

Aus dem Institut für Integrative und Experimentelle Genomik
der Universität zu Lübeck

Direktorin: Prof. Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann

**Funktionelle Untersuchung des Gens *Abcc6* und seines
Einflusses auf Verkalkungsprozesse**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von

Ann-Kathrin Sowa

aus Schleswig

Lübeck 2013

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Franz Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 02.06.2014

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 02.06.2014

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

I. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1	Physiologische Verkalkungsmechanismen.....1
1.2	Pathologische Verkalkungsmechanismen.....1
1.2.1	Grundlagen der heterotopen (extraossären) Verkalkung.....1
1.2.2	Dystrophe Verkalkung.....2
1.2.2.1	Arteriosklerose.....2
1.2.2.2	Koronare Herzkrankheit3
1.2.2.3	Dystrophe kardiale Verkalkung im Mausmodell.....4
1.3	Verkalkungsmechanismen <i>in vitro</i>4
1.3.1	Induktion von Verkalkung <i>in vitro</i>5
1.3.1.1	Anorganisches Phosphat.....5
1.3.1.2	BMP2.....6
1.3.1.3	Interleukin-4.....6
1.3.1.4	Wasserstoffperoxid.....6
1.3.1.5	Physikalische Stimuli.....7
1.3.2	Inhibition von Verkalkung.....7
1.3.2.1	Osteopontin.....7
1.3.2.2	Matrix GLA Protein.....8
1.3.2.3	Fetuin-A.....8
1.4	Identifikation eines <i>Dyscalc1</i> -Locus für Verkalkung.....9
1.5	Ultrafine mapping des <i>Dyscalc1</i> -Locus.....10
1.6	Identifikation des Gens <i>Abcc6</i>11
1.7	Das Gen <i>Abcc6</i>12
1.8	Pseudoxanthoma elasticum und das Gen <i>Abcc6</i> beim Menschen.....13
1.9	Zielsetzung und Fragestellung der Doktorarbeit.....14
2. Material und Methoden.....	15
2.1 Material.....	15
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....15
2.1.2	Labormaterialien.....16
2.1.3	Geräte.....17
2.1.4	Größenstandards.....19
2.1.4.1	DNA-Längenstandards.....19
2.1.4.2	Proteingrößenstandards.....19
2.1.5	Biologisches Material.....19
2.1.5.1	Bakterienstämme.....19
2.1.5.2	Zelllinien.....19
2.1.5.2.1	C3H10T1/2 Zellen.....19
2.1.5.2.2	HEK-Zellen20
2.1.5.3	Kulturmedien.....20
2.1.5.3.1	Medien zur Anzucht von <i>Escherichia coli</i>20
2.1.5.3.2	Medien zur Anzucht eukaryotischer Zelllinien.....21
2.1.5.4	Enzyme.....21
2.1.5.5	Inhibitoren.....22
2.1.5.6	Antikörper.....22
2.1.5.7	Oligonukleotidprimer.....22
2.1.5.8	Vektoren.....22
2.1.6	Zusammensetzungen der Puffer und Lösungen.....23
2.1.6.1	Puffer und Gele für Western Blot24

2.1.7	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme.....	25
2.1.8	Sterilisation/Autoklavieren.....	26
2.1.9	Programme und Datenbanken	26
2.1.9.1	Programme.....	26
2.1.9.2	Datenbanken.....	26
2.1.10	Statistische Auswertung.....	27
2.2	Methoden.....	27
2.2.1	Mikrobiologische Methoden.....	27
2.2.1.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	27
2.2.1.2	Lagerung von <i>Escherichia coli</i>	27
2.2.1.3	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	27
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	28
2.2.2.1	Methoden der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	28
2.2.2.1.1	PCR-Varianten.....	28
2.2.2.1.2	Einfügen von Punktmutationen in eine cDNA-Sequenz.....	29
2.2.2.1.3	Amplifikation von cDNA-Fragmenten.....	29
2.2.2.1.4	Reverse Transkription.....	30
2.2.2.1.5	Semiquantitative-real-time PCR	31
2.2.2.1.5.1	Optimierung der Oligonukleotidprimer.....	34
2.2.2.1.5.2	$\Delta\Delta C_T$ -Methode.....	36
2.2.2.1.5.3	Einsatz von Sonden zur Signaldetektion.....	37
2.2.2.2	Elektrophoretetechniken.....	38
2.2.2.3	Isolation von cDNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	39
2.2.2.4	Spektrometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration.....	39
2.2.2.5	DNA-Sequenzierung.....	40
2.2.2.6	Spaltung von Nukleinsäuren durch Restriktionsenzyme.....	40
2.2.2.6.1	Verdau mit EcoR I und Bgl II	40
2.2.2.6.2	DPN1	41
2.2.2.7	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	41
2.2.2.7.1	Isolation im analytischen Maßstab.....	41
2.2.2.7.2	Isolation im präparativen Maßstab.....	42
2.2.2.8	<i>In vitro</i> Transkription/Translation	43
2.2.2.9	RNA-Isolation aus Zellen oder Geweben mit Trizol [®] Reagent.....	44
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	45
2.2.3.1	Isolation von Proteinen aus Zellen.....	45
2.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	46
2.2.3.3	Immunhistologie.....	46
2.2.3.4	Western Blot.....	47
2.2.4	Zellbiologische Methoden.....	49
2.2.4.1	Anzucht von Zellen.....	49
2.2.4.2	Subkultivierung von Monolayern.....	49
2.2.4.3	Bestimmung der Zellzahl.....	49
2.2.4.4	Transfektion von Zellen.....	50
2.2.4.5	Kryokonservierung von Zellen.....	50
2.2.4.6	Quantitative Bestimmung der Verkalkung mittels Radox Ca Kit.....	50

2.2.4.7	Färbungen.....	51
2.2.4.7.1	Alizarin Red S Färbung.....	51
2.2.4.7.1.1	Quantifizierung der Verkalkung.....	51
2.2.4.7.2	Calcein-Färbung.....	52
2.2.4.7.3	Färbung mit DAPI.....	52
2.2.4.8	Etablierung eines Zellkulturmodells zur Untersuchung von Verkalkungsprozessen <i>in vitro</i>	52
2.2.4.8.1	Vorbereitungen.....	52
2.2.4.8.2	Toxizitätstestungen.....	53
2.2.4.8.2.1	Toxizität der Transfektionlösungen.....	53
2.2.4.8.2.2	Toxizität der Vektoren in verschiedenen Konzentrationen.....	53
2.2.4.8.3	Auswahl des Verkalkungsinduktors.....	53
2.2.4.8.3.1	β -Glycerophosphat.....	53
2.2.4.8.3.2	Natriumdihydrogenphosphat.....	53
2.2.4.8.4	Ablauf des Zellkulturversuches.....	54
2.2.5	Tierexperimentelle Methoden.....	54
2.2.5.1	Tierhaltung.....	54
2.2.5.2	Kryopexie des Myokards.....	55
2.2.6	Experimenteller Ablauf der Doktorarbeit.....	56
3.	Ergebnisse.....	57
3.1	Expression des Gens <i>Abcc6</i> bei der Maus.....	57
3.1.1	Gewebespezifität.....	57
3.2	Sequenzanalyse des Gens <i>Abcc6</i> in den Mausstämmen <i>C3H/He</i> und <i>C57BL/6</i>	57
3.3	Herstellung eines pSG5-Konstruktes auf einem <i>C3H/He</i> -Hintergrund.....	59
3.3.1	Einfügen von sieben Punktmutationen.....	59
3.3.2	Sequenzierung der hergestellten cDNA.....	59
3.3.3	Transfektion von C3H10T1/2 Zellen mit den Varianten von <i>Abcc6</i>	60
3.3.3.1	Bestimmung der Transfektionseffizienz mit dem GFP-Vektor....	60
3.3.3.2	Molekularer Nachweis der Transfektion.....	61
3.3.4	Bestätigung der Insertion von <i>Abcc6</i> auf dem pSG5-Vektor.....	62
3.3.4.1	Verdau mit EcoR I und Bgl II.....	62
3.3.5	Bestätigung der Funktionsfähigkeit der hergestellten Konstrukte.....	63
3.3.5.1	<i>In vitro</i> Transkription/Translation	63
3.3.5.2	<i>In vitro</i> Bestätigung der Konstrukte mittels Immunhistologie und Western Blot.....	65
3.3.5.2.1	Immunhistologie.....	65
3.3.5.2.2	Western Blot.....	67
3.4	Etablierung eines <i>in vitro</i> Zellkulturmodells für Verkalkungsprozesse.....	68
3.4.1	Induktion von Verkalkung.....	68
3.4.1.1	β -Glycerophosphat.....	68
3.4.1.2	Natriumdihydrogenphosphat	70
3.5	Einfluss der Varianten des Gens <i>Abcc6</i> auf die Entwicklung von Verkalkung <i>in vitro</i>	72
3.5.1	Verlauf der Verkalkungsentwicklung.....	73
3.5.1.1	Zeitlicher Überblick.....	73
3.5.1.2	<i>C3H/He</i> bedingte Zunahme der Verkalkung nach 7 Tagen	74
3.6	Analyse der Expression von Transkriptionsfaktoren der Osteogenese <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	75
3.6.1	Analyse der Transkriptionsfaktorexpression <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> mittels konventioneller PCR.....	77

3.6.2	Analyse der Transkriptionsfaktorexpression mittels semiquantitativer real-time PCR.....	81
3.6.2.1	Transkriptionsfaktorexpression <i>in vitro</i>	81
3.6.2.2	Transkriptionsfaktorexpression <i>in vivo</i>	84
4.	Diskussion.....	86
4.1	<i>In vitro</i> Zellkulturmodell für Verkalkung.....	86
4.2	Hypothesen zur Funktionsstörung von MRP6.....	89
4.3	Transkriptionsfaktoren der Osteogenese.....	93
4.4	<i>Runx2</i> – Schlüsselgen für Verkalkungsprozesse <i>in vivo</i> ?.....	95
4.5	Schlussfolgerungen.....	97
4.6	Ausblicke.....	98
5.	Zusammenfassung.....	101
6.	Literaturverzeichnis.....	103
7.	Anhang.....	108
7.1	Sequenz des Gens <i>Abcc6</i>	108
7.2	Oligonukleotidprimer.....	109
8.	Danksagung.....	112
9.	Lebenslauf.....	113
10.	Veröffentlichungen.....	114
10.1	Publikationen.....	114
10.2	Abstract-Publikationen.....	114
10.3	Vorträge.....	114
10.4	Poster.....	115
II.	Abbildungsverzeichnis	
Abbildung 1.1:	Hochauflösende <i>in-silico</i> -Kartierung des <i>Dyscalc1</i> Locus.....	11
Abbildung 1.2:	MRP6-Protein.....	12
Abbildung 2.1:	Aufbau des pSG5 Vektors.....	23
Abbildung 2.2:	Standardkurve.....	35
Abbildung 2.3:	Dissoziationskurve.....	36
Abbildung 3.1:	Gewebespezifische Expression den Gens <i>Abcc6</i>	57
Abbildung 3.2:	Schematische Darstellung des Gens <i>Abcc6</i>	58
Abbildung 3.3:	Sequenzausschnitt im Programm Chromas.....	60
Abbildung 3.4:	Transfektion mit dem GFP-Vektor.....	61
Abbildung 3.5:	Molekularer Nachweis der Transfektion.....	62
Abbildung 3.6:	Verdau des Vektors mit EcoR I und Bgl II.....	63
Abbildung 3.7:	IVTT-Produkte auf einer Membran.....	64
Abbildung 3.8:	MRP6-Expression in HEK-Zellen.....	66
Abbildung 3.9:	Western Blot Membran mit dem MRP6-Protein.....	67
Abbildung 3.10:	Durch β -Glycerophosphat induzierte Verkalkung.....	68
Abbildung 3.11:	Molekularer Nachweis der β -Glycerophosphat induzierten Verkalkung...69	69
Abbildung 3.12:	Histologischer Nachweis der β -Glycerophosphat induzierten Verkalkung.....	70

Abbildung 3.13:	Molekularer Nachweis der NaH ₂ PO ₄ -induzierten Verkalkung.....	71
Abbildung 3.14:	Histologischer Nachweis der NaH ₂ PO ₄ -induzierten Verkalkung.....	72
Abbildung 3.15:	Zeitlicher Verlauf der NaH ₂ PO ₄ induzierten Verkalkung.....	73
Abbildung 3.16:	NaH ₂ PO ₄ induzierte Verkalkung nach 7d.....	74
Abbildung 3.17:	Molekularer Verkalkungsnachweis mit <i>Osteopontin</i>	76
Abbildung 3.18:	Expression osteogener Transkriptionsfaktoren.....	78
Abbildung 3.19:	Expression osteogener Transkriptionsfaktoren <i>in vitro</i>	83
Abbildung 3.20:	Expression osteogener Transkriptionsfaktoren <i>in vivo</i>	85
Abbildung 4.1:	Homologiemodell von MRP6.....	92

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Verwendete Chemikalien/Reagenzien.....	15
Tabelle 2.2:	Verwendete Labormaterialien.....	16
Tabelle 2.3:	Verwendete Geräte.....	17
Tabelle 2.4:	Verwendete Medien.....	20
Tabelle 2.5:	Verwendete Medien zur Anzucht eukaryotischer Zellen.....	21
Tabelle 2.6:	Verwendete Enzyme.....	21
Tabelle 2.7:	Verwendete Inhibitoren.....	22
Tabelle 2.8:	Verwendete Antikörper.....	22
Tabelle 2.9:	Verwendete Puffer und Lösungen.....	23
Tabelle 2.10:	Verwendete Wester-Blot-Puffer und Gele.....	24
Tabelle 2.11:	Verwendete gebrauchsfertige Reaktionssysteme.....	25
Tabelle 2.12:	Verwendete Programme.....	26
Tabelle 2.13:	PCR-Programm zum Einfügen von Punktmutationen.....	29
Tabelle 2.14:	PCR-Programm zur Amplifikation von cDNA-Fragmenten.....	30
Tabelle 2.15:	PCR-Programm der real-time PCR.....	32
Tabelle 2.16:	<i>In vitro</i> verwendete Proben in der real-time PCR.....	33
Tabelle 2.17:	<i>In vivo</i> verwendete Proben in der real-time PCR.....	34
Tabelle 2.18:	In der real-time PCR verwendete FAM-Sonden.....	38
Tabelle 2.19:	Programm der real-time PCR mit FAM-Sonden.....	38
Tabelle 2.20:	Reaktionsansätze für Einzel- und Doppelverdau.....	41
Tabelle 2.21:	Puffer des QIAprep® Spin Miniprep Kits sowie deren Zusammensetzung.....	42
Tabelle 2.22:	Puffer des QIAGEN® Plasmid Maxi Kits sowie deren Zusammensetzung.....	43
Tabelle 2.23:	Übersicht über <i>in vivo</i> gewonnene Gewebeproben.....	55
Tabelle 3.1:	Aminosäureunterschiede zwischen <i>C3H/He</i> und <i>C57BL/6</i>	58
Tabelle 3.2:	Untersuchte Transkriptionsfaktoren der Osteogenese.....	75
Tabelle 3.3:	Übersicht über die Expression osteogener Transkriptionsfaktoren <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	81
Tabelle 7.1:	Primer zum Einfügen von Punktmutationen in das Gen <i>Abcc6</i>	109
Tabelle 7.2:	Primer für die Sequenzierung von Teilabschnitten von <i>Abcc6</i>	109
Tabelle 7.3:	Primer für Knochenmarker.....	109
Tabelle 7.4:	Primer für Interne Standards.....	109
Tabelle 7.5:	Primer für Transkriptionsfaktoren der Osteogenese.....	110
Tabelle 7.6:	Primer für das native <i>Abcc6</i> und das <i>Abcc6</i> auf pSG5.....	110

IV. Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	Engl.: ATP-binding cassette
APS	Amonium Persulfat

BAC	Engl.: bacterial artificial chromosome
BMP2	Engl.: bone morphogenic protein 2
bp	Engl.: base pair
bzw.	beziehungsweise
cDNA	Copy DNA
C _t -Wert	Engl.: cycle threshold
d	Engl.: day
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAPI	4`6-Diamino-2-phenylindoldihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCC	Dystrophic cardiac calcification
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethyl Pyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d. h.	das heißt
dH ₂ O	Demineralisiertes Wasser
DMEM	Engl.: Dulbeccos modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleotid-5'-Triphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxytymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraazetat-Säure
<i>Et al.</i>	<i>Et altera</i> , und andere
FAM	6-FAM-phosphoramidit
FKS	Fetales Kälber Serum
GFP	Engl.: green fluorescent protein
H ₂ O	Wasser
HASMC	Engl.: human aortic smooth muscle cell
HCASMC	Engl.: human coronary artery smooth muscle cell
HCL	Salzsäure
HEK	Engl.: human embryonal kidney
HRP	Engl.: Horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
IE	Internationale Einheit

IL-4	Interleukin-4
IVTT	<i>In vitro</i> Transkription Translation
KHK	Koronare Herzkrankheit
LB-Medium	Laura-Bertani-Medium
LDL	Engl.: low density lipoprotein
LOD-Score	Engl.: likelihood of odds
MGP	Matrix Gla Protein
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	Messenger-RNA
MRP6	Engl.: Multidrug-Resistance-Protein 6
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
OD	Engl.: optic density, Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Engl.: phosphat buffered saline
PCR	Engl.: polymerase chain reaction
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PMSF	Engl.: phenylmethansulfonyl fluorid solution
PXE	Pseudoxanthoma elasticum
QTL-Analyse	Engl.: Quantitative trait locus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Engl.: rounds per minute
<i>sh</i> RNA	Engl.: short hairpin RNA
S.O.B. Medium	Engl.: super optimal broth
S.O.C. Medium	Entspricht S.O.B. Medium mit 10 mM Glukose
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	Engl.: single nucleotide polymorphism
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS-T	Engl.: tris buffered saline tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	Engl.: transforming-growth-factor β
Tris	Tris(hydroxymethyle)-aminomethan
u. a.	unter anderem
UV	Ultra Violett
v. a.	vor allem
v/v	Engl.: volume/volume

VEGF	Engl.: vascular endothelial growth factor
VSMC	Engl.: vascular smooth muscle cell
w/v	Engl.: weight/volume
x	mal
z. B.	zum Beispiel

V. Einheitenverzeichnis

°C	Grad Celsius
V	Volt
g	Erdanziehungskraft
g/l	Gramm/Liter
kb	Kilobase
kBa	Kilodalton
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Milli Mol
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
pH	Potentium hydrogenii
s	Sekunde
μ	mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

1. Einleitung

Erkenntnisse über die Mechanismen und Abläufe von kardiovaskulären Verkalkungsprozessen haben in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen, da in den westlichen Industrieländern Erkrankungen des Herz-/Kreislaufsystems die Statistik der Todesursachen anführen. Verkalkungsprozesse spielen hierbei eine entscheidene Rolle, da 90 % der Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit (KHK) eine Atherosklerose der Herzkranzgefäße aufweisen (Böcker *et al.*, Kapitel 19: Herz). Laut des Statistischen Bundesamtes starb im Jahr 2006 in Deutschland jeder Zweite an einer solchen Erkrankung (Pressemitteilung Nr. 385). Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, den Pathomechanismus von Verkalkungsprozessen näher zu untersuchen.

1.1 Physiologische Verkalkungsmechanismen

Im menschlichen Körper finden physiologische Verkalkungsprozesse nur im Knochen- und Zahngewebe statt, welche aus verschiedenen Zelltypen und mineralisierter Extrazellulärmatrix bestehen (Schinke *et al.*, 1999; Murshed *et al.*, 2004). Zu den Zellen des Knochengewebes zählen Osteoblasten, die Knochen aufbauen, Osteozyten, bei denen es sich um ruhende, in die Knochensubstanz "eingemauerte" Osteoblasten handelt, und Osteoklasten, die Knochengewebe abbauen können. Das Zusammenwirken dieser Zelltypen ermöglicht, dass sich das Knochengewebe zeitlebens im Umbau befindet und im gesunden Knochen ein Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau besteht (Muruganandan *et al.*, 2008). Während der Keimentwicklung entstehen Knochen aus zwei verschiedenen Vorläufergeweben. Bei der desmalen Osteogenese entsteht Knochengewebe durch die direkte Differenzierung von Mesenchymzellen zu Knochenzellen, wohingegen es bei der chondralen Osteogenese zum Umbau eines zuvor angelegten Knorpelvorläufermodells in den späteren Knochen kommt (Lüllmann-Rauch, 2003; Heng *et al.*, 2004).

1.2 Pathologische Verkalkungsmechanismen

1.2.1 Grundlagen der heterotopen (extraossären) Verkalkung

Im Gegensatz zur Mineralisation im Knochengewebe, die ein orthotoper Prozess ist, handelt es sich bei der extraossären Verkalkung um einen heterotopen pathologischen Vorgang. Die Entstehung dieser pathologischen Verkalkungen wird in drei ätiologische

Mechanismen eingeteilt: die metastatische, die dystrophe und die genetisch-hereditäre Verkalkung (Seifert G, 1997).

