktion erfolgt durch eine Gelfiltration mittels mit Sephadex-Agarose beladenen Säulen. Die Verdichtung des Säulenmaterials erfolgt durch Zentrifugation bei 3500 rpm für 2 Minuten. Nach Auftragen der Sequenzierungsprodukte auf die Gelmatrix wird bei 3500 rpm für 4 Minuten eluiert. Zum Eluat werden 10 µl HPLC-Wasser gegeben, in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 2 Minuten bei 94°C denaturiert. Die Auftrennung und Fluoreszenzdetektion erfolgt im ABI Prism 7200 *Sequence Detector*.

Tabelle 5-3: Ansatz für eine Sequenzierungsreaktion

Reaktionsansatz	20 µl
DNA (aufgereinigtes PCR-Produkt)	3,0 µl
Primer (25 µM)	1,5 µl
BigDye <i>Premix</i>	2,0 µl
BigDye 5x <i>Buffer</i>	4,0 µl
HPLC-Wasser	9,5 µl

5.1.8. Nachweis von Mutationen durch RFLP-Analyse

Beim Nachweis von Mutanten mittels der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP)-Analyse werden Restriktionsendonukleasen eingesetzt, deren Erkennungsstellen durch die Mutationen der genomischen DNA, im Vergleich zu einer als Wildtyp bestimmten DNA-Probe, entweder entstehen oder verschwinden. Der Nachweis der Mutation erfolgt durch Spaltung des PCR-Produkts, das die vermutete Stelle der Mutation beinhaltet, mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease und anschließender Auftrennung der Fragmente auf einem Agarosegel. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen sind in den Tabellen 5-4 bis 5-7 gezeigt. Die Inkubation erfolgt jeweils über Nacht bei der angegebenen Temperatur und in dem in Tabelle 5-8 angegebenen Ansatz.

Tabelle 5-4: Für die RFLP-Analyse der SNPs im *VEGFA*-Gen verwendete Restriktionsendonukleasen.

<i>SNP</i>	<i>Restriktionsenzym</i>	<i>Puffer</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Erkennungssequenz</i>
rs699947	<i>Bgl</i> III	NEBuffer 3	37°C	5'... A [▽] GATCT...3' 3'... TCTAGA [▲] ...5'
rs13207351	<i>Dde</i> I	NEBuffer 3	37°C	5'... C [▽] TNAG...3' 3'... GANTC [▲] ...5'
rs2010963	<i>Ava</i> II	NEBuffer 4	37°C	5'... G [▽] GWCC...3' 3'... CCWGG [▲] ...5'
rs1413711	<i>Bme</i> 1580I	NEBuffer 2	37°C	5'... GKGCM [▽] C...3' 3'... [▲] CMCGKG...5'
rs25648	<i>Dde</i> I	NEBuffer 3	37°C	5'... C [▽] TNAG...3' 3'... GANTC [▲] ...5'
rs735286	<i>Mly</i> I	NEBuffer 4	37°C	5'... GAGTC(N) ₅ [▽] ...3' 3'... CTCAG(N) ₅ [▲] ...5'
rs3025020	<i>Msp</i> I	NEBuffer 4	37°C	5'... C [▽] CGG...3' 3'... GGCC [▲] ...5'
rs3025021	<i>Msp</i> I	NEBuffer 4	37°C	5'... C [▽] CGG...3' 3'... GGCC [▲] ...5'

Tabelle 5-5: Für die RFLP-Analyse der SNPs im *MMP2*-Gen verwendete Restriktionsendonukleasen.

<i>SNP</i>	<i>Restriktionsenzym</i>	<i>Puffer</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Erkennungssequenz</i>
rs243866	<i>Nla</i> III	NEBuffer 4	37°C	5'... CATG [▽] ...3' 3'... [▲] GTAC...5'
rs243865	<i>Csp</i> CI	NEBuffer 4	37°C	5'... [▽] ₁₀₋₁₁ (N)CAA(N) ₅ GTGG(N) ₁₂₋₁₃ [▽] ...3' 3'... [▲] ₁₂₋₁₃ (N)GTT(N) ₅ CACC(N) ₁₀₋₁₁ [▲] ...5'
rs243864	<i>Dde</i> I	NEBuffer 3	37°C	5'... C [▽] TNAG...3' 3'... GANTC [▲] ...5'
rs2285053	<i>Ava</i> II	NEBuffer 4	37°C	5'... G [▽] GWCC...3' 3'... CCWGG [▲] ...5'
rs17859829	<i>Bsa</i> II	NEBuffer 4	60°C	5'... C [▽] CNNGG...3' 3'... GGNNC [▲] C...5'
rs865094	<i>Hae</i> III	NEBuffer 4	37°C	5'... GG [▽] CC...3' 3'... CC [▲] GG...5'
rs11646643	<i>Bse</i> YI	NEBuffer 3	37°C	5'... C [▽] CCAGC...3' 3'... GGGTC [▲] G...5'

<i>SNP</i>	<i>Restriktionsenzym</i>	<i>Puffer</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Erkennungssequenz</i>
rs1053605	<i>MspI</i>	NEBuffer 4	37°C	5'... C [▼] CGG... 3' 3'... GG [▲] C... 5'
rs2241146	<i>HphI</i>	NEBuffer 4	37°C	5'... GGTGA (N) ₈ [▼] ... 3' 3'... CCACT (N) ₇ [▲] ... 5'
rs243847	<i>SmaI</i>	NEBuffer 4	25°C	5'... CCC [▼] GGG... 3' 3'... GGG [▲] CCC... 5'
rs2287074	<i>TspRI</i>	NEBuffer 4	65°C	5'... NNCASTGNN [▼] ... 3' 3'... [▲] NNGTSACNN... 5'
rs11639960	<i>BtsI</i>	NEBuffer 1	55°C	5'... GCAGTGNN [▼] ... 3' 3'... CGTCAC [▲] NN... 5'
rs243832	<i>HindIII</i>	NEBuffer 2	37°C	5'... A [▼] AGCTT... 3' 3'... TTCGAA [▲] ... 5'
rs243831	<i>MboII</i>	NEBuffer 2	37°C	5'... GAAGA (N) ₈ [▼] ... 3' 3'... CTTCT (N) ₇ [▲] ... 5'

Tabelle 5-6: Für die RFLP-Analyse der SNPs im *MMP9*-Gen verwendete Restriktionsendonukleasen.

<i>SNP</i>	<i>Restriktionsenzym</i>	<i>Puffer</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Erkennungssequenz</i>
rs3918242	<i>NlaIII</i>	NEBuffer 4	37°C	5'... CATG [▼] ... 3' 3'... [▲] GTAC... 5'

Tabelle 5-7: Für die RFLP-Analyse der SNPs im *MMP14*-Gen verwendete Restriktionsendonukleasen.

<i>SNP</i>	<i>Restriktionsenzym</i>	<i>Puffer</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Erkennungssequenz</i>
rs1003349	<i>BsrI</i>	NEBuffer 3	65°C	5'... ACTGNN [▼] ... 3' 3'... TGAC [▲] N... 5'
rs1042703	<i>MnII</i>	NEBuffer 2	37°C	5'... CCTC (N) ₇ [▼] ... 3' 3'... GGAG (N) ₆ [▲] ... 5'
rs2236302	<i>HpyCH4III</i>	NEBuffer 1	37°C	5'... ACN [▼] GT... 3' 3'... TGN [▲] CA... 5'
rs2236307	<i>HphI</i>	NEBuffer 4	37°C	5'... GGTGA (N) ₈ [▼] ... 3' 3'... CCACT (N) ₇ [▲] ... 5'
rs3751489	<i>StyI</i>	NEBuffer 3	37°C	5'... C [▼] CWWGG... 3' 3'... GGWW [▲] C... 5'

Tabelle 5-8: Ansatz für eine Restriktionsspaltung

Reaktionsansatz	20 µl
PCR-Produkt	5,0 µl
Puffer gemäß Tabelle 4	2,0 µl
Restriktionsenzym (5 Units)	x µl
BSA (soweit erforderlich)	0,2 µl
S-Adenosylmethionin (nur <i>CspCI</i>)	0,02 µl
Steriles Wasser	ad 20 µl

5.1.9. Nachweis von Mutationen durch allelspezifische PCR (ARMS)

Das *amplification refractory mutation system* (ARMS) eignet sich für den Nachweis bekannter Mutationen [173]. Das System erfordert zwei Primer, deren Sequenz den beiden Varianten entspricht, die nachgewiesen werden sollen. Um das Vorhandensein einer der beiden möglichen Varianten nachzuweisen, werden zwei PCRs durchgeführt, jeweils mit einem der sequenzspezifischen Primer und einem Gegenprimer. Dabei wird die *Annealing*-Temperatur so gewählt, dass nur dann eine Amplifikation stattfindet, wenn die Sequenzen von Primer und Template genau übereinstimmen. Bei einigen Sequenzen lässt sich durch das Einfügen einer Mutation nahe des 3'-Endes des *Primers* eine bessere Unterscheidung zwischen den Varianten erreichen.

5.1.10. cDNA-Synthese (reverse Transkription)

Durch reverse Transkription kann RNA mit Hilfe des retroviralen Enzyms Reverse Transkriptase in die komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben werden. Als Primer werden *random*- oder *Oligo-dT-Primer* verwendet, wobei bei der Verwendung der letzteren nur polyadenylierte RNA umgeschrieben wird. Für die cDNA-Synthese wird 1 µg RNA mit 1 µl Oligo-dT-Primer (7 pmol), 1 µl dNTPs (je 25 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) gemischt und mit RNase-freiem Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wird für 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend wird zügig auf Eis abgekühlt und 4 µl 5x *First-Strand-Buffer*, 2 µl 0,1 M DTT sowie RNaseOUT hinzugefügt. Der Ansatz wird gut gemischt und bei 42°C für 2 Minuten inkubiert. Dann wird 1 µl SuperScript II RT hinzu gegeben und der Reaktionsansatz für 50 Minuten bei 42°C inkubiert. Das Enzym wird schließlich durch Erhitzen auf 70°C für 15 Minuten inaktiviert und der Reaktionsansatz auf Eis abgekühlt. Die cDNA wird bei -20°C gelagert.

5.1.11. *realtime* PCR

Reverse Transkription (RT), gefolgt von einer *realtime* PCR ist derzeit die Methode der Wahl für die Analyse der mRNA-Expression in Proben aus verschiedenen Quellen. Die *realtime* PCR ist ein hochempfindliches Verfahren und erlaubt die Quantifizierung von seltenen Transkripten und kleinen Veränderungen in der Genexpression. „*Realtime*“ bezieht sich dabei auf die Detektion des PCR-Produktes bereits während des Amplifikationsvorgangs. Die einfachste Methode zur Detektion von

neu synthetisierten PCR-Produkten bei der *realtime* PCR ist die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green, der spezifisch an die kleine Furche doppelsträngiger DNA bindet. Die *realtime* PCRs wurden mit dem *Mastercycler ep realplex* der Firma Eppendorf in dem in Tabelle 5-9 angegebenen Ansatz durchgeführt. Abbildung 5-1 zeigt ein typisches Temperatur-Zeit-Profil einer *realtime* PCR.

Tabelle 5-9: Ansatz für eine *realtime* PCR

Reaktionsansatz	20 µl
Template	5,0 µl
SYBR-Green-Mix	10 µl
5'-Primer	0,5 µl
3'-Primer	0,5 µl
Steriles Wasser	ad 20 µl

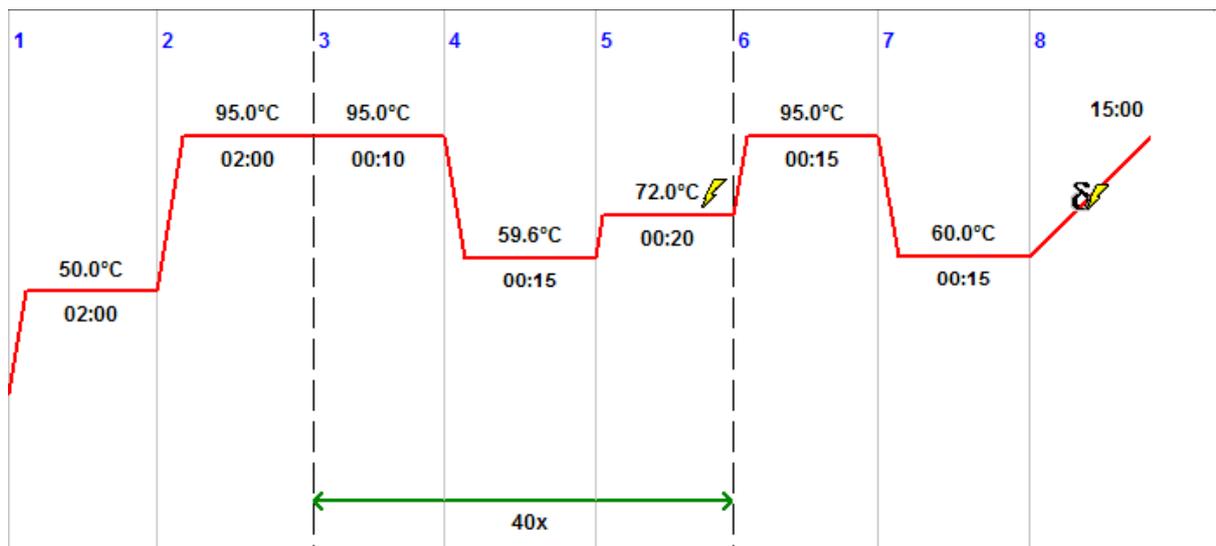


Abbildung 5-1: Typisches Temperatur-Zeit-Profil einer *realtime* PCR. Es werden 40 Amplifikationszyklen durchlaufen. Anschließend wird eine Schmelzkurve aufgenommen.

5.1.12. Datenauswertung

Aus den mit dem *Mastercycler*-System gewonnenen Rohdaten werden zunächst mit der *Mastercycler ep realplex* Software die C_T -Werte der einzelnen Proben ermittelt. Aus diesen werden dann die relativen Expressionsdaten mittels der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet [168, 251]. Zur Normalisierung der Expressionsdaten kommen sogenannte Haushaltsgene zum Einsatz. Um Schwankungen in der Expression dieser Haushaltsgene zu kompensieren, wird ein Index von mehreren Haushaltsgenen zur Normalisierung benutzt. Dieser Normalisierungsfaktor wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$NF_n = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^n HKG_i}$$

HKG_i: relative Expression des Haushaltsgens i

n: Anzahl der Haushaltsgene

5.2. Zellbiologische Methoden

5.2.1. Kultivierung von Säugerzellen

Die Kultivierung von Säugerzellen erfolgt in sterilen Zellkulturschalen bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ und 99 % Luftfeuchtigkeit. Die Zellen werden in DMEM-Medium kultiviert. Den Zellkulturmedien werden 1 % L-Glutamin, 1 % Antibiotikum / Antimykotikum und 10 % fötales Kälberserum (FCS) hinzugefügt.

5.2.2. Passagieren von adhärent wachsenden Zellen

Die vollständig konfluenten, adhärent wachsenden Zellen werden zur Vermeidung der Kontaktinhibition und zur weiteren Vermehrung passagiert. Hierzu werden die Zellen mit 5 ml DPBS gewaschen und anschließend zur Ablösung von der Oberfläche mit 5 ml Trypsin/EDTA für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml Komplettmedium zur Inhibierung der Protease-Aktivität werden die Zellen in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 5 ml Medium aufgenommen. Von der Zellsuspension wird 1 ml in eine neue Zellkulturschale mit 10 ml Medium überführt.

5.2.3. Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Kompetente Zellen werden auf Eis aufgetaut und Aliquote von 45 µl in vorgekühlte, autoklavierte Eppendorfgefäße gegeben. Nach Zugabe von 2 µl β-Mercaptoethanol-Mix werden die Zellen 10 Minuten auf Eis inkubiert und alle zwei Minuten geschüttelt. 2 µl *Dpn* I-verdaute DNA werden hinzugegeben und 30 Minuten auf Eis, dann für 30 Sekunden bei 42°C und dann wieder für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml vorgewärmten SOC-Medium wird der Ansatz eine Stunde lang bei 37°C geschüttelt und anschließend ausplattiert.

5.2.4. Transfektion primärer humaner Dermalfibroblasten mittels Elektroporation

Die Transfektion primärer dermaler Dermalfibroblasten erfolgt mittels Elektroporation unter Verwendung des *Nucleofectors* der Firma Amaxa. Dazu wurden Fibroblasten mit Trypsin abgelöst, zentrifugiert und das Pellet in einem speziellen Elektroporationspuffer, der zuvor mit dem zu transfizierenden Plasmid vermischt wurde, resuspendiert. Anschließend wurden die Fibroblasten in eine Elektroporationsküvette überführt und unter Verwendung eines speziell für dermale Fibroblasten optimierten Programms elektroporiert. Nach Abschluss des Vorgangs werden die Zellen aus der Küvette in eine Zellkulturschale überführt.

5.2.5. Selektion stabiler Klone

Die Zellen, die das transfizierte Plasmid aufgenommen haben, werden durch die Zugabe von Geneticin zum Zellkulturmedium selektioniert. Anschließend wird in 24-well Platten durch sukzessive Verdünnung einer Zellsuspension eine Verdünnungsreihe erstellt, bei der sich die Zellzahl von well zu well halbiert. Die Zellen aus dem well mit der geringsten eingebrachten Zellzahl, in dem noch ein Proliferation stattgefunden hat, werden anschließend weiter expandiert und der gesamte Vorgang mehrmals wiederholt.

5.2.6. Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Die Bestimmung der Zellzahl wird mit einer Zählkammer nach Neubauer durchgeführt. Das Raster der Zählkammer ist in neun Quadrate unterteilt, wobei sich an den vier Ecken und im Zentrum Flächen zum Auszählen befinden. Die vier Eckquadrate haben jeweils eine Fläche von 0,1 mm² und sind wiederum in 16 kleinere Quadrate unterteilt. Vor dem Zählen werden die Zellen, wie unter Abschnitt 5.2.2 beschrieben, von den Zellkulturgefäßböden abgelöst, zentrifugiert und nochmals mit DPBS gewaschen. Die Zellen werden in frisches Medium aufgenommen und resuspendiert. Ein Volumenanteil dieser Zellsuspension wird mit einem Volumenanteil einer 0,4 %igen (v/v) Trypanblau-Lösung gemischt und in die Zählkammer pipettiert. Das Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen abgestorbener Zellen in das Cytosol und färbt diese Zellen tiefblau. Vitale Zellen erscheinen unter dem Lichtmikroskop leuchtend hell. Nur nichtgefärbte Zellen innerhalb der vier Eckquadrate werden ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgt nach folgender Gleichung unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung.

$$c = \frac{n \cdot F}{N \cdot V}$$

c: Zellkonzentration [Zellen/ml]

n: Anzahl der gezählten Zellen

N: Anzahl der gezählten Eckquadrate

V: Volumen über einem Eckquadrat
[10⁻⁴ ml]

F: Verdünnungsfaktor

5.2.7. Cryokonservierung und Revitalisierung von primären humanen Dermal-fibroblasten

Zur Cryokonservierung werden fast konfluente Zellen verwendet. Diese werden durch Inkubation mit Trypsin für 10 min bei 37°C von der Zellkulturschale abgelöst, das Trypsin durch Zugabe von Medium inhibiert, bei 300x g für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert. In jedes Cryoröhrchen werden 500 µl Einfriermedium (DMEM mit 20% (v/v) FCS und 10% (v/v) DMSO) vorgelegt und diese in vorgekühlte Aluminiumblöcken gestellt. Es folgt die Zugabe von 500 µl Zellsuspension, ein vorsichtiges Durchmischen und das schnelle Einfrieren. Um den

Einfriervorgang schonender zu gestalten, werden die Cryokulturen in den Aluminiumblöcken zuerst für 24-72 h bei -80 °C in einer Styroporbox gelagert und anschließend in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt. Die Revitalisierung einer Cryokultur erfolgt durch schnelles Auftauen mit 37 °C warmem Medium. Am nächsten Tag sollte das Medium gewechselt werden, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen.