Bei der metastatischen Verkalkung führt eine Hyperkalziämie (3,0 - 4,0 mmol/l; Norm: 2,0 - 2,6 mmol/l) im Blutserum zu Ablagerungen von Kalziumverbindungen in verschiedenen Organen des menschlichen Körpers. In 70 % der Fälle ist diese Hyperkalziämie tumorassoziiert, da maligne Tumoren über osteolytische Infiltrate zu einem verstärkten Knochenabbau und so zu einer Erhöhung des Kalziumspiegels im Blut führen können. Dies geschieht insbesondere bei Lungen-, Mamma- und Prostatakarzinomen sowie bei neoplastischen hämatologischen Erkrankungen. Auch Adenome, Hyperplasien oder Karzinome der Nebenschilddrüse können durch eine Überproduktion von Parathormon eine Hyperkalziämie auslösen, da dieses die Aktivität der Osteoklasten fördert und dadurch Kalzium aus dem Knochengewebe freigesetzt wird (Seifert G, 1997).

Bei der dystrophen Verkalkung ist der Kalziumphosphatstoffwechsel nicht gestört und der Kalziumspiegel im Blut liegt im Normbereich. Durch Ischämien, Traumata oder Entzündungen werden Gewebeschädigungen ausgelöst, wodurch diese Areale nekrotisieren oder degenerativ verändert werden und es dort zu einer amorphen Ablagerung von Kalzium und in Folge zu einer dystrophen Verkalkung kommt (Seifert G, 1997).

Eine weitere Gruppe von Verkalkungsformen stellen die genetisch-hereditären Verkalkungen dar. Erkrankungen, bei der diese auftreten, sind die Chondrokalzinose, bei der Kalziumpyrophosphatdihydrate in Menisken und Zwischenwirbelscheiben ausfallen, und die familiäre hyperphosphatämisch-tumorale Kalzinose, bei der ein Defekt im proximalen Tubulus die Rückresorption von Phosphat in den Nieren pathologisch erhöht (Seifert G, 1997).

1.2.2 Dystrophe Verkalkung

In dieser Arbeit wurde ein besonderes Augenmerk auf den Prozess der dystrophen Verkalkung gelegt. Diese Art der Verkalkung kommt beim Menschen bei der Arteriosklerose und der koronaren Herzkrankheit (KHK) sowie im Herzgewebe von für dystrophe Verkalkung prädisponierten Mausstämmen vor.

1.2.2.1 Arteriosklerose

Arteriosklerose ist ein Oberbegriff für drei verschiedene Erkrankungsformen von Arterien:

der Atherosklerose, der Mönckeberg-Mediaverkalkung und der Arteriosklerose/-hyalinose. Von diesen dreien hat die Atherosklerose die größte Bedeutung, da die durch sie hervorgerufenen Folgeerkrankungen (z. B. Myokardinfarkt, Schlaganfall) in den westlichen Industrienationen zu den häufigsten Todesursachen zählen (Gebbers J.-O., 2007). Es sind verschiedene Risikofaktoren wie u. a. Hypertonie, Hyperlipidämie, Nikotinabusus und Diabetes mellitus bekannt, die das Auftreten einer Atherosklerose begünstigen. Heute wird vermutet, dass die oben erwähnten Risikofaktoren zu einer Schädigung des Gefäßendothels und so zu einer endothelialen Dysfunktion mit nachfolgender "Response-to-injury" Reaktion führen. Durch die Funktionsstörung kommt es zu einem Einstrom von Lipoproteinen, vor allem von LDL, in die Endothelzellen der Gefäßintima, welche dort akkumulieren und eine Chemokinausschüttung auslösen. Monozyten aus dem Blut wandern daraufhin ein und differenzieren sich zu Makrophagen, die das LDL phagozytieren und dadurch zu unbeweglichen Schaumzellen werden. Beim nachfolgenden Absterben dieser Schaumzellen werden oxidierte Lipide frei, die ihrerseits wiederum einen lokalen Entzündungsprozess fördern. Es kommt zu einer Einwanderung glatter Muskelzellen in die Region und zur Entstehung fibröser Plaques mit Lipideinlagerungen. Als Folge davon mineralisiert das geschädigte Gewebe durch dystrophe Verkalkung. Die Kalziumphosphatablagerungen bewirken eine Wandverdickung des Gefäßes mit Elastizitätsverlust und Einengung des Lumens. In der Altersgruppe der 30 - 65jährigen führt die Atherosklerose mit ihren Folgeerkrankungen in den westlichen Industrienationen mit 30 % die Mortalitätsstatistik an. Bei Menschen über 65 Jahren lassen sich sogar 50 % der Todesfälle durch Atherosklerose und deren Folgen erklären. Somit weist dieser Erkrankungskomplex aktuell eine höhere Morbidität als alle anderen Krankheitsgruppen auf (Böcker *et al.*, Kapitel 20: Gefäße).

1.2.2.2 Koronare Herzkrankheit

Bei der koronaren Herzkrankheit (KHK) handelt es sich um einen Sammelbegriff, der alle morphologisch oder funktionell fassbaren stenosierenden Erkrankungen der Koronararterien zusammenfasst, die zu einer unzureichenden Blutversorgung des Myokards führen (Böcker *et al.*, Kapitel 19: Herz). In mehr als 90 % der Fälle ist eine Atherosklerose der extramuralen Koronargefäße ursächlich für diese Erkrankung. Die Risikofaktoren einer KHK entsprechen denen der allgemeinen Atherosklerose, wobei ein besonders starker Zusammenhang zwischen Nikotinabusus und KHK besteht. Das klinische Erscheinungsbild einer KHK kann sehr variabel sein und zeigt sich z. B. als

Angina pectoris, als Myokardinfarkt, als Herzrhythmusstörung oder als Herzinsuffizienz (Böcker *et al.*, Kapitel 19: Herz).

1.2.2.3 Dystrophe kardiale Verkalkung im Mausmodell

Um Verkalkungsprozesse *in vivo* zu untersuchen, werden Mäuse als Modellorganismen verwendet. Es sind verschiedene Mausinzuchtstämme bekannt, die sich zur Untersuchung von Verkalkungsprozessen eignen. Hierzu zählen *BALB/c*, *C3H/He* und *DBA/2* (Brunnert und Altman, 1990; Korff *et al.*, 2006). Unter diesen wurden bei *C3H/He* Mäusen häufiger als bei anderen Stämmen Verkalkungen des Myokards gefunden (Qiao *et al.*, 1994). Dieser Phänotyp wurde als dystrophe kardiale Verkalkung (Engl.: dystrophic cardiac calcification, DCC) beschrieben. Der Stamm *C57BL/6* wird als resistent für die Entwicklung von DCC betrachtet (Eaton *et al.*, 1978). Unter DCC versteht man die durch Gewebsverletzungen ausgelöste Ablagerung von Kalzium und Phosphat außerhalb des Knochengewebes unabhängig von der Kalzium- und Phosphatkonzentration im Blut (Wada *et al.*, 1999; Aherrahrou *et al.*, 2008). Neben dem genetischen Hintergrund, dem Alter und dem Geschlecht der Tiere können auch noch weitere Faktoren das Auftreten und den Schweregrad der DCC beeinflussen (Eaton *et al.*, 1978). Hierzu zählen Infektionen, hormoneller Status und die Art der Ernährung, wie beispielsweise eine "high-fat" Diät. Auch eine direkte Schädigung des Myokards durch eine Kälteapplikation in Form einer Kryopexie kann eine dystrophe Verkalkung bewirken (Ivandic *et al.*, 1996; Korff *et al.*, 2006). Der Phänotyp der DCC scheint dabei unabhängig vom Auslöser bei allen Mäusen identisch ausgeprägt zu sein. Deswegen kann davon ausgegangen werden, dass es einen gemeinsamen Entstehungsmechanismus gibt, bei dem die gleichen Gene durch externe Auslöser (z. B. Kryopexie, "high-fat" Diät, Infektion) beeinflusst werden und es dadurch zur Entstehung der DCC kommt. Der genaue Mechanismus, der hierzu führt, ist jedoch noch nicht aufgeklärt.

1.3 Verkalkungsmechanismen *in vitro*

Die pathologischen Verkalkungsprozesse der atherosklerotischen Läsionen *in vivo* scheinen ein aktiv regulierter Prozess zu sein, der den physiologischen Prozessen im Knochengewebe und während der Knochenentwicklung (Osteogenese) ähnelt (Proudfoot *et al.*, 1998; Shanahan *et al.*, 1999). Um diese Prozesse, die die Entstehung von Verkalkungen beeinflussen, nachzubilden und zu verstehen, wurden verschiedene *in vitro* Zellkulturmodelle etabliert. Hierbei war zumeist nicht die physiologische Verkalkung in

Zahn- oder Knochengewebe von besonderem Interesse, sondern vor allem pathologische Verkalkungsprozesse in Muskel- oder Bindegewebe.

Zu den in der Zellkultur verwendeten Zelllinien zählen u. a. glatte Gefäßmuskelzellen tierischen und menschlichen Ursprungs, wie VSMC (engl.: vascular smooth muscle cells) aus Rindern, HASMC (engl.: human aortic smooth muscle cells) und HCASMC (human coronary artery smooth muscle cells) (Hofbauer *et al.*, 2006; Son *et al.*, 2008). Außerdem finden auch mesenchymale Stammzellen wie die Linie C3H10T1/2 sowie primäre aus Ratten oder Mäusen gewonnene mesenchymale Stammzellen Verwendung (Atkinson *et al.*, 1997; Mie *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2009). Die meisten dieser Zelllinien besitzen ein Differenzierungspotenzial und lassen sich durch externe Stimulation in unterschiedliche Differenzierungsrichtungen drängen (Heng *et al.*, 2004). Die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen wird dabei durch das Zusammenwirken zahlreicher extrazellulärer Mediatoren, wie Wachstumsfaktoren, Hormonen, Nährstoffen und Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Hierbei handelt es sich um einen komplex regulierten Prozess, bei dem konstante Bedingungen und eine optimale Zusammensetzung der mitwirkenden Mediatoren erforderlich sind, um eine ungestörte Differenzierung in eine definierte Richtung zu ermöglichen (Heng *et al.*, 2004; Muruganandan *et al.*, 2008).

1.3.1 Induktion von Verkalkung *in vitro*

1.3.1.1 Anorganisches Phosphat

Eine sehr häufig verwendete Substanzgruppe zur Induktion von Verkalkungsprozessen in der Zellkultur sind anorganische Phosphate. Die geläufigsten Substanzen für die Untersuchung phosphatinduzierter Verkalkung *in vitro* sind hierbei die beiden anorganischen Phosphate β -Glycerophosphat und Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) (Steitz *et al.*, 2001). Der Mechanismus der phosphatinduzierten Verkalkung ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine Hypothese besagt, dass es durch das Phosphat zu einer Änderung des Phänotyps der Zellen kommt und die Expression linientypischer Marker zu Gunsten osteogener Marker, wie z. B. *Osteocalcin*, *Osteopontin*, *Alkalische Phosphatase* und *Runx2*, verloren geht (Giachelli CM, 2004; Giachelli *et al.*, 2005; Giachelli *et al.*, 2005a). Jono *et al.* (2000) und CM Giachelli (2003) bezeichneten *Runx2* als hauptverantwortliches Gen (Engl.: “master gene“) der Osteoblastendifferenzierung. Erhöhtes extrazelluläres Phosphat führte in einem Zellkulturmodell mit Glattmuskelzellen zu Verkalkungen, die denen in verkalkten Herzklappen und atherosklerotischen Plaques

morphologisch ähnelten. Es konnten *in vitro* Mechanismen beobachtet werden, die auch *in vivo* in Knochengewebe oder in pathologisch verkalkten Gefäßen vorkommen und zu denen verkalkende Kollagenfibrillen, Matrixvesikel- und Bioapatitbildung gehören (Giachelli CM, 2001).

1.3.1.2 BMP2

BMP2 (Engl.: bone morphogenic protein 2) ist ein Wachstumsfaktor der TGF- β -Familie (Engl.: transforming-growth-factor β) und spielt eine wichtige Rolle bei Wachstum, Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose von Zellen. BMP2 sowie auch BMP4 sind dabei besonders wichtig für die Differenzierung von Osteoblasten (Muruganandan *et al.*, 2008). Dies konnten auch Mie *et al.* (2000) zeigen, die C3H10T1/2 Zellen mit dem für BMP2 kodierenden Gen transfizierten und so eine osteogene Differenzierung induzieren konnten.

1.3.1.3 Interleukin-4

Ein weiterer Faktor, der zur Mineralisation von Zellen führen kann, ist das von T-Lymphozyten produzierte Zytokin Interleukin-4 (IL-4). Hofbauer *et al.* (2006) konnten zeigen, dass IL-4 über den Transkriptionsfaktor *Runx2* die Transformation arterieller Glattmuskelzellen in die osteoblastische Richtung fördert und so zu einer verstärkten Bildung von Kalziumablagerungen führt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass IL-4 die Mineralisation menschlicher Osteoblasten fördert und eine hemmende Wirkung auf die Funktion von Osteoklasten besitzt.

1.3.1.4 Wasserstoffperoxid

Oxidativer Stress induziert durch Signalmoleküle die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Zellen mit einem osteogenen Phänotyp und kann so die Entwicklung von Verkalkung bewirken (Heng *et al.*, 2004). Byon *et al.* (2008) identifizierten in einem *in vitro* Modell mit glatten Gefäßmuskelzellen Wasserstoffperoxid als ein Molekül, das oxidativen Stress auslöst und eine Änderung des Phänotypes dieser Zellen hin zu einem osteogenen Phänotyp bewirkt. Nachfolgend konnten ein Verkalkungsprozess der Zellen sowie eine erhöhte Expression des für die Osteoblastendifferenzierung typischen Transkriptionsfaktors *Runx2* beobachtet werden.

1.3.1.5 Physikalische Stimuli

Stammzellen können auch durch physikalische Stimuli wie elektrische oder magnetische Felder, Hitze, Ultraschallwellen oder Laserirritation dazu angeregt werden, in die osteogene Richtung zu differenzieren (Heng *et al.*, 2004). Der Einfluss elektrischer Felder auf die Osteogenese ist *in vitro* und *in vivo* gut untersucht. Der stimulierende Effekt auf Verkalkung hängt dabei von der pulsatilen Frequenz und der Stärke des elektrischen Feldes sowie der Entwicklungsphase der Zelle ab. Außerdem scheinen Hitze-Schock-Proteine einen stimulierenden Effekt auf die osteogene Differenzierung von Zellen nach transientser Temperaturerhöhung zu haben. Der zugrunde liegende Mechanismus des stimulierenden Effektes von Ultraschallwellen ist noch nicht gut charakterisiert, eine erhöhte Zytokin- und Prostaglandin E₂-Produktion scheinen dabei aber eine Rolle zu spielen. Ebenso können mechanische Einflüsse wie periodische Dehnungen oder Scherströmungen *in vitro* und *in vivo* die osteogene Differenzierung der entsprechenden Zellen oder Gewebe bewirken (Heng *et al.*, 2004).

1.3.2 Inhibition von Verkalkung

Unter normalen Bedingungen verhindert *in vivo* die balancierte Sekretion pro- und antiosteogener Substanzen durch Mesenchymal- und Entzündungszellen die ektope Verkalkung der umliegenden Gewebe (Giachelli CM, 2001a). Fehlen diese Verkalkungsinhibitoren, kommt es zu einem Verlust der Inhibition und nachfolgend zu einer Verkalkung des betreffenden Areals. Ein Beispiel für diesen Mechanismus ist die Ideopathische Infantile Arterielle Verkalkung, die durch ein genetisch bedingtes Defizit des Verkalkungsinhibitors Pyrophosphat bedingt ist (Giachelli *et al.*, 2005a). Die ektope Verkalkung von Extrazellulärmatrix ist somit ein aktiv regulierter Prozess, an dem mehrere spezifische Gene und Moleküle beteiligt sind (Schinke *et al.*, 1999).

1.3.2.1 Osteopontin

Osteopontin ist ein nicht-kollagenes adhäsives Phosphoprotein, das von Makrophagen synthetisiert wird und normalerweise in Knochen- und Zahngewebe aber auch gehäuft an Stellen dystropher Verkalkung wie in verkalkten Herzklappen oder atherosklerotischen Plaques vorkommt (Jono *et al.*, 2000; Giachelli *et al.*, 2005a). In phosphoryliertem Zustand ist Osteopontin ein potenter Inhibitor für die Bildung von Kalziumablagerungen, wobei der inhibitorische Effekt mit der Anzahl der Phosphorylierungen ansteigt. Daraus schlossen Jono *et al.* (2000) und Giachelli CM (2005), dass der Grad der Phosphorylierung von

Osteopontin ein möglicher Regulationsmechanismus für die Entwicklung von Verkalkungen ist. Seine inhibitorische Wirkung entfaltet es nicht nur über die Chelatierung von Kalziumionen, sondern hauptsächlich über eine direkte Interaktion mit der Oberfläche von Kalziumkristallen (Wada *et al.*, 1999; Schinke *et al.*, 1999). Osteopontin führt somit nicht nur zur Verhinderung des Wachstums dieser Kristalle, sondern reduziert auch aktiv deren Größe (Giachelli CM, 2005). In einem *in vitro* Modell mit glatten Gefäßmuskelzellen aus *Osteopontin*-knock-out Mäusen stellten Speer *et al.* (2005) im Vergleich zu Wildtyp-Zellen unter Normalbedingungen keine Unterschiede fest. Nach Inkubation mit einem phosphathaltigen Medium entwickelten die Zellen aus *Osteopontin*-knock-out Mäusen eine stärker ausgeprägte Verkalkung.

1.3.2.2 Matrix-GLA-Protein

Das Matrix-GLA-Protein ist ein Molekül, das durch Vitamin-K-abhängige γ -Carboxylierung posttranslational modifiziert wird und dadurch eine hohe Affinität zu den Ionen in Kalziumkristallen besitzt. Es wird in glatten Gefäßmuskelzellen und Chondrozyten, nicht aber in Osteoblasten exprimiert. Ist das für Matrix-GLA-Protein kodierende Gen durch Mutationen geschädigt, kommt es zu diffusen Verkalkungen im Knorpelgewebe (Schinke *et al.*, 1999; Murshed *et al.*, 2004). *Matrix-GLA*-knock-out Mäuse sterben im Alter von zwei Monaten durch starke Gefäßverkalkungen mit nachfolgenden Gefäßrupturen. Zusätzlich ist die Verknöcherung von Knorpelgeweben beispielsweise in den Wachstumsfugen gestört, was zu Osteopenie, Frakturen und kleiner Statur dieser Mäuse führt (Luo *et al.*, 1997).

1.3.2.3 Fetuin-A

Hendig *et al.* (2006) identifizierten Fetuin-A als Inhibitor systemischer Verkalkung und fanden bei Individuen mit Gefäßverkalkung erniedrigte Fetuin-A Level im Serum. Auch in einem *Abcc6*-knock-out Mausmodell (*Abcc6*^{-/-}) konnte ein erniedrigter Serumspiegel von Fetuin-A nachgewiesen werden (Jiang *et al.*, 2007). Merx *et al.* (2005) wiesen in *Fetuin-A*-knock-out Mäusen spontan auftretende Verkalkungen des Bindegewebes sowie myokardiale Verkalkungen nach. In einem Zellkulturmodell für Verkalkung, in dem glatte Gefäßmuskelzellen mit den Seren von *Abcc6*^{-/-} Mäusen inkubiert wurden, verhinderte die Zugabe von Fetuin-A zum Medium die Ausbildung der Verkalkung (Jiang *et al.*, 2007).

1.4 Identifikation des *Dyscalc1*-Locus für Verkalkung

In der Arbeitsgruppe um Dr. med. B. Ivandic wurde 1996 zur Identifikation eines Genlocus für Verkalkung ein kongenes Mausmodell entwickelt. Hierzu wurden zwei Mausstämme verwendet: *C3H/He*, der prädisponiert für die Entwicklung einer dystrophen kardialen Verkalkung ist, und der Stamm *C57BL/6*, welcher gegen die Entwicklung von Verkalkung resistent ist. Da es sich bei beiden Stämmen um Inzuchtstämme handelte, waren sie jeweils in jedem Allel ihres Genoms homozygot. Wurden nun Individuen der beiden Stämme miteinander verpaart, besaßen die Individuen der F₁-Generation je ein Allel von *C3H/He* und eins von *C57BL/6* und waren somit heterozygot. Die Tiere der F₁-Generation wurden auf das Vorliegen einer DCC getestet und waren negativ. Daraus konnte geschlossen werden, dass es sich bei DCC um eine autosomal-rezessive Erkrankung handelt. Innerhalb dieser entstandenen F₁-Generation wurde eine erneute Kreuzung durchgeführt (inter-cross) und Ivandic *et al.* (1996) erhielten eine F₂-Generation in der es zu unterschiedlichen Rekombinationen der elterlichen Allele gekommen war. Diese Tiere erhielten eine fett- und cholesterinreiche Diät, um eine dystrophe kardiale Verkalkungen hervorzurufen. Anschließend wurden alle Individuen von der Arbeitsgruppe geno- und phänotypisiert. Für die Genotypisierung wurden Mikrosatellitenmarker verwendet. Diese binden an (CA)_n-Repeats im Genom, die sich auf allen Chromosomen durchschnittlich in einem Abstand von 5 cM zueinander befinden. Die Anzahl der CA-Repeats ist hierbei jeweils typisch für einen Mausstamm. So konnte jeder Abschnitt des Genoms daraufhin untersucht werden, von welchem Stamm der F₀-Generation er ursprünglich stammte. Danach konnte für jede Maus der F₂-Generation der Phänotyp der dazugehörigen Allelvariante zugeordnet werden. Durch ein statistisches Verfahren wurde dann festgestellt, ob signifikante Genotyp-Phänotyp-Korrelationen bestanden. Hierzu wurde eine QTL-Analyse (Engl.: quantitative trait locus) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Kopplungsanalyse wurden als "Likelihood of Odds" in log-Einheiten (LOD-Score) ausgedrückt. Ein LOD-Score über 3 galt dabei als signifikant. Ivandic *et al.* (1996) erzielten für den Locus *Dyscalc1* einen LOD-Score von 14,6. Um diesen als verantwortlichen Locus für Verkalkung zu bestätigen, wurde ein weites Experiment angeschlossen, in dem so genannte kongene Tiere hergestellt wurden. Heterozygote Individuen der F₁-Generation wurden mit *C57BL/6*-Mäusen der Elterngeneration rückgekreuzt (back-cross). Die entstandene N₂-Generation wurde wieder genotypisiert und die Tiere, die den gesuchten Genlocus enthielten, ausgewählt und wiederum mit *C57BL/6*-Wildtypmäusen verpaart. Dieser Vorgang wurde über zehn Generationen wiederholt und somit der Anteil des Genoms von *C3H/He* immer weiter

reduziert. Am Ende der Rückkreuzung erhielten Aherrahrou *et al.* (2004) eine N₁₀-Generation mit einem zu >99 %igen C57BL/6-Hintergrund, in der nur der *Dyscalc1* Locus von C3H/He konserviert war. Um homozygote Mäuse zu erhalten, wurde ein erneuter inter-cross innerhalb der N₁₀-Generation durchgeführt. In der N₁₀-F₁-Generation wurde durch eine Kryopexie des Myokards Verkalkung induziert und die Tiere anschließend geno- und phänotypisiert. Nur die Individuen, die homozygot für die C3H/He-Variante innerhalb des Locus *Dyscalc1* waren, wiesen Verkalkungen auf. Somit konnten Aherrahrou *et al.* (2004) beweisen, dass der Locus *Dyscalc1* verantwortlich für die Ausbildung der Verkalkung ist, da sich die verkalkenden Mäuse nur in diesem Locus von den nicht verkalkenden resistenten Mäusen des C57BL/6-Stammes unterschieden.