5.2.8. Transfektion primärer humaner Fibroblasten mit siRNA

Zur Vorbereitung der Zellen auf die reverse Transfektion wird das alte Medium entfernt, zweimal mit DPBS gewaschen und die Zellen mit 5 ml einer 1 %igen Trypsin-Lösung für 10 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inhibierung des Trypsin werden 5 ml Medium zugegeben, die Zellsuspension vollständig in ein Falcon-Röhrchen überführt, bei 300x g für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 5 ml Medium ohne Antibiotikum/Antimykotikum resuspendiert. Für diese Zellsuspension wird, wie unter 5.2.6 beschrieben, die Zellanzahl bestimmt. Pro Ansatz werden 40 nmol der benötigten siRNA in 500 µl DMEM verdünnt. Es folgt die Verdünnung von 30 µl Lipofectamin 2000 in 500 µl DMEM und eine Inkubationszeit von 5 min. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die beiden Lösungen vollständig gemischt und im Dunkeln für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit werden 1×10^6 Zellen in 6,5 ml Medium ohne Antibiotikum/Antimykotikum ausgesät. Nach beendeter Inkubationszeit wird das Transfektionsgemisch unter ständiger Bewegung der Zellkulturschale zugegeben. Ein Mediumwechsel zu Antibiotika- und Antimykotika-haltigem Medium mit vorherigem Waschen der Zellen sollte nach 12-24 h erfolgen. Eine Kontrolle hinsichtlich der Effizienz ist durch eine Fluoreszenzmarkierung der verwendeten siRNA unter einem Fluoreszenzmikroskop möglich.

5.2.9. Ernte der revers transfizierten Zellen

Der Zellkulturüberstand wird in ein Falcon-Röhrchen überführt und zur späteren Analyse bei -20°C eingefroren. Die Zellkulturschale wird zweimal mit 5 ml DPBS gewaschen, anschließend werden 5 ml Trypsin zugegeben, für 10 min bei 37 °C inkubiert, die Ablösung der Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert und die Zellsuspension vollständig in ein Falcon-Röhrchen überführt. Es folgt eine Zentrifugation mit 300x g für 5 min. Das Pellet wird in 1 ml Medium resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nun wird bei 1000x g für 4 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 1 ml DPBS gewaschen, nochmals mit 1000x g für 4 min zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Das Pellet wird in 350 µl RNA Lysis-Puffer mit 1% (v/v) β -Mercaptoethanol aufgenommen, kurz gevortext und bis zur RNA-Isolierung bei -80 °C gelagert.

5.2.10. β -Galaktosidase-Färbung

Die β -Galaktosidase-Färbung wurde durchgeführt wie in der Literatur angegeben [176]. Die Zellen werden mit DPBS gewaschen, mit 3%iger Formaldehydlösung für 5 Minuten fixiert, gewaschen und bei 37°C mit frisch angesetzter Färbelösung für seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase inkubiert. Die Färbung wird sichtbar nach 2 bis 4 Stunden und erreicht ein Maximum nach 12 bis 16 Stunden.

5.3. Klinisch-chemische Methoden

5.3.1. Radiochemischer XT-Aktivitätstest

Das Prinzip der Quantifizierung der Xylosyltransferase-Aktivität beruht auf der Bestimmung eingebauter radioaktiver Xylose in das Substrat der Xylosyltransferase. Als Substrat dient das Seidenfibroin des Seidenspinners *Bombyx mori* [252].

5.3.1.1. Präparation des Seidenfibroins

Die Aminosäuresequenz des Seidenfibroins beinhaltet repetitive Bereiche (Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ala)_n [253], welche eine Konsensus-Sequenz für die Xylosylierung darstellen. Vor der Verwendung des Seidenfibroins als Akzeptor für Xylosylierungen bedarf es zunächst einer Vorbehandlung mit Lithiumthiocyanat. Hierfür wird das Seidenpräparat entsprechend einer beschriebenen Methode [103] in Lithiumthiocyanat solvatisiert, anschließend erfolgt die Abtrennung der Salze über Dialyse. Das so erhaltene 1 %ige Seidenfibroin-Dialysat wird mit 0,1 M Tris/HCl, pH 7,0 äquilibriert und kann im Anschluss bei -80 °C ca. 12 Monate stabil gelagert werden.

5.3.1.2. Radiochemischer Aktivitätstest

Der radiochemische XT-Aktivitätstest wird in dem in Tabelle 5-10 angegebenen Ansatz durchgeführt. Die Testansätze werden für 60 - 90 min bei 37 °C inkubiert. Nachfolgend werden die Ansätze (je 90 µl) auf eine Nitrocellulose-Membran pipettiert und 2 h bei Raumtemperatur getrocknet. Die Membranen werden in Szintillationsgefäße überführt und nach dem in Tabelle 5-11 aufgeführten Schema gewaschen. Im Anschluss werden zu jeder Nitrocellulose-Membran 3,5 ml Szintillationsflüssigkeit pipettiert und 12 h inkubiert, bevor die Radioaktivität im Szintillationsdetektor bestimmt wird.

Tabelle 5-10: Ansatz für den radiochemischen XT-Aktivitätstest.

Reaktionsansatz	100 µl
MES-Puffer	5,0 µl
Mg / Mn-Lösung	5,0 µl
UDP-[¹⁴ C]-Xylose	10 µl
Seide	20 µl
Probe	50 µl

Tabelle 5-11: Standardprotokoll zur Präzipitation von Protein mit TCA und Abwaschen ungebundener UDP-[¹⁴C]-Xylose

Inkubationszeit	Volumen pro Szintillationsgefäß	Trichloressigsäure (TCA)
10 min	3 ml	10%ige
15 min	3 ml	1%ige
10 min	4 ml	1%ige
15 min	3 ml	1%ige

5.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Probe wird das Bicinchoninsäure (BCA) *Protein Assay Kit* der Firma Sigma eingesetzt. Zuerst wird eine Reaktionslösung aus einem Teil Kupfer-II-Sulfat-Lösung und 50 Teilen BCA-Lösung hergestellt. Es folgt die Vorbereitung einer Standardreihe mit den Konzentrationen 1000 µg/ml, 800 µg/ml, 600 µg/ml, 400 µg/ml, 200 µg/ml aus einer 1000 µg/ml BSA (Rinderserumalbumin)- Stammlösung und einer Nullprobe. Nun werden je zu analysierender Probe 25 µl in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert und anschließend zu jeder Probe 200 µl Reaktionslösung gegeben. Es folgt eine Inkubation von 30 min bei 37 °C mit anschließender Bestimmung der Absorption bei 550 nm am Plattenreader Tecan GENios.

5.3.3. Bestimmung der Konzentration der Matrix-Metalloproteinase 2 im Serum

Zur Konzentrationsbestimmung von MMP2 im Serum wird das *Quantikine Human MMP2 (total)* Kit von R&D Systems verwendet. Dabei handelt es sich um einen *sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (sandwich-ELISA)*, welcher sowohl proMMP2 als auch die aktive Form detektiert. Da Serumproben analysiert werden, müssen diese zuerst 10-fach mit Calibrator Diluent RD5-32 verdünnt werden. Je Well werden 100 µl Assay Diluent RD1-74 vorgelegt, anschließend je Probe oder Standard 50 µl zugegeben, mit einer Folie verschlossen und 2 h auf einem Schüttler bei 500 rpm inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird mit Hilfe eines *Autowashers* die Flüssigkeit in jedem Well entfernt, 400 µl Wash-Buffer zugegeben, dieser Vorgang 4x wiederholt und abschließend die Flüssigkeit vollständig entfernt. Es folgt die Zugabe von 200 µl MMP2-Conjugate Lösung, das Verschließen der Platte mit einer Folie und die Inkubation für 2 h auf einem Schüttler mit 500 rpm. Der obige Waschzyklus wird wiederholt, 200 µl Substrat-Lösung in jedes Well pipettiert und bei Raumtemperatur im Dunkeln für 30 min inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion werden 50 µl *Stop-Solution* in jedes Well pipettiert und die Absorption der Proben auf der Platte innerhalb von 30 min bei 450 nm und 550 nm (Korrektur) am Plattenreader Tecan GENios gemessen.

5.3.4. Bestimmung der Konzentration der Matrix-Metalloproteinase 9 im Serum

Für die Bestimmung der Konzentration von MMP9 im Serum wurde das *Quantikine Human MMP9 (total)* Kit der Firma R&D Systems eingesetzt. Auch mit diesem Kit lassen sich die aktive- und die Vorläuferform des MMP9 detektieren. Das Prinzip gleicht dem des für die Bestimmung der Matrix-Metalloproteinase 2 verwendeten Kits. Die Durchführung einer Analyse entspricht dem Vorgehen bei der Messung der MMP2-Konzentrationen mit wenigen Änderungen. Die Proben werden für die Konzentrationsbestimmung von MMP9 100-fach verdünnt. Außerdem werden 100 µl an Probe/Standard eingesetzt und die Inkubationszeit für die MMP9-Conjugate Lösung beträgt abweichend nur 1 h.

5.4. Glykosaminoglykan-Analytik

5.4.1. Isolierung von Glykosaminoglykanen aus Zellkulturüberständen

Bei Zellkulturüberständen erfolgt zunächst die Fällung der Proteoglykane und Glykosaminoglykane mit 4 Volumina 99% vergälltem Ethanol bei 20 °C über Nacht. Nach Zentrifugation bei 15.000 x g für 15 Minuten wird der Überstand verworfen und der feste Rückstand im Vakuumkonzentrator getrocknet. Die trockene Probe wird mit einer ausreichenden Menge einer Lösung von 1 M Natriumborhydrid in 0,5 M Natronlauge versetzt und für 72 bei 37 °C inkubiert. Dabei löst sich das Pellet auf und die Glykosaminoglykan-Ketten werden von den Proteoglykanen abgespalten. Im nächsten Schritt wird die Natriumborhydridlösung im Ansatz durch Zugabe von 6 M Salzsäure unter Eiskühlung neutralisiert. Danach wird durch Zugabe einer konzentrierten Trichloressigsäurelösung (TCA) eine TCA-Konzentration von 10% eingestellt. Zur Fällung der Proteine wird die Probe 1 auf Eis belassen. Danach werden die Proteine für 15 min bei 4 °C mit 20.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird vollständig in ein anderes Gefäß überführt und mit 4 Volumina einer Lösung von 5% Kaliumacetat in abs. Ethanol versetzt. Die Proben werden über Nacht bei 20 °C inkubiert, wobei die Glykosaminoglykane und Salze ausfallen. Nach Zentrifugation für 15 min bei 4 °C mit 15.000 x g wird der Überstand verworfen und der Rückstand im Vakuumkonzentrator vollständig getrocknet. Zum Entsalzen wird die Probe in 40 ml HPLC-Wasser gelöst und 400 µl der Lösung in eine Vivascience 500 PES 3 kDa Ultrafiltrationseinheit pipettiert. Anschließend wird die Probe viermal für je 25 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Nach jedem Zentrifugationsschritt wird der Durchfluss verworfen und das Retentat mit 400 µl HPLC-Wasser aufgefüllt. Das letzte Retentat wird in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß überführt und getrocknet.

5.4.2. Isolierung von Glykosaminoglykanen aus kultivierten humanen Dermal-fibroblasten

Zur Isolierung der Glykosaminoglykane aus dem Zelllayer wird nach Entfernen des Kulturmediums zunächst zweimal mit DPBS gewaschen. Anschließend werden 5 ml einer Lösung von 2 % Triton-X in 4 M Guadiniumhydrochlorid zugegeben und der Zelllayer durch Inkubation auf einem Schüttler für 2h bei 37 °C inkubiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie für die Zellkulturüberstände beschrieben.

5.4.3. Aufspaltung von Glykosaminoglykanen in Δ -Disaccharide

Zum Verdau von Chondroitinsulfat, Dermatansulfat und Hyaluronsäure werden die isolierten Glykosaminoglykane in 45 µl Ammoniumacetatpuffer (pH 8, 50 mM) gelöst und nach Zugabe von 5 µl einer Lösung von Chondroitinase ABC (1 U/ml in 0,01% BSA) bei 37 °C über Nacht verdaut. Zum Verdau von Heparansulfat und Heparin werden die Glykosaminoglykane in 35 µl Ammoniumacetatpuffer gelöst (20 mM Ammoniumacetat, 4 mM Calciumacetat, pH 7,1) und mit je 5 µl der Lösungen der Heparinasen 1, 2 und 3 (jeweils 0,1 U/ml in 0,01% BSA) versetzt. Der Verdau

erfolgt über Nacht bei 37 °C. Die verdauten Proben werden im Vakuumkonzentrator getrocknet und bis zur Derivatisierung bei Raumtemperatur gelagert.

5.4.4. Derivatisierung von Δ -Disacchariden mit 2-Aminoacridon

2,1 mg 2-Aminoacridon (AMAC) werden in 100 μ l einer Mischung aus 15 μ l Essigsäure und 85 μ l Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. 5 μ l dieser Lösung werden zu der verdauten Glykosaminoglykan-Probe gegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 6,284 mg Natriumcyanoborhydrid werden in 100 μ l Wasser gelöst (1 M Lösung) und je 5 μ l zu jedem Reaktionsansatz gegeben. Die Derivatisierung erfolgt über Nacht bei 37 °C im Dunkeln. Nach der Derivatisierung wird die Probe mit einem Gemisch aus 50% DMSO und 50% HPLC-Wasser auf ein Volumen von 200 μ l eingestellt und möglichst zeitnah der Messung zugeführt.

5.4.5. HPLC-Analytik

Die Analyten werden mit einer Gradientenelution aufgetrennt [171]. Dabei wird ein Gradient aus einem Ammoniumacetatpuffer (60 mM, pH 5,6) und Acetonitril gefahren. Die Trennung erfolgt mit der HPLC-Säule Waters X-Bridge Shield (3,5 μ m, 100 mm x 4,6 mm) bei einer Flussrate von 1,66 ml/min. Zunächst wird die Säule mit einem Gemisch aus 98% Puffer und 2% Acetonitril für 8 Minuten äquilibriert. Danach erfolgt die Injektion eines bestimmten Volumens Probe mit einem Direktinjektions-Autosampler. Zur Auftrennung der derivatisierten Δ -Disaccharide kommt der in Tabelle 5-12 beschriebene Gradient zum Einsatz. Die Trennung der aus Heparansulfat bzw. Heparin stammenden Disaccharide wird mittels eines zeitlich verkürzten Trenngradientenschritts von 17 Minuten anstatt 23 Minuten durchgeführt. Die Detektion der derivatisierten Δ -Disaccharide erfolgt mittels Fluoreszenzdetektion mit einer Anregungswellenlänge von 442 nm und einer Detektion bei einer Emissionswellenlänge von 520 nm. Die Peaks werden anhand ihrer Retentionszeit den jeweiligen Δ -Disacchariden zugeordnet und durch Integration der Peakfläche mit der Shimadzu LC *solution postrun analysis* Software quantifiziert.

Tabelle 5-12: HPLC-Programm zur Trennung der Disaccharide von Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat und Dermatansulfat mittels linearer Gradienten.

Dauer des Schritts [min]	Ammoniumacetatpuffer [%]	Acetonitril [%]
1	98	2
2	98 \rightarrow 96	2 \rightarrow 4
23 (Trenngradient)	96 \rightarrow 85	4 \rightarrow 15
5 (Spülung)	40	60

6. Patienten und Material

6.1. Patienten- und Kontrollkohorten

6.1.1. Kohorten für die molekularbiologischen Untersuchungen

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen standen EDTA-Blutproben von 163 PXE-Patienten zur Verfügung. Die Charakteristika der PXE-Patienten und der Kontrollpersonen sind in Tabelle 6-1 angegeben. Das Durchschnittsalter der PXE-Patienten und die Standardabweichung betragen 49 Jahre \pm 15 Jahre. Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung und die Standardabweichung betragen 31 Jahre \pm 16 Jahre. Unter den PXE-Patienten befanden sich 29 % Männer und 71 % Frauen.

Tabelle 6-1: Charakteristika der PXE-Patienten und Kontrollpersonen. Die Werte stellen Mittelwerte \pm Standardabweichungen dar oder geben die Probanden-Anzahl (Prozent) an.

<i>Charakteristikum</i>	<i>PXE-Patienten</i> <i>n = 163</i>	<i>Kontrollpersonen</i> <i>n = 163</i>
Männer	48 (29,4 %)	48 (29,4 %)
Frauen	115 (70,6 %)	115 (70,6 %)
Alter (Jahre)	48,5 \pm 15,3	47,6 \pm 14,4
Diagnosealter (Jahre)	30,9 \pm 16,0	/

Die Entnahme von Hautbiopsien, die Blutabnahme, die Erstellung der PXE-Diagnose, weitere Untersuchungen und die Befragung der Probanden hinsichtlich ihrer Anamnese erfolgten durch die PXE-Ambulanz der Dermatologischen Klinik am Krankenhaus Bethesda in Freudenberg.

Als gesunde Kontrollpersonen dienten anonymisierte Blutspender im Alter von 18 bis 65 Jahren aus Ostwestfalen-Lippe. Die Kontrollpersonen wurden den PXE-Patienten so zugeordnet, dass Alter und Geschlecht möglichst gut übereinstimmten, wobei die maximale Abweichung \pm 3 Jahre betrug. Das Durchschnittsalter der Blutspender und die Standardabweichung betragen 48 Jahre \pm 14 Jahre. Unter den Blutspendern befanden sich 29 % Männer und 71 % Frauen. Die Bereitstellung der Blutproben erfolgte durch den Blutspendedienst OWL des Herz- und Diabeteszentrums NRW in Bad Oeynhausen.

6.1.2. Kohorten für die Serum-Untersuchungen

Die Serumproben der PXE-Patientenkohorte wurden von der PXE-Ambulanz der Dermatologischen Klinik am Krankenhaus Bethesda in Freudenberg zur Verfügung gestellt. Für die Untersuchungen wurden 72 an PXE erkrankte Personen ausgewählt. Auch die Serumproben der Angehörigen wurden von der PXE-Ambulanz der Dermatologischen Klinik am Krankenhaus Bethesda in Freudenberg zur Verfügung gestellt. Auf Grund einer geringeren Anzahl zur Verfügung stehender Proben konnten für die Untersuchungen nur 54 Proben verwendet werden. Als Kontrollkohorte dienten Serumproben von gesunden, anonymisierten Blutspendern aus der Region Ostwestfalen-Lippe. Alle Serumproben wurden vom Blutspendedienst OWL des Herz- und Diabeteszentrums NRW in Bad Oeynhausen zur Verfügung gestellt. Bei der Zusammenstellung aller Kohorten wurden das Geschlecht und das Personenalter berücksichtigt, mit einer maximalen Abweichung von ± 3 Jahren. In den PXE-Patienten- und Kontrollkohorten sind die jeweiligen exakt übereinstimmenden Proben, in Bezug zu den Angehörigen-Proben, enthalten. Die Charakteristika der PXE-Patienten, Angehörigen und Kontrollpersonen sind in Tabelle 6-2 angegeben.

Tabelle 6-2: Charakteristika der drei untersuchten Kohorten (PXE-Patienten, Kontrollen und Angehörige). Angegeben sind die Anzahl an Personen, der prozentuale Anteil und der Mittelwert des Alters mit Standardabweichung.

<i>Charakteristikum</i>	<i>PXE-Patienten</i> <i>n = 72</i>	<i>Kontrollpersonen</i> <i>n = 72</i>	<i>Angehörige</i> <i>n = 54</i>
Männer	33 (45,8 %)	33 (45,8 %)	27 (50 %)
Frauen	39 (54,2 %)	39 (54,2 %)	27 (50 %)
Alter (Jahre)	45,2 \pm 13,9	45,5 \pm 13,6	43,1 \pm 18,5
Diagnosealter (Jahre)	30,8 \pm 16,3	/	/

6.2. Chemikalien und Reagenzien

Acetonitril, HPLC-Gradient Grade	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
2-Aminoacridon (AMAC)	Fluka, Schnelldorf
Ammoniumacetat	Fluka, Schnelldorf
Borsäure	Roth, Karlsruhe
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-Galaktosid (X-Gal)	Sigma, Taufkirchen
Calciumacetat	Fluka, Schnelldorf
Chondroitinsulfat A, B und C	Sigma, Taufkirchen
Citronensäure	Roth, Karlsruhe
Desoxynucleosid-Triphosphate (dNTPs)	Promega, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Schnelldorf
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Formaldehydlösung	Merck, Darmstadt
Glykosaminoglykan Δ -Disaccharide	MoBiTec, Göttingen
Heparansulfat	Sigma, Taufkirchen
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma, Taufkirchen
Kaliumacetat	Sigma, Taufkirchen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhexacyanidoferrat(II)	Sigma, Taufkirchen

Kaliumhexacyanidoferrat(III)	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Serva, Heidelberg
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
MetaPhor-Agarose	BioWhittaker, Vallengbaek Strand, DK
Methanol, HPLC-Gradient Grade	Roth, Karlsruhe
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma, Taufkirchen
Natriumazid	Fluka, Schnelldorf
Natriumborhydrid	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcyanoborhydrid	Fluka, Schnelldorf
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Oligo dT-Primer	Invitrogen, San Diego, U.S.A.
Oligonucleotide (Primer)	Biomers.net, Ulm
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Sephadex G50	USB Amersham, Ohio, U.S.A.
Szintillationsflüssigkeit	Beckmann Coulter, U.S.A.
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen
UDP-[¹⁴ C]-Xylose	NEN / Perkin Elmer, Boston, U.S.A.
Wasser, HPLC-Grade	Fisher Scientific
Wasser zu Injektionszwecken	Braun, Melsungen
Wasser (Aqua B. Braun)	Braun, Melsungen

6.3. Puffer und Lösungen

Ampicilin-Stammlösung	50 mg/ml in 70%igem Ethanol Endkonzentration Medium: 50 µg/ml
Chondroitinase-Puffer	50 mM Ammoniumacetat, pH = 8
Färbelösung für seneszenz-assoziierte β-Galaktosidase (SA-β-Gal)	40 mM Citronensäure, 40 mM Na ₃ PO ₄ , pH 6,0 150 mM NaCl, 2 mM MgCl ₂ , 5 mM K ₄ [Fe(CN) ₆], 5 mM K ₃ [Fe(CN) ₆], 1 mg/ml X-Gal
<i>5x First Strand Buffer</i>	Invitrogen, Groningen, Niederlande
GAG-Isolierungspuffer	4 M Guanidiniumhydrochlorid, 50 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, Triton X-100 2 % (v/v), pH = 6,5
Gelauftragungspuffer	0,05 % Xylencyanol, 0,05% Bromphenolblau, 60% Saccharose in H ₂ O
Heparinase-Puffer	20 mM Ammoniumacetat, 4 mM Calciumacetat, pH = 7,1
HPLC-Puffer	60 mM Ammoniumacetat, Natriumazid 0,05 % (w/v), pH = 5,6
K1-Peptid	Biotin-NH-QEEEGSGGGQKK-(5-Fluorescein)- CONH ₂ , 60 µg/µl in H ₂ O
Magnesiumchloridlösung 25mM	Qiagen, Hilden
MES + KF	500 mM MES, 100 mM KF, pH = 6,5
Mg / Mn / KCl	100 mM MgCl ₂ , 100 mM MnCl ₂ , 250 mM KCl
10x PCR-Puffer	Qiagen, Hilden
PBS	137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM Na ₂ HPO ₄ , 1,4mM KH ₂ PO ₄
Q-Solution	Qiagen, Hilden
10x TBE-Puffer	108 g TRIS-Base, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA, H ₂ O ad 1000 ml, pH = 8,0
UDP-[¹⁴ C]-Xylose 50 pmol	50 µl MES, 950 µl H ₂ O, 250 µl UDP-[¹⁴ C]-Xylose

6.4. Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Antibiotika-Lösung 100x (10,000 U Penicillin, 10 mg Streptomycin und 25 µl/ml Amphotericin B in 0,9 %-iger NaCl-Lösung)	Sigma, Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
DPBS	Cambrex, Verviers, Belgien
Fötales Kälberserum (FCS)	Biowest, Nuaille, Frankreich
Geneticin (G418)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
L-Glutamin (100 x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
LB-Agarmedium	1 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) Pepton aus Fleisch, 2 % (w/v) Agar
LB-Flüssigmedium	1 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) Pepton aus Fleisch
SOC-Medium	2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose in dest. H ₂ O
Trypsin-EDTA-Lösung (10 x)	Cambrex, Verviers, Belgien
Zeocin	InvivoGen, San Diego, U.S.A.

6.5. Enzyme

Chondroitinase ABC	Sigma, Taufkirchen
Exonuclease I (20 U/ µl)	New England Biolabs, Frankfurt
Heparinasen 1,2 und 3	Grampian Enzymes, Orkney, U.K.
HotStarTaq DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme und Puffer	New England Biolabs, Frankfurt
RNaseOUT (40 U/ µl)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Shrimp Alkaline Phosphatase (1 U/ µl)	Amersham, Freiburg
Superscript II RNase H ⁻ Reverse Transkriptase	Invitrogen, Groningen, Niederlande

6.6. Geräte

ABI Prism 310 <i>Genetic Analyzer</i>	Perkin Elmer, Foster City, U.S.A.
ABI Prism 7200 <i>Sequence Detector</i>	Perkin Elmer, Foster City, U.S.A.
Autoklav	Tecnorama, Fernwald
Elektrophoresekammern	Pharmacia, Freiburg AGS, Heidelberg
Elektrophorese-Spannungsversorgungseinheit	Gibco BRL, Eggenstein Renner, Darmstadt
HPLC (Shimadzu Prominence LC-20A)	Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
HPLC / ESI-MS	Waters Corporation, Milford, U.S.A.
Kolbenhubpipetten	Eppendorf, Hamburg
Mastercycler ep realplex	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Nikon Eclipse TE2000-S	Nikon, Düsseldorf
Plattenreader GENios	Tecan, Gröding
Sterilbank Variolab W 90	Waldner, Wangen
Szintillationszähler Tri-Carb 2800 TR	Perkin Elmer, Foster City, U.S.A.
Thermocycler T-Gradient	Biometra, Göttingen
Thermocycler	Landgraf Laborgeräte, Langenhagen
Ultrospec 2100 pro Spektrophotometer	Amersham Biosciences
UV-Illuminator	Renner, Darmstadt
Vakuumzentrifuge	Bachofer Laborgeräte, Reutlingen
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg Hettich

6.7. Kommerzielle Reaktions- und Nachweissysteme

ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer, Foster City, U.S.A.
Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay Kit	Sigma, Taufkirchen
GenElute HP Plasmid Midiprep Kit	Sigma, Taufkirchen
OXI-TEK TBARS Assay Kit	Alexis Biochemicals, Lörrach
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG	Invitrogen, Groningen, Niederlande
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder Homogenizers	Qiagen, Hilden
Quantikine Human MMP2 (total)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Quantikine Human MMP9 (total)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

6.8. Längen- und Größenstandards

1 kB DNA-Ladder (0,1 µg/µl)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
DNA-Marker pUC19/MspI	MBLL, Bielefeld

6.9. Oligonucleotide

6.9.1. siRNAs für den *ABCC6*-knockdown

Tabelle 6-3: Verwendete *ABCC6*-spezifische siRNA-Oligonucleotide und deren Bindestellen.

<i>siRNA</i>	<i>ID</i> ¹	<i>Binde- stelle</i> ²	<i>sense-Oligo</i>	<i>antisense-Oligo</i>
1	118143	Exon 23	CCCAUUGGUCACCUGCUAAtt	UUAGCAGGUGACCAAUGGGtg
2	106395	Exon 21	GGAAAGGACAGCAUCCAAUtt	AUUGGAUGCUGUCCUUUCCtg
NK	#1 siRNA	-	-	-

¹ nach Ambion

² nach Genbank

6.9.2. Primer für die Analyse von Polymorphismen

Tabelle 6-4: Zur Analyse von Polymorphismen im *VEGFA*-Gen verwendete *Primer*.

<i>SNP</i>	<i>5'-Primer</i>	<i>3'-Primer</i>	<i>T_A</i>
rs699947	GGCCTTAGGACACCATA	AGGAAGCAGCTTGGAA	61°C
rs833061	TGCGTGTGGGGTTGAGTG(C/T)	GGCTCTGCGGACGCTCAGTGA	59°C/ 63°C
rs13207351	TGTCCGCACGTAACCTCA	GATCCTCCCCGCTACCAG	64°C
rs2010963	CGACGGCTTGGGGAGATTGCTC T	CAGGTCACCTCACTTTGCCCCGGTC	65°C
rs1413711	GGTGTGCGCAGACAGTGCTCCA G	CACCCAAGACAGCAGAAAGTTCAT GGTCTC	65°C
rs25648	CGCAAGTTCCTCAGACCC	ACCCATTCCCATGACACC	60°C
rs735286	ATGCCACCACCTTCTCA	CCTACGTCCTCCCCACAAC	62°C
rs2146323	ACGTTAGATTTTGGGAAGGA(A/C)	GGATGGCTTGAAGATGTAC	59°C/ 61°C
rs3025020	GGGCTGTGAATGACTGGA	GTGGGCTAAAGTAGGGTGTG	62°C
rs3025021	GGGCTGTGAATGACTGGA	GTGGGCTAAAGTAGGGTGTG	62°C

T_A: Annealingtemperatur

Tabelle 6-5: Zur Analyse von Polymorphismen im *MMP2*-Gen verwendete *Primer*.

<i>SNP</i>	<i>5'-Primer</i>	<i>3'-Primer</i>	T_A
rs243866	CAGCCAAGGTTTGTCACT	GCTGGAGGGGTCAGTAA	56°C
rs243865	AAACTTTCTTCTCCAGTGCC	ACCTGAAGAGCAAAAGAGGT	56°C
rs243864	TAGCGTAAAATGAGCAGTGAGG ATG	AGATAGAAATTGGGCAAGACTGGT TTACTA	63°C
rs2285053	AGCGTAAAATGAGCAGTGCC	CCTTGGGAAATAGAGCAG	58°C
rs17859829	TAGTACCGCTGCTCTCTAA	CCTGAGGAAGTCTGGAT	57°C
rs865094	CTCGCAAGCCCAAGT	GCCGTTTGTATTAGTTCAGC	56°C
rs11646643	AGAGGGCAGTATTGACAGGAT	CGCCATGCTCTGAAACAC	60°C
rs1053605	AACGCCGATGGGGAGTA	GGGGGAAGTGAAGGA	60°C
rs2241146	TGGACCAGGCAGAATG	GAGAGGGAAGGATGTGAA	56°C
rs243847	CAGACACCCACCTACCCA	GCCTACCAGCTCCTTGAA	60°C
rs2287074	AGGCGATTTCTTCTGACT	ACCTGAACCCAAACTGTAG	61°C
rs11639960	GGACAGGTTGGGATTTGA	CTCCTGAGGTTTGGGCTA	56°C
rs243832	GGCTAGAGGCACAATCA	ACTTCACGCTCTTCAGAC	56°C
rs243831	CAAAAACACCCCCACCAC	TCACCAGCCCCATCATAA	59°C

T_A : Annealingtemperatur

Tabelle 6-6: Zur Analyse von Polymorphismen im *MMP9*-Gen verwendete *Primer*.

<i>SNP</i>	<i>5'-Primer</i>	<i>3'-Primer</i>	T_A
rs3918242	GCCTGGCACATAGTAGGCC	CTTCCTAGCCAGCCGGCATC	66°C

T_A : Annealingtemperatur

Tabelle 6-7: Zur Analyse von Polymorphismen im *MMP14*-Gen verwendete *Primer*.

<i>SNP</i>	<i>5'-Primer</i>	<i>3'-Primer</i>	T_A
rs1003349	CACATAGCCCCCAATAAT	TCTTCGGTAGGCACTGA	63°C
rs1042703	CGCCGACTAAGCAGAAGA	CCTGAGCAGCGGAGAT	58°C
rs2236302	GGCCACTTTGGATTGAA	AGAGGGGAAATGCGTAGAC	56°C
rs2236307	GCCCATCCACACCTTTC	CCAGCCCACTTCTTCTCA	61°C
rs3751489	TTAGTCTTTGGGAGTGAGG	CTAGGCAACAGCAGAGG	60°C

T_A : Annealingtemperatur

6.9.3. Primer für die *realtime* RT-PCR

Tabelle 6-8: *Primer* für die relative Quantifizierung, Referenzgene.

<i>Zielgen (Symbol)</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequenz (5'-3')</i>	<i>Annealing-temperatur</i>	<i>Produktgröße</i>
β -Actin (<i>ACTB</i>)	betaA_419U22 betaA_812L21	TGT GCT CGC GCT ACT CTC TCT T CGG ATG GAT GAA ACC CAG ACA	59,6°C	414 bp
Hypoxanthin- Phosphoribosyl- transferase 1 (<i>HPRT1</i>)	HPRT1_311U18 HPRT1_568L18	GCT GAC CTG CTG GAT TAC TGC GAC CTT GAC CAT CTT	59,6°C	275 bp
β 2-Mikroglobulin (<i>B2M</i>)	B2M_84U22 B2M_200L21	TGT GCT CGC GCT ACT CTC TCT T CGG ATG GAT GAA ACC CAG ACA	61,0°C	137 bp
Phosphoglycerat- kinase 1 (<i>PGK1</i>)	PGK1_1135U20 PGK1_1233L20	ATG GAT GAG GTG GTG AAA GC CAG TGC TCA CAT GGC TGA CT	61,0°C	118 bp
Ribosomales Protein L13a (<i>RPL13A</i>)	RPL13_113U18 RPL13_210L18	CGG AAG GTG GTG GTC GTA CTC GGG AAG GGT TGG TGT	61,0°C	115 bp

<i>Zielgen (Symbol)</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequenz (5'-3')</i>	<i>Annealing-temperatur</i>	<i>Produktgröße</i>
Succinatdehydrogenasekomplex Untereinheit A (<i>SDHA</i>)	SDHA_1387U18 SDHA_1563L18	AAC TCG CTC TTG GAC CTG GAG TCG CAG TTC CGA TGT	60,5°C	177 bp
α 1 Tubulin (<i>TUBA1</i>)	aTUBU1_160U18 aTUBU1_478L16	GCA GAT GCC CAG TGA CAA AGT GCC CCC ACC AAA G	61,0°C	334 bp
Tyrosin-3-monooxygenase /Tryptophan-5-monooxygenase Aktivierungsprotein, ζ -Polypeptid (<i>YWHAZ</i>)	YWHAZ_U YWHAZ_L	ACT TTT GGT ACA TTG TGG CTT CAA CCG CCA GGA CAA ACC AGT AT	60,0°C	94 bp

Tabelle 6-9: Primer für die relative Quantifizierung, Zielgene GAG-Biosynthese.