1.5 Ultrafine mapping des *Dyscalc1* Locus

Um den *Dyscalc1* Locus näher einzugrenzen, wurde er von Aherrahrou *et al.* (2007) durch SNP-Genotypanalyse (Engl.: single nucleotide polymorphism) und *in silico mapping* näher untersucht. Diese Analysen beruhen auf Rechenmethoden, die dadurch ermöglicht werden, dass die Genome der heute zu Forschungszwecken verwendeten Mausstämme vollständig bekannt und die Sequenzen im Internet verfügbar sind. Man kann dadurch den beobachteten Phänotyp einer Maus mit ihrem bekannten Genotyp in eine Beziehung setzen. Durch dieses Rechenmodell können sehr effizient viele Mausstämme miteinander verglichen und Loci ausfindig gemacht werden, in denen sich zwei Mausstämme unterscheiden. Bei dieser Analyse beobachteten Aherrahrou *et al.* (2007), dass der Mausstamm *New Zealand Black* phänotypisch verkalkte, aber einen C57BL/6 entsprechenden, also verkalkungsresistenten, Genotyp am *Dyscalc1* Locus besaß. Bei genauerer Analyse der Region konnte festgestellt werden, dass innerhalb der C57BL/6-Sequenz ein 80 kb großes Stück einer C3H/He-Sequenz insertiert war. Das für Verkalkung verantwortliche Gen musste sich also innerhalb dieser insertierten Sequenz befinden. In dieser von Aherrahrou *et al.* (2007) eingegrenzten Region lagen die beiden bekannten Gene *EMP3* und *Abcc6*.

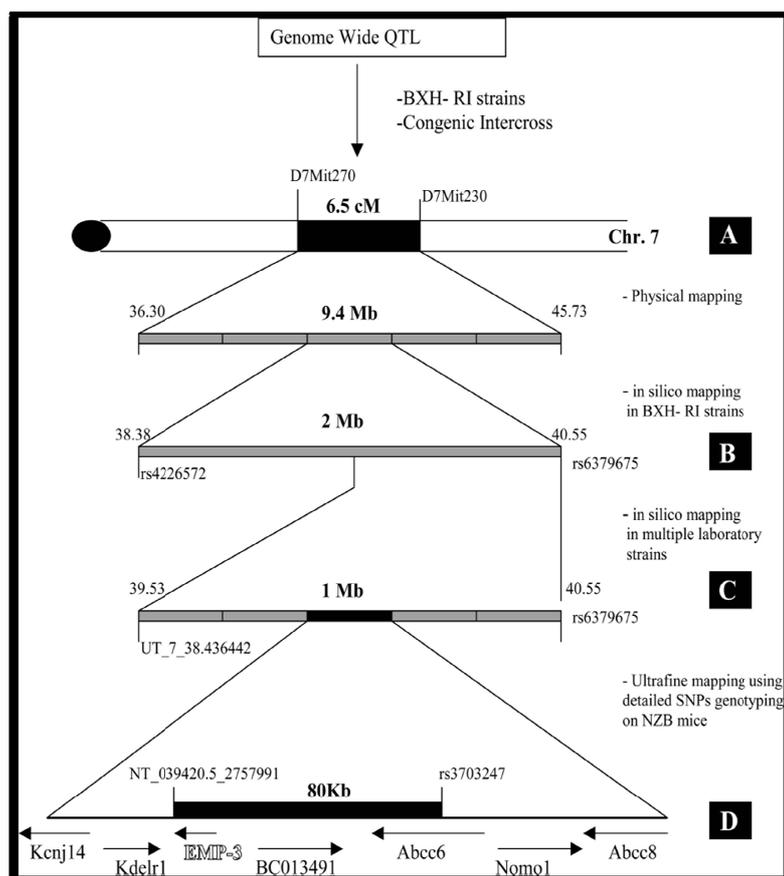


Abbildung 1.1: Hochauflösende in-silico-Kartierung des *Dyscalc1* Locus.

- A: Mittels rekombinanter Inzuchtstämme und kongener Mäuse wurde durch QTL-Analysen der *Dyscalc1* Locus auf dem proximalen Chromosom 7 innerhalb einer 6,5 cM großen Region identifiziert.
- B: Mittels in-silico-Kartierung rekombinanter Inzuchtstämme wurde der *Dyscalc1*-Locus auf einem 2 Mb chromosomalen Abschnitt feinkartiert.
- C: Mit Hilfe zusätzlicher Labormausstämme konnte die Region auf 1 Mb eingegrenzt werden.
- D: Mittels Genotypisierung und neuen SNPs in verschiedenen Labor-Mausstämmen konnte die Region auf einen 80 kb langen chromosomalen Abschnitt eingegrenzt werden. In dieser Region befindet sich auch ein Teil des Gens *Abcc6*. Abbildung entnommen aus Aherrahrou *et al.*, (2007).

1.6 Identifikation des Gens *Abcc6*

Durch QTL-Analysen konnten auch Meng *et al.* (2007) den *Dyscalc1* Locus auf dem proximalen Chromosom 7 weiter eingrenzen und identifizierten *Abcc6* durch "positional cloning" als kausales Gen für dystrophe kardiale Verkalkung. Um dies zu bestätigen, wurde eine transgene Maus benötigt. Dazu wurde das Gen *Abcc6* des *C57BL/6*-Genotyps mit seinen flankierenden Regionen (30 kb upstream und 10 kb downstream) durch das Enzym *MluI* aus einem BAC (Engl.: bacteria artificial chromosome) ausgeschnitten. Anschließend wurde das 95 kb große Fragment aufgereinigt und per Mikroinjektion in Oozyten mit *C3H/He*-Hintergrund eingebracht. Nach Gabe einer "high-fat" Diät ergab die

Analyse des Phänotyps, dass die DCC prädisponierten transgenen *C3H/He*-Mäuse, die das DCC resistente *C57BL/6*-Allel von *Abcc6* enthielten, im Vergleich zu nicht transgenen Mäusen keine Verkalkung entwickelten. Meng *et al.* (2007) schlossen daraus, dass das *C57BL/6*-Allel dominant über das *C3H/He*-Allel ist und dass *Abcc6* das hauptsächliche Gen für DCC im *Dyscalc1* Locus ist.

1.7 Das Gen *Abcc6*

Das Gen *Abcc6* liegt beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 16 (16p13.1) und enthält 31 Exone. Es gehört in die 48 Mitglieder umfassende ABC-Genfamilie, welche wiederum in sieben Subfamilien unterteilt ist. Eine dieser Untergruppen ist die *Abcc*-Gruppe, der zwölf Mitglieder angehören, von denen neun für je ein MRP-Protein kodieren (Klement *et al.*, 2005). *Abcc6* kodiert das 165-kDa große MRP6. Dieses Protein gehört zur Gruppe der ABC-Transporter (Engl.: ATP-binding cassette) und ist aus drei Domänen aufgebaut, welche aus 17 in einer Fünfer- und zwei Sechsergruppen angeordneten transmembranären Helices bestehen (Hendig *et al.*, 2005). Außerdem besitzt der Transporter zwei intrazellulär gelegene nukleotidbindende Schleifen, die an der Hydrolyse von ATP beteiligt sind und den aktiven Stofftransport über die Zellmembran ermöglichen (Klement *et al.*, 2005).

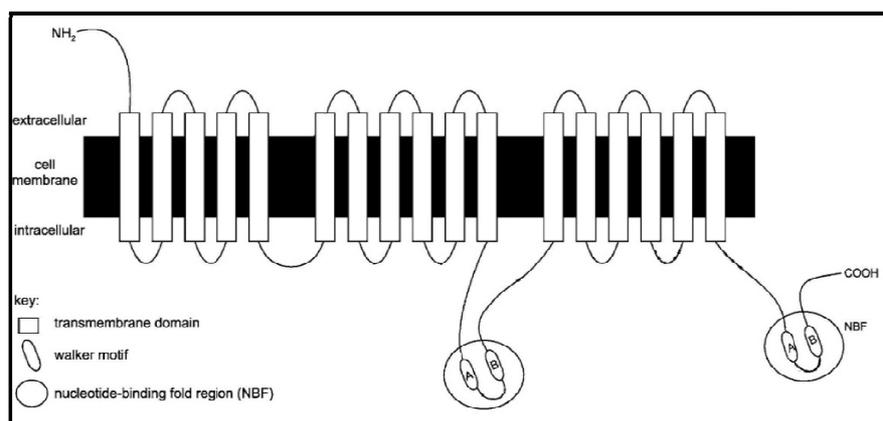


Abbildung 1.2: MRP6-Protein: Struktureller Aufbau des MRP6-Proteins als Transporter in der Zellmembran. (NH_2 =N-Terminus, COOH =C-Terminus, NBF=Nucleotide bindende Schleife). Abbildung modifiziert und entnommen aus Hu *et al.* (2003).

Das Protein MRP6 wird vor allem in der Leber und den Nieren exprimiert, in geringem Ausmaß aber auch in anderen Geweben wie dem Gastrointestinaltrakt, dem Gehirn und den Augen (Beck *et al.*, 2002). In der Leber ist das Protein an der basolateralen Seite der

Hepatozyten lokalisiert, in der Niere vor allem in den proximalen Tubuli (Beck *et al.*, 2002; Gorgels *et al.*, 2005). Die genaue Funktionsweise des Transportes ist noch unbekannt. Man geht davon aus, dass die Funktion des MRP6 der des MRP1 ähnlich ist, da beide zur Subgruppe C der ABC-Transporter gehören und zu 45 % homolog sind. Über das MRP1 ist bekannt, dass es an der zellulären Entgiftung mitwirkt und einen Einfluss auf die Resistenz von Zellen gegenüber Chemotherapeutika (z. B. Doxorubizin, Etoposid) hat (Choi CH, 2005). Es wird davon ausgegangen, dass das MRP6 ebenfalls als Effluxpumpe arbeitet und beispielsweise Stoffwechselprodukte aus dem Intrazellularraum eliminiert (Klemet *et al.*, 2005). Des Weiteren wird vermutet, dass es eine Schutzfunktion gegenüber oxidativem Stress übernimmt. Fällt diese Funktion aus, kommt es zu Gewebeschäden durch oxidativen Stress, die wiederum die Entstehung einer Verkalkung begünstigen können (Matsuzaki *et al.*, 2005).

1.8 Pseudoxanthoma elasticum und das Gen *Abcc6* beim Menschen

Kommt es im Gen *Abcc6* zu Veränderungen in Form von Mutationen, kann dies verschiedene Erkrankungen zur Folge haben. Zu den mit *Abcc6* assoziierten Erkrankungen zählen Pseudoxanthoma elasticum (PXE) beim Menschen und DCC bei der Maus. Pseudoxanthoma elasticum ist eine seltene autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, der eine oder mehrere Mutationen des Gens *Abcc6* zugrunde liegen (Klement *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; LaRusso *et al.*, 2009) und bei der es zu einer progressiven Verkalkung elastischer Fasern und Kollagenfasern des Bindegewebes sowie zur Bildung abnormer Elastinfasern kommt. Besonders betroffen sind die extrazelluläre Matrix der Haut, der Augen und des kardiovaskulären Systems (Matsuzaki *et al.*, 2005). Der Beginn und die Schwere der Symptome sind interindividuell sehr unterschiedlich, wobei die ersten Anzeichen der Erkrankung zumeist in der zweiten und dritten Lebensdekade auftreten. Sie zeigen sich vor allem als Hautläsionen, die bevorzugt in der Nackenregion, der Ellenbeuge, der Axilla und der Leistenregion auftreten (Gorgels *et al.*, 2005). Durch eine abnorme Mineralisation der elastischen Fasern in der Dermis kommt es zur Bildung von Papeln und Plaques. Im Auge bewirkt PXE eine Verkalkung der elastischen Bruch'schen Membran, welche dadurch brüchig wird. In der Folge treten vasoaktive Mediatoren wie VEGF (Engl.: vascular endothelial growth factor) aus und bedingen eine subretinale Neovaskularisation. Diese neu eingesprossenen Gefäße sind zumeist von minderer Qualität und können zu vermehrten Einblutungen führen, die Visusminderungen und Erblindung nach sich ziehen.

PXE hat ebenso einen Einfluss auf das kardiovaskuläre System. Es kommt zu einem verstärkten und frühzeitigen Auftreten von Atherosklerose, die zu Bluthochdruck, Angina pectoris, Claudicatio intermittens als Zeichen einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit, sowie gastrointestinalen Blutungen und Myokardinfarkten in jungem Alter führen kann (Hendiget *al.*, 2005).

1.9 Zielsetzung und Fragestellung der Doktorarbeit

Es ist bekannt, dass Mutationen im Gen *Abcc6* ursächlich für die Entstehung der Erkrankungen Pseudoxanthoma elasticum beim Menschen sowie der Prädisposition zur Dystrophen Kardialen Verkalkung bei Mäusen sind. Beiden Erkrankungen ist gemein, dass es bei betroffenen Individuen zu Störungen von Verkalkungsprozessen mit resultierender abnormer Verkalkung kommt. Die Rolle des Gens *Abcc6* in der Pathogenese dieser Erkrankungen ist bisher unbekannt. Aufbauend auf den bisher gewonnenen Erkenntnissen über den Zusammenhang des Gens *Abcc6* mit gestörten Verkalkungsprozessen, sollen in dieser Arbeit folgende Ziele erreicht werden.

1. Zwei unterschiedliche cDNA-Konstrukte des Gens *Abcc6* sollen hergestellt werden. Die Sequenzen sollen dabei denen des DCC prädisponierten Mausstammes *C3H/He* und des DCC resistenten Stammes *C57BL/6* entsprechen. Beide unterscheiden sich durch sieben Punktmutationen voneinander, die den Austausch von sieben Aminosäuren im Protein zu Folge haben.
2. Ein Zellkulturmodell für die Untersuchung von Verkalkungsprozessen *in vitro* soll mit murinen mesenchymalen Stammzellen der Linie C3H10T1/2 etabliert werden.
3. Der Einfluss der DCC prädisponierten *C3H/He*- und der DCC resistenten *C57BL/6*-Variante des Gens *Abcc6* auf Verkalkungsprozesse *in vitro* soll durch Transfektion und Überexpression der Konstrukte in C3H10T1/2 Zellen untersucht werden.
4. Um ein besseres Verständnis für die Abläufe und Regulationenprozesse während der Entstehung von Verkalkungen sowie die zugrunde liegenden Pathomechanismen zu erlangen, soll die Expression von Transkriptionsfaktoren der Osteogenese *in vivo* und *in vitro* analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Die nachfolgende Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien sowie deren Hersteller.

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
100 bp DNA Leiter PLUS	Peqlab
21 kb DNA-Sizer III	Peqlab
3 x SDS Sample Buffer	New England BioLabs
Alizarin Red S	Fluka
Ampicillin	Sigma-Aldrich
APS 10%	Roth
Borsäure	Sigma-Aldrich
Calcein	Sigma-Aldrich
Chloroform	Sigma-Aldrich
DAPI	Roche Germany
DEPC Wasser 0,05 %	Sigma-Aldrich
Destilliertes Wasser	Delta Select
dNTP	Amersham Biotech
DTT	New England Biolabs
EDTA	Sigma-Aldrich
Ethanol (100 %)	Apotheke des UK-SH
FKS	Gibco BRL [®] Life Technologies [®]
Formaldehyd 36,5 %	Riedel-de-Haën [®]
GFP	Amaxa
Glycerol	Sigma-Aldrich
Indomethacin	Sigma-Aldrich
Isopropanol (100 %)	Sigma-Aldrich
L-Ascorbat-Phosphat	Sigma-Aldrich
LB Agar	Fluka Bio Chemika

LB Broth	Fluka Bio Chemika
Loading Dye	Eigene Herstellung 99 % Formamid 1 % Dextran Blau 0,2 % Bromphenolblau 0,2 % Xylencyanol
NaH ₂ PO ₄ (Natriumdihydrogenphosphat)	Sigma-Aldrich
Nile Red	Sigma-Aldrich
Oil Red O	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd 4 %	Merck
pd(N6)Primer	Amersham Biotech
Penicillin	Biochrom
QA-Agarose TM	MP Biomedicals North America
SDS	Sigma
Streptomycin	Biochrom
Sybr Green I	Invitrogen
TEMED	Carl Roth GmbH und Co
Tris-Base	Sigma-Aldrich
Trizol	Invitrogen
Trypsin/EDTA 10x	Gibco/Invitrogen
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien/Reagenzien

2.1.2 Labormaterialien

In Tabelle 2.2 sind die während der Arbeit verwendeten Labormaterialien mit Herstellern aufgeführt.

Material	Hersteller
24-Well-Platten für Zellkultur	Nunc
3 mm Filterpapier	Whatman
384-Well-Platten	4-titude
Chamber Slides	Nunc
Entsorgungsbeutel/PP	Hassa
Glasflaschen, Erlenmeyerkolben	Schott Duran

Kryotubes	Nunc
Kulturflaschen für Zellkultur (T75)	TPP®
Messzylinder	Schott Duran
Molecular Imager ChemiDoc XRS	BioRad
Parafilm "M"	American National Can™
Petrischalen mit Nocken	Greiner bio-one
Phase Lock Gel Tubes 2 ml	5 Prime
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf/Sarstedt
Precision Plus Protein™ Standards (Dual Color)	BioRad
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Schaber für Zellkulturen	Sarstedt
Serologische Pipetten(2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Skalpell	Feather
Sterilfilter 0,45 µm	Nalgene
Sterilfilter MILLEX®-GS 0,22 µm	Millipore
Transfermembran Immobilon-P Filter Typ PVDF, Pore Size 0,45 nm	Millipore

Tabelle 2.2: *Verwendete Labormaterialien*

2.1.3 Geräte

Nachfolgende Tabelle 2.3 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und deren Hersteller.

Gerät	Hersteller
Autoklav	Systec 2540 EL
BioPhotometer	Eppendorf
Eismaschine F90 Compact ELECTRONIC	Icematic
Freezing Container	Nalgene™
Gefrierschrank -20 °C	Bosch
Gefrierschrank -40 °C	Colora VF 40-300S
Gefrierschrank -80 °C	HERA freeze, Profiline

Geldokumentationsstation	Vilber Lourmat
Gelkammer	Biometra [®] , Maxicell [®]
Inkubationsschrank 37 °C/5 % CO ₂	HERA cell Kendro
Inkubator KS-15 Contraol	Edmund Bühler GmbH
Kühlschrank	Siemens, Liebherr
Laborwaage	Scout TM Pro Ohaus [®] , Scaltec
Magnetrührer	IKA [®] big-squid
Mikroskop	Wiloverta Hudt
Mikrowelle	Siemens
PCR-Cycler	Sensoquest
Phasenkontrasmikroskop Olympus IX 70	Olympus
pH-Meter	Hanna
Pipettor	Sarstedt
Plate Reader	DYNEX Technologies
Sicherheitswerkbank der Klasse II entsprechend DIN EN 12469	HERA safe Kendro
Stickstoffbehälter MVE CryoSystems750	Chart Biomedical
TaqMan (7900 HT Fast Real-Time PCR)	Applied Biosystems
Thermal Cycler	Thermo Elektron Corporation
Thermoschüttler	Edmund Bühler GmbH
Thermomixer	Eppendorf
Thermoschrank	Memmert
UV-Lampe	Peqlab
Voltmeter	Micro-Bio-Tec-Brand
Vortex	IKA [®] Vortex Genius 3
Wasserbad	GFL [®] 1083
Zählkammer	Neubauer
Zentrifugen	Varifuge 3.0 R Heraeus
Kühlzentrifuge	sepatech
Kühlzentrifuge (groß)	Hettich EBA 12 R
Tischzentrifuge	Biofuge pico Heraeus sepatech

Mini Format Vertical Elektrophoresis, Mini PROTEAN® Tetra Cell	BioRad
Tank Transfer System, Mini Transfer Blot® Cell	BioRad

Tabelle 2.3: Verwendete Geräte

2.1.4 Größenstandards

2.1.4.1 DNA-Längenstandards

Als DNA-Längenstandards in der Gelelektrophorese dienten je nach Größe des zu erwartenden DNA-Fragments die 100 bp DNA-Leiter PLUS (Peqlab) und der 21 kb DNA-Sizer III (Peqlab).

2.1.4.2 Proteingrößenstandards

Der Precision Plus Protein™ Standards Dual Color (BioRad) wurde bei der Durchführung des Western Blots als Proteingrößenstandard verwendet.

2.1.5 Biologisches Material

2.1.5.1 Bakterienstämme

Für die Vermehrung von Plasmid-DNA wurde der *Escherichia coli* Stamm TOP10 aus dem TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen™) verwendet. Der Stamm hat folgenden Genotyp: F- *mcr* AΔ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1 araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*.

2.1.5.2 Zelllinien

2.1.5.2.1 C3H10T1/2 Zellen

Als Zellkulturmodell dienten Zellen der Linie C3H10T1/2-Klon 8 (ATCC®). Es handelt sich bei diesen um mesenchymale Stammzellen aus Mausembryonen mit einer fibroblastenartigen Morphologie. Sie wachsen als Monolayer, besitzen ein Differenzierungspotential und können sich nach externer Stimulation in Adipo-, Chondro- und Osteozyten differenzieren.

2.1.5.2.2 HEK-Zellen

Primäre humane embryonale Nierenzellen der Linie 293 (DSMZ, ACC 305; HEK engl.: human embryonal kidney) wurden von Frau Dr. Stefanie Stölting (Universität zu Lübeck) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden dazu verwendet, die verschiedenen Varianten des Konstrukts auf ihre Funktionsfähigkeit zu testen. Nach Transfektion der Zellen mit den unterschiedlichen Varianten des Gens *Abcc6*, wurden sie zum einen nach Fixation immunhistologisch untersucht und zum anderen mit dem aus ihnen isolierten Protein ein Western Blot durchgeführt.

2.1.5.3 Kulturmedien

2.1.5.3.1 Medien zur Anzucht von *Escherichia coli*

In der nachfolgenden Tabelle 2.4 sind die zur Anzucht von Bakterien verwendeten Medien sowie deren Zusammensetzung aufgeführt.

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	1 % (w/v) Pepton 0,5 % (w/v) Hefe Extrakt 0,5 % (w/v) NaCl pH 7,5 in dH ₂ O angesetzt und autoklaviert
LB-Agarose	1,5 % (w/v) in LB-Medium
S.O.C. Medium (entspricht S.O.B. Medium mit 10 mM Glukose)	Hefeextrakt 0,5 % (w/v) Trypton 2 % (w/v) Natriumchlorid 10 mM Kaliumchlorid 2,5 mM Magnesiumchlorid 10 mM Magnesiumsulfat 10 mM Glukose 10 mM

Tabelle 2.4: Verwendete Medien

Die Stammlösungen wurden nach dem Ansetzen autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden die Medienzusätze, wie Ampicillin (100 µg/ml), in entsprechender Konzentration hinzugegeben.

2.1.5.3.2 Medien zur Anzucht eukaryotischer Zelllinien

Das Serum- und Antibiotika-freie Dulbeccos modified Eagles Medium (DMEM, 4 mM L-Glutamine, 4500 mg/L Glukose, 1 mM Natriumpyruvat, 1500 mg/L Natriumbikarbonat) wurde von der Firma ATCC[®] bezogen. Die folgenden Medien (Tabelle 2.5) wurden daraus hergestellt und für die Zellkultur verwendet.

Medium	Zusätze/Zusammensetzung
DMEM	10 % (v/v) fetales Kälberserum 5 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (10.000 I.E.)
Osteogenic Medium:	DMEM 10 mM β -Glycerophosphat 170 μ M L-Ascorbat-Phosphat
Einfriermedium:	DMEM 10 % DMSO
NaH₂PO₄-Medium:	DMEM NaH ₂ PO ₄ (6 mM)

Tabelle 2.5: Verwendete Medien zur Anzucht eukaryotischer Zellen

2.1.5.4 Enzyme

Tabelle 2.6 gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und deren Hersteller.

Enzym	Hersteller
Restriktionsenzyme Bgl II (A↓GATCT) EcoR I (G↓AATTC)	Hybaid New England Biolabs
<i>Taq DNA Polymerase</i>	Invitrogen
<i>Reverse Transkriptase (M-MLV RT)</i>	Invitrogen
DPN/1	Fermentas
<i>Taq Polymerase Hot Gold Star</i>	EGT Group eurogentec
DNase	QIAGEN

Tabelle 2.6: Verwendete Enzyme

2.1.5.5 Inhibitoren

Inhibitor	Hersteller
Ribonuklease-Inhibitor (RNA-Guard)	Amersham Biotech

Tabelle 2.7: Verwendete Inhibitoren

2.1.5.6 Antikörper

Die in der nachfolgenden Tabelle 2.8 aufgeführten Antikörper wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Antikörper	Hersteller
Polyklonaler primärer Anti-Maus MRP6-S20 Antikörper (sc5787, goat)	Santa Cruz Biotechnology
Sekundärer Donkey-Anti-Goat-IgG-HRP Antikörper (Santa Cruz –sc2020)	Santa Cruz Biotechnology
Polyklonaler primärer Anti-Maus α -Actin Antikörper (rabbit)	Abcam plc.
Sekundärer Anti-rabbit HRP IgG	Cell Signaling Technology

Tabelle 2.8: Verwendete Antikörper

2.1.5.7 Oligonukleotidprimer

Die benötigten Oligonukleotide wurden mit dem Open Source Programm Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) anhand von Referenzsequenzen des Ensembl Genome Browsers (www.ensembl.org) ausgewählt und dann von der Firma BioTez GmbH synthetisiert. Die Primer für die *Reverse Transkriptions* PCR wurden so ausgewählt, dass das bei der PCR resultierende cDNA-Fragment eine Größe zwischen 150 und 200 bp hatte. Zusätzlich wurden die Primer so ausgewählt, dass sie in der cDNA-Referenzsequenz die Übergänge zwischen zwei Exonen überspannten. Damit konnte verhindert werden, dass in der PCR auch genomische DNA amplifiziert wurde. Die Primer wurden lyophilisiert geliefert und mit dH₂O auf eine Konzentration von 100 μ M gebracht. Anschließend wurden sie 1:10 auf die Arbeitskonzentration von 10 pmol/ μ l verdünnt. Die Sequenzen der verwendeten Primer befinden sich im Anhang in Tabelle 7.1-7.6.

2.1.5.8 Vektoren

Der pSG5-Vektor (Firma: Stratagene, Abbildung 2.1) ist ein eukaryotischer Expressionsvektor, der durch eine Kombination von pKCR2 und dem Stratagene Vektor

pBS hergestellt wurde. Es handelt sich um einen high-copy Vektor mit dem sich große Mengen doppelsträngiger DNA herstellen lassen. Der Vektor kann für Expression in Pro- und Eukaryoten verwendet werden und enthält eine Ampicillinresistenz sowie zwei Promotoren: T7 für prokaryotische und SV/40 für eukaryotische Expression. Außerdem enthält der Vektor Bindungsstellen für die Restriktionsenzyme EcoR I, BamH I und Bgl II, die zum Einfügen von Genen in den Vektor genutzt werden können. Das Gen *Abcc6* wurde zwischen den Restriktionsstellen EcoR I und Bgl II in den pSG5-Vektor eingefügt.

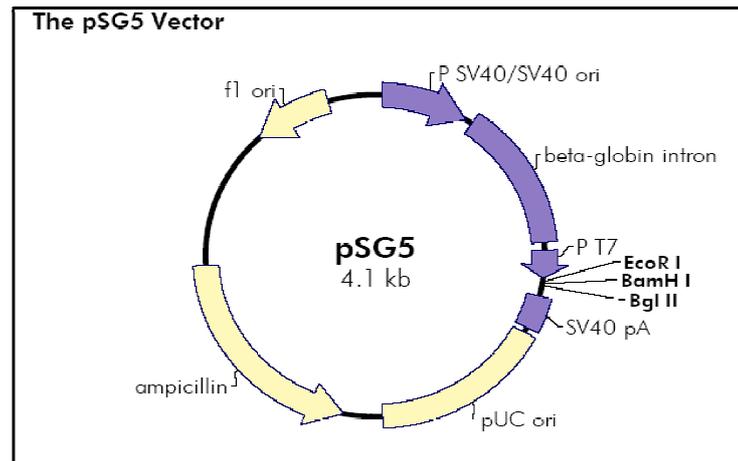


Abbildung 2.1: Aufbau des pSG5Vektors, Abbildung entnommen aus dem pSG5 Instruction Manual Catalog #216201. Agilent Technology

Die Sequenz des Vektors pSG5 kann im Internet unter folgendem Link abgerufen werden: <https://www.lablife.org/II?a=viewvecseq&vectorid=3768> (Stand: 06.10.2009).

2.1.6 Zusammensetzungen der Puffer und Lösungen

Tabelle 2.9 gibt einen Überblick über die verwendeten Puffer sowie deren Zusammensetzungen.

Puffer	Zusammensetzung
TBE Puffer	1 M Tris-Base 1 M Borsäure 10 mM EDTA
PBS	1,3 M NaCl 70 mM Na ₂ HPO ₄ 30 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7,4

dNTP-Mix	2,5 mM dATP 2,5 mM dCTP 2,5 mM dGTP 2,5 mM dTTP/dUTP
Lysis Buffer	0,1 N NaOH hergestellt aus 1 N NaOH verdünnt mit 10 % SDS

Tabelle 2.9: Verwendete Puffer und Lösungen

Die Herstellung der Puffer und Lösungen erfolgte, sofern nicht anders angegeben, in demineralisiertem Wasser (dH₂O).

2.1.6.1 Puffer und Gele für Western Blot

Die Puffer und Gele für die Durchführung eines Western Blots wurden nach den in Tabelle 2.10 aufgeführten Zusammensetzungen hergestellt.

Puffer	Zusammensetzung
Trenngel: SDS-PAGE (6,5 %)	1250 µl Trenngelpuffer 1083 µl Acrylamid/Bis-Lösung 2667 µl ddH ₂ O TEMED 5 µl 10 % APS 30 µl (Gesamtvolumen 5 ml)
Sammelgel (5 %)	750 µl Sammelgelpuffer 500 µl Acrylamid/Bis-Lösung 1750 µl ddH ₂ O TEMED 5 µl 10 % APS 30 µl (Gesamtvolumen 5 ml)
Trenngelpuffer	1,5 M Tris pH 8,8 0,4 % SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris pH 6,8 0,4 % SDS
Elektrophoresepuffer (pH 8,3)	250 mM Tris Base 1,9 M Glycin

	1 % SDS
Blot/Transferpuffer	25 mM Tris Base 192 mM Glycin 20 % Methanol
5 % Magermilchlösung	Magermilchpulver TBS
TBS-T Puffer (Waschpuffer) (pH 7,3)	80 g NaCl 12,1 g Tris Base pH mit HCL einstellen

Tabelle 2.10: Verwendete Western-Blot-Puffer und Gele

2.1.7 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Tabelle 2.11 stellt die in dieser Arbeit verwendeten gebrauchsfertigen Reaktionssysteme dar.

Reaktionssystem	Hersteller
5 PRIME-Mastermix Taq DNA Polymerase (62,5 U/ml) 125 mM KCl®-CA360 0,5 % 500 µM von jedem dNTP 75 mM Tris-HCl pH 8,3 3,75 mM Mg (OA) ₂ 0,25 % Igepal + Stabilisator	5 PRIME
Avertin-Lösung	
2,2,2-Tri-Bromo-Ethanol-Lösung	Aldrich
2-Methyl-2-Butanol	Aldrich
Cell and Tissue Staining Kit	R&D Systems
DC Protein Assay	BioRad
Nanofectin Transfection Reagent	PAA Laboratorie GmbH
Nucleo Spin [®] Extract II	Machery-Nagel
Osteogenesis Quantitation Kit	Chemicon International
QIAfilter Plasmid Purification Kit Maxiprep Kit/Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
qPCR [™] Core Kit for Sybr Green I	eurobiotec
Quick Change XL Kit	Stratagene

Randox Ca Kit	Randox Laboratories LTD.
RNase-Free DNase Set	QIAGEN
RNeasy [®] Mini Kit	QIAGEN
TOPO TA Cloning [®]	Invitrogen
TransFectin [™] Lipid Reagent	BioRad
ECL-Western Blotting Detection System	Amersham [™]
TaqMan [®] Gene Expression Assay	Applied Biosystems

Tabelle 2.11: Verwendete gebrauchsfertige Reaktionssysteme

2.1.8 Sterilisation/Autoklavieren

Die Gebrauchswaren und Medien wurden, soweit nicht schon steril erworben, vor dem Gebrauch bei 121°C für 20 min autoklaviert oder durch einen 0,22 µm großen Filter filtriert.

2.1.9 Programme und Datenbanken

2.1.9.1 Programme

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 2.12 aufgeführten Programme verwendet.

Programm	Verwendung
Primer3 (Open Source Software)	Design von Oligonukleotidprimern
Chromas 2.31 (Technelysium Pty ltd)	Bearbeitung von Sequenzdateien
S.D.S.	Auswertung semiquantitativer real-time PCR
StatView	Statistische Auswertung

Tabelle 2.12: Verwendete Programme

2.1.9.2 Datenbanken

Für das Design von Oligonukleotidprimern wurden die auf der Seite des Ensembl Genom Browsers (www.ensembl.org) angezeigten Sequenzen als Referenz verwendet.

Die Internetseite der "genecards"-Datenbank des Weizmann Institute of Science (www.genecards.org) wurde genutzt, um genauere Informationen über ein Gen zu erhalten.

2.1.10 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse innerhalb dieser Arbeit wurden durch einen t-Test auf Signifikanz überprüft. Hierzu wurde das Programm StatView verwendet. Die Signifikanzschwelle wurde bei allen Untersuchungen für $p = 0,05$ festgelegt.

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

Die mikrobiologischen Arbeiten wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe 1 (S1) durchgeführt.

2.2.1.1 Anzucht von *Escherichia coli*

Die *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien wurden soweit nicht anders angegeben in LB-Medium bei 37 °C über Nacht angezogen. Dies erfolgte bei Flüssigkulturen bei 150 rpm auf einem Flachbrettschüttler, bei Kulturen auf LB-Agarose im Brutschrank. Die Bakterien wurden für ein Kulturvolumen von 5 ml in 15 ml Falconröhrchen, für ein Volumen von 20 ml in 50 ml Falconröhrchen oder bei einem Kulturvolumen von 200 ml in Erlenmeyerkolben angezogen. Entsprechend der Plasmidresistenzen wurde den Medien Ampicillin (100 µg/ml) zugesetzt.

2.2.1.2 Lagerung von *Escherichia coli*

Die Bakterien wurden für kurze Zeitspannen auf LB-Platten bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Die Platten wurden am Rand mit Parafilm abgedichtet, um eine Austrocknung zu verhindern. Um die Bakterien über eine längere Zeit lagern zu können, wurden von den entsprechenden Stämmen Glycerinstocks hergestellt, welche bei -80 °C eingefroren wurden. Für diese Stocks wurden 770 µl einer Übernachtskultur von *E. coli* mit 230 µl Glycerin (99 %) vermischt und in Aliquots eingefroren.

2.2.1.3 Transformation von *Escherichia coli*

Der die *Abcc6*-cDNA enthaltende pSG5-Vektor wurde durch Transformation mit dem TOPO TA Cloning[®] Kit von der Firma Invitrogen in TOP10 *E. coli* Bakterien eingefügt. Zu den TOP10 *E. coli* Bakterien wurden 2 µl des cDNA enthaltenden pSG5-Vektors

gegeben und der Ansatz gemischt. Anschließend wurde der Ansatz für 20 min auf Eis inkubiert, um die Anlagerung des Plasmids an die Zellwand von *E. coli* zu ermöglichen. Im darauf folgenden Schritt wurden die Zellen für 40 s auf 42 °C erhitzt und danach sofort wieder auf Eis gestellt. Dieser Hitzeschock führte zur Aufnahme des Plasmids ins Zellinnere. Nach Zugabe von 250 µl antibiotikafreien S.O.C. Mediums wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C horizontal geschüttelt (200 rpm). Dieser Schritt ist notwendig, damit sich die Zellwand regenerieren und sich bei den Zellen, die das Plasmid aufgenommen haben, die Antibiotikaresistenz aufbauen kann. Nach Ablauf der Stunde wurden 10 - 50 µl des Ansatzes auf eine LB-Platte (100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden von den gewachsenen Einzelkolonien Klone gepickt und sowohl auf eine Reserveplatte ausgebracht als auch für eine erneute Übernachtflüssigkultur verwendet.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Methoden der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Engl.: polymerase chain reaction) ist eine Methode, mit der sich Nukleinsäuresequenzen *in vitro* durch exponentielle Vervielfältigung spezifisch amplifizieren lassen. Das Verfahren besteht aus drei Zyklen, der Denaturierung der Doppelstrang-DNA, der Anlagerung sequenzspezifischer Oligonukleotide an die Einzelstrang-DNA und der Elongation, d. h. der Synthese und Verlängerung eines zum Ursprungsstrang komplementären Stranges. Im ersten Schritt wird das komplexe DNA-Gemisch temperaturgesteuert denaturiert und dadurch in seine Einzelstränge aufgespalten. Beim Absenken der Temperatur auf eine für die eingesetzten Oligonukleotidprimer abgestimmte Temperatur können sich diese dann an die komplementäre Sequenz der DNA-Einzelstränge anlagern. Durch eine hitzestabile (*Taq*)-DNA-Polymerase wird ein zum Ausgangsstrang komplementärer Strang durch Anbau von im PCR-Ansatz zugefügten Nukleotiden synthetisiert und die Elongation beginnt. Dieser Zyklus wird dann mehrmals wiederholt, um eine Vervielfältigung der Ausgangs-DNA zu erreichen.

2.2.2.1.1 PCR-Varianten

Die verwendeten Reaktionsansätze und PCR-Programme variierten, je nachdem zu welchem Zweck die PCR durchgeführt wurde.

2.2.2.1.2 Einfügen von Punktmutationen

Um in die *C3H/He*-Variante des Gens *Abcc6* Punktmutationen einzufügen und so die *C57BL/6*-Wildtypvariante herzustellen, wurde das Quick Change XL Kit der Firma Stratagene verwendet.

Die für diese PCR verwendeten Primer wurden mit dem Programm Primer3 so designt, dass sie bis auf eine Base komplementär zur *C3H/He*-cDNA waren. An der Position dieser Base erfolgte ein Austausch mit der Base, die sich in der *C57BL/6*-Sequenz dort befindet. In jedem neu entstehenden cDNA-Strang kam es somit zu einer Punktmutation an dieser Stelle. Der unten stehende Reaktionsansatz sowie das in Tabelle 2.13 dargestellte PCR-Programm wurden verwendet. Im Anschluss an die PCR wurde das PCR-Produkt mit DPN1 (siehe 2.2.2.6.2) verdaut, um das ursprüngliche methylierte Plasmid zu zerstören. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer befinden sich im Anhang in Tabelle 7.1.

Reaktionsansatz Gesamtvolumen 10 µl:

- 10x reaction buffer
- Primer forward (10 µM)
- Primer reverse (10 µM)
- dNTP Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Quick Solution
- Destilliertes Wasser
- ds DNA , Vektor (1 µg)
- *Pfu-Turbo*-DNA Polymerase (2,5 U/µl)

PCR-Programm:

Temperatur (°C)	Zeit	Anzahl der Zyklen
95	1 min	1
95	50 s	18
60	50 s	
68	10 min	
68	7 min	1

Tabelle 2.13: PCR-Programm zum Einfügen von Punktmutationen

2.2.2.1.3 Amplifikation von cDNA-Fragmenten

Ein Programm zur Amplifikation von cDNA-Fragmenten ist das so genannte

“touch-down“-Programm (Tabelle 2.14). Dieses zeichnet sich durch einige zusätzliche Zyklen höherer Temperatur am Anfang der PCR aus, welche zu einer spezifischeren Anlagerung der Oligonukleotidprimer an die cDNA und zu einer Unterdrückung unspezifischer Bindungen führen.

Reaktionsansatz Gesamtvolumen 10 µl:

- 4x 5-PRIME-Mastermix
- Destilliertes Wasser
- Primer forward (10 µM)
- Primer reverse (10 µM)
- ds DNA (1 µg)

PCR-Programm „Touch-down-61“:

Temperatur (°C)	Zeit	Anzahl der Zyklen
94	5 min	1
94	30 s	3
61	30 s	
72	45 s	
94	30 s	3
59	30 s	
72	45 s	
94	30 s	3
57	30 s	
72	45 s	
94	30 s	30-40
55	30 s	
72	45 s	
72	10 min	1

Tabelle 2.14: PCR-Programm zur Amplifikation von cDNA-Fragmenten

2.2.2.1.4 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription ist eine Methode bei der mit Hilfe des Enzyms *Reverse Transkriptase* RNA in cDNA umgeschrieben wird. Die RNA wird zunächst für 5 min bei 68 °C inkubiert, dann auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert. Durch die Temperaturerhöhung wird die RNA aufgefaltet und evtl. gebildete Sekundärstrukturen lösen sich auf. Der Puffer und die weiteren Bestandteile werden zur RNA pipettiert und als

letztes die *Reverse Transkriptase* hinzugegeben. Der Ansatz wird gemischt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit lagern sich die im Ansatz befindlichen Random-Hexamer-Primer an die zu ihrer Sequenz komplementären Positionen der RNA an. Die *Reverse Transkriptase* kann diese nun als Ansatzpunkt nutzen und von hieraus mit der Synthese eines zur RNA komplementären cDNA-Stranges beginnen. Im nächsten Schritt wird die *Reverse Transkriptase* bei 95 °C inaktiviert.