<i>Zielgen (Symbol)</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequenz (5'-3')</i>	<i>Annealing-temperatur</i>	<i>Produktgröße</i>
Xylosyltransferase 1 (<i>XYLT1</i>)	XT-I_2489U18 XT-I_2633L19	ACT GCC GAA TTC ACA CAC GTG CCT CCT CAG GTT TGA T	58,0°C	163 bp
Xylosyltransferase 2 (<i>XYLT2</i>)	XT-II_2258U18 XT-II_2352L18	CCT TGT GCT GCC CTT GAC GCC CTG GAA ACT CTG CTC	58,0°C	112 bp
Galactosyltransferase I (<i>B4GALT7</i>)	B4GALT7_30U18 B4GALT7_226L18	CTC TCC GCA CGA TGT TCC GTC TCC TGC CCT TGT CCC	57,0°C	214 bp
Galactosyltransferase II (<i>B3GALT6</i>)	B3GALT6_1981U20 B3GALT6_2151L18	CCC CGC TGT GGT CTT TGT TG CGC CCC CGT TTC TTC CTC	55,4°C	188 bp
Glucuronosyltransferase I (<i>B3GAT3</i>)	B3GAT3_933U18 B3GAT3_1180L17	ACT CGG GTA CTG GTG TGG GGG TGA AGC AGC AGG AC	64,4°C	247 bp

<i>Zielgen (Symbol)</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequenz (5'-3')</i>	<i>Annealing-temperatur</i>	<i>Produktgröße</i>
<i>N</i> -Acetylgalactos-aminyltransferase I (<i>CSGALNACT1</i>)	CHGN1774U18 CHGN1931L18	AAT ACA CAG CCA GGG AAG CTG ACC GAT ACT GAC ACG	59,6°C	175 bp
<i>N</i> -Acetylgalactos-aminyltransferase II (<i>CSGALNACT2</i>)	CSGALN2_3466U18 CSGALN2_3638L17	GCC ACT GTC TCC TTT TAT TGC TTA GCT TCC ATC TT	55,2°C	189 bp
<i>N</i> -Acetylglucos-aminyltransferase (<i>EXTL2</i>)	EXTL2_594U18 EXTL2_770L19	ATC AGG CTG TAC CAA ATC CAT CTA CCA TCA ACA CTG C	59,6°C	195 bp
<i>N</i> -Acetylglucos-aminyltransferase (<i>EXTL3</i>)	EXTL3_4601U18 EXTL3_4903L17	AGG CTG TGA TTT GCT GTG AGG GAA GAC GGA ACT GG	59,6°C	319 bp
Glukuronsäure-C5-Epimerase (<i>GLCE</i>)	GLCE_U GLCE_L	ACA ATG TGG AAG TCC GAG CAG TTG CAA GGA TAC ACC	57,0°C	320 bp
Chondroitin-Synthase 1 (<i>CHSY1</i>)	CHSY1_759U17 CHSY1_889L16	GAC CGC CCA GAA ATA CC CGT CCA CAC CCC GTA G	59,6°C	146 bp
Chondroitin-Synthase 2 (<i>CHPF</i>)	CHPF_1284U18 CHPF_1361L16	CAG GAG TTA CAG TGG GAG GGA TGG TGC TGG AAT A	57,0°C	93 bp
Chondroitin-Synthase 3 (<i>CHSY3</i>)	CHSY3_1045U15 CHSY3_1170L20	GTT CGC CGT TTT GGT TGT TGG GAT GAA GTG TTA TG	59,6°C	145 bp
Chondroitinsulfat-Glucuronyltransferase (<i>CHPF2</i>)	CSGLCAT_2188U18 CSGLCAT_2336L18	GGG CTT TGG CTA CCT GTT ATA CTG CTG CCC CTG GTG	59,6°C	166 bp
Exostosin 1 (<i>EXT1</i>)	EXT1_2411U15 EXT1_2606L18	GAG CAG CCG TTT TCT GAG TAG TCG TTC GTC CAC	59,6 °C	213 bp

<i>Zielgen (Symbol)</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequenz (5'-3')</i>	<i>Annealing-temperatur</i>	<i>Produktgröße</i>
Exostosin 2 (<i>EXT2</i>)	EXT2_2495U18 EXT2_2774L19	ATG GTG GAG AGG TCA GAG TGA GAA AGT GGG TTA GGT G	59,6°C	298 bp
Uronyl-2-sulfotransferase (<i>UST</i>)	UST_600U20 UST_730L20	CTC GAC ATG TTC ATT TCC TC GGA TCA TGT GAT TTT GTT CC	58,2°C	150 bp
Chondroitin-4-sulfotransferase 1 (<i>CHST11</i>)	C4ST1_783U20 C4ST1_1049L20	TAC GCA CAAGAT ATC AA CTTCAGGTAGCTGCCAC TC	61,0°C	286 bp
Chondroitin-4-sulfotransferase 2 (<i>CHST12</i>)	CHST12_1024U19 CHST12_1156L18	CTT CGC CAA CTT CAT CCA G GCG TCC TCG TCC AGA GTC	61,0°C	150 bp
Chondroitin-6-sulfotransferase 3 (<i>CHST3</i>)	CHST3_516U26 CHST3_626L17	CTT TTC TTG GTT TTT GTG GTG ATA G CTG GGT CGG TGC TGT TG	63,5°C	127 bp
Hyaluronsynthase 1 (<i>HAS1</i>)	HAS1_1053U16 HAS1_1286L20	CGG CAC CTC ACC AAC C AGA ACA GAC GCA GCA CAG TG	55,2°C	253 bp
Hyaluronsynthase 2 (<i>HAS2</i>)	HAS2_1122U15 HAS2_1270L18	CAG CCT TCA GAG CAC CAG GAA TCG TAC TTG TTT	55,0°C	166 bp
Hyaluronsynthase 3 (<i>HAS3</i>)	HAS3_674U17 HAS3_866U18	GTG TGC GGG ATG TGG TG CCC CGA CTC CCC CTA CTT	58,2°C	192 bp

Tabelle 6-10: Primer für die relative Quantifizierung, Zielgene extrazelluläre Matrix.

<i>Zielgen (Symbol)</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequenz (5'-3')</i>	<i>Annealing- temperatur</i>	<i>Produkt- größe</i>
$\alpha 2$ Actin (ACTA2)	ACTA_1412U18 ACTA_1580L17	GAC CGA ATG CAG AAG GAG CGG TGG ACA ATG GAA GG	59,6°C	185 bp
Aggrecan (ACAN)	ACAN_7212U18 ACAN_7352L18	CAC CCC ATG CAA TTT GAG GCC ACT GTG CCC TTT TTA	59,6°C	158 bp
Biglycan (BGN)	hBGN/E6/912U18 hBGN/E8/1186L16	AGG ACC TGC TTC GCT ACT GGG CAC GGG GTT GTT G	61,0°C	290 bp
CD44	CD44_2336U17 CD44_2647L17	AGC AAA CAC AAC CTC TG TTA CAC CCC AAT CTT CA	57,0°C	328 bp
Decorin (DCN)	hDCN/E1/572U16 hDCN/E2/656L18	CCT TCC GCT GTC AAT G GCA GGT CTA GCA GAG TTG	60,5°C	102 bp
Elastin (ELN)	hELN/E17+18/929U23 hELN/E20/1180L24	CCG CTA AGG CAG CCA AGT ATG GA AGC TCC AAC CCC GTA AGT AGG AAT	58,2°C	251 bp
Fibronectin (FN)	hFN/E37/6807U17 hFN/E39/7080L18	CCC AGG GAA GAT GTA GA CTC TTC CCG AAC CTT ATG	57,0°C	291 bp
Osteonectin (SPARC)	SPARC_466U18 SPARC_641L18	TCT TCC TGC CAC TTC TTT TGT CCT CAT CCC TCT CAT	59,6°C	193 bp
Osteopontin (SPP1)	hSPP1/E5/402U18 hSPP1/E6/723L18	TGA TGA CCA TGT GGA CAG ACC ATT CAA CTC CTC GCT	59,6°C	339 bp

Zielgen (Symbol)	Primer	Sequenz (5'-3')	Annealing- temperatur	Produkt- größe
Tenascin C (<i>TNC</i>)	TNC_6805U19 TNC_6940L16	ACT GTC ACC GTG TCA ACC T CGC CTG CCT TCA AGA T	56,0°C	151 bp
Vitronectin (<i>VTN</i>)	VTN_323U17 VTN_402L18	CAA GCC CCA AGT GAC TC ATG GAC AGT GGC ATT GTT	59,6°C	97 bp

Tabelle 6-11: Primer für die relative Quantifizierung, sonstige Zielgene.

Zielgen (Symbol)	Primer	Sequenz (5'-3')	Annealing- temperatur	Produkt- größe
Matrix-Metallo- proteinase 2 (<i>MMP2</i>)	MMP2_1538U18 MMP2_1776L17	GAG CAC TCC CAA GAC CCT AGT CCG CCA AAT GAA CC	57,0°C	255 bp
Matrix-Metallo- proteinase 9 (<i>MMP9</i>)	MMP9_1812U16 MMP9_2063L18	CGA GGC GTC TGG ACA A CTC ACT CCG GGA ACT CAC	59,6°C	269 bp
Matrix-Metallo- proteinase 14 (<i>MMP14</i>)	MMP14_3303U17 MMP14_3396L18	CCC AGC CCA CCC ATT GA CCC CGA CAT CCC TCT CCT	59,6°C	111 bp
TIMP Metallo- proteinase- inhibitor 1 (<i>TIMP1</i>)	TIMP1_637U19 TIMP1_896L19	GAA TGC ACA GTG TTT CCC T TGC TGG GTG GTA ACT CTT T	58,2°C	278 bp
TIMP Metallo- proteinase- inhibitor 2 (<i>TIMP2</i>)	TIMP2_3323U19 TIMP2_3470L18	CCG CTC AAA TAC CTT CAC A TCC CCC AAA AAT CCA AAC	56,0°C	165 bp

6.10. Software und Datenbanken

BioEdit Sequence Alignment Editor	Tom Hall
Chromas Lite 2.01	Technelysium Pty Ltd.
Clone Manager 4.01	Scientific & Educational Software, Cary, U.S.A.
Ensembl Genome Browser	http://www.ensembl.org
GraphPad Prism 4.0	GraphPad Software Inc., U.S.A.
Haploview 4.1	Broad Institute, Cambridge, U.S.A.
NEBCutter 2.0	http://tools.neb.com/NEBCutter2/index.php
Oligo Primer Analysis 5.0	National Biosciences, Annapolis, U.S.A.
PHASE 2.1	Matthew Stephens
Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi
Sequence Analysis 3.7	Perkin Elmer, Foster City, U.S.A.
Shimadzu LC solution	Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
SPSS 14.0	SPSS Inc., U.S.A.
WatCut	http://watcut.uwaterloo.ca/

6.11. Zellen

Bakterienstämme	XL1-Blue, XL1-Gold (Stratagene) Top 10 F' (Invitrogen)
hTERT-BJ1-Zellen	Telomerase-immortalisierte humane Fibroblasten (CLONTECH Laboratories, Palo Alto, U.S.A.)
Normale humane Dermalfibroblasten	Promocell, siehe Tabelle 6-12
Dermale PXE-Fibroblasten	Primärkultur aus dem Hautgewebe von PXE-Patienten, siehe Tabelle 6-13

Tabelle 6-12: Charakteristika der verwendeten normalen humanen Dermalfibroblasten.

<i>Kürzel</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Entnahmealter</i>
F37A	w	37
F42A	w	42
M45D	m	45
F52C	w	52
M56D	m	56

Tabelle 6-13: Charakteristika der verwendeten primären Dermalfibroblasten von PXE-Patienten.

<i>Kürzel</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Geburtsdatum</i>	<i>Genotyp</i>
P41M	m	15.05.1964	c. 1552C>T (p.R518X), ht
P52M	m	14.10.1953	c.3769_3770insC (p.L1259fsX1277), hm
P42M	m	28.04.1963	c.-90ins14 / p.R1141X
P59M	m	15.12.1946	p.R1141X / c.3883-6G>A
P63F	w	17.11.1942	p.Q378X / p.R1141X

6.12. Plasmide

pCl neo-hEST2

pCl neo Vektor mit hTERT-cDNA Insert
Addgene

6.13. Sonstige Materialien

Einwegpipetten steril	Greiner
HPLC-Säule Waters X-Bridge Shield	Waters Corporation, Milford, U.S.A.
Kunststoffröhrchen	Falcon Greiner
Neubauer-Zählkammer	Fleischhacker, Meckenheim
Nitrocellulosemembranen	Sartorius, Göttingen
PCR-Platten	Abgene
Pipettenspitzen	Biozym Eppendorf, Hamburg Sarstedt
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg Sarstedt
Vivaspin 0,5 ml 3000 MWCO PES	Vivascience, Hannover
Zellkulturschalen	Falcon Greiner

7. Abkürzungen

ABC	ATP-bindende Kasette
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMAC	Aminoacridon
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
c.	cDNA-Sequenz
CNV	Choroidale Neovaskularisation
COPD	Chronische obstruktive Lungenerkrankung
CS	Chondroitinsulfat
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dpm	Zerfälle pro Minute
DS	Dermatansulfat
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDP	<i>Elastin derived peptides</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FCS	Fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GAG	Glykosaminoglykan
Gal	Galaktose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
GlcA	Glukuronsäure
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
HA	Hyaluronsäure
hm	homozygot
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HS	Heparansulfat
ht	heterozygot
IdoA	Iduronsäure
KS	Keratansulfat

LD	<i>Linkage disequilibrium</i>
MES	2-(<i>N</i> -morpholino)-ethansulfonsäure
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MRP	<i>Multidrug resistance-associated protein</i>
mU	Milliunits
NBF	<i>Nucleotid binding fold</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
p.	Proteinsequenz
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PDR	Proliferative diabetische Retinopathie
PES	Polyethersulfon
PG	Proteoglykan
PXE	<i>Pseudoxanthoma elasticum</i>
RA	Rheumatoide Arthritis
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPE	Retinales Pigmentepithel
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
SD	Standardabweichung
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SLRP	Small Leucine-rich protein
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
TBA	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TMD	Transmembrandomäne
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
wt	Wildtyp
XT	Xylosyltransferase
Xyl	Xylose
ZKÜ	Zellkulturüberstand

8. Literatur

- [1] Neldner K. H., Pseudoxanthoma elasticum. *Clin Dermatol* **6**, S. 1–159 (1988).
- [2] Ladewig M. S., Götting C., Szliska C., Issa P. C., Helb H.-M., Bedenicki I. *et al.*, Pseudoxanthoma elasticum. Genetische Grundlagen, Manifestationen und therapeutische Ansätze. *Der Ophthalmologe* **103**, S. 537–553 (2006).
- [3] Li Q., Jiang Q., Pfendner E., Váradi A., Uitto J., Pseudoxanthoma elasticum: clinical phenotypes, molecular genetics and putative pathomechanisms. *Exp Dermatol* **18**, S. 1–11 (2009).
- [4] Hu X., Plomp A. S., van Soest S., Wijnholds J., de Jong P. T. V. M., Bergen A. A. B., Pseudoxanthoma elasticum: a clinical, histopathological, and molecular update. *Surv Ophthalmol* **48**, S. 424–438 (2003).
- [5] Le Saux O., Urban Z., Tschuch C., Csiszar K., Bacchelli B., Quaglino D. *et al.*, Mutations in a gene encoding an ABC transporter cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet* **25**, S. 223–227 (2000).
- [6] Bergen A. A. B., Plomp A. S., Schuurman E. J., Terry S., Breuning M., Dauwerse H. *et al.*, Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet* **25**, S. 228–231 (2000).
- [7] Ringpfeil F., Lebwohl M. G., Christiano A. M., Uitto J., Pseudoxanthoma elasticum: mutations in the MRP6 gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proc Natl Acad Sci USA*. **97**, S. 6001–6006 (2000).
- [8] Ratajewski M., Van de Ven W. J. M., Bartosz G., Pulaski L., The human pseudoxanthoma elasticum gene ABCC6 is transcriptionally regulated by PLAG family transcription factors. *Hum Genet* **124**, S. 451–463 (2008).
- [9] Chassaing N., Martin L., Calvas P., Le Bert M., Hovnanian A., Pseudoxanthoma elasticum: a clinical, pathophysiological and genetic update including 11 novel ABCC6 mutations. *J Med Genet* **42**, S. 881–892 (2005).
- [10] Plomp A. S., Hu X., de Jong P. T., Bergen A. A. B., Does autosomal dominant pseudoxanthoma elasticum exist. *Am J Med Genet* **126A**, S. 403–412 (2004).
- [11] Ringpfeil F., McGuigan K., Fuchsel L., Kozic H., Larralde M., Lebwohl M., Pseudoxanthoma elasticum is a recessive disease characterized by compound heterozygosity. *J Invest Dermatol* **126**, S. 782–786 (2006).
- [12] Martin L., Maître F., Bonicel P., Daudon P., Verny C., Bonneau D. *et al.*, Heterozygosity for a single mutation in the ABCC6 gene may closely mimic PXE: consequences of this phenotype overlap for the definition of PXE. *Arch Dermatol* **144**, S. 301–306 (2008).
- [13] Martin L., Chassaing N., Delaite D., Estève E., Maître F., Le Bert M., Histological skin changes in heterozygote carriers of mutations in ABCC6, the gene causing pseudoxanthoma elasticum. *J Eur Acad Dermatol Venerol* **21**, S. 368–373 (2007).
- [14] Passi A., Albertini R., Baccarani Contri M., De Luca G., De Paepe A., Pallavicini G. *et al.*, Proteoglycan alterations in skin fibroblast cultures from patients affected with pseudoxanthoma elasticum. *Cell Biochem Funct* **14**, S. 111–120 (1996).

- [15] Li Q., Grange D. K., Armstrong N. L., Whelan A. J., Hurley M. Y., Rishavy M. A. *et al.*, Mutations in the GGCX and ABCC6 genes in a family with pseudoxanthoma elasticum-like phenotypes. *J Invest Dermatol* **129**, S. 553–563 (2009).
- [16] Borst P. und Elferink R. O., Mammalian ABC transporter in health and disease. *Annu Rev Biochem* **71**, S. 537–592 (2002).
- [17] Pulkkinen L., Nakano A., Ringpfeil F., Uitto J., Identification of ABCC6 pseudogenes on human chromosome 16p: implications for mutation detection in pseudoxanthoma elasticum. *Hum Genet* **109**, S. 356–365 (2001).
- [18] Kool M., van der Linden M., de Haas M., Baas F., Borst P., Expression of Human MRP6, a Homologue of the Multidrug Resistance Protein Gene MRP1, in Tissues and Cancer Cells. *Cancer Res* **59**, S. 175–182 (1999).
- [19] Matsuzaki Y., Nakano A., Jiang Q., Pulkkinen L., Uitto J., Tissue-specific expression of the ABCC6 gene. *J Invest Dermatol* **125**, S. 900–905 (2005).
- [20] Belinsky M. G., Chen Z. S., Shchaveleva I., Zeng H., Kruh G. D., Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6). *Cancer Res* **62**, S. 6172–6177 (2002).
- [21] Schulz V., Hendig D., Henjakovic M., Szliska C., Kleesiek K., Götting C., Mutational Analysis of the ABCC6 Gene and the Proximal ABCC6 Gene Promoter in German Patients With Pseudoxanthoma Elasticum (PXE). *Hum Mutat* **27**, S. 831 (2006).
- [22] Plomp A. S., Florijn R. J., ten Brink J., Castle B., Kingston H., Martin-Santiago A. *et al.*, ABCC6 mutations in pseudoxanthoma elasticum: an update including eight novel ones. *Mol Vis* **14**, S. 118-124 (2007).
- [23] Pfendner E. G., Vanakker O. M., Terry S. F., Vourthis S., McAndrew P. E., McClain M. R. *et al.*, Mutation detection in the ABCC6 gene and genotype-phenotype analysis in a large international case series affected by pseudoxanthoma elasticum. *J Med Genet* **44**, S. 621–628 (2007).
- [24] Gheduzzi D., Guidetti R., Anzivino C., Tarugi P., Di Leo E., Quaglino D., Pasquali-Ronchetti I., ABCC6 mutations in Italian families affected by pseudoxanthoma elasticum (PXE). *Hum Mutat* **24**, S. 438–439 (2004).
- [25] Miksch S., Lumsden A., Guenther U. P., Foernzler D., Christen-Zäch S., Daugherty C. *et al.*, Molecular genetics of pseudoxanthoma elasticum: type and frequency of mutations in ABCC6. *Hum Mutat* **26**, S. 235–248 (2005).
- [26] Hu X., Plomp A., Wijnholds J., Ten Brink J., van Soest S., van den Born L. I. *et al.*, ABCC6/MRP6 mutations: further insight into the molecular pathology of pseudoxanthoma elasticum. *Eur J Hum Genet* **11**, S. 215–224 (2003).
- [27] Le Saux O., Beck K., Sachsinger C., Silvestri C., Treiber C., Göring H. H. *et al.*, A spectrum of ABCC6 mutations is responsible for pseudoxanthoma elasticum. *Am J Hum Genet* **69**, S. 749–764 (2001).
- [28] Moreira A. P., Feijó F. S., Pinto J. M., Martinelli I. L., Rochael M. C., Pseudoxanthoma elasticum. *Dermatol Online J.* **15**:7 (2009).