Es wurde folgender Ansatz für die Reverse Transkription verwendet.

Reaktionsansatz Gesamtvolumen 10 µl:

- 5x First Strand Puffer
- RNA-Guard (25,200 U/ml)
- 4 mM dNTP (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- pd (N₆)-Primer
- 0,1 M DTT

RNA (0,5-1 µg)

Reverse Transkriptase (M-MLV RT, 200 U/µl)

2.2.2.1.5 Semiquantitative real-time PCR

Die semiquantitative real-time PCR ist eine Methode, die auf dem Prinzip einer herkömmlichen PCR beruht, es aber zusätzlich ermöglicht das PCR-Produkt zu quantifizieren und das Expressionsniveau von Genen zu analysieren. Für die Durchführung dieser Methode wurden der TaqMan (7900 HT Fast Real-Time PCR) der Firma Applied Biosystems und das *qPCRTM Core Kit for Sybr Green I* der Firma eurobiotec verwendet. Die Bestandteile des Kits wurden nach Herstellerangaben in einem 10 µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Tabelle 2.15 zeigt den Ablauf des PCR-Programmes.

Reaktionsansatz Gesamtmenge 10 µl:

- 10x Real-Time Puffer für Sybr[®] Green I Assay
- 50 mM MgCl₂
- 5 mM dNTP (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dUTP)
- Primer forward (10 µM)
- Primer reverse (10 µM)
- Sybr Green I
- dH₂O
- cDNA (1 µg)
- *Taq* Polymerase (5 U/µl)

Ablauf des Programmes:

SDS 2.2.2 (Signal Detection System): Absolute Quantification (Standard Curve)

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	50 °C	2 min	1 x
2	95 °C	10 min	1x
3	95 °C 60 °C	15 s 1 min	40 x
Dissoziation	Schrittweise bis 95 °C	Je 15 s	

Tabelle 2.15: PCR-Programm der real-time PCR

Die Funktionsweise des verwendeten Kits beruht darauf, dass sich der Fluoreszenzfarbstoff Sybr Green I in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA anlagert und dann fluoresziert. Während der real-time PCR lagert sich das im Reaktionsansatz enthaltene Sybr Green I an das PCR-Produkt an und das Ausmaß der messbaren Fluoreszenz steigt mit der Menge der entstehenden Doppelstrang-DNA an. Die Fluoreszenz wird dabei nach jedem PCR-Zyklus gemessen. Es wird die Anzahl von Zyklen bestimmt, an der das gemessene Sybr Green I Signal zum ersten Mal einen zuvor festgelegten Schwellenwert C_t überschreitet, der sich signifikant vom Hintergrundsignal unterscheidet. Dieser C_t -Wert liegt immer in der exponentiellen Phase der PCR, in der sich die Menge des PCR-Produktes in jedem Zyklus verdoppelt. Je mehr Ausgangsmaterial im Reaktionsansatz vorhanden ist oder je stärker das zu untersuchende Gen exprimiert ist, desto kleiner ist die Anzahl der Zyklen die ausreicht, den Schwellenwert C_t zu überschreiten. Anhand ihrer C_t -Werte können dann

einzelnen Proben bezüglich des Expressionsniveaus eines Gens miteinander verglichen werden. Um Unterschiede in der cDNA-Menge im Ansatz auszugleichen, wird der gemessene C_t -Wert jeder Probe auf den C_t -Wert eines housekeeping-Gens wie z. B. *18 S*, *GAPDH* oder *β -Aktin* derselben Probe normalisiert. Dieses housekeeping-Gen wird in allen Zellen konstant exprimiert und kann daher als Referenz für das Expressionsniveau anderer Gene verwendet werden.

In dieser Arbeit wurde das Expressionsniveau einiger Transkriptionsfaktoren der Osteogenese untersucht.

Nachfolgende cDNA-Proben wurden auf ihre Expression osteogener Transkriptionsfaktoren untersucht (Tabelle 2.16 und Tabelle 2.17). Die *in vitro* Proben wurden aus den unterschiedlich transfizierten C3H10T1/2 gewonnen. Die *in vivo* cDNA-Proben wurden aus dem Herzgewebe von *C3H/He* und *C57BL/6* Mäusen isoliert

Verwendete cDNA-Proben:

In vitro Proben:

Zellen, aus denen die cDNA gewonnen wurde	Zeitpunkt der Probenentnahme	Behandelt mit 6 mM NaH₂PO₄ im Medium	Unbehandelt DMEM
C3H10T1/2 ohne Vektor	7 d	N = 3	N = 3
C3H10T1/2 mit pSG5-Vektor	7 d	N = 3	N = 3
C3H10T1/2 mit pSG5- <i>C3H/He</i>	7 d	N = 3	N = 3
C3H10T1/2 mit pSG5- <i>C57BL/6</i>	7 d	N = 3	N = 3

Tabelle 2.16: *In vitro* verwendete Proben in der real-time PCR

In vivo Proben:

Mausstamm	Zeitpunkt der Probenentnahme	Nekrotisches Gewebe	Gesundes Gewebe
<i>C3H/He</i>	1d post Kryopexie	3 x	3 x
<i>C3H/He</i>	3d post Kryopexie	2 x	2 x
<i>C57BL/6</i>	1d post Kryopexie	3 x	3 x
<i>C57BL/6</i>	3d post Kryopexie	3 x	3 x
<i>C57BL/6</i> (Kontrolle)	Abdominalinzision ohne Kryopexie	-	2 x

Tabelle 2.17: In vivo verwendete Proben in der real-time PCR**2.2.2.1.5.1 Optimierung der Oligonukleotidprimer**

Die eingesetzten Oligonukleotidprimer wurden vor ihrer Verwendung mittels einer Standardkurve auf ihre Funktionsfähigkeit getestet. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen einer cDNA-Probe mit dem zu testenden Oligonukleotidprimer versetzt und eine real-time PCR durchgeführt.

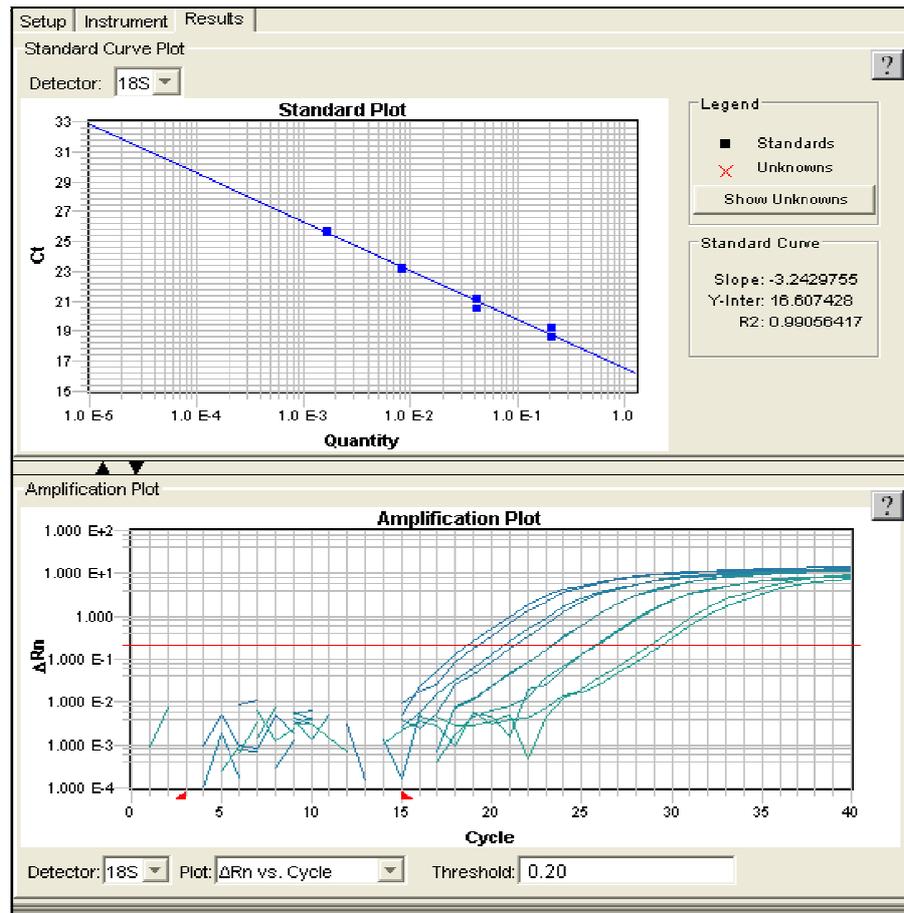


Abbildung 2.2: Standardkurve: Ausschnitt aus dem Programm S.D.S., das zur Analyse der real-time-PCR verwendet wurde. Gezeigt sind die PCR-Verläufe einer 1:5 Verdünnungsreihe einer cDNA-Probe mit Primer für Osteopontin.

Die Abbildung 2.2 zeigt den zeitlichen Verlauf und die Zunahme des PCR-Produktes während einer real-time PCR zur Testung des Primers *Osteopontin*. In der ersten Phase der Amplifikation ist die Templatmenge noch begrenzt und die Wahrscheinlichkeit, dass sich Template, Primer und Polymerasen im Reaktionsansatz treffen und miteinander reagieren, ist gering. Auf diese Phase folgt die exponentielle Phase, in der optimale Reaktionsbedingungen herrschen und sich das PCR-Produkt in jedem Zyklus verdoppelt. Darauf folgt eine Plateauphase in der die Reaktionsbedingungen nicht mehr optimal sind, da die Substrate der Reaktion verbraucht wurden und Polymerasen sowie Nukleotide durch die Temperaturerhöhungen geschädigt wurden. Die horizontale rote Linie markiert in der Abbildung 2.2 den Schwellenwert C_t , der in der exponentiellen Phase der PCR liegt. Die fünf abgebildeten blauen Doppellinien gehören zu einer Standardreihe einer jeweils 1:5 verdünnten cDNA-Probe und überschreiten alle nach einer anderen Anzahl von Zyklen den Schwellenwert C_t . Die am höchsten konzentrierte Probe überschreitet als erste, die am

niedrigsten konzentrierte als letzte den Schwellenwert.

Ein weiteres Kontrollinstrument zur Analyse der PCR-Qualität ist die Auswertung der Dissoziationskurve, die weiteren Aufschluss darüber gibt, wie spezifisch die Oligonukleotidprimer während der PCR an die cDNA gebunden haben. Hat die Dissoziationskurve nur einen Peak, spricht dies für eine spezifische Reaktion ohne Bildung von Primerdimern, welche als zweiter flacherer Peak in der Standardkurve auftauchen würden (Abbildung 2.3). Primerdimere können zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen, da sich Sybr Green I auch an diese anlagert und ein unspezifisches Fluoreszenzsignal detektiert wird.

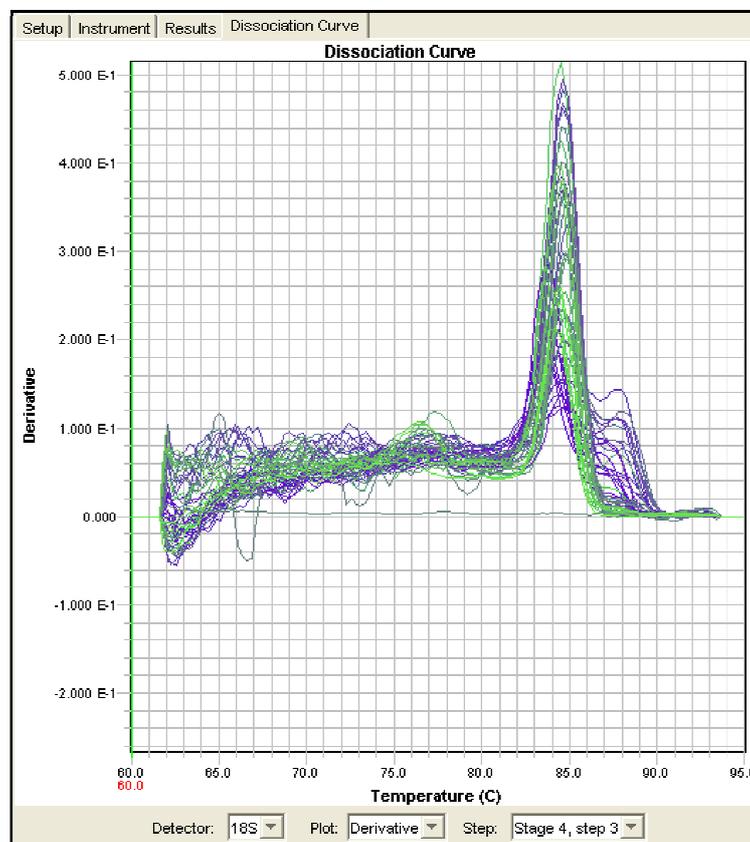


Abbildung 2.3: Dissoziationskurve: Dargestellt ist eine Dissoziationskurve einer real-time PCR mit dem Oligonukleotidprimer Osteopontin. Der einzelne Peak zeigt eine spezifische Primerbindung an.

2.2.2.1.5.2 $\Delta\Delta C_t$ -Methode

Um das Niveau der Genexpression zweier Proben miteinander zu vergleichen, wurde die von Livak und Schmittgen (2001) beschriebene $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet. Das

Grundprinzip dieser Methode beruht darauf, dass eine cDNA-Probe als Referenzprobe festgelegt wird und alle anderen zu dieser in Beziehung gesetzt werden. Dabei gilt folgende Gleichung:

$$\Delta\Delta Ct = 2^{-(\Delta Ct (Probe) - \Delta Ct (Referenz))}$$

$\Delta Ct (Probe)$ ist hierbei der normalisierte C_t -Wert der zu untersuchenden Probe und $\Delta Ct (Referenz)$ der ebenfalls normalisierte Wert der festgelegten Referenzprobe. So kann festgestellt werden um ein wievielfaches die Expression des untersuchten Gens in der Probe höher bzw. niedriger ist als in der Referenzprobe.

2.2.2.1.5.3 Einsatz von Sonden zur Signaldetektion

Da Sybr Green I relativ unspezifisch an Doppelstrang-DNA und z. B. auch an Primerdimere bindet, wurden ausgesuchte Proben zusätzlich mit einem spezifischeren Verfahren untersucht. Dazu wurden Sonden eingesetzt, die am 5'-Ende den Reporterfarbstoff 6-FAM-Phosphoramid und am 3'-Ende den Quencherfarbstoff Sybr Green I gebunden haben. Diese wurden wie auch das TaqMan[®] Gene Expression Assay von der Firma Applied Biosystems bezogen. Es handelt sich bei den eingesetzten Sonden um Oligonukleotide, die sich an die DNA anlagern. Ist die Sonde intakt, liegen Reporter- und Quencherfarbstoff räumlich sehr nah beieinander und die Fluoreszenz des Quencherfarbstoffes überlagert die des Reporterfarbstoffes. Bei der Synthese des komplementären Stranges durch die *Taq*-Polymerase wird die Sonde aus ihrer Bindung an die cDNA verdrängt. Dadurch wird der Reporterfarbstoff frei und das FAM-Fluoreszenzsignal kann detektiert werden. Die Bestimmung der Fluoreszenz ist somit spezifischer, da Primerdimere und unspezifisch gebundenes Sybr Green I nicht detektiert werden.

Nachfolgende FAM-Sonden wurden verwendet:

Sonde	Artikelnummer des TaqMan® Gene Expression Assays von Applied Biosystems (Assay ID)
GAPDH	Mm99999915_g1
β-Aktin	Mm02619580_g1
Sox9	Mm00448840_m1
Runx2	Mm00501580_m1
Vdr	Mm00437297_m1

Tabelle 2.18: In der real-time PCR verwendete FAM-Sonden

Reaktionsansatz (Volumen 10 µl):

- 0,5 µl Sonde
- 5 µl TaqMan® Gene Expression Master Mix
- 3,5 µl Wasser
- 30-80 ng cDNA

Bei den real-time PCR Durchläufen, in denen FAM-Sonden eingesetzt wurden, kam folgendes PCR-Programm zum Einsatz:

Zyklus	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
1	50 °C	2 min	1 x
2	95 °C	10 min	1 x
3	95 °C	15 s	40 x
	60 °C	1 min	40 x

Tabelle 2.19: Programm der real-time PCR mit FAM-Sonden

2.2.2.2 Elektrophoresetechniken

Die Gelelektrophorese ist eine weit verbreitete Methode, um geladene Teilchen im elektrischen Feld zu trennen. Die mittels PCR vervielfältigten cDNA-Fragmente wandern in diesem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode, da sie selber Anionen sind. Die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld wird weitgehend von der Molekülgröße bestimmt, wobei kleine bzw. kurze schneller als große bzw. lange Moleküle wandern. Der

prozentuale Anteil der Agarose im Gel hängt von der erwarteten Fragmentgröße ab und lag zwischen 0,5 - 2,0 %. Die Agarose wird zunächst durch Aufkochen in 1x TBE gelöst. Nachdem das Gel polymerisiert ist, wird es in die Elektrophoresekammer eingehängt und mit 1x TBE-Puffer überschichtet. Zu den einzelnen cDNA-Proben und einem passenden Längenstandard wurden je 1 µl Sybr Green II (1:200 in DMSO) und 1,5 µl Loading Dye gegeben (Gesamtansatzvolumen 10 µl) und die Ansätze jeweils in eine Geltasche pipettiert. Durch die im Loading Dye enthaltenen Farbstoffe, Bromphenolblau und Xylencyanol, wird das Beladen der Gelkammern erleichtert und die Identifikation der Lauffront, d. h. der ungefähren Laufhöhe der cDNA, ermöglicht. Danach wurde mit dem Voltmeter eine Spannung von 100 - 120 V angelegt und die cDNA-Fragmente wanderten entsprechend ihrer Länge auf den positiv geladenen Pol zu. Unter einer Geldokumentationsstation mit UV-Lampe wurde das Gel fotografiert und die Fragmentlängen im Vergleich zum Längenstandard abgeschätzt.

2.2.2.3 Isolation von cDNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Mit dem NucleoSpin[®] Extract II Kit erfolgte die Isolation von cDNA-Fragmenten aus Agarosegelen. Das zu isolierende cDNA-Fragment wurde mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Zu dem Gelstück wurden pro 100 mg Gel 200 µl Puffer NT gegeben und für 5 - 10 min bei 50 °C inkubiert, um das Gel aufzulösen. Währenddessen wurde der Ansatz alle 2 - 3 min einmal auf einem Vortexschüttler gemischt. Im nächsten Schritt wurde das Gemisch dann auf eine NucleoSpin[®] Extract II Säule gegeben und für 1 min bei 11.000 g zentrifugiert, um die cDNA an die Membran der Säule zu binden. Im Weiteren erfolgte ein Waschschrift der cDNA mit 600 µl Puffer NT3 und anschließender Zentrifugation (1 min, 11.000 g). Im letzten Schritt erfolgte die Elution der cDNA mit 15 - 50 µl Elutionspuffer NE (5 mM Tris/HCl, pH 8,5).

2.2.2.4 Spektrometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Mittels des BioPhotometers von Eppendorf wurden die Konzentrationen von DNA und RNA photometrisch bestimmt. Für die Messung wurden 2 µl der jeweiligen Probe eingesetzt, in 98 µl dH₂O gelöst und deren Absorption bei verschiedenen Wellenlängen bestimmt. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm. Unter Berücksichtigung der Verdünnung kann nach der Bestimmung der optischen Dichte (OD) die Konzentration der Probe bestimmt werden. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht hierbei einer

DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

Der Reinheitsgrad der Nukleinsäuren kann anhand des Quotienten OD_{260}/OD_{280} abgeschätzt werden. Bei reiner DNA ergibt sich ein Quotient von 1,8. Ist die Probe mit Proteinen oder aromatischen Substanzen verunreinigt, ergibt sich meist ein Quotient unter 1,8. Ein Quotient über 2 deutet dagegen auf eine Kontamination mit RNA hin.

2.2.2.5 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma SeqLab durchgeführt und die Sequenzen anschließend mit dem Programm Chromas 2.31 (www.technelysium.com.au) ausgewertet.

2.2.2.6 Spaltung von Nukleinsäuren durch Restriktionsenzyme

2.2.2.6.1 Verdau mit EcoR I und Bgl II

Bei EcoR I und Bgl II handelt es sich um Restriktionsenzyme, die an eine für sie spezifische Sequenz der DNA binden und diese dort enzymatisch spalten. Auf dem Vektor pSG5 befinden sich Schnittstellen für diese beiden Enzyme, die es ermöglichen, zwischen beiden Schnittstellen befindliche Gene oder Sequenzen aus dem Vektor herauszutrennen. Ebenfalls ist es durch den Einsatz von nur einem der beiden Enzyme möglich, die Ringmorphologie des Vektors aufzuspalten und ihn zu linearisieren. Die Restriktionsschnittstellen der beiden Enzyme in der cDNA-Sequenz liegen zum einen dicht vor dem Startcodon und zum anderen dicht hinter dem Stopcodon des Gens *Abcc6*. Um zu überprüfen, ob sich das Gen *Abcc6* auf dem pSG5-Vektor befand, wurde der Vektor einmal mit Bgl II und einmal mit den beiden Restriktionsenzymen Bgl II und EcoR I verdaut. Nach Verdau mit Bgl II öffnete sich die Ringstruktur des Vektors. Wurde der Verdau mit beiden Restriktionsenzymen durchgeführt, entstanden zwei Fragmente: Zum einen die eröffnete Ringstruktur des pSG5-Vektors und zum anderen die Sequenz des Gens *Abcc6*. Der Erfolg des Verdau wurde anhand der Größe der entstandenen DNA-Fragmente auf einem Gel analysiert.