- [29] Finger R. P., Charbel Issa P., Ladewig M., Holz F. G., Scholl H. P. N., Intravitreal bevacizumab for choroidal neovascularisation associated with pseudoxanthoma elasticum. *Br J Ophthalmol* **92**, S. 483–487 (2008).
- [30] Bhatnagar P., Freund K. B., Spaide R. F., Klancnik Jr. J. M., Cooney M. J., Ho I. *et al.*, Intravitreal bevacizumab for the management of choroidal neovascularization in pseudoxanthoma elasticum. *Retina* **27**, S. 897–902 (2007).
- [31] Gheduzzi D., Sammarco R., Quaglino D., Bercovitch L., Terry S., Taylor W., Pasquali-Ronchetti I., Extracutaneous Ultrastructural Alterations in Pseudoxanthoma Elasticum. *Ultrastructural Pathology* **27**, S. 375–384 (2003).
- [32] Vanakker O. M., Voet D., Petrovic M., van Robaeys F., Leroy B. P., Coucke P., De Paepe A., Visceral and testicular calcifications as part of the phenotype in pseudoxanthoma elasticum: ultrasound findings in Belgian patients and healthy carriers. *Br J Radiol* **79**, S. 221–225 (2006).
- [33] Crespi G., Derchi L. E., Saffiotti S., Sonographic detection of renal changes in pseudoxanthoma elasticum. *Urol Radiol* **13**, S. 223–225 (1992).
- [34] Baccarani-Contri M., Vincenzi D., Cicchetti F., Mori G., Pasquali-Ronchetti I., Immunochemical identification of abnormal constituents in the dermis of pseudoxanthoma elasticum patients. *Eur J Histochem* **38**, S. 111–123 (1994).
- [35] Scheffer G. L., Hu X., Pijnenborg A. C., JWijnholds J., Bergen A. A. B., Scheper R. J., MRP6 (ABCC6) detection in normal human tissues and tumors. *Lab Invest* **82**, S. 515–518 (2002).
- [36] Le Saux O., Bunda S., Van Mart C. M., Douet V., Got L., Martin L., Hinek A., Serum factors from pseudoxanthoma elasticum patients alter elastic fiber formation in vitro. *J Invest Dermatol* **126**, S. 1497–1505 (2006).
- [37] Jiang Q., Li Q., Uitto J., Aberrant mineralization of connective tissues in a mouse model of pseudoxanthoma elasticum: systemic and local regulatory factors. *J Invest Dermatol* **127**, S. 1392–1402 (2007).
- [38] Jiang Q., Endo M., Dibra F., Wang K., Uitto J., Pseudoxanthoma elasticum is a metabolic disease. *J Invest Dermatol* **129**, S. 348–354 (2009).
- [39] Hendig D., Schulz V., Arndt M., Szliska C., Kleesiek K., Götting C., Role of Serum Fetuin-A, a Major Inhibitor of Systemic Calcification, in Pseudoxanthoma Elasticum. *Clin Chem* **52**, S. 227–234 (2006).
- [40] Hendig D., Zarbock R., Szliska C., Kleesiek K., Götting C., The local calcification inhibitor matrix Gla protein in pseudoxanthoma elasticum. *Clin Biochem* **41**, S. 407–412 (2008).
- [41] Pasquali-Ronchetti I., Garcia-Fernandez M. I., Boraldi F., Quaglino D., Gheduzzi D., De Vincenzi Paolinelli C. *et al.*, Oxidative stress in fibroblasts from patients with pseudoxanthoma elasticum: possible role in the pathogenesis of clinical manifestations. *J Pathol* **208**, S. 54–61 (2006).
- [42] Quaglino D., Sartor L., Garbisa S., Boraldi F., Croce A., Passi A. *et al.*, Dermal fibroblasts from pseudoxanthoma elasticum patients have raised MMP-2 degradative potential. *Biochim Biophys Acta* **1741**, S. 42–47 (2005).

- [43] Quaglino D., Boraldi F., Barbieri D., Croce A., Tiozzo R., Pasquali Ronchetti I., Abnormal phenotype of in vitro dermal fibroblasts from patients with Pseudoxanthoma elasticum (PXE). *Biochim Biophys Acta* **1501**, S. 51–62 (2000).
- [44] Baccarani Contri M., Boraldi F., Taparelli F., De Paepe A., Pasquali Ronchetti I., Matrix Proteins with High Affinity for Calcium Ions Are Associated with Mineralization within the Elastic Fibers of Pseudoxanthoma Elasticum Dermis. *Am J Pathol* **148**, S. 569–577 (1996).
- [45] Sakuraoka K., Tajima S., Nishikawa T., Seyama Y., Biochemical analyses of macromolecular matrix components in patients with pseudoxanthoma elasticum. *J Dermatol* **21**, S. 98–101 (1994).
- [46] Zarbock R., Hendig D., Szliska C., Kleesiek K., Götting C., Pseudoxanthoma elasticum: genetic variations in antioxidant genes are risk factors for early disease onset. *Clin Chem* **53**, S. 1734–1740 (2007).
- [47] Garcia-Fernandez M. I., Gheduzzi D., Boraldi F., Paolinelli C. D., Sanchez P., Valdivielso P. *et al.*, Parameters of oxidative stress are present in the circulation of PXE patients. *Biochim Biophys Acta* **1782**, S. 474–481 (2008).
- [48] Baccarani-Contri M., Bacchelli B., Boraldi F., Quaglino D., Taparelli F., Carnevali E. *et al.*, Characterization of pseudoxanthoma elasticum-like lesions in the skin of patients with beta-thalassemia. *J Am Acad Dermatol* **44**, S. 33–39 (2001).
- [49] Aessopos A., Farmakis D., Loukopoulos D., Elastic tissue abnormalities resembling pseudoxanthoma elasticum in beta thalassemia and the sickling syndromes. *Blood* **99**, S. 30–35 (2002).
- [50] Aessopos A., Floudas C. S., Kati M., Tsironi M., Giakoumi X., Livir-Rallatos C., Farmakis D., Loss of vision associated with angioid streaks in β -thalassemia intermedia. *Int J Hematol* **87**, S. 35–38 (2008).
- [51] Li Q., Jiang Q., Uitto J., Pseudoxanthoma elasticum: oxidative stress and antioxidant diet in a mouse model (Abcc6^{-/-}). *J Invest Dermatol* **128**, S. 1160–1164 (2008).
- [52] Bastaki M M., Huen K., Manzanillo P., Chande N., Chen C., Balmes J. R. *et al.*, Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans. *Pharmacogenet Genomics* **16**, S. 279–286 (2006).
- [53] Ranganathan A. C., Nelson K. K., Rodriguez A. M., Kim K. H., Tower G. B., Rutter J. L. *et al.*, Manganese superoxide dismutase signals matrix metalloproteinase expression via H₂O₂-dependent ERK1/2 activation. *J Biol Chem* **276**, S. 14264–14270 (2001).
- [54] Kawaguchi Y., Tanaka H., Okada T., Konishi H., Takahashi M., Ito M., Asai J., Effect of reactive oxygen species on the elastin mRNA expression in cultured human dermal fibroblasts. *Free Radic Biol Med* **23**, S. 162–165 (1997).
- [55] Tanaka H., Okada T., Konishi H., Tsuji T., The effect of reactive oxygen species on the biosynthesis of collagen and glycosaminoglycans in cultured human dermal fibroblasts. *Arch Dermatol Res* **285**, S. 352–355 (1993).
- [56] Ferrara N. und Davis-Smyth T., The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* **18**, S. 4–25 (1997).

- [57] Renner W., Kotschan S., Hoffmann C., Obermayer-Pietsch B., Pilger E., A Common 936 C/T Mutation in the Gene for Vascular Endothelial Growth Factor Is Associated with Vascular Endothelial Growth Factor Plasma Levels. *J Vasc Res* **37**, S. 443–448 (2000).
- [58] Bates D. O., Cui T., Doughty J. M., Winkler M., Sugiono M., Shields J. D. *et al.*, VEGF165b, an Inhibitory Splice Variant of Vascular Endothelial Growth Factor, Is Down-Regulated in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res* **62**, S. 4123–4131 (2002).
- [59] Woolard J., Wang W., Bevan H. S., Qiu Y., Morbidelli L., Pritchard-Jones R. O. *et al.*, VEGF165b, an Inhibitory Vascular Endothelial Growth Factor Splice Variant: Mechanism of Action, In vivo Effect On Angiogenesis and Endogenous Protein Expression. *Cancer Res* **64**, S. 7822–7835 (2003).
- [60] Watson C. J., Webb N. J. A., Bottomley M. J., Brenchley P. E. C., Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine* **12**, S. 1232–1235 (2000).
- [61] Stevens A., Soden J., Brenchley P. E. C., Ralph S., Ray D. W., Haplotype Analysis of the Polymorphic Human Vascular Endothelial Growth Factor Gene Promoter. *Cancer Res* **63**, S. 812–816 (2003).
- [62] Buraczynska M., Ksiazek P., Baranowicz-Gaszczyk I., Jozwiak L., Association of the VEGF gene polymorphism with diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients. *Nephrol Dial Transplant* **22**, S. 827–832 (2007).
- [63] Awata T., Inoue K., Kurihara S., Ohkubo T., Watanabe M., Inukai K. *et al.*, A Common Polymorphism in the 5'-Untranslated Region of the VEGF Gene Is Associated With Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes. *Diabetes* **51**, S. 1635–1639 (2002).
- [64] Churchill A. J., Carter J. G., Lovell H. C., Ramsden C., Turner S. J., Yeung A. *et al.*, VEGF polymorphisms are associated with neovascular age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet* **15**, S. 2955–2961 (2006).
- [65] Al-Kateb H., Mirea L., Xie X., Sun L., Liu M., Chen H. *et al.*, Multiple Variants in Vascular Endothelial Growth Factor (VEGFA) Are Risk Factors for Time to Severe Retinopathy in Type 1 Diabetes. The DCCT/EDIC Genetics Study. *Diabetes* **56**, S. 2161–2168 (2007).
- [66] Churchill A. J., Carter J. G., Ramsden C., Turner S. J., Yeung A., Brenchley P. E., Ray D. W., VEGF Polymorphisms Are Associated with Severity of Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**, S. 3611–3616 (2008).
- [67] Drumm M. L., Konstan M. W., Schluchter M. D., Handler A., Pace R., Zou F. *et al.*, Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med* **353**, S. 1443–1453 (2005).
- [68] Hendig D., Arndt M., Szliska C., Kleesiek K., Götting C., SPP1 Promotor Polymorphisms: Identification of the First Modifier Gene for Pseudoxanthoma Elasticum. *Clin Chem* **53**, S. 829–836 (2007).
- [69] Schön S., Schulz V., Prante C., Hendig D., Szliska C., Kuhn J. *et al.*, Polymorphisms in the xylosyltransferase genes cause higher serum XT-I activity in patients with pseudoxanthoma elasticum (PXE) and are involved in a severe disease course. *J Med Genet* **43**, S. 745–749 (2006).
- [70] Karp G., Cell and Molecular Biology. 5. Aufl., John Wiley & Sons (2007).

- [71] Volpi N. und Maccari F., Chondroitin sulfate in normal human plasma is modified depending on the age. Its evaluation in patients with pseudoxanthoma elasticum. *Clin Chim Acta* **370**, S. 196–200 (2006).
- [72] Tiozzo-Costa R., Baccarani-Contri M., Cingi M. R., Pasquali-Ronchetti I., Salvini R., Rindi S., De Luca G., Pseudoxanthoma elasticum (PXE): ultrastructural and biochemical study on proteoglycan and proteoglycan-associated material produced by skin fibroblasts in vitro. *Coll Relat Res* **8**, S. 49–64 (1988).
- [73] Lebwohl M., Longas M. O., Konstadt J., Koreen R., Grabowski G. A., Phelps R. *et al.*, Hyaluronic acid and dermatan sulfate in nonlesional pseudoxanthoma elasticum skin. *Clin Chim Acta* **238**, S. 101–107 (1995).
- [74] Longas M. O., Wisch P., Lebwohl M. G., Fleischmajer R., Glycosaminoglycans of skin and urine in pseudoxanthoma elasticum: evidence for chondroitin 6-sulfate alteration. *Clin Chim Acta* **155**, S. 227–236 (1986).
- [75] Maccari F. und Volpi N., Structural characterization of the skin glycosaminoglycans in patients with pseudoxanthoma elasticum. *Int J Dermatol* **47**, S. 1024–1027 (2008).
- [76] Prydz K. und Dalen K. T., Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci* **113**, S. 193–205 (2000).
- [77] Lee P. H. A., Trowbridge J. M., Taylor K. R., Morhenn V. B., Gallo R. L., Dermatan Sulfate Proteoglycan and Glycosaminoglycan Synthesis Is Induced in Fibroblasts by Transfer to a Three-dimensional Extracellular Environment. *J Biol Chem* **279**, S. 48640–48646 (2004).
- [78] Tkachenko E., Rhodes J. M., Simons M., Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res* **96**, S. 488–500 (2005).
- [79] Kiani C., Chen L., Wu Y. J., Yee A. J., Yang B. B., Structure and function of aggrecan. *Cell Res* **12**, S. 19–32 (2002).
- [80] Fraser J. R., Laurent T. C., Laurent U. B., Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med* **242**, S. 27–33 (1997).
- [81] Mochida Y., Parisuthiman D., Pornprasertsuk-Damrongsri S., Atsawasuwon P., Sricholpech M., Boskey A. L., Yamauchi M., Decorin modulates collagen matrix assembly and mineralization. *Matrix Biol* **28**, S. 44–52 (2009).
- [82] Honda E. und Munakata H., Purification and characterization of decorin from the culture media of MRC-5 cells. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, S. 1635–1644 (2004).
- [83] Danielson K. G., Baribault H., Holmes D. F., Graham H., Kadler K. E., Iozzo R. V., Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol* **136**, S. 729–743 (1997).
- [84] Kinsella M. G., Bressler S. L., Wight T. N., The regulated synthesis of versican, decorin, and biglycan: extracellular matrix proteoglycans that influence cellular phenotype. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **14**, S. 203–234 (2004).
- [85] Delpech B., Girard N., Bertrand P., Courel M.-N., Chauzy C., Delpech A., Hyaluronan: fundamental principles and applications in cancer. *J Intern Med* **242**, S. 41–48 (1997).

- [86] Iozzo R. V., Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* **67**, S. 609–652 (1998).
- [87] Silbert J. E. und Sugumaran G., Biosynthesis of Chondroitin/Dermatan Sulfate. *IUBMB Life* **54**, S. 177–186 (2002).
- [88] Uyama T., Kitagawa H., Tamura J., Sugahara K., Molecular cloning and expression of human chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase: the key enzyme for chain initiation and elongation of chondroitin/dermatan sulfate on the protein linkage region tetrasaccharide shared by heparin/heparan sulfate. *J Biol Chem* **277**, S. 8841–8846 (2002).
- [89] Sato T., Gotoh M., Kiyohara K., Akashima T., Iwasaki H., Kameyama A. *et al.*, Differential roles of two N-acetylgalactosaminyltransferases, CSGalNAcT-1, and a novel enzyme, CSGalNAcT-2. Initiation and elongation in synthesis of chondroitin sulfate. *J Biol Chem* **278**, S. 3063–3071 (2003).
- [90] Kitagawa H., Uyama T., Sugahara K., Molecular cloning and expression of a human chondroitin synthase. *J Biol Chem* **276**, S. 38721–38726 (2001).
- [91] Kitagawa H., Izumikawa T., Uyama T., Sugahara K., Molecular cloning of a chondroitin polymerizing factor that cooperates with chondroitin synthase for chondroitin polymerization. *J Biol Chem* **278**, S. 23666–23671 (2003).
- [92] Yada T., Sato T., Kaseyama H., Gotoh M., Iwasaki H., Kikuchi N. *et al.*, Chondroitin sulfate synthase-3. Molecular cloning and characterization. *J Biol Chem* **278**, S. 39711–39725 (2003).
- [93] Izumikawa T., Uyama T., Okuura Y., Sugahara K., Kitagawa H., Involvement of chondroitin sulfate synthase-3 (chondroitin synthase-2) in chondroitin polymerization through its interaction with chondroitin synthase-1 or chondroitin-polymerizing factor. *Biochem J.* **403**, S. 545–552 (2007).
- [94] Gotoh M., Yada T., Sato T., Akashima T., Iwasaki H., Mochizuki H. *et al.*, Molecular cloning and characterization of a novel chondroitin sulfate glucuronyltransferase that transfers glucuronic acid to N-acetylgalactosamine. *J Biol Chem* **277**, S. 38179–38188 (2002).
- [95] Gotoh M., Sato T., Akashima T., Iwasaki H., Kameyama A., Mochizuki H. *et al.*, Enzymatic synthesis of chondroitin with a novel chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase that transfers N-acetylgalactosamine to glucuronic acid in initiation and elongation of chondroitin sulfate synthesis. *J Biol Chem* **277**, S. 38189–38196 (2002).
- [96] Kusche-Gullberg M. und Kjellén L., Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol* **13**, S. 605–611 (2003).
- [97] Sugahara K. und Kitagawa H., Heparin and Heparan Sulfate Biosynthesis. *IUBMB Life* **54**, S. 163–175 (2002).
- [98] Busse M. und Kusche-Gullberg M., In vitro polymerization of heparan sulfate backbone by the EXT proteins. *J Biol Chem* **278**, S. 41333–41337 (2003).
- [99] Busse M., Feta A., Presto J., Wilén M., Grønning M., Kjellén L., Kusche-Gullberg M., Contribution of EXT1, EXT2, and EXTL3 to Heparan Sulfate Chain Elongation. *J Biol Chem* **282**, S. 32802–32810 (2007).

- [100] Götting C., Kuhn J., Zahn R., Brinkmann T., Kleesiek K., Molecular cloning and expression of human UDP-d-Xylose:proteoglycan core protein beta-d-xylosyltransferase and its first isoform XT-II. *J Mol Biol* **304**, S. 517–528 (2000).
- [101] Götting C., Sollberg S., Kuhn J., Weilke C., Huerkamp C., Brinkmann T. *et al.*, Serum xylosyltransferase: a new biochemical marker of the sclerotic process in systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* **112**, S. 919–924 (1999).
- [102] Götting C., Kuhn J., Sollberg S., Huerkamp C., Brinkmann T., Krieg T., Kleesiek K., Elevated serum xylosyltransferase activity correlates with a high level of hyaluronate in patients with systemic sclerosis. *Acta Derm Venereol* **80**, S. 60–61 (1999).
- [103] Kleesiek K., Reinards R., Okusi J., Wolf B., Greiling H. J., UDP-D-xylose: proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase: a new marker of cartilage destruction in chronic joint diseases. *J Clin Chem Clin Biochem* **25**, S. 473–481 (1987).
- [104] Götting C., Hendig D., Adam A., Schön S., Schulz V., Szliska C. *et al.*, Elevated xylosyltransferase I activities in pseudoxanthoma elasticum (PXE) patients as a marker of stimulated proteoglycan biosynthesis. *J Mol Med* **83**, S. 984–992 (2005).
- [105] Pönighaus C., Ambrosius M., Casanova J. C., Prante C., Kuhn J., Esko J. D. *et al.*, Human xylosyltransferase II is involved in the biosynthesis of the uniform tetrasaccharide linkage region in chondroitin sulfate and heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* **282**, S. 5201–5206 (2007).
- [106] Itano N. und Kimata K., Mammalian Hyaluronan Synthases. *IUBMB Life* **54**, S. 195–199 (2002).
- [107] Noble P. W., Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biol* **21**, S. 25–29 (2002).
- [108] Itano N., Sawai T., Yoshida M., Lenas P., Yamada Y., Imagawa M. *et al.*, Three Isoforms of Mammalian Hyaluronan Synthases Have Distinct Enzymatic Properties. *J Biol Chem* **274**, S. 25085–25092 (1999).
- [109] Schulz T., Schumacher U., Prehm P., Hyaluronan Export by the ABC Transporter MRP5 and Its Modulation by Intracellular cGMP. *J Biol Chem* **282**, S. 20999–21004 (2007).
- [110] Juhlin L., Hyaluronan in skin. *J Intern Med* **242**, S. 61–66 (1997).
- [111] Passos C. O., Werneck C. C., Onofre G. R., Pagani E. A., Filgueira A. L., Silva L.-C. F., Comparative biochemistry of human skin: glycosaminoglycans from different body sites in normal subjects and in patients with localized scleroderma. *J Eur Acad Dermatol Venerol* **17**, S. 14–19 (2003).
- [112] Gerdin B. und Hällgren R., Dynamic role of hyaluronan (HYA) in connective tissue activation and inflammation. *J Intern Med* **242**, S. 49–55 (1997).
- [113] Stern R., Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet. *Glycobiology* **13**, S. 105R–115R (2003).
- [114] Termeer C., Benedix F., Sleeman J., Fieber C., Voith U., Ahrens T. *et al.*, Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* **195**, S. 99–111 (2002).

- [115] Knudson W., Chow G., Knudson C. B., CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan. *Matrix Biol* **21**, S. 15–23 (2002).
- [116] Fieber C., Baumann P., Vallon R., Termeer C., Simon J. C., Hofmann M. *et al.*, Hyaluronan-oligosaccharide-induced transcription of metalloproteinases. *J Cell Sci* **117**, S. 359–637 (2004).
- [117] Yamada Y., Itano N., Hata K.-I., Ueda M., Kimata K., Differential Regulation by IL-1 β and EGF of Expression of Three Different Hyaluronan Synthases in Oral Mucosal Epithelial Cells and Fibroblasts and Dermal Fibroblasts: Quantitative Analysis Using Real-Time RT-PCR. *J Invest Dermatol* **122**, S. 631–639 (2004).
- [118] Galis Z. S., Muszynski M., Sukhova G. K., Simon-Morrissey E., Unemori E. N., Lark M. W. *et al.*, Cytokine-Stimulated Human Vascular Smooth Muscle Cells Synthesize a Complement of Enzymes Required for Extracellular Matrix Digestion. *Circ Res* **75**, S. 181–189 (1994).
- [119] Shah J. S., Hughes D. A., Tayebjee M. H., MacFadyen R. J., Mehta A. B., Elliott P. M., Extracellular matrix turnover and disease severity in Anderson–Fabry disease. *J Inherit Metab Dis* **30**, S. 88–95 (2007).
- [120] Galis Z. S. und Khatri J. J., Matrix Metalloproteinases in Vascular Remodeling and Atherogenesis. The Good, the Bad, and the Ugly. *Circ Res* **90**, S. 251–262 (2002).
- [121] Harendza S., Lovett D. H., Panzer U., Lukacs Z., Kühnl P., Stahl R. A. K., Linked Common Polymorphisms in the Gelatinase A Promoter Are Associated with Diminished Transcriptional Response to Estrogen and Genetic Fitness. *J Biol Chem* **278**, S. 20490–20499 (2003).
- [122] Birkedal-Hansen H., Moore W. G., Bodden M. K., Windsor L. J., Birkedal-Hansen B., DeCarlo A., Engler J. A., Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **4**, S. 197–250 (1993).
- [123] Gearing A. J. H., Beckett P., Christodoulou M., Churchill M., Clements J., Davidson A. H. *et al.*, Processing of tumor necrosis factor- α precursor by metalloproteinases. *Nature* **370**, S. 555–557 (1994).
- [124] Lijnen H. R., Ugwu F., Bini A., Collen D., Generation of an angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP-3). *Biochemistry* **37**, S. 4699–5702 (1998).
- [125] Fernandez-Patron C., Radomski M. W., Davidge S. T., Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res* **85**, S. 906–911 (1999).
- [126] Qin X., Corriere M. A., Matrisian L. M., Guzman R. J., Matrix Metalloproteinase Inhibition Attenuates Aortic Calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, S. 1510–1516 (2006).
- [127] Chefetz I., Kohno K., Izumi H., Uitto J., Richard G., Sprecher E., GALNT3, a gene associated with hyperphosphatemic familial tumoral calcinosis, is transcriptionally regulated by extracellular phosphate and modulates matrix metalloproteinase activity. *Biochim Biophys Acta* **1792**, S. 61–67 (2009).
- [128] Soo Lee J., Basalyga D. M., Simionescu A., Isenburg J. C., Simionescu D. T., Vyavahare N. R., Elastin Calcification in the Rat Subdermal Model Is Accompanied by Up-Regulation of Degradative and Osteogenic Cellular Responses. *Am J Pathol* **168**, S. 490–498 (2006).
- [129] Nee L. E., McMorrow T., Campbell E., Slattery C., Ryan M. P., TNF- α and IL-1 β -mediated regulation of MMP-9 and TIMP-1 in renal proximal tubular cells. *Kidney Int* **66**, S. 1376–1386 (2004).

- [130] Lam K.-K., Cheng P.-Y., Hsiao G., Chen S.-Y., Shen H.-H., Yen M.-H., Lee Y.-M., Estrogen Deficiency-Induced Alterations of Vascular MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 in Ovariectomized Rats. *Am J Hypertens* **22**, S. 27–34 (2009).
- [131] Siwik D. A., Pagano P. J., Colucci W. S., Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**, S. C53-C60 (2001).
- [132] Nadra I., Mason J. C., Philippidis P., Florey O., Smythe C. D., McCarthy G. M. *et al.*, Proinflammatory Activation of Macrophages by Basic Calcium Phosphate Crystals via Protein Kinase C and MAP Kinase Pathways. A Vicious Cycle of Inflammation and Arterial Calcification. *Circ Res* **96**, S. 1248–1256 (2005).
- [133] Lambert V., Munaut C., Jost M., Noel A., Werb Z., Foidart J.-M., Rakic J.-M., Matrix Metalloproteinase-9 Contributes to Choroidal Neovascularization. *Am. J. Pathol.* **161**, S. 1247–1253 (2002).
- [134] Strongin A. Y., Collier I., Bannikov G., Marmer B. L., Grant G. A., Goldberg G. I., Mechanism Of Cell Surface Activation Of 72-kDa Type IV Collagenase. *J Biol Chem* **270**, S. 5331–5338 (1995).
- [135] Han Y.-P., Tuan T.-L., Wu H., Hughes M., Garner W. L., TNF- α stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF- κ B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci* **114**, S. 131–139 (2001).
- [136] Lambert V., Wielockx B., Munaut C., Galopin C., Jost M., Itoh T. *et al.*, MMP-2 and MMP-9 synergize in promoting choroidal neovascularization. *FASEB Journal* **17**, S. 2290–2292 (2003).
- [137] Belotti D., Calcagno C., Garofalo A., Caronia D., Riccardi E., Giavazzi R., Taraboletti G., Vascular Endothelial Growth Factor Stimulates Organ-Specific Host Matrix Metalloproteinase-9 Expression and Ovarian Cancer Invasion. *Mol Cancer Res* **6**, S. 525–534 (2008).
- [138] McCawley L. J. und Matrisian L. M., Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* **13**, S. 534–540 (2001).
- [139] Ogata T., Shibamura H., Tromp G., Sinha M., Goddard K. A. B., Sakalihasan N. *et al.*, Genetic analysis of polymorphisms in biologically relevant candidate genes in patients with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* **41**, S. 1036–1042 (2005).
- [140] Verloes A., Sakalihasan N., Limet R., Koulischer L., Genetic aspects of abdominal aortic aneurysms. *Ann NY Acad Sci* **800**, S. 44–55 (1996).
- [141] Rajavashisth T. B., Liao J. K., Galis Z. S., Tripathi S., Laufs U., Tripathi J. *et al.*, Inflammatory Cytokines and Oxidized Low Density Lipoproteins Increase Endothelial Cell Expression of Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase. *J Biol Chem* **274**, S. 11924–11929 (1999).
- [142] Zhang B., Ye S., Herrmann S.-M., Eriksson P., de Maat M., Evans A. *et al.*, Functional Polymorphism in the Regulatory Region of Gelatinase B Gene in Relation to Severity of Coronary Atherosclerosis. *Circulation* **99**, S. 1788–1794 (1999).
- [143] Price S. J., Greaves D. R., Watkins H., Identification of Novel, Functional Genetic Variants in the Human Matrix Metalloproteinase-2 Gene. *J Biol Chem* **276**, S. 7549–7558 (2001).

- [144] Yu C., Zhou Y., Miao X., Xiong P., Tan W., Lin D., Functional Haplotypes in the Promoter of Matrix Metalloproteinase-2 Predict Risk of the Occurrence and Metastasis of Esophageal Cancer. *Cancer Res* **64**, S. 7622–7628 (2004).
- [145] Seitzman R. L., Mahajan V. B., Mangione C., Cauley J. A., Ensrud K. E., Stone K. L. *et al.*, Estrogen Receptor Alpha and Matrix Metalloproteinase 2 Polymorphisms and Age-related Maculopathy in Older Women. *Am J Epidemiol* **167**, S. 1217–1225 (2008).
- [146] Ries C., Egea V., Karow M., Kolb H., Jochum M., Neth P., MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood* **109**, S. 4055–4063 (2007).
- [147] Unemori E. N., Hibbs M. S., Amento E. P., Constitutive Expression of a 92-kD Gelatinase (Type V Collagenase) by Rheumatoid Synovial Fibroblasts and Its Induction in Normal Human Fibroblasts by Inflammatory Cytokines. *J Clin Invest* **88**, S. 1656–1662 (1991).
- [148] Beránek M., Kolar P., Tschoplova S., Kankova K., Vasku A., Genetic variations and plasma levels of gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) and gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) in proliferative diabetic retinopathy. *Molecular Vision* **14**, S. 1114–1121 (2008).
- [149] Deryugina E. I. und Quigley J. P., Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **25**, S. 9–34 (2006).
- [150] Bergers G., Brekken R., McMahon G., Vu T. H., Itoh T., Tamaki K. *et al.*, Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* **2**, S. 737–744 (2000).
- [151] Schönbeck U., Mach F., Libby P., Generation of biologically active IL-1 β by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 β processing. *J Immunol* **161**, S. 3340–3346 (1998).
- [152] Grandas O. H., Mountain D. H., Kirkpatrick S. S., Cassada D. C., Stevens S. L., Freeman M. B., Goldman M. H., Regulation of vascular smooth muscle cell expression and function of matrix metalloproteinases is mediated by estrogen and progesterone exposure. *J Vasc Surg* **49**, S. 185–191 (2009).
- [153] Knäuper V., Will H., López-Otin C., Smith B., Atkinson S. J., Stanton H. *et al.*, Cellular Mechanisms for Human Procollagenase-3 (MMP-13) Activation. *J Biol Chem* **271**, S. 17124–17131 (1996).
- [154] Saitoh W., Sakamoto T., Hegab A. E., Nomura A., Ishii Y., Morishima Y. *et al.*, MMP14 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Mol Med* **17**, S. 621–626 (2006).
- [155] Bai G., Howell D. S., Howard G. A., Roos B. A., Cheung H. S., Basic calcium phosphate crystals up-regulate metalloproteinases but down-regulate tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in human fibroblasts. *Osteoarthr Cartilage* **9**, S. 416–422 (2001).
- [156] Wang X., Tromp G., Cole C. W., Verloes A., Sakalihasan N., Yoon S., Kuivaniemi H., Analysis of coding sequences for tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP1) and 2 (TIMP2) in patients with aneurysms. *Matrix Biol* **18**, S. 121–124 (1999).

- [157] Agrawal N., Dasaradhi P. V., Mohammed A., Malhotra P., Bhatnagar R. K., Mukherjee S. K., RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, S. 657–685 (2003).
- [158] Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C., Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, S. 744–745 (1998).
- [159] Abraham N., Stojdl D. F., Duncan P. I., Méthot N., Ishii T., Dubé M. *et al.*, Characterization of transgenic mice with targeted disruption of the catalytic domain of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *J Biol Chem* **274**, S. 5953–5962 (1999).
- [160] Elbashir S. M., Lendeckel W., Tuschl T., RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**, S. 188–200 (2001).
- [161] Martinez J., Patkaniowska A., Urlaub H., Lührmann R., Tuschl T., Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **110**, S. 563–574 (2002).
- [162] Schwarz D. S., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N., Zamore P. D., Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, S. 199–208 (2003).
- [163] Hammond S. M., Bernstein E., Beach D., Hannon G. J., An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, S. 293–296 (2000).
- [164] Lee K. M., Choi K. H., Ouellette M. M., Use of exogenous hTERT to immortalize primary human cells. *Cytotechnology* **45**, S. 33–38 (2004).
- [165] Bodnar A. G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S. E., Chiu C. P., Morin G. B. *et al.*, Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, S. 349–352 (1998).
- [166] Morales C. P., Holt S. E., Ouellette M., Kaur K. J., Yan Y., Wilson K. S. *et al.*, Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat Genet* **21**, S. 115–118 (1999).
- [167] Jiang X. R., Jimenez G., Chang E., Frolkis M., Kusler B., Sage M. *et al.*, Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nat Genet* **21**, S. 111–114 (1999).
- [168] Livak K. J. und Schmittgen T. D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ Method. *Methods* **25**, S. 402–408 (2001).
- [169] Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F., Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**, research0034.1-0034.11 (2002).
- [170] Hendig D., Langmann T., Kocken S., Zarbock R., Szliska C., Schmitz G. *et al.*, Gene expression profiling of ABC transporters in dermal fibroblasts of pseudoxanthoma elasticum patients identifies new candidates involved in PXE pathogenesis. *Lab Invest* **88**, S. 1303–1315 (2008).
- [171] Ambrosius M., Kleesiek K., Götting C., Quantitative determination of the glycosaminoglycan Delta-disaccharide composition of serum, platelets and granulocytes by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* **1201**, S. 54–60 (2008).

- [172] Barrett J. C., Fry B., Maller J., Daly M. J., Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**, S. 263–265 (2005).
- [173] Newton C. R., Graham A., Heptinstall L. E., Powell S. J., Summers C., Kalsherker N. *et al.*, Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucl Acids Res* **17**, S. 2503–2516 (1989).
- [174] International HapMap Consortium, The International HapMap Project. *Nature* **426**, S. 789–796 (2003).
- [175] Haines J. L., Schnetz-Boutaud N., Schmidt S., Scott W. K., Agarwal A., Postel E. A. *et al.*, Functional Candidate Genes in Age-Related Macular Degeneration: Significant Association with VEGF, VLDLR, and LRP6. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, S. 329–335 (2006).
- [176] Dimri G. P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C. *et al.*, A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, S. 9363–9367 (1995).
- [177] Flavell S. J., Hou T. Z., Lax S., Filer A., Salmon M., Buckley C. D., Fibroblasts as novel therapeutic targets in chronic inflammation. *Br J Pharmacol* **153**, S. 241–246 (2008).
- [178] Pfaffl M. W., A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. *Nucl Acids Res* **29**, S. 2002–2007 (2001).
- [179] Huggett J., Dheda K., Zumla A., Real-time RT-PCR normalization: strategies and considerations. *Genes Immun* **6**, S. 279–284 (2005).
- [180] Pfaffl M. W., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T. P., Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* **26**, S. 509–515 (2004).
- [181] Dheda K., Huggett J. F., Bustin S. A., Johnson M. A., Rook G., Zumla A., Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques* **37**, S. 112–119 (2004).
- [182] Rinn J. L., Bondre C., Gladstone H. B., Brown P. O., Chang H. Y., Anatomic Demarcation by Positional Variation in Fibroblast Gene Expression Programs. *PLoS Genetics* **2**, S. 1084–1096 (2006).
- [183] Chang H. Y., Chi J.-T., Dudoit S., Bondre C., van de Rijn M., Botstein D., Brown P. O., Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, S. 12877–12882 (2002).
- [184] Gardner H., Shearstone J. R., Bandaru R., Cromwell T., Lynes M., Trojanowska M. *et al.*, Gene Profiling of Scleroderma Skin Reveals Robust Signatures of Disease That Are Imperfectly Reflected in the Transcript Profiles of Explanted Fibroblasts. *Arthritis Rheum* **54**, S. 1961–1973 (2006).
- [185] Krieg T., Perlish J. S., Fleischmajer R., Braun-Falco O., Collagen synthesis in scleroderma: selection of fibroblast populations during subcultures. *Arch Dermatol Res* **277**, S. 373–376 (1985).
- [186] Davis E. C., Blattel S. A., Mecham R. P., Remodeling of elastic fiber components in scleroderma skin. *Connect Tissue Res* **40**, S. 113–121 (1990).

- [187] Pannu J. und Trojanowska M., Recent advances in fibroblast signaling and biology in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* **16**, S. 739–745 (2004).
- [188] Smith T. J., Sempowski G. D., Wang H.-S., Del Vecchio P. J., Lippe S. D., Phipps R. P., Evidence for Cellular Heterogeneity in Primary Cultures of Human Orbital Fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* **80**, S. 2620–2625 (1995).
- [189] Parsonage G., Falciani F., Burman A., Filer A., Ross E., Bofill M. *et al.*, Global gene expression profiles in fibroblasts from synovial, skin and lymphoid tissue reveals distinct cytokine and chemokine expression patterns. *Thromb Haemost* **90**, S. 688–697 (2003).
- [190] Carrino D. A., Sorrell D. A., Caplan A. I., Age-related Changes in the Proteoglycans of Human Skin. *Arch Biochem Biophys* **373**, S. 91–101 (2000).
- [191] Fischer J. W., Steiz S., Johnson P., Burke A., Kolodgie F., Virmani R. *et al.*, Decorin Promotes Aortic Smooth Muscle Cell Calcification and Colocalizes to Calcified Regions in Human Atherosclerotic Lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, S. 2391–2396 (2004).
- [192] Kähäri V. M., Larjava H., Uitto J., Differential regulation of extracellular matrix proteoglycan (PG) gene expression. *J Biol Chem* **266**, S. 10608–10615 (1991).
- [193] Mochida Y., Parisuthiman D., Yamauchi M., Biglycan is a positive modulator of BMP-2 induced osteoblast differentiation. *Adv Exp Med Biol* **585**, S. 101–113 (2006).
- [194] Pasquali-Ronchetti I., Volpin D., Baccarani-Contri M., Castellani I., Peserico A., Pseudoxanthoma elasticum. Biochemical and ultrastructural studies. *Dermatologica* **163**, S. 307–325 (1981).
- [195] Lebowitz M., Schwartz E., Lemlich G., Lovelace O., Shaikh-Bahai F., Fleischmajer R., Abnormalities of connective tissue components in lesional and non-lesional tissue of patients with pseudoxanthoma elasticum. *Arch Dermatol Res* **285**, S. 121–126 (1993).
- [196] Trebault A., Chan E. K., Midwood K. S., Regulation of fibroblast migration by tenascin-C. *Biochem Soc Trans* **35**, S. 695–697 (2007).
- [197] Vyavahare N., Jones P. L., Tallapragada S., Levy R. J., Inhibition of Matrix Metalloproteinase Activity Attenuates Tenascin-C Production and Calcification of Implanted Purified Elastin in Rats. *Am J Pathol* **157**, S. 885–893 (2000).
- [198] Bailey M., Pillarisetti S., Jones P., Xiao H., Simionescu D., Vyavahare N., Involvement of matrix metalloproteinases and tenascin-C in elastin calcification. *Cardiovasc Pathol* **13**, S. 146–155 (2004).
- [199] Schön S., Prante C., Bahr C., Kuhn J., Kleesiek K., Götting C., Cloning and recombinant expression of active full-length xylosyltransferase I (XT-I) and characterization of subcellular localization of XT-I and XT-II. *J Biol Chem* **281**, S. 14224–14231 (2006).
- [200] Ishikawa O., Yamakage A., LeRoy E. C., Trojanowska M., Persistent effect of TGF- β 1 on extracellular matrix gene expression in human dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Comm* **169**, S. 232–238 (1990).