Es wurden folgende Ansätze (Tabelle 2.20) hergestellt und dann bei 37 °C für zwei Stunden inkubiert.

Einzelverdau	Doppelverdau
0,5 µl EcoR I (10U/ µl)	0,5 µl EcoR I (10U/ µl)
2 µl cDNA(1 µg/µl)	0,5 µl Bgl II (5U/ µl)
2 µl Wasser	2 µl cDNA(1 µg/µl)
2 µl Universalpuffer	2,5 µl Wasser
	2 µl Universalpuffer

Tabelle 2.20: Reaktionsansätze für Einzel- und Doppelverdau

2.2.2.6.2 DPN1

DPN1 ist ein Enzym, das methylierte DNA degradiert. Nach Ablauf der PCR erhält man ein PCR-Produkt, in dem sich methylierte Originalstränge und unmethylierte neu entstandene Stränge befinden. Wird zu diesem Ansatz DPN1 gegeben, werden die methylierten Originalstränge abgebaut und es resultiert ein Endprodukt, das ausschließlich die neu entstandenen Stränge enthält. Dieses Vorgehen ist z. B. dann notwendig, wenn mittels PCR Mutationen in eine DNA-Sequenz eingefügt worden sind und man ein reines PCR-Produkt ausschließlich mit mutationstragenden Strängen benötigt.

2.2.2.7 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

2.2.2.7.1 Isolation im analytischen Maßstab

Zunächst wird eine LB-Flüssigkultur mit *E. coli* angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Ist die Größe der angesetzten Kultur von *E. coli* relativ klein, verwendet man zur Isolation der Plasmid-DNA das QIAprep[®] Spin Miniprep Kit. Tabelle 2.21 gibt die Zusammensetzung der im Kit enthaltenen Puffer wieder.

Die Übernachtskultur von *E. coli* wird zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das zurückbleibende Pellet wird in 250 µl gekühltem Puffer P1 resuspendiert und in ein 2 ml Tube überführt. Nach Zugabe von 250 µl Puffer P2 wird der Ansatz im Tube gemischt und daraufhin 350 µl des Puffers P3 hinzugefügt und wiederum mehrmals invertiert. Im Anschluss wird der Ansatz 10 min lang bei 13.000 g zentrifugiert. Der entstehende Überstand wird nun in eine im Kit enthaltene QIAprep Spin Säule überführt und erneut für

30 - 60 s zentrifugiert. Die Membran in der Säule wird nun durch 500 µl Puffer PB und erneute 30 - 60 s Zentrifugation gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgt eine weitere Waschung mit 750 µl Puffer PE und 30 - 60 s Zentrifugation. Durch eine weitere einminütige Zentrifugation werden letzte Pufferreste aus der Membran entfernt. Die Säule wird nun auf ein frisches Tube gesetzt. Um die DNA aus der Membran zu lösen, werden 50 µl Elutionspuffer PE auf selbige gegeben und abschließend für eine Minute zentrifugiert.

Puffer des QIAprep® Spin Miniprep Kit	Zusammensetzung
Resuspensionspuffer P1	50 mM Tris-HCL, pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml Rnase A
Lysis-Puffer P2	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
Neutralisationspuffer N3	3 M Ammoniumacetat, pH 3,5
Waschpuffer PB	Keine Herstellerangaben
Elutionspuffer PE	70 % (v/v) Ethanol Keine weiteren Angaben

Tabelle 2.21: Puffer des QIAprep® Spin Miniprep Kits sowie deren Zusammensetzung

2.2.2.7.2 Isolation im präparativen Maßstab

Die Isolation von Plasmid-DNA aus größeren Kulturvolumen von *E. coli* erfolgte mittels des QIAGEN® Plasmid Maxi Kits unter Verwendung des *Plasmid or Cosmid DNA Purification Using QIAfilter* Protokolls. Tabelle 2.22 gibt die Zusammensetzung der im Kit enthaltenen Puffer wieder.

Eine Übernachtskultur von 200 ml LB-Medium mit Bakterien wird für 15 min mit 6.000 g bei 4 °C abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wird anschließend in 10 ml gekühlten Puffer P1 plus RNase resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgt durch die anschließende Zugabe von 10 ml Puffer P2. Das Lysat wird dann bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Nach der Inkubation werden 10 ml vorgekühlter Puffer P3 zum Lysat hinzugegeben, um es zu neutralisieren, und der Ansatz vorsichtig gemischt. Anschließend wird das Lysat durch Filtration mittels QIAfilter Maxi Cartridge geklärt. Auf diese Weise wird das klare Filtrat vom aus Proteinen, genomischer DNA und Zelltrümmern bestehenden, weißen, flockigen Präzipitat getrennt. Eine Anionenaustauschersäule wird mit QBT-Puffer äquilibriert und das Filtrat auf diese Säule geladen. Die Nukleinsäuren binden mit ihren negativ geladenen

Phosphatgruppen an die positiv geladene Matrix der Säule. Die weniger stark negativ geladenen Proteine binden nicht an die Säule und Verunreinigungen werden anschließend mittels zweimaliger Waschung mit 30 ml Puffer QC entfernt. Im Anschluss erfolgt die Elution der Plasmid-DNA mittels 15 ml Puffer QF. Dieser Puffer hat einen hohen Salzgehalt. Durch eine Präzipitation mit Isopropanol erfolgt die Entsalzung und Aufkonzentration der Plasmid-DNA. Hierzu werden 10,5 ml Isopropanol zu den 15 ml Eluat gegeben und der Ansatz für 60 min bei 8.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die im Pellet verbleibende Plasmid-DNA wird in 2 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und für 10 min bei 12.000 g zentrifugiert. Dieser Schritt dient der weiteren Reinigung der DNA, bei dem Salze und niedermolekulare, wasserlösliche Stoffe herausgewaschen werden. Anschließend wird das Pellet in 300 µl H₂O aufgenommen.

Puffer	Zusammensetzung
Puffer P1 (Resuspensions-Puffer):	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml Rnase A
Puffer P2 (Lysis-Puffer):	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
Puffer P3 (Neutralisations-Puffer):	3 M Kaliumacetat, pH 5,5
Puffer QBT (Äquilibrierungs-Puffer) :	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15 % (v/v) Isopropanol 0,15 % (v/v) Triton® X-100
Puffer QC (Wasch-Puffer):	1 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15 % (v/v) Isopropanol
Puffer QF (Elutions-Puffer):	1,25 M NaCl 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 15 % (v/v) Isopropanol

Tabelle 2.22: Puffer des QIAGEN® Plasmid Maxi Kits sowie deren Zusammensetzung

2.2.2.8 *In vitro* Transkription/Translation

Die *In vitro* Transkription/Translation (IVTT) erfolgte mit dem TNT® Quick Coupled Transcription/Translation Systems (Promega) im Institut für Physiologie der Universität zu

Lübeck in der Arbeitsgruppe von Dr. Reinhard Depping.

Die IVTT ist eine Methode, mit der von einer DNA-Matrize *in vitro* das dazugehörige Protein synthetisiert werden kann. Hierzu wird der TNT[®] Quick Master Mix verwendet, der alle für diese Reaktion notwendigen Reagenzien enthält. Er besteht aus RNA-Polymerase, Nukleotiden, Salzen, einem rekombinanten RNasin[®] Ribonuklease Inhibitor und einer Lösung aus Retikulozytenlysat. Die in der Reaktion synthetisierten Proteine können auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und deren Größe mittels Elektrophorese bestimmt werden. Um ein genaueres Ergebnis zu ermöglichen, kann das Protein mit radioaktivem [³⁵S]-Methionin hergestellt werden. Es wird ein Ansatz aus 40 µl TNT[®] Quick Master Mix, 2 µl [³⁵S]-Methionin und 2 µl Plasmid-DNA (1 µg, pSG5, pSG5-*Abcc6-C3H/He*, pSG5-*Abcc6-C57BL/6*) hergestellt und mit nukleasefreiem Wasser auf eine Gesamtmenge von 50 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wird für 60 - 90 min bei 30 °C inkubiert. Danach kann das Ergebnis der Translation beurteilt werden. Hierzu wird ein 1-5 µl Aliquot aus dem Ansatz entnommen und in 20 µl SDS Sample Puffer gegeben. Das Aliquot wird für 20 min auf 60 °C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Aus diesem Aliquot wird wiederum ein Aliquot von 5 - 10 µl entnommen und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels Elektrophorese. Zuvor ist es nötig, freie Aminosäuren durch Acetonpräzipitation zu entfernen. Wenn die Elektrophorese beendet ist, wird das Gel für 30 min mit einer Fixationslösung überschichtet, dabei leicht geschwenkt und anschließend getrocknet. Hierzu wird es zunächst für 5 min in 10 % Glycerol getränkt, damit es während des Trocknens nicht bricht. Auf das Gel wird anschließend ein Blatt Whatman 3 mm Filterpapier gelegt und das Gel dann bei 80 °C im konventionellen Geltrockner getrocknet. Die radioaktiv markierten Proteine können jetzt mittels Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

2.2.2.9 RNA-Isolation aus Zellen oder Geweben mittels Trizol[®] Reagent

Die C3H10T1/2 Zellen wurden auf einer 24-Well-Platte ausgebracht und kultiviert. Vor der RNA-Isolation wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurde eine dem Durchmesser des Wells entsprechende Menge Trizol[®] Reagent in jedes Well gegeben (1 ml Trizol[®]/ 3,5 cm Durchmesser). Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Untergrund abgelöst und mehrmals durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Der Inhalt eines Wells wurde dann jeweils in ein Tube überführt und auf einem Vortex gemischt. Danach wurde der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und kurz zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde in ein frisches Tube

überführt. Gewebeproben wurden in einer ihrer Größe angepassten Menge Trizol[®] Reagent emulgiert. In jedes Tube wurden dann pro 1 ml Trizol[®] 0,2 ml Chloroform gegeben und für 15 s gevortext. Nach einer zwei- bis dreiminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz dann bei 12.000 g und 2 – 8 °C für 15 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation trennte sich der Ansatz in drei Phasen, eine rote Phenol-Chloroformphase, eine Interphase und eine farblose wässrige Phase. Da die RNA sich ausschließlich in der wässrigen Phase befindet, wurde diese in ein neues Tube überführt. Um die RNA zu präzipitieren, wurden pro 1 ml Trizol[®] 0,5 ml Isopropanolalkohol dazugegeben und der Ansatz gemischt. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz bei nicht mehr als 12.000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die RNA bildete jetzt ein gelartiges Pellet am Boden oder der Wand des Tubes. Der Überstand wurde entfernt und die RNA mit 1 ml 75 %igem Ethanol pro 1 ml Trizol[®] gewaschen. Der Ansatz wurde gevortext und nochmals bei nicht mehr als 7.500 g und 2 - 8 °C für 5 min zentrifugiert. Der Ethanolüberstand wurde entfernt und das RNA-Pellet für 5-10 min an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde abschließend in 0,05 % DEPC-Wasser aufgenommen.

Um die Reinheit und Qualität der RNA zu verbessern, wurde das Trizol-Protokoll mit dem Rneasy[®] Mini Kit (Qiagen) kombiniert. Es wurden Phase Lock Gel Tubes verwendet, die eine bessere Trennung der Trizol- von der Chloroformphase bewirkten. Die Kontamination mit DNA oder Proteinen konnte so minimiert werden. Das Trizol-Zell-Lysat wurde in die Geltubes überführt und zentrifugiert. Über der Gelschicht befand sich nach der Zentrifugation eine wässrige Phase, die die RNA aus den Zellen enthielt. Diese Phase wurde abpipettiert und mit der gleichen Menge 70 %igem Ethanol gemischt. Dieses Gemisch wurde auf die Säulen des Kits überführt und zentrifugiert. Die RNA blieb an die Membran der Säule gebunden. Es folgten mehrere Waschschrte mit verschiedenen Puffern sowie ein DNA-Verdau durch Zugabe von DNase auf die Membran, die die RNA weiter aufreinigten. Zuletzt wurde die RNA in ein frisches Tube eluiert und die Konzentration photometrisch gemessen.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Isolation von Proteinen aus Zellen

Um die Proteine aus Zellen isolieren zu können, wurden die Zellen zunächst inklusive

Überstand mit einem Zellschaber aus dem Well entfernt und in ein Tube gegeben. Nach Zentrifugation setzten sich die festen Bestandteile am Boden des Tubes ab. Der Überstand wurde entfernt. Auf das Zellpellet wurden 250 µl Zelllysis-Puffer gegeben. Dieser wurde vorher aus 1 N NaOH hergestellt, der mit 10 %igem SDS auf eine Endkonzentration von 0,1 N gebracht wurde. Dieser Ansatz wurde dann mehrere Stunden auf einem Schüttler bei 4 °C inkubiert, damit die Proteine aus dem Zellpellet gelöst werden konnten.

2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das DC Protein Assay[®] von BioRad verwendet. Auf einer 96-Well-Platte wurde zunächst eine Standardreihe ausgebracht. Hierfür wurden je 5 µl einer Lösung mit den nachfolgenden Proteinkonzentrationen in je zwei Wells pipettiert: 2 x Wasser und einer aufsteigenden Reihe von 0,1-1 mg/ml (Einzelschritte je 0,1 mg/ml). Auch von den zu untersuchenden Proben wurden je 5 µl in je zwei Wells ausgebracht. Danach wurden 25 µl einer 1:50 Mischung aus Lösung S (BioRad) und Lösung A (BioRad) hinzugegeben. Abschließend wurden in jedes Well 200 µl der Lösung B (BioRad) pipettiert. Die Platte wurden für 15 min abgedunkelt gelagert und später die Proteinkonzentration der Proben bei einer Wellenlänge von 630 nm im Vergleich zur Standardreihe photometrisch ermittelt.

2.2.3.3 Immunhistologie

Um die Expression der *Abcc6*-enthaltenden Plasmide in der Zellkultur darzustellen, wurden HEK-Zellen (Engl.: human embryonal kidney) zunächst auf einem Chamber Slide ausgebracht und anschließend unter Verwendung des Nanofectin Transfection Reagent mit jeweils 1 µg der drei Varianten des pSG5-Vektors transfiziert (pSG5, pSG5-*Abcc6-C3H/He*, pSG5-*Abcc6-C57BL/6*).

Zwei Tage nach der Transfektion wurde der Zellmonolayer mit PBS gewaschen und anschließend mit 70 %igem Ethanol fixiert, um ihn dann immunhistologisch zu untersuchen. Für die Färbungen wurden die im "Cell and Tissue Staining Kit" (R&D systems) mitgelieferten Farbstoffe und Reagenzien verwendet. Die Blockung endogener Peroxidasen erfolgte durch Zugabe von 1 - 3 Tropfen Peroxidaseblock-Lösung pro Chamber Slide und fünfminütiger Inkubation. Dies war notwendig, da beim Anfärben der Farbstoff durch eine zugesetzte Peroxidase aktiviert wird und endogene Peroxidasen das Ergebnis verfälschen würden. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 20 min mit 1 - 3 Tropfen/Slide Serumblock (Serum Blocking Reagent D) überschichtet.

Die Serumblocklösung stammt aus der Spezies, aus der der sekundäre Antikörper gewonnen wurde und blockiert eventuell andere Bindungsstellen auf dem Monolayer. Hierdurch wird sichergestellt, dass der sekundäre spezifisch an den primären Antikörper und nicht an den Monolayer bindet. Anschließend wurde der Monolayer mit dem monoklonalen primären Anti-Maus MRP6-S20 Antikörper (Santa Cruz, 5 µg/ml) überschichtet und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Antikörper ist gegen das Proteinprodukt des Gens *Abcc6*, das MRP6, gerichtet. Nach der Inkubation wurden nicht gebundene Antikörper durch mehrmaliges, je zweiminütiges Waschen mit PBS entfernt. Im nächsten Schritt wurde der Monolayer für 30 min mit dem sekundären Biotin-gelabelten Antikörper Donkey-Anti-Goat-IgG-HRP überschichtet. An diesen Antikörper ist der Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Komplexe gebunden. Diese Peroxidase aktiviert nach 30-minütiger Inkubation den zugesetzten Farbstoff 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), der sich dadurch bräunlich verfärbt. Unter dem Durchlichtmikroskop konnte anschließend beurteilt werden, ob die Zellen MRP6 exprimierten.

2.2.3.4 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zur Auftrennung und zum Nachweis von Proteinen unter Verwendung einer Gelelektrophorese und einer Trägermembran. Die verwendeten Gele und Puffer wurden nach den in Tabelle 2.10 beschriebenen Rezepten hergestellt. Im ersten Schritt wurden die Proteine, die aus transfizierten HEK-Zellen (pSG5, pSG5-*Abcc6-C3H/He*, pSG5-*Abcc6-C57BL/6*) isoliert wurden, in einer vertikalen Gelelektrophorese entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Hierzu wurde in eine vertikale Gelelektrophoresekammer ein 1 mm dickes, 6,5 %iges SDS-Polyacrylamid-Trenngel gegossen (SDS-PAGE). Dem Ansatz wurden die beiden Katalysator-Redoxsysteme APS und TEMED zugesetzt, um die Polymerisation des Gels zu initiieren. Die Dichte des Polyacrylamidgels richtete sich dabei nach der zu erwartenden Größe der Proteine. Um ein Austrocknen des Gels zu verhindern, wurde es zunächst mit 70 %igem Ethanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Ethanol abgegossen, ein Sammelgel oberhalb in die Kammer gegossen und ein Probenkamm eingehängt. Das Sammelgel wurde dafür verwendet, die Proteine für die folgende Elektrophorese an einer gemeinsamen Lauffront zu positionieren. Zu den Proteinproben (30 µg) wurde 3 x SDS Sample Buffer plus DTT Ladepuffer gegeben, um ein Verbleiben der Probe in der Tasche zu sichern. Danach wurde der Ansatz für 5 min auf 95 °C erhitzt, um die Proteine zu

denaturieren und dann auf Eis gestellt. War auch das Sammelgel polymerisiert, wurde der Elektrophoresepuffer in die Kammer gegeben und die Taschen mit den Proben sowie eine mit dem Precision Plus Protein Standard (BioRad) beladen. Als Ladekontrolle wurde außerdem α -Actin in die Taschen gegeben. Da es sich um ein kleines Protein handelt, wanderte es im Gel weiter als das zu untersuchende MRP6. Dies ermöglichte eine separate Detektion des α -Actins durch einen sekundären Anti-rabbit HRP IgG Antikörper (Cell Signaling Technology) im zuvor abgetrennten unteren Teil des Gels. Für 90 - 120 min wurde eine Spannung von 100 V angelegt, um die Proben auszutrennen. Danach wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel, in dem sich die Proteine befanden für den nachfolgenden Blot verwendet. Hierzu wurden die Proteine auf dem Elektrophoresegel in einem Tank Transfer System auf eine Transfer PVDF-Membran Immobilon-P geblottet. Beide Membranen wurden dabei parallel zueinander in ein Gestell eingespannt und in einen mit Blotpuffer gefüllten Tank eingehängt. Für 60 min wurde eine Spannung von 120 V angelegt und die Proteinproben dadurch auf die Immobilon-P Membran geblottet. Nach dem Blotvorgang wurden freie Proteinbindungsstellen auf der Membran geblockt. Hierzu wurde sie für eine Stunde bei 4 °C in eine 5 %ige proteinhaltige Magermilchlösung gelegt.

Nachfolgend wurde der primäre MRP6-S20 Antikörper (Santa Cruz–sc5787 Goat, Verdünnung 1:1000) in eine 5 %ige Magermilchlösung gegeben und die Immobilon-P Membran in dieser Lösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x 15 min mit TBS-Tween-Waschpuffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in eine Lösung aus 5 %iger Magermilch und dem sekundären Donkey-Anti-Goat-IgG-HRP Antikörper (Santa Cruz–sc2020, Verdünnung 1:2000) gegeben und anschließend wieder 3 x 15 min mit TBS-Tween-Waschpuffer gewaschen. Die Detektion des Antikörpersignals erfolgte mit dem ECL Plus Western Blotting Detection Reagent System (AmershamTM). Hierzu wurde ein Ansatz aus 2 ml Solution A und 50 μ l Solution B auf die Membran gegeben und für 5 min in Dunkelheit inkubiert. Die Chemilumineszenz wurde abschließend mit dem Molecular Imager ChemiDoc XRS System von BioRad detektiert.

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Anzucht von Zellen

Die Anzucht der C3H10T1/2 Zellen erfolgte in den entsprechenden Kulturgefäßen im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C unter 5 % CO₂. Die Zellen wurden in Dulbeccos modified Eagles Medium (DMEM) mit 10 % fetalem Kälberserum und 5 % Penicillin/Streptomycin in Kulturflaschen kultiviert. Entsprechend der mikroskopischen Beurteilung der Zellen erfolgte alle zwei bis vier Tage je nach Konfluenzgrad der Zellen ein Medienwechsel unter sterilen Bedingungen.