- [201] Hirth A., Skapenko A., Kinne R. W., Emmrich F., Schulze-Koops H., Sack U., Cytokine mRNA and protein expression in primary-culture and repeated-passage synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* **4**, S. 117–125 (2002).
- [202] Pap T., Müller-Ladner U., Gay R. E., Gay S., Fibroblast biology Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* **2**, S. 361–367 (2000).
- [203] Danielsen L., Morphologic changes in pseudoxanthoma elasticum and senile skin. *Int J Dermatol* **21**, S. 449–454 (1982).
- [204] Shelton D. N., Chang E., Whittier P. S., Choi D., Funk W. D., Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol* **9**, S. 939–945 (1999).
- [205] Fazio M. J., Olsen D. R., Kuivaniemi H., Chu M. L., Davidson J. M., Rosenbloom J., Uitto J., Isolation and characterization of human elastin cDNAs, and age-associated variation in elastin gene expression in cultured skin fibroblasts. *Lab Invest* **58**, S. 270–277 (1988).
- [206] Schönherr E., Beavan L. A., Hausser H., Kresse H., Culp L. A., Differences in decorin expression by papillary and reticular fibroblasts in vivo and in vitro. *Biochem J* **290**, S. 893–899 (1993).
- [207] Breen M., Weinstein H. G., Johnson R. L., Veis A., Marshall R. T., Acidic glycosaminoglycans in human skin during fetal development and adult life. *Biochim Biophys Acta* **201**, S. 54–60 (1970).
- [208] Takeda K., Gosiewska A., Peterkofsky B., Similar, but not identical, modulation of expression of extracellular matrix components during in vitro and in vivo aging of human skin fibroblasts. *J Cell Physiol* **153**, S. 450–459 (1992).
- [209] Bartold P. M., Boyd R. R., Page R. C., Proteoglycans synthesized by gingival fibroblasts derived from human donors of different ages. *J Cell Physiol* **126**, S. 37–46 (1986).
- [210] Maccari F., Gheduzzi D., Volpi N., Anomalous Structure of Urinary Glycosaminoglycans in Patients with Pseudoxanthoma Elasticum. *Clin Chem* **49**, S. 380–388 (2003).
- [211] Gheduzzi D., Guerra D., Bochicchio B., Pepe A., Tamburro A. M., Quaglino D. *et al.*, Heparan sulphate interacts with tropoelastin, with some tropoelastin peptides and is present in human dermis elastic fibers. *Matrix Biol* **24**, S. 15–25 (2005).
- [212] Tu Y. und Weiss A. S., Transient tropoelastin nanoparticles are early-stage intermediates in the coacervation of human tropoelastin whose aggregation is facilitated by heparan sulfate and heparin decasaccharides. *Matrix Biol* (2009).
- [213] Stern R., Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur J Cell Biol* **83**, S. 317–325 (2004).
- [214] Campo G. M., D'Ascola A., Avenoso A., Campo S., Ferlazzo A. M., Micali C. *et al.*, Glycosaminoglycans reduce oxidative damage induced by copper, iron and hydrogen peroxide in human fibroblast cultures. *Glycoconj J* **20**, S. 133–141 (2004).
- [215] Campo G. M., Avenoso A., D'Ascola A., Campo S., Am Ferlazzo, Samà D., Calatroni A., Purified human plasma glycosaminoglycans limit oxidative injury induced by iron plus ascorbate in skin fibroblast cultures. *Toxicol In Vitro* **19**, S. 561–572 (2005).

- [216] Campo G. M., Avenoso A., Campo S., D'Ascola A., Ferlazzo A. M., Samà D., Calatroni A., Purified human chondroitin-4-sulfate reduced MMP/TIMP imbalance induced by iron plus ascorbate in human fibroblast cultures. *Cell Biol Int* **30**, S. 21–30 (2006).
- [217] Diekmann U., Zarbock R., Hendig D., Szliska C., Kleesiek K., Götting C., Elevated circulating levels of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in pseudoxanthoma elasticum patients. *J Mol Med* **87**, S. 965–970 (2009).
- [218] Vasků A., Goldbergová M., Izakovicová Hollá L., Sisková L., Groch L., Beránek M. *et al.*, A haplotype constituted of four MMP-2 promoter polymorphisms (-1575G/A, -1306C/T, -790T/G and -735C/T) is associated with coronary triple-vessel disease. *Matrix Biol* **22**, S. 585–591 (2004).
- [219] Jones G. T., Phillips V. L., Harris E. L., Rossaak J. I., van Rij A. M., Functional matrix metalloproteinase-9 polymorphism (C-1562T) associated with abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* **38**, S. 1363–1367 (2003).
- [220] Lommatzsch A., Management of choroidal vascularisation. *Br J Ophthalmol* **92**, S. 445–446 (2008).
- [221] Kliffen M., Sharma H. S., Mooy C. M., Kerkvliet S., de Jong P. T. V. M., Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy. *Br J Ophthalmol* **81**, S. 154–162 (1997).
- [222] Suganthalakshmi B., Anand R., Kim R., Mahalakshmi R., Karthikprakash S., Namperumalsamy P., Sundaresan P., Association of VEGF and eNOS gene polymorphisms in type 2 diabetic retinopathy. *Mol Vis* **12**, S. 336–341 (2006).
- [223] Ray D., Mishra M., Ralph S., Read I., Davies R., Brenchley P., Association of the VEGF Gene With Proliferative Diabetic Retinopathy But Not Proteinuria in Diabetes. *Diabetes* **53**, S. 861–864 (2004).
- [224] Beatty S., Koh H.-H., Henson D., Boulton M., The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration. *Surv Ophthalmol* **45**, S. 115–134 (2000).
- [225] Klein R., Klein B. E., Linton K. L., Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* **99**, S. 933–943 (1992).
- [226] Vingerling J. R., Dielemans I., Hofman A., Grobbee D. E., Hijmering M., Kramer C. F. L., de Jong P. T. V. M., The prevalence of age-related maculopathy in the Rotterdam Study. *Ophthalmology* **102**, S. 205–210 (1995).
- [227] Spaide R. F., Armstrong D., Browne R., Choroidal Neovascularization in age-related macular degeneration—what is the cause. *Retina* **23**, S. 595–614 (2003).
- [228] Lambrechts D., Storkebaum E., Morimoto M., Del-Favero J., Desmet F., Marklund S. L. *et al.*, VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic cell death. *Nat Genet* **34**, S. 383–394 (2003).
- [229] Johnson L. V. und Anderson D. H., Age-Related Macular Degeneration and the Extracellular Matrix. *N Engl J Med* **351**, S. 320–322 (2004).
- [230] Stone E. M., Braun T. A., Russell S. R., Kuehn M. H., Lotery A. J., Moore P. A. *et al.*, Missense Variations in the Fibulin 5 Gene and Age-Related Macular Degeneration. *N Engl J Med* **351**, S. 346–353 (2004).

- [231] Spraul C. W., Lang G. E., Grossniklaus H. E., Lang G. K., Charakteristika von Drusen und Veränderungen der Bruch-Membran in Augen mit altersabhängiger Makuladegeneration. Histologische Studie. *Der Ophthalmologe* **95**, S. 73–79 (1998).
- [232] Davis W. L., Jones R. G., Hagler H. K., An electron microscopic histochemical and analytical X-ray microprobe study of calcification in Bruch's membrane from human eyes. *J Histochem Cytochem* **29**, S. 601–608 (1981).
- [233] Chau K. Y., Sivaprasad S., Patel N., Donaldson T. A., Luthert P. J., Chong N. V., Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 and -9 (MMP-2 and MMP-9) in age-related macular degeneration. *Eye* **21**, S. 1511–1515 (2007).
- [234] Kuroki M., Voest E. E., Amano S., Beerepoot L. V., Takashima S., Tolentino M. *et al.*, Reactive Oxygen Intermediates Increase Vascular Endothelial Growth Factor Expression In Vitro and In Vivo. *J Clin Invest* **98**, S. 1667–1675 (1996).
- [235] Tayebjee M. H., Tan K. T., MacFadyen R. J., Lip G. Y. H., Abnormal circulating levels of metalloprotease 9 and its tissue inhibitor 1 in angiographically proven peripheral arterial disease: relationship to disease severity. *J Intern Med* **257**, S. 110–116 (2005).
- [236] Tayebjee M. H., Lip G. Y., MacFadyen R. J., Matrix metalloproteinases in coronary artery disease: clinical and therapeutic implications and pathological significance. *Curr Med Chem* **12**, S. 917–925 (2005).
- [237] Tayebjee M. H., Nadar S., Blann A. D., Gareth Beevers D., MacFadyen R. J., Lip G. Y., Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hypertension and their relationship to cardiovascular risk and treatment: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT). *Am J Hypertens* **17**, S. 764–769 (2004).
- [238] Matsunaga T., Abe N., Kameda K., Hagii J., Fujita N., Onodera H. *et al.*, Circulating level of gelatinase activity predicts ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* **105**, S. 203–208 (2005).
- [239] Basalyga D. M., Simionescu D. T., Xiong W., Baxter B. T., Starcher B. C., Vyavahare N. R., Elastin Degradation and Calcification in an Abdominal Aorta Injury Model. Role of Matrix Metalloproteinases. *Circulation* **110**, S. 3480–3487 (2004).
- [240] Schwartz E., Cruickshank F. A., Lebwohl M. G., Elastase-like protease and elastolytic activities expressed in cultured dermal fibroblasts derived from lesional skin of patients with pseudoxanthoma elasticum, actinic elastosis, and cutis laxa. *Clin Chim Acta* **176**, S. 219–224 (1988).
- [241] Kameda K., Matsunaga T., Abe N., Hanada H., Ishizaka H., Ono H. *et al.*, Correlation of oxidative stress with activity of matrix metalloproteinase in patients with coronary artery disease. Possible role for left ventricular remodelling. *Eur Heart J* **24**, S. 2180–2185 (2003).
- [242] Simionescu A., Simionescu D. T., Vyavahare N. R., Osteogenic Responses in Fibroblasts Activated by Elastin Degradation Products and Transforming Growth Factor- β 1. Role of Myofibroblasts in Vascular Calcification. *Am J Pathol* **171**, S. 116–123 (2007).
- [243] Wingrove C. S., Garr E., Godsland I. F., Stevenson J. C., 17β -oestradiol enhances release of matrix metalloproteinase-2 from human vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* **1406**, S. 169–174 (1998).

- [244] Rangaswami H., Bulbule A., Kundu G. C., Nuclear Factor-inducing Kinase Plays a Crucial Role in Osteopontin-induced MAPK/I κ B α Kinase-dependent Nuclear Factor κ B-mediated Promatrix Metalloproteinase-9 Activation. *J Biol Chem* **279**, S. 38921–38935 (2004).
- [245] Lai C.-F., Seshadri V., Huang K., Shao J.-S., Cai J., Vattikuti R. *et al.*, An Osteopontin–NADPH Oxidase Signaling Cascade Promotes Pro–Matrix Metalloproteinase 9 Activation in Aortic Mesenchymal Cells. *Circ Res* **98**, S. 1479–1489 (2006).
- [246] Scatena M., Liaw L., Giachelli C. M., Osteopontin. A Multifunctional Molecule Regulating Chronic Inflammation and Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, S. 2302–2309 (2007).
- [247] Han S., Ritzenthaler J. D., Sitaraman S. V., Roman J., Fibronectin increases matrix metalloproteinase 9 expression through activation of c-Fos via extracellular-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in human lung carcinoma cells. *J Biol Chem* **281**, S. 29614–29624 (2006).
- [248] Tintut Y., Patel J., Territo M., Saini T., Parhami F., Demer L. L., Monocyte/Macrophage Regulation of Vascular Calcification In Vitro. *Circulation* **105**, S. 650–655 (2002).
- [249] Funk W. D., Wang C. K., Shelton D. N., Harley C. B., Pagon G. D., Hoeffler W. K., Telomerase Expression Restores Dermal Integrity to in Vitro-Aged Fibroblasts in a Reconstituted Skin Model. *Exp Cell Res* **258**, S. 270–278 (2000).
- [250] Kurz D. J., Decary S., Hong Y., Trivier E., Akhmedov A., Erusalimsky J. D., Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci* **117**, S. 2417–2426 (2004).
- [251] Pfaffl M. W., Realtime RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA-Quantifizierung. *BIOspektrum* (2004).
- [252] Weilke C., Brinkmann T., Kleesiek K., Determination of xylosyltransferase activity in serum with recombinant human bikunin as acceptor. *Clin Chem* **43**, S. 45–51 (1997).
- [253] Mita K., Ichimura S., James T. C., Highly repetitive structure and its organization of the silk fibroin gene. *J Mol Evol* **38**, S. 583–592 (1994).

9. Publikationen und Präsentationen

9.1. Publikationen

Diekmann, U., **Zarbock, R.**, Hendig, D., Szliska, C., Kleesiek, K., Götting, C., Elevated circulating levels of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in pseudoxanthoma elasticum patients. *J Mol Med* **87**, S. 965-970 (2009).

Zarbock, R., Hendig, D., Szliska, C., Kleesiek, K., Götting, C., Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms as prognostic markers for ocular manifestations in pseudoxanthoma elasticum. *Hum Mol Genet* **18**, S. 3344-3351 (2009).

Hendig, D., Langmann, T., **Zarbock, R.**, Schmitz, G., Kleesiek, K., Götting, C., Characterization of the ATP-binding cassette transporter gene expression profile in Y79: a retinoblastoma cell line. *Mol Cell Biochem* **328**, S. 85-92 (2009).

Hendig, D., Langmann, T., Kocken, S., **Zarbock, R.**, Szliska, C., Schmitz, G., Kleesiek, K., Götting, C., Gene expression profiling of ABC transporters in dermal fibroblasts of pseudoxanthoma elasticum patients identifies new candidates involved in PXE pathogenesis. *Lab Invest* **88**, S. 1303-1315 (2008).

Götting, C., Hendig, D., **Zarbock, R.**, Szliska, C., Kleesiek, K., Complement factor H variant p.Y402H in pseudoxanthoma elasticum patients. *Genet Test* **12**, S. 431-436 (2008).

Hendig, D., Adam, A., **Zarbock, R.**, Szliska, C., Kleesiek, K., Götting, C., Elevated serum levels of intercellular adhesion molecule ICAM-1 in Pseudoxanthoma elasticum. *Clin Chim Acta* **394**, S. 54-58 (2008).

Hendig, D., **Zarbock, R.**, Szliska, C., Kleesiek, K., Götting, C., The local calcification inhibitor matrix Gla protein in pseudoxanthoma elasticum. *Clin Biochem* **41**, S. 407-412 (2008).

Zarbock, R., Hendig, D., Szliska, C., Kleesiek, K., Götting, C., Pseudoxanthoma elasticum: genetic variations in antioxidant genes are risk factors for early disease onset. *Clin Chem* **53**, S. 1734-1740 (2007).

9.2. Kongressbeiträge

Zarbock, R., Diekmann, U., Hendig, D., Szliska C., Kleesiek, K., Götting, C., Monitoring of extracellular matrix remodeling in Pseudoxanthoma elasticum by measurement of serum matrix metalloproteinases. 6. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL). 7.–10. Oktober 2009, Leipzig, Germany.

Zarbock, R., Diekmann, U., Hendig, D., Szliska C., Kleesiek, K., Götting, C., Matrix metalloproteinases as markers of tissue remodeling in Pseudoxanthoma elasticum. Euromedlab Innsbruck 2009, 18th IFCC – EFCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.

Zarbock, R., Hendig, D., Szliska C., Kleesiek, K., Götting, C., VEGF gene polymorphisms as a prognostic marker for ocular manifestations in pseudoxanthoma elasticum. 5. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL). 21.–24. September 2008, Mannheim, Germany.

Zarbock, R., Hendig, D., Szliska C., Kleesiek, K., Götting, C., Pseudoxanthoma elasticum: genetic variations in antioxidant genes are risk factors for early disease onset. Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Vienna, Austria, September 2007. Clin. Chem. Lab. Med. 45(8): A101: P12.

Hendig, D., Langmann, T., Kocken, S., **Zarbock, R.**, Szliska, C., Schmitz, G., Kleesiek, K., Götting C., Gene expression profile of ATP-binding cassette superfamily members in dermal fibroblasts from pseudoxanthoma elasticum patients. Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Vienna, Austria, September 2007. Clin. Chem. Lab. Med. 45(8): A97: V16.

Hendig, D., **Zarbock, R.**, Szliska, C., Kleesiek, K., Götting, C., Implication of systemic and local calcification inhibitor proteins in the pathogenesis of Pseudoxanthoma elasticum. Gordon Research Conference - Elastin and elastic fibers. University of New England, Biddeford, ME, USA, July - August 2007.

10. Anhang

Tabelle 10-1: Stoffmengen von CS- Δ -Disacchariden und Δ di-0S_{HA} im Zellkulturüberstand von transfizierten Fibroblasten.