2.2.4.2 Subkultivierung von Monolayern

Das Subkultivieren der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Zunächst wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 7 ml vorgewärmten 1 x Trypsin überschichtet, für 3 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und währenddessen regelmäßig unter dem Mikroskop begutachtet. Dabei war zu beachten, dass die Zellen nicht länger als 5 min dem Trypsin ausgesetzt wurden, da dieses dann toxisch für die Zellen wäre. Durch das Trypsin lösten sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche und gingen in den Überstand. Waren 90 % der Zellen in den Überstand gegangen, wurden 13 ml vorgewärmtes DMEM in die Kulturflasche gegeben. Hierbei neutralisierte das enthaltene FKS die Wirkung des Trypsins. Die Zellsuspension wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zu diesem Zeitpunkt wurden 10 µl der Suspension abgenommen und in einer Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Die Suspension wurde für 5 min bei 1000 g zentrifugiert. Es entstand ein Zellpellet, von dem der Überstand abgesaugt wurde. Das Pellet wurde in einer der Zellzahl entsprechenden Menge frischen Mediums aufgenommen und auf neue Kulturgefäße überführt. Bei einer Subkultur in T75er Flaschen wurde eine Zellzahl von 2-4 x 10⁵ je Flasche in 20 ml Medium, bei 24-Well-Platten 1 x 10⁵ Zellen/Well/ml verwendet.

2.2.4.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels einer Neubauer Zählkammer. Nachdem die Zellen während des Subkultivierens vom Untergrund abgelöst wurden, wurden 10 µl der Suspension entnommen und unter das Deckgläschen der Neubauer Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen gezählt, die sich in den äußeren vier Quadranten

des Zählfeldes befanden und aus der ermittelten Anzahl der Mittelwert gebildet. Dieser Wert wurde mit 10^4 multipliziert und man erhielt die Zellzahl pro Milliliter. Auf die Gesamtmenge der Zellsuspension hochgerechnet ergab sich die Gesamtzellzahl.

2.2.4.4 Transfektion von Zellen

Zunächst wurden die Zellen auf eine 24-Well-Kulturplatte subkultiviert und bis zu 60 - 80 % Konfluenz kultiviert. War die erforderliche Konfluenz erreicht, wurden die Zellen mittels TransFectin™ Lipid Reagent und leicht abgewandeltem Protokoll transfiziert. Es wurden zunächst zwei Ansätze hergestellt. Zu 50 µl serumfreien DMEM wurde 1 µg cDNA gegeben. In einem weiteren Ansatz wurden 3,2 µl TransFectin™ in 50 µl serumfreies DMEM gegeben. Anschließend wurden die beiden Ansätze vermischt und bei Raumtemperatur für 25 min inkubiert. Dabei ist es entscheidend, dass der TransFectin™ enthaltende zum cDNA enthaltenden Ansatz gegeben wird und diese Reihenfolge stets eingehalten wird. 100 µl dieses Ansatzes wurden zum Medium jedes Wells pipettiert. Nach 4, 12, 24 und 48 Stunden wurde mikroskopisch das Aussehen der Zellen kontrolliert und bei Bedarf ein Medienwechsel durchgeführt.

Die Transfektionseffizienz wurde durch Transfektion einiger Zellen mit GFP und späterer Anfärbung der Zellkerne mit DAPI kontrolliert.

2.2.4.5 Kryokonservierung von Zellen

Um auch später noch auf die Zellen zurückgreifen zu können, wurden Stocks angelegt und bei -196 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zunächst wurden die Zellen dafür mit Trypsin vom Flaschengrund abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und die Zellzahl mit der entsprechenden Menge Einfriermedium auf 5×10^5 Zellen/ml eingestellt. Das Einfriermedium wurde vorher aus DMEM + FKS + Pen/Strep und 10 % DMSO hergestellt. Das DMSO verhinderte die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zelle sowie die Dehydratation des Zytoplasmas. Die Tubes wurden sofort auf Eis gelagert und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.4.6 Quantitative Bestimmung der Verkalkung mittels Randox Ca Kit

Um die Verkalkung der C3H/10T1/2 Zellen quantitativ bestimmen zu können, wurde das Randox Ca Kit verwendet. Zunächst wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und der Monolayer einmal mit PBS gewaschen. In jedem Well wurde der Monolayer dann mit 500 µl 0,6 N HCL überschichtet und über Nacht auf einem Schüttler im Kühlraum

inkubiert, um das Kalzium aus dem Monolayer zu lösen. Am nächsten Tag wurde der Monolayer mittels Zellschaber abgehoben und mit HCL zusammen in ein Tube überführt. Anschließend wurden die Zellen und der Überstand durch Zentrifugation voneinander getrennt. 12,5 µl des Überstandes wurden dann in ein Well einer 96-Well-Plate-Reader Platte überführt und mit 150 µl einer 1:1 Mischung der zum Randox Ca Kit gehörigen Lösungen R1 und R2 überschichtet. Der Kalziumgehalt wurde photometrisch gegen eine Standardreihe bei einer Wellenlänge von 570 nm ermittelt.

2.2.4.7 Färbungen

2.2.4.7.1 Alizarin Red S Färbung

Die Färbung mit Alizarin Red S ist eine spezifische und sensitive Methode, um Kalziumablagerungen nachzuweisen. Das Molekül Alizarin Red S bindet dabei mit seinen OH-Gruppen zweiwertige Kationen wie z. B. Kalzium und bildet eine Chelatverbindung. Amorphe Kalziumablagerungen stellen sich durch diese Komplexbildung intensiv rötlich-orange dar. Die Alizarin Red S Färbung wurde mit dem Osteogenesis Quantitation Kit (Chemicon International) durchgeführt. Zunächst wurde das Nährmedium von den Zellen abgesaugt und der Monolayer zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 10 % Formaldehyd überschichtet, für 15 min inkubiert und somit fixiert. Das Formaldehyd wurde anschließend abgesaugt und der Monolayer zweimal mit deionisiertem Wasser gewaschen. In jedes Well wurde 1 ml Alizarin Red S Solution gegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Alizarin Red S entfernt und der Monolayer viermal mit deionisiertem Wasser gewaschen. Um die Zellen vor dem Austrocknen zu schützen, wurden sie abschließend noch einmal mit 1 ml Wasser bedeckt und die Verkalkung unter dem Mikroskop beurteilt.

2.2.4.7.1.1 Quantifizierung der Verkalkung

In einem weiteren Schritt wurde die Verkalkung auch quantitativ bestimmt. Hierzu wurden zu jedem Well 400 µl 10 % Essigsäure gegeben und die 24-Well-Platte auf dem Schüttler für 30 min inkubiert. Danach wurde der Inhalt eines Wells jeweils in ein Tube überführt, kurz zentrifugiert und für 10 min bei 85 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min auf Eis gestellt und danach für 15 min bei 20.000 g zentrifugiert. 400 µl des Überstandes wurden in ein frisches Tube überführt und mit ≈150 µl Ammoniumhydroxid neutralisiert. Von diesem Ansatz wurden dann 150 µl in ein Well einer Elisa-96-Well-

Platte gegeben und gegen eine Standardreihe photometrisch die Kalziumkonzentration ermittelt.

2.2.4.7.2 Calcein-Färbung

Calcein ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der durch die Zellmembran lebender Zellen in deren Intrazellularraum transportiert werden kann und dort in der Lage ist, Kalzium zu chelatieren. Durch diese Komplexbildung entsteht eine grüne Fluoreszenz, die unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden kann. Calcein dient dem Nachweis von Verkalkungen in der Zellkultur. Für die Färbung wird zunächst eine 100 mM Stammlösung von Calcein in 0,05 M TBS (pH 9) hergestellt. Daraus wird durch weiteres Verdünnen mit TBS eine 0,1 mM Gebrauchslösung hergestellt und die Zellen 30 min mit dieser überschichtet. Anschließend wird der Monolyer 3 x für jeweils 5 min mit TBS gewaschen. Danach kann eine Färbung der Zellkerne mit DAPI erfolgen.

2.2.4.7.3 Färbung mit DAPI

DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der bevorzugt in der kleinen Furche der DNA an AT-reiche Regionen bindet. Wenn DAPI mit UV-Licht angeregt wird, fluoresziert es im sichtbaren Bereich in blauer bis cyaner Farbe. Der Farbstoff wird zur Färbung von Zellkernen verwendet und gilt als DNA-spezifisch. Für die Färbung mit DAPI wird zunächst ein Ansatz aus einem Teil DAPI und neun Teilen TBS hergestellt. Der Zellmonolayer wird für zwei Minuten mit diesem Ansatz überschichtet und anschließend mehrmals mit TBS gewaschen. Die Fluoreszenz der Zellkerne kann danach unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden.

2.2.4.8 Etablierung eines Zellkulturmodell zur Untersuchung von Verkalkungsprozessen *in vitro*

2.2.4.8.1 Vorbereitungen

Um ein Zellkulturmodell für Verkalkungsprozesse zu etablieren, war es notwendig, einige Einflussgrößen zunächst in vorbereitenden Versuchen zu optimieren. Dazu wurden einige Substanzen, die später verwendet werden sollten, auf ihre Toxizität getestet.

2.2.4.8.2 Toxizitätstestungen

2.2.4.8.2.1 Toxizität der Transfektionlösungen

Bevor die C3H10T1/2 Zellen mit den zuvor hergestellten Plasmidkonstrukten transfiziert werden konnten, wurden zunächst verschiedene Transfektionslösungen auf ihre Toxizität getestet. Hierzu wurden die Zellen bis zu einer ca. 80 %igen Konfluenz auf einer 6-Well-Platte kultiviert. In drei Wells erfolgte die Transfektion mit Transfektin (BioRad) und in den anderen drei Wells mit Nanofektin (PAA). Statt DNA wurden den Ansätzen eine entsprechende Menge Wasser zugesetzt. Die Zellen wurden nach 4, 12 und 24 Stunden mikroskopisch beurteilt.

2.2.4.8.2.2 Toxizität der Vektoren in verschiedenen Konzentrationen

Um herauszufinden, ob die Plasmid-DNA toxisch für die Zellen war, wurden sie mit unterschiedlichen Konzentrationen der Vektoren pSG5, pSG5-*Abcc6-C3H/He* und pSG5-*Abcc6-C57BL/6* transfiziert. Auf einer 24-Well-Platte wurden die C3H10T1/2 Zellen mit jeweils 1 µg, 0,5 µg, 0,25 µg und 0,1 µg der Plasmid-DNA transfiziert und mikroskopisch beurteilt.

2.2.4.8.3 Auswahl des Verkalkungsinduktors

Um Verkalkungsprozesse in der Zellkultur zu initiieren, wurden dem Medium verschiedene anorganische Phosphate zugesetzt und auf ihre verkalkungsinduzierende Wirkung hin untersucht.

2.2.4.8.3.1 β -Glycerophosphat

In einem Vorversuch wurden dem Nährmedium verschiedene Konzentration von β -Glycerophosphat zugesetzt. Danach wurde ermittelt, unter welcher Konzentration die Zellen eine optimale Verkalkung zeigten. Auf einer 24-Well-Platte wurden jeweils vier Wells mit folgenden Konzentrationen an β -Glycerophosphat im Medium für 21 d kultiviert: 5 mM, 10 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM und 150 mM.

2.2.4.8.3.2 Natriumdihydrogenphosphat

Als weiterer Induktor der Verkalkung diente Natriumdihydrogenphosphat(NaH_2PO_4). Auf einer 24-Well-Platte wurden jeweils vier Wells mit folgenden Konzentrationen anorganischen Phosphates im Medium für 21 d kultiviert: 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 4 mM,

und 7 mM.

2.2.4.8.4 Ablauf des Zellkulturversuches

C3H10T1/2 Zellen einer Passage zwischen 7-10 wurden in T75-Kulturflaschen herangezogen bis eine genügend hohe Anzahl Zellen vorhanden war, um 24-Well-Platten mit 5×10^5 Zellen pro Well zu bestücken. Nachdem eine Konfluenz von 80 % erreicht war, wurden die Zellen mittels Transfektin (BioRad) mit einer cDNA-Menge von $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ pro Well transfiziert. Nach Ablauf einer Woche wurden die Platten jeweils zur Hälfte weiter mit Medium kultiviert, das 6 mM Natriumdihydrogenphosphat enthielt, die andere Hälfte der Platte erhielt weiterhin DMEM. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Medienwechsel. Zu einem Zeitpunkt wurden jeweils sechs Platten gleichzeitig behandelt. Auf je zwei wurde der Versuch nach 3 d, nach 7 d und nach 21 d beendet. Eine Platte wurde jeweils zur Isolation von RNA, die andere zur Bestimmung der Kalzium- und Proteinkonzentration verwendet. Dieser Versuchsablauf wurde insgesamt dreimal wiederholt.

2.2.5 Tierexperimentelle Methoden

Um zu überprüfen, ob sich die *in vitro* ermittelten Ergebnisse auch *in vivo* zeigten, war es notwendig, Gewebeproben von Mäusen zu untersuchen.

Die Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Deutschen Tierversuchskommission von Schleswig-Holstein und mit Genehmigung der lokalen Aufsichtsbehörde durchgeführt (Referenznummer: 1/1n/09).

2.2.5.1 Tierhaltung

Die Tierversuche wurden von Dr. Zouhair Aherrahrou durchgeführt, der mir die entnommenen Gewebeproben zur weiteren Untersuchung überließ.

Es wurden die beiden Inzuchtsstämme *C3H/He* und *C57BL/6* verwendet, die von der Firma Charles River (Sulzbach-Rosenberg) bezogen wurden. Alle Mäuse wurden in einem 12 h Tag/Nacht-Rhythmus und bei freiem Zugang zu Wasser und Nahrung in einer pathogenfreien Umgebung gehalten. Die verwendete Nahrung (Altromin 1324-pellet, Altromin, Lage) enthielt nachfolgende Bestandteile: 19 % Proteine, 4 % Fett, 6 % Fasern, 7 % Asche, 13,5 % Feuchtigkeit, 0,9 % Kalzium, 0,7 % Phosphor, 15.000 IE Vitamin A, 600 IE Vitamin D3, 75 mg Vitamin E und 5 mg Kupfer.

2.2.5.2 Kryopexie des Myokards

Bei der Kryopexie handelt es sich um eine durch Kälte induzierte Verletzung des Myokards (Brunnert und Altman, 1990) durch die es möglich ist, unter Ausschluss des Fettstoffwechsels eine maximale Stimulation der dystrophen Myokardverkalkung zu erreichen und den zeitlichen Ablauf der Verkalkungsentwicklung optimal zu untersuchen. Hierzu wurden die Mäuse zunächst durch eine kurze Isofluraninhalation und eine intraperitoneale Injektion von Avertin[®]-Lösung (250 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert. Danach wurde das Abdomen nach einer Rasur der Haare durch eine Inzision der Rekturscheide entlang der Linea alba eröffnet und die Bauchorgane mittels einer Schiene zur Seite geschoben. Das schlagende Herz wurde durch das Zwerchfell hindurch dargestellt. Ein zuvor in flüssigem Stickstoff abgekühlter Metallstempel (Durchmesser ca. 4 mm²) wurde für 10 Sekunden auf das schlagende Herz gelegt und so eine Nekrose induziert. Abschließend wurde das Peritoneum mit Einzelknopfnähten sowie die Haut mit einer fortlaufenden Naht verschlossen. Nach Ablauf von einem bzw. von drei Tagen wurde der Versuch beendet, indem die Mäuse unter Inhalationsnarkose durch cervikale Dislokation geopfert wurden. Die Herzen der Tiere wurden entnommen, dann in PBS gespült und je eine Gewebeprobe aus einem durch die Kryopexie nekrotischen und aus einem gesunden Gewebsanteil entnommen. Somit ergaben sich für die weiteren Untersuchungen folgende Proben (Tabelle 2.23):

Mausstamm	Zeitpunkt der Probenentnahme	Nekrotisches Gewebe	Gesundes Gewebe
<i>C3H/He</i>	1 d post Kryopexie	3 x	3 x
<i>C3H/He</i>	3 d post Kryopexie	3 x	3 x
<i>C57BL/6</i>	1 d post Kryopexie	3 x	3 x
<i>C57BL/6</i>	3 d post Kyropexie	3 x	3 x
<i>C57BL/6</i> (Kontrolle)	3 d post Abdominalinzision ohne Kryopexie	-	2 x

Tabelle 2.23: Übersicht über in vivo gewonnenen Gewebeproben

Bis zur RNA-Isolation wurden die Gewebeproben in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.6 Experimenteller Ablauf der Doktorarbeit

Um ein besseres Verständnis für die Zusammenhänge der Methoden und den experimentellen Ablauf während dieser Arbeit zu ermöglichen, werden sie im folgenden Abschnitt noch einmal chronologisch und zusammenhängend dargestellt.

***In vitro* Versuche:**

- Aus der für DCC-prädisponierten *C3H/He*-cDNA des Gens *Abcc6* wurde durch Einfügen von sieben Punktmutationen die DCC-resistente *C57BL/6*-cDNA hergestellt. (siehe 2.2.2.1.2)
- Die Funktionsfähigkeit der hergestellten Konstrukte wurde *in vitro* durch IVTT, Immunhistologie und Western Blot bestätigt. (siehe 2.2.2.8 / 2.2.3.3 / 2.2.3.4)
- Ein Zellkulturmodell mit C3H10T1/2 Zellen und NaH₂PO₄ (6 mM) als Verkalkungsinduktor wurde etabliert. (siehe 2.2.4.8)
- Die Zellen wurden mit den hergestellten Varianten von *Abcc6* transfiziert und für 3 d, 7 d und 21 d mit NaH₂PO₄-haltigem Medium kultiviert. (siehe 2.2.4.4 / 2.2.4.8.4)
- Die Ausbildung von Verkalkung wurde auf histologischer und molekularer Ebene bestätigt. (siehe 2.2.4.7 / 2.2.2.1.3)
- Das Ausmaß der Verkalkung wurde quantifiziert. (siehe 2.2.4.6 / 2.2.4.7.1.1)
- Aus den Zellen wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. (siehe 2.2.2.9 / 2.2.2.1.4)
- Die gewonnene cDNA wurde mittels konventioneller PCR und real-time PCR auf die Expression von osteogenen Transkriptionsfaktoren untersucht. (siehe 2.2.2.1.3 / 2.2.2.1.5)

***In vivo* Versuche:**

- Um Aufschluss über die Expression dieser Transkriptionsfaktoren *in vivo* zu erhalten, wurden cDNA-Proben aus Mäusen der Stämme *C3H/He* und *C57BL/6* untersucht. Diese wurden von Dr. Zohair Aherrahrou entnommen (siehe 2.2.5.2). Aus den gewonnenen Gewebeproben wurde RNA gewonnen, in cDNA umgeschrieben und mit diesen Proben ebenso wie mit den aus Zellen gewonnen Proben verfahren.

3. Ergebnisse

3.1 Expression des Gens *Abcc6* bei der Maus

3.1.1 Gewebespezifität

Um einen Überblick darüber zu erhalten, in welchen Geweben das Gen *Abcc6* exprimiert wird, wurden einige Gewebe der Maus (Leber, Niere, Auge, Milz, Gehirn, Haut, Muskel, Thymus, Magen sowie Herzgewebe nekrotisch und gesund je von Stamm *C3H/He* und *C57BL/6*) auf die Expression des Gens *Abcc6* untersucht. Zusätzlich wurde auch die murine mesenchymale Stammzelllinie C3H10T1/2 auf die Expression des Gens getestet.

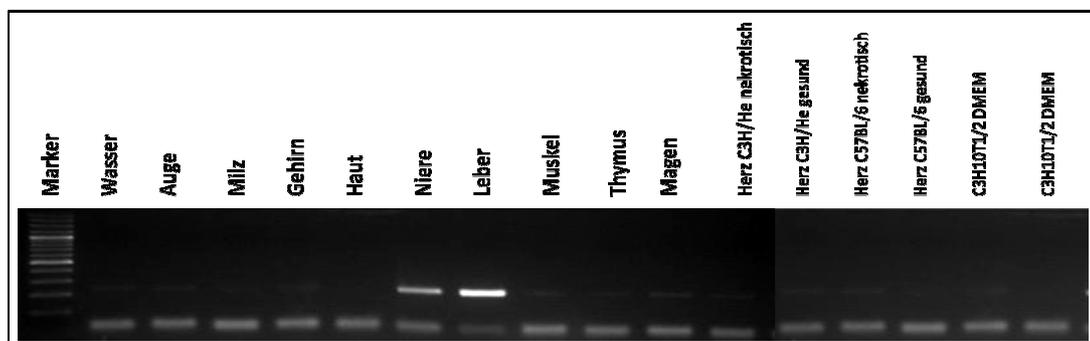


Abbildung 3.1: Gewebespezifische Expression des Gens *Abcc6*: Dargestellt ist das Bild eines Elektrophoresegels. Die PCR-Produkte einer PCR mit einem *Abcc6*-spezifischen Primer (*Abcc6_mus*) wurden auf das Gel aufgetragen.

Es zeigte sich, dass das Gen *Abcc6* am stärksten in der Leber und zu einem etwas geringeren Ausmaß in der Niere exprimiert wurde (Abbildung 3.1). Auch die murine mesenchymale Stammzelllinie C3H10T1/2 zeigte eine leichte Expression des Gens *Abcc6*.