Spender		Δ -Disaccharide (48 h) ^a	P ^b	Δ -Disaccharide (96 h) ^a	P ^b	Δ -Disaccharide (168 h) ^a	P ^b
CS-Δ-Disaccharide gesamt							
F42A	siRNA	682 ± 40,3	0,952	683 ± 53,4	0,526	816 ± 21,9	0,0123
	siNK	684 ± 37,1		704 ± 35,0		704 ± 59,9	
M45D	siRNA	305 ± 23,2	0,0948	361 ± 12,0	0,289	332 ± 73,7	0,270
	siNK	386 ± 55,1		352 ± 5,98		379 ± 22,1	
M56D	siRNA	577 ± 49,3	0,294	639 ± 11,0	0,402	584 ± 14,1	0,419
	siNK	615 ± 28,7		676 ± 47,5		605 ± 47,6	
P52M	siRNA	330 ± 9,94	0,425	360 ± 37,8	0,499	411 ± 32,0	0,575
	siNK	308 ± 48,7		377 ± 13,3		398 ± 30,4	
P59M	siRNA	580 ± 28,5	0,174	590 ± 14,6	0,0521	588 ± 74,1	0,162
	siNK	531 ± 53,4		616 ± 11,4		662 ± 8,35	
P63F	siRNA	711 ± 30,0	0,229	691 ± 33,0	0,310	703 ± 40,4	0,130
	siNK	757 ± 47,6		726 ± 37,4		745 ± 21,2	
Adi-mono4S_{CS}							
F42A	siRNA	138 ± 16,3	0,7337	166 ± 41,9	0,3633	257 ± 9,54	0,0760
	siNK	135 ± 11,1		142 ± 25,2		234 ± 16,9	
M45D	siRNA	96,1 ± 15,0	0,2088	133 ± 9,71	0,1163	162 ± 3,98	0,0346
	siNK	120 ± 23,0		122 ± 7,65		146 ± 6,44	
M56D	siRNA	136 ± 21,5	0,1129	191 ± 6,49	0,1447	186 ± 3,31	0,1134
	siNK	161 ± 5,92		141 ± 43,1		172 ± 12,5	
P52M	siRNA	109 ± 6,05	0,8078	138 ± 12,7	0,8552	169 ± 13,5	0,7284
	siNK	107 ± 14,6		140 ± 9,91		164 ± 18,7	
P59M	siRNA	159 ± 7,87	0,1746	162 ± 11,2	0,0675	202 ± 22,4	0,0920
	siNK	138 ± 25,2		179 ± 5,33		233 ± 9,20	
P63F	siRNA	181 ± 15,5	0,0615	138 ± 11,7	0,1368	156 ± 9,13	0,0016
	siNK	209 ± 10,1		160 ± 18,7		191 ± 5,86	
Adi-mono2S_{CS}							
F42A	siRNA	147 ± 12,5	0,841	149 ± 14,7	0,381	131 ± 6,23	0,779
	siNK	149 ± 12,6		156 ± 4,52		132 ± 5,41	
M45D	siRNA	16,9 ± 0,379	0,256	18,2 ± 0,655	0,192	23,0 ± 1,01	0,742
	siNK	19,0 ± 2,70		19,0 ± 0,834		24,5 ± 5,62	
M56D	siRNA	19,8 ± 1,08	0,324	22,2 ± 0,507	0,633	24,3 ± 4,89	0,336
	siNK	20,6 ± 0,761		21,3 ± 1,49		21,2 ± 0,376	
P52M	siRNA	16,4 ± 0,312	0,0493	17,0 ± 0,496	0,0144	19,7 ± 0,784	0,384
	siNK	19,0 ± 2,10		18,6 ± 0,703		20,2 ± 0,751	
P59M	siRNA	20,1 ± 3,09	0,854	25,0 ± 3,50	0,199	23,8 ± 1,97	0,559
	siNK	20,4 ± 1,60		21,8 ± 1,21		22,5 ± 0,523	
P63F	siRNA	137 ± 3,55	0,533	162 ± 14,8	0,365	157 ± 3,25	0,125
	siNK	136 ± 1,57		147 ± 24,3		152 ± 3,66	

<i>Spender</i>		<i>A-Disaccharide (48 h)^a</i>	<i>P^b</i>	<i>A-Disaccharide (96 h)^a</i>	<i>P^b</i>	<i>A-Disaccharide (168 h)^a</i>	<i>P^b</i>
<i>Adi-mono6S_{CS}</i>							
F42A	siRNA	274 ± 3,43	0,504	269 ± 28,5	0,471	312 ± 10,5	0,111
	siNK	280 ± 15,7		282 ± 15,7		273 ± 40,0	
M45D	siRNA	120 ± 5,38	0,275	128 ± 1,15	0,0837	130 ± 8,35	0,819
	siNK	135 ± 19,5		121 ± 6,62		132 ± 10,2	
M56D	siRNA	289 ± 23,5	0,879	283 ± 0,13	0,276	246 ± 16,5	0,196
	siNK	292 ± 30,2		268 ± 14,8		270 ± 26,7	
P52M	siRNA	129 ± 4,34	0,737	117 ± 14,7	0,195	146 ± 12,2	0,0656
	siNK	126 ± 11,3		130 ± 2,26		131 ± 5,70	
P59M	siRNA	259 ± 23,1	0,335	260 ± 0,93	0,0463	232 ± 44,7	0,262
	siNK	245 ± 13,5		274 ± 8,22		266 ± 4,65	
P63F	siRNA	291 ± 12,0	0,953	298 ± 16,1	0,363	297 ± 16,0	0,266
	siNK	290 ± 38,0		310 ± 1,25		287 ± 4,85	
<i>Adi-0S_{CS}</i>							
F42A	siRNA	123 ± 16,7	0,845	130 ± 6,79	0,603	117 ± 12,1	0,613
	siNK	121 ± 15,4		124 ± 15,2		112 ± 9,80	
M45D	siRNA	72,0 ± 11,7	0,182	81,5 ± 3,13	0,740	75,9 ± 0,869	0,970
	siNK	88,1 ± 12,9		80,4 ± 5,41		76,2 ± 10,3	
M56D	siRNA	132 ± 13,4	0,392	143 ± 5,04	0,302	131 ± 9,35	0,202
	siNK	141 ± 10,2		131 ± 12,1		141 ± 6,17	
P52M	siRNA	76,1 ± 4,56	0,289	88,5 ± 10,5	0,941	76,1 ± 7,52	0,453
	siNK	66,5 ± 15,9		88,9 ± 1,69		81,8 ± 12,0	
P59M	siRNA	141 ± 9,23	0,282	141 ± 7,70	0,933	130 ± 12,2	0,226
	siNK	131 ± 14,3		141 ± 5,15		141 ± 3,27	
P63F	siRNA	101 ± 12,1	0,051	93,6 ± 11,0	0,155	92,7 ± 26,5	0,220
	siNK	123 ± 6,16		109 ± 6,88		115 ± 16,7	
<i>Adi-0S_{HA}</i>							
F42A	siRNA	144 ± 8,68	0,1926	182 ± 33,3	0,1379	183 ± 15,6	0,2694
	siNK	154 ± 10,6		153 ± 5,35		168 ± 16,2	
M45D	siRNA	142 ± 11,1	0,0181	225 ± 12,4	0,0098	232 ± 18,5	0,3608
	siNK	195 ± 8,23		289 ± 31,7		281 ± 62,8	
M56D	siRNA	101 ± 14,9	0,0516	86,9 ± 0,477	0,1218	196 ± 15,1	0,5627
	siNK	126 ± 8,16		92,3 ± 3,38		203 ± 9,13	
P52M	siRNA	121 ± 14,8	0,6726	217 ± 10,4	0,0043	218 ± 24,9	0,2148
	siNK	111 ± 39,4		275 ± 20,8		285 ± 93,7	
P59M	siRNA	294 ± 31,1	0,1002	497 ± 27,0	0,0002	645 ± 22,5	0,0006
	siNK	243 ± 42,0		338 ± 8,97		468 ± 22,4	
P63F	siRNA	163 ± 1,77	0,0039	161 ± 2,84	0,0372	157 ± 3,90	0,6520
	siNK	175 ± 3,15		170 ± 4,18		158 ± 2,63	

^a Mittelwert [pmol] ± Standardabweichung

^b t-Test für die Gleichheit der Mittelwerte

Tabelle 10-2: Stoffmengen von HS- Δ -Disacchariden im Zellkulturüberstand von transfizierten Fibroblasten.

Spender		<i>A</i> -Disaccharide (48 h) ^a	<i>P</i> ^b	<i>A</i> -Disaccharide (96 h) ^a	<i>P</i> ^b	<i>A</i> -Disaccharide (168 h) ^a	<i>P</i> ^b
HS-<i>A</i>-Disaccharide gesamt							
F42A	siRNA siNK	188 ± 14,7 186 ± 5,74	0,757	190 ± 4,81 179 ± 8,20	0,295	193 ± 8,87 190 ± 8,03	0,665
M45D	siRNA siNK	195 ± 5,43 183 ± 11,2	0,105	202 ± 9,00 205 ± 0,826	0,600	219 ± 4,94 205 ± 9,60	0,0326
M56D	siRNA siNK	216 ± 6,06 201 ± 17,2	0,165	211 ± 21,0 186 ± 24,9	0,165	220 ± 11,6 217 ± 23,9	0,836
P52M	siRNA siNK	202 ± 16,8 198 ± 8,38	0,684	186 ± 4,25 198 ± 12,7	0,126	206 ± 19,9 198 ± 4,42	0,442
P59M	siRNA siNK	199 ± 9,88 186 ± 9,63	0,124	189 ± 13,2 188 ± 9,34	0,886	197 ± 14,8 210 ± 11,0	0,212
P63F	siRNA siNK	180 ± 2,74 189 ± 9,57	0,120	194 ± 12,0 182 ± 2,50	0,101	179 ± 6,38 201 ± 52,5	0,438
<i>Adi-di(2,N)</i>S_{HS}							
F42A	siRNA siNK	10,97 ± 0,301 10,77 ± 0,223	0,404	10,95 ± 0,141 10,97 ± 0,590	0,964	11,24 ± 0,331 11,21 ± 0,525	0,924
M45D	siRNA siNK	12,38 ± 0,395 12,30 ± 0,415	0,812	12,29 ± 0,388 12,14 ± 0,375	0,585	12,22 ± 0,292 12,91 ± 0,784	0,148
M56D	siRNA siNK	12,06 ± 0,734 12,31 ± 0,509	0,700	14,17 ± 2,164 13,70 ± 2,424	0,782	14,07 ± 0,611 13,29 ± 1,035	0,245
P52M	siRNA siNK	12,34 ± 0,410 12,28 ± 0,405	0,825	11,86 ± 0,188 11,95 ± 0,253	0,597	12,69 ± 0,301 12,29 ± 0,202	0,072
P59M	siRNA siNK	12,57 ± 0,810 12,03 ± 0,137	0,233	11,85 ± 0,451 12,06 ± 0,283	0,448	11,40 ± 0,573 11,98 ± 0,627	0,222
P63F	siRNA siNK	11,12 ± 0,190 11,75 ± 0,656	0,114	11,04 ± 0,331 10,80 ± 0,319	0,327	11,32 ± 0,617 10,66 ± 0,224	0,143
<i>Adi-monoN</i>S_{HS}							
F42A	siRNA siNK	34,9 ± 0,449 34,9 ± 0,922	1,000	37,5 ± 1,11 35,1 ± 2,15	0,353	44,9 ± 1,85 39,2 ± 0,868	0,0047
M45D	siRNA siNK	34,9 ± 0,930 33,9 ± 2,29	0,492	33,3 ± 1,05 33,5 ± 1,41	0,807	40,1 ± 2,61 40,1 ± 6,16	0,983
M56D	siRNA siNK	56,6 ± 4,36 45,5 ± 11,5	0,138	48,9 ± 5,95 44,4 ± 6,91	0,361	63,2 ± 4,39 55,0 ± 10,9	0,208
P52M	siRNA siNK	34,5 ± 1,95 34,3 ± 0,756	0,842	34,3 ± 0,977 36,0 ± 1,97	0,159	39,9 ± 3,69 40,7 ± 2,89	0,747
P59M	siRNA siNK	42,6 ± 7,33 34,2 ± 1,35	0,0642	39,2 ± 2,84 37,5 ± 4,48	0,544	47,0 ± 4,45 51,0 ± 5,93	0,312
P63F	siRNA siNK	34,1 ± 0,877 35,2 ± 3,70	0,574	37,0 ± 2,40 36,5 ± 2,19	0,772	38,4 ± 3,33 45,6 ± 8,77	0,175
<i>Adi-di(2,6)</i>S_{HS}							
F42A	siRNA siNK	18,5 ± 0,729 18,2 ± 0,355	0,518	18,3 ± 0,563 18,4 ± 1,16	0,816	18,3 ± 0,589 18,3 ± 0,805	0,894
M45D	siRNA siNK	23,4 ± 0,447 22,7 ± 1,79	0,440	23,8 ± 0,694 23,2 ± 1,04	0,385	23,2 ± 0,692 24,8 ± 1,83	0,150
M56D	siRNA siNK	24,8 ± 1,30 24,3 ± 0,754	0,698	23,2 ± 1,19 21,4 ± 1,82	0,151	25,7 ± 0,848 25,0 ± 3,07	0,687
P52M	siRNA siNK	24,5 ± 1,34 24,1 ± 0,781	0,583	22,0 ± 1,90 22,8 ± 0,932	0,438	25,4 ± 1,50 22,8 ± 1,09	0,0287
P59M	siRNA siNK	22,8 ± 2,23 20,9 ± 0,272	0,131	21,6 ± 1,50 20,8 ± 1,02	0,384	19,9 ± 1,11 21,3 ± 1,60	0,194
P63F	siRNA siNK	18,6 ± 0,321 20,6 ± 1,63	0,0511	18,6 ± 0,579 17,8 ± 1,10	0,236	18,5 ± 0,356 19,4 ± 3,84	0,660

Spender		<i>Δ-Disaccharide</i> (48 h) ^a	<i>P</i> ^b	<i>Δ-Disaccharide</i> (96 h) ^a	<i>P</i> ^b	<i>Δ-Disaccharide</i> (168 h) ^a	<i>P</i> ^b
<i>Δdi-mono6S_{HS}</i>							
F42A	siRNA	21,9 ± 1,38	0,289	24,1 ± 2,13	0,783	26,2 ± 0,861	0,135
	siNK	20,8 ± 1,00		23,6 ± 2,20		23,3 ± 1,19	
M45D	siRNA	24,5 ± 1,71	0,0788	26,5 ± 4,99	0,954	34,1 ± 6,09	0,0535
	siNK	27,0 ± 1,54		26,7 ± 0,577		22,8 ± 7,21	
M56D	siRNA	27,3 ± 1,97	0,127	28,0 ± 6,76	0,547	27,0 ± 2,76	0,579
	siNK	23,9 ± 2,40		24,7 ± 0,801		24,9 ± 4,20	
P52M	siRNA	29,7 ± 1,73	0,221	24,0 ± 2,67	0,773	26,1 ± 4,95	0,939
	siNK	25,8 ± 5,39		25,1 ± 2,38		25,7 ± 1,11	
P59M	siRNA	24,3 ± 3,13	0,806	20,8 ± 6,95	0,728	21,9 ± 7,51	0,0440
	siNK	25,2 ± 6,32		22,6 ± 6,79		31,6 ± 1,14	
P63F	siRNA	26,1 ± 0,687	0,306	22,2 ± 5,18	0,989	24,1 ± 3,15	0,876
	siNK	27,4 ± 2,21		22,2 ± 2,16		24,6 ± 5,10	
<i>Δdi-mono2S_{HS}</i>							
F42A	siRNA	60,7 ± 3,20	0,179	64,2 ± 7,28	0,560	61,4 ± 5,39	0,876
	siNK	65,9 ± 6,03		60,7 ± 8,94		60,8 ± 3,76	
M45D	siRNA	51,4 ± 2,90	0,190	53,7 ± 4,72	0,350	59,3 ± 6,18	0,194
	siNK	48,0 ± 2,99		56,6 ± 3,12		54,3 ± 2,85	
M56D	siRNA	62,5 ± 3,55	0,817	64,2 ± 8,81	0,266	67,4 ± 4,76	0,796
	siNK	63,4 ± 5,47		57,5 ± 6,28		68,7 ± 7,91	
P52M	siRNA	58,0 ± 7,97	0,812	54,7 ± 0,413	0,0718	61,2 ± 3,78	0,165
	siNK	56,8 ± 4,19		58,8 ± 3,75		55,4 ± 6,44	
P59M	siRNA	63,4 ± 2,64	0,303	64,1 ± 1,95	0,550	58,5 ± 4,99	0,240
	siNK	60,1 ± 5,15		62,3 ± 5,54		64,6 ± 7,86	
P63F	siRNA	54,1 ± 2,25	0,492	71,6 ± 14,5	0,215	52,5 ± 4,41	0,0707
	siNK	57,0 ± 7,59		61,2 ± 5,27		62,0 ± 7,45	
<i>Δdi-0S_{HS}</i>							
F42A	siRNA	34,2 ± 1,07	0,745	34,3 ± 2,77	0,409	32,6 ± 1,09	0,293
	siNK	34,7 ± 2,25		36,2 ± 3,50		36,8 ± 7,27	
M45D	siRNA	48,3 ± 4,56	0,0653	51,9 ± 2,19	0,699	50,5 ± 7,19	0,822
	siNK	38,7 ± 6,35		52,6 ± 2,21		49,7 ± 1,73	
M56D	siRNA	32,4 ± 2,17	0,593	32,9 ± 2,96	0,846	32,3 ± 1,47	0,163
	siNK	31,4 ± 1,37		32,4 ± 4,30		30,6 ± 1,63	
P52M	siRNA	42,9 ± 3,75	0,650	39,5 ± 1,71	0,308	46,8 ± 4,32	0,0773
	siNK	44,7 ± 6,09		43,5 ± 6,91		40,7 ± 3,76	
P59M	siRNA	33,0 ± 0,553	0,153	31,4 ± 1,05	0,550	29,4 ± 2,40	0,910
	siNK	33,9 ± 1,03		32,6 ± 3,70		29,7 ± 5,42	
P63F	siRNA	35,9 ± 1,26	0,571	33,2 ± 4,77	0,915	34,6 ± 2,90	0,417
	siNK	36,9 ± 3,24		33,5 ± 2,90		32,8 ± 2,52	

^a Mittelwert [pmol] ± Standardabweichung

^b t-Test für die Gleichheit der Mittelwerte

Curriculum vitae

Ralf Zarbock

Daimlerstr. 4c, 21337 Lüneburg

geboren am 18.07.1977 in Lüneburg

ledig

Berufliche Erfahrung

Seit 01/2007: Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand)
 Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, Herz- und
 Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen in Bad Oeynhausen
 Promotion unter der Leitung von Prof. Dr. med. K. Kleesiek zum Thema
 „Pathobiochemie der extrazellulären Matrix bei *Pseudoxanthoma elasticum*
 (PXE)“

Studium und Ausbildung

10/2003 – 12/2006: Universität Bielefeld
 Diplomstudiengang Biochemie
 Diplomarbeit zum Thema „Detektion genetischer Kofaktoren bei
 Pseudoxanthoma elasticum (PXE) und Analysen zur Genexpression dermalen
 PXE-Fibroblasten“, beurteilt mit der Note „sehr gut“
 Diplom mit der Gesamtnote „sehr gut“

10/2002 – 09/2003: Universität Bielefeld
 Bachelorstudiengang Bioinformatik und Genomforschung

10/2001 – 09/2002: Fernuniversität Hagen
 Diplomstudiengang Volkswirtschaftslehre

08/2001 – 10/2001: Dresdner Bank AG in Hamburg
 Ausbildung zum Bankkaufmann

10/1998 – 09/2001: Universität Hannover
 Diplomstudiengang Biochemie
 Vordiplom mit der Gesamtnote „gut“

Schulbildung

08/1990 – 06/1997: Gymnasium Johanneum in Lüneburg
Abitur mit der Gesamtnote 1,6

08/1988 – 07/1990: Orientierungsstufe Kaltenmoor in Lüneburg

08/1984 – 07/1988: Grundschule Hagen in Lüneburg

Andere Tätigkeiten

11/1997 – 08/1998: Wehrdienst beim Panzeraufklärungslehrbataillon 3 in Lüneburg

Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß §8, Absatz (2) der Promotionsordnung der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe und dass diese Dissertation weder in dieser noch in einer anderen Form einer anderen Fakultät oder Hochschule vorgelegen hat.

Bielefeld, den 22. Dezember 2009

Ralf Zarbock