3.2 Sequenzanalyse des Gens *Abcc6* in den Mausstämmen *C3H/He* und *C57 BL/6*

Die Stämme *C3H/He* und *C57BL/6* wurden als Modelle für die Untersuchung von Verkalkungsprozessen verwendet. Der Stamm *C3H/He* wurde dabei als prädisponiert für die Entwicklung von dystropher kardialer Verkalkung (DCC), der Stamm *C57BL/6* als resistent für DCC identifiziert. Um eine Vorstellung über die Funktion des *Abcc6*-Proteinproduktes zu gewinnen, hat die Arbeitsgruppe um Aherrahrou die cDNA des Gens *Abcc6* beider Mausstämmen sequenziert (Aherrahrou *et al.*, 2007). Die Arbeitsgruppe

konnte dabei in der cDNA-Sequenz des Stammes *C3H/He* im Vergleich zum Stamm *C57BL/6* sieben Punktmutationen identifizieren, die den Austausch von sieben Aminosäuren im resultierenden MRP6 zur Folge hatten. Nachfolgende Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die Position der gefundenen Punktmutationen sowie die daraus resultierenden Aminosäureaustausche zwischen *C3H/He* und *C57BL/6*.

Position der Punktmutation	Aminosäure <i>C3H/He</i>	Aminosäure <i>C57BL/6</i>
23	Serin (S)	Arginin (R)
186	Leucin (L)	Glutaminsäure (G)
706	Valin (V)	Alanin (A)
927	Threonin (T)	Isoleucin (J)
1401	Glutamin (Q)	Histidin (H)
1448	Valin (V)	Leucin (L)
1476	Serin (S)	Asparagin (N)

Tabelle 3.1: Aminosäureunterschiede zwischen *C3H/He* und *C57BL/6*: Übersicht über die Positionen der in die *C3H/He*-Variante von *Abcc6* eingefügten Punktmutationen und der daraus resultierenden Aminosäureaustausche.

Zur besseren Veranschaulichung sind im nachfolgenden Schema (Abbildung 3.2) die Positionen der Punktmutationen im Gen sowie die Aminosäureaustausche noch einmal dargestellt.

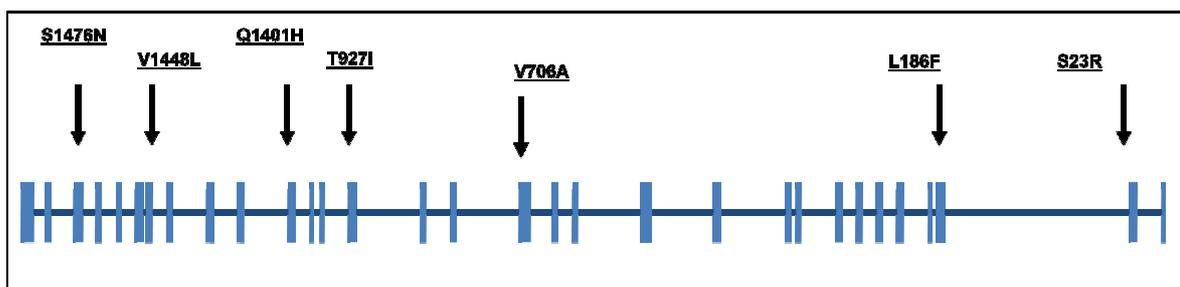


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Gens *Abcc6*: Dargestellt ist ein Schema des Gens *Abcc6*. Die blauen Querbalken symbolisieren die Exone des Gens. Die schwarzen Pfeile markieren die Positionen der in die *C3H/He*-Variante von *Abcc6* eingefügten Punktmutationen, die Buchstaben vor und hinter der Positionsnummer geben den Aminosäureaustausch an.

3.3 Herstellung eines pSG5-Konstruktes auf einem *C3H/He*-Hintergrund

3.3.1 Einfügen von sieben Punktmutationen

Die in einen pSG5-Expressionsvektor geklonte cDNA des Gens *Abcc6* wurde von der Firma RZPD in Berlin erworben. Die cDNA entsprach der Sequenz des für DCC prädisponierten Mausstammes *C3H/He*. In das Gen auf diesem Vektor wurden unter Verwendung des Quick Change XL Kits der Firma Stratagene die sieben Punktmutationen eingefügt, um dadurch die *C57BL/6*-Wildtypvariante des Gens *Abcc6* zu erhalten. Hierzu wurden die in Tabelle 7.1 dargestellten Primer verwendet.

3.3.2 Sequenzierung der hergestellten cDNA

Nach dem Einfügen jeder Punktmutation wurde der betreffende Sequenzabschnitt des Gens *Abcc6* mittels PCR amplifiziert, die cDNA isoliert und von der Firma SeqLab sequenziert. Anschließend wurden die Sequenzen mit dem Programm Chromas 2.31 ausgewertet und überprüft, ob sich die Mutation im Gen befand. Die nächste Mutation wurde jeweils nach dem gleichen Prinzip eingefügt, bis alle sieben Mutationen eingefügt und die *C57BL/6*-Variante von *Abcc6* hergestellt worden war. Abschließend wurden die fertigen Varianten des pSG5-Vektors (pSG5-*Abcc6*-*C3H/He*, pSG5-*Abcc6*-*C57BL/6*) jeweils komplett sequenziert. Die Sequenz der auf dem Vektor befindlichen cDNA des Gens mit den eingefügten Punktmutationen befindet sich im Anhang (7.1 Sequenz des Gens *Abcc6*).

Die nachfolgende Abbildung 3.3 zeigt einen Ausschnitt aus dem Analyseprogramm Chromas 2.31 mit dem die Sequenzen auf das Vorhandensein der eingefügten Punktmutationen überprüft wurden.



Abbildung 3.3: Sequenzausschnitt im Programm Chromas: Dargestellt ist ein Screen Shot aus dem Programm Chromas mit dem die Sequenzen des Gens *Abcc6*. Der blaue Rahmen markiert die Position, an der ein Austausch einer Base stattgefunden hat. Dargestellt ist die Mutation A726V.

3.3.3 Transfektion von C3H10T1/2 Zellen mit den Varianten von *Abcc6*

3.3.3.1 Bestimmung der Transfektionseffizienz mit dem GFP-Vektor

C3H10T1/2 Zellen wurden mit den hergestellten Konstrukten (pSG5-*Abcc6*-C3H/He, pSG5-*Abcc6*-C57BL/6) sowie mit dem pSG5-Leervektor als Kontrolle transfiziert. Zur Abschätzung der Transfektionseffizienz wurde die Transfektion in einigen Wells mit einem GFP-Vektor durchgeführt (Abbildung 3.4).

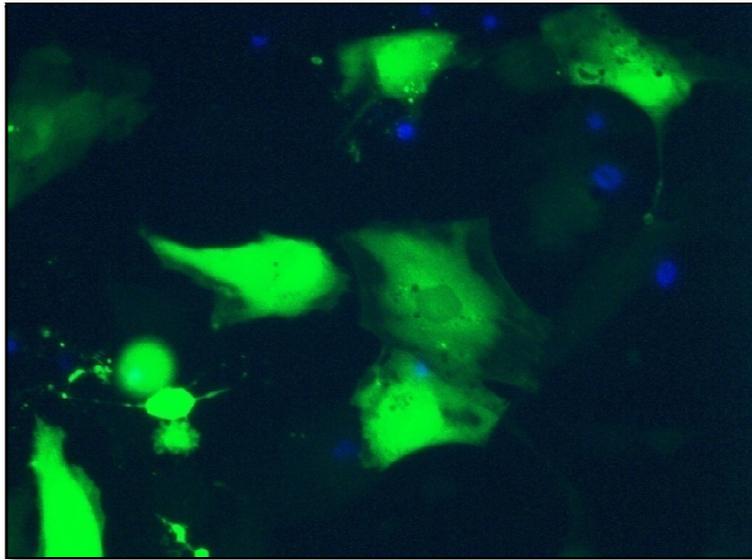


Abbildung 3.4: Transfektion mit dem GFP-Vektor: Dargestellt sind C3H10T1/2 Zellen 24 h nach einer Transfektion mit dem GFP-Vektor. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt und die Fluoreszenz in einer 200-fachen Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert.

Durch das Verhältnis fluoreszierender zu nicht-fluoreszierenden Zellen wurde die Transfektionseffizienz abgeschätzt. In den vorliegenden Versuchen lag die Transfektionseffizienz bei 50-70 %.

3.3.3.2 Molekularer Nachweis der Transfektion

Um zu überprüfen, ob die *Abcc6*-tragenden Vektoren in die Zellen aufgenommen wurden, wurde aus ihnen RNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Diese wurde dann auf die Expression des Gens *Abcc6* untersucht. Hierbei konnte die native Expression des Gens *Abcc6* von der Expression des transfizierten *Abcc6* abgegrenzt werden, da sich die Sequenzen beider unterscheiden. Durch diese Unterschiede in den Sequenzen konnten jeweils spezifische Primer für das native (*Abcc6_mus*) und das auf dem pSG5-Vektor befindliche Gen (*Abcc6-pSG5*) designt werden. So konnte gezielt untersucht werden, ob sich nicht nur das zelleigene, sondern auch das transfizierte Gen in den Zellen befand.

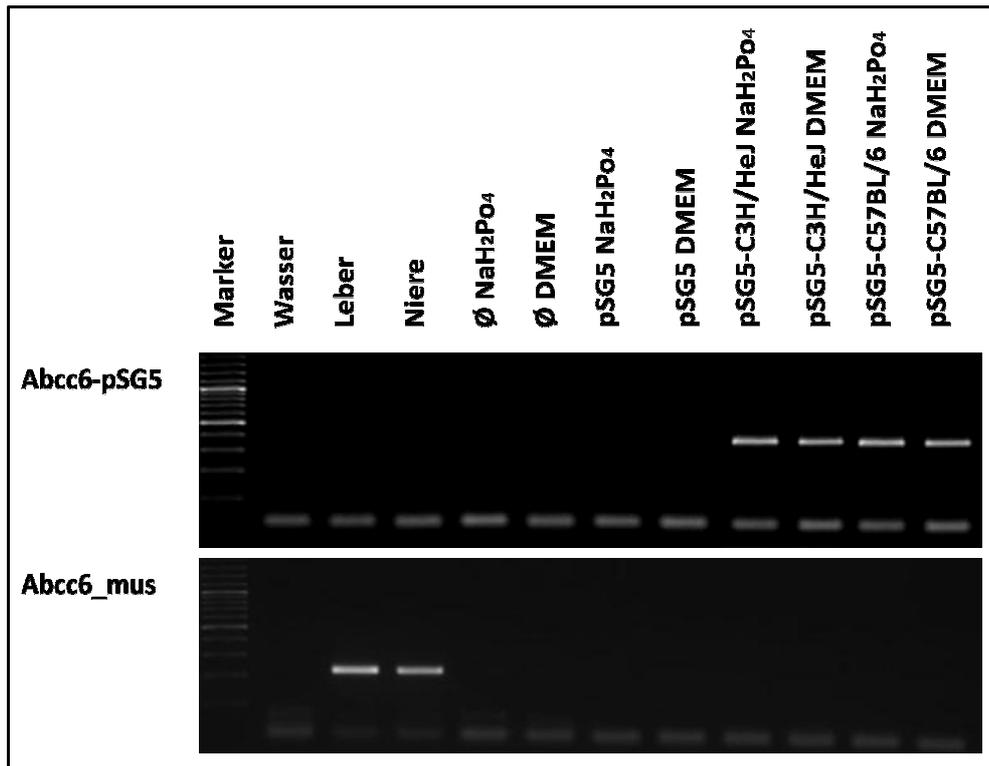


Abbildung 3.5: Molekularer Nachweis der Transfektion: Dargestellt sind zwei Bilder von Elektrophoresegelel, auf die die PCR-Produkte einer PCR zur Überprüfung der Transfektion aufgetragen sind. Ø steht für die nicht transfizierten Zellen.

Durch die PCR mit dem für das auf dem pSG5-Vektor befindliche *Abcc6* spezifischen Primer (*Abcc6*-pSG5) konnte nachgewiesen werden, dass die Zellen das transfizierte Gen exprimierten. Dass dieser Primer spezifisch für das Gen auf dem pSG5-Vektor ist, kann daran abgelesen werden, dass bei den beiden Positivkontrollen aus Leber und Niere keine Expression ermittelt werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei Verwendung des für das native *Abcc6* spezifischen Primers (*Abcc6*_mus) erwartungsgemäß eine Expression in Leber und Niere sowie eine leichte Grundexpression der C3H10T1/2 Zellen selbst (Abbildung 3.5).

3.3.4 Bestätigung der Insertion von *Abcc6* auf dem pSG5-Vektor

3.3.4.1 Verdau des Vektors mit EcoR I und Bgl II

Durch den Verdau des Vektors mit dem beiden Restriktionsenzymen EcoR I und Bgl II wurde anhand der Größe der entstehenden Fragmente kontrolliert, ob sich das Gen *Abcc6* auf dem pSG5-Vektor befand. Beim Einzelverdau mit nur einem der beiden Enzyme wurde die Ringstruktur des Vektors gespalten und es resultierte ein 9,597 kb großes

Fragment bestehend aus linearisiertem Vektor und dem Gen *Abcc6*. Der Doppelverdau mit beiden Enzymen ergab zwei Fragmente, zum einen den 4,1 kb großen pSG5-Vektor und zum anderen das 4,497 kb große Gen *Abcc6*. Die Abbildung 3.6 verdeutlicht, dass sich das Gen *Abcc6* auf dem pSG5-Vektor befand und zwischen den beiden Restriktionsenzymbindungsstellen *EcoR I* und *Bgl II* auf dem Vektor inseriert war.

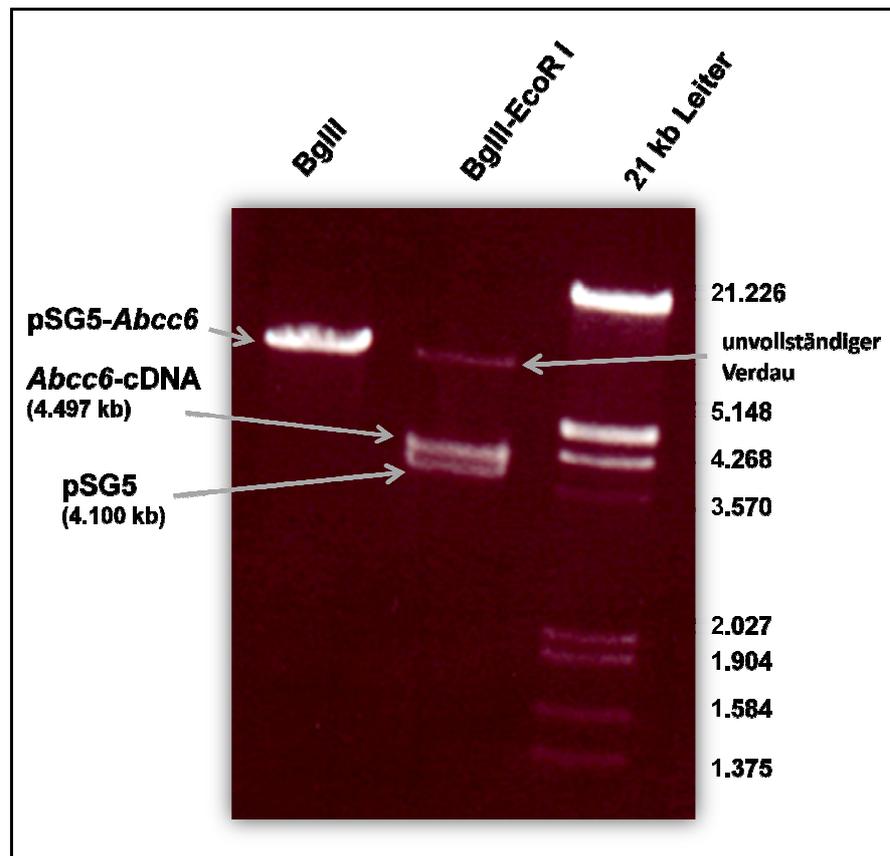


Abbildung 3.6: Verdau des Vektors mit *EcoR I* und *Bgl II*: Dargestellt ist ein Bild einer Gelelektrophorese. Aufgetragen sind das Produkt des Verdau nur mit dem Enzym *Bgl II* auf der linken und mit beiden Enzymen *Bgl II* und *EcoR I* auf der rechten Seite.

3.3.5 Bestätigung der Funktionsfähigkeit der hergestellten Konstrukte

Durch das Einfügen der sieben Punktmutationen in die *C3H/He*-Vektorvariante von pSG5 wurde die *C57BL/6* Variante hergestellt. Mittels verschiedener Methoden wurden die hergestellten Konstrukte auf ihre Funktionsfähigkeit überprüft.

3.3.5.1 *In vitro* Transkription/Translation

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Dr. rer. nat. Reinhard Depping im Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck wurde eine *in vitro* Transkription/Translation (IVTT) durchgeführt. Mit dieser Methode wurde überprüft, ob die Transkription der

Genvarianten von *Abcc6* auf dem hergestellten Konstrukt zur Translation in ein Protein führt, das die zu erwartende Größe von ca. 165 kDa hat.

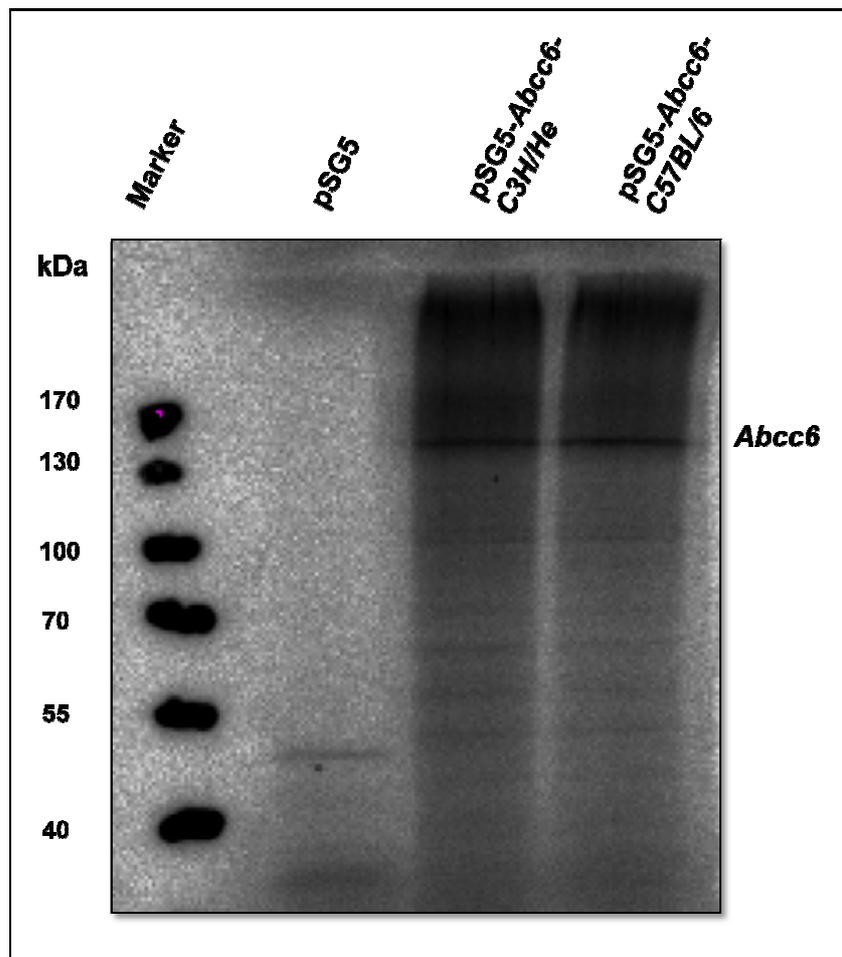


Abbildung 3.7: IVTT-Produkte auf einer Membran: Abgebildet ist eine Membran, auf der die *in vitro* durch IVTT hergestellten Proteine aufgetragen wurden. Es zeigt sich, dass die Proteine von *Abcc6*-C3H/He und *Abcc6*-C57BL/6 wie erwartet die gleiche Größe von ca. 165 kDa haben.

Mittels der IVTT konnte nachgewiesen werden, dass das Ableiten der Genvarianten von *Abcc6* zu je einem ca. 165 kD großen Protein führt. Beide Proteine hatten wie erwartet die gleiche Größe, da sie sich nur durch sieben Aminosäureaustausche voneinander unterscheiden.

3.3.5.2 *In vitro* Bestätigung der Konstrukte mittels Immunhistologie und Western Blot

Um die Konstrukte auch *in vitro* zu testen, wurden HEK-Zellen (Engl.: human embryonal kidney) mit den verschiedenen Varianten des Konstrukts (pSG5, pSG5-*Abcc6-C3H/He*, pSG5-*Abcc6-C57BL/6*) transfiziert. Ein Teil der Zellen wurde auf Chamber Slides herangezogen und für eine immunhistologische Färbung verwendet, aus dem anderen Teil wurden Proteine isoliert und mit diesem ein Western Blot durchgeführt.

3.3.5.2.1 Immunhistologie

Die immunhistologische Färbung der transfizierten HEK-Zellen mit dem in Ziegen hergestellten primären MRP6-S20-Antikörper und dem sekundären Donkey-Anti-Goat-Antikörper ergab eine bräunliche Färbung der mit *C3H/He*- und *C57BL/6-Abcc6*-transfizierten Zellen (Abbildung 3.8). Daraus konnte geschlossen werden, dass das Gen *Abcc6* in den transfizierten Zellen abgelesen und das resultierende MRP6 exprimiert wurde. Zellen, die nur mit dem Leervektor pSG5 transfiziert wurden, zeigten nur eine sehr leichte bräunliche Färbung. Dies spricht dafür, dass die Zellen eine leichte native Expression des Gens *Abcc6* aufweisen.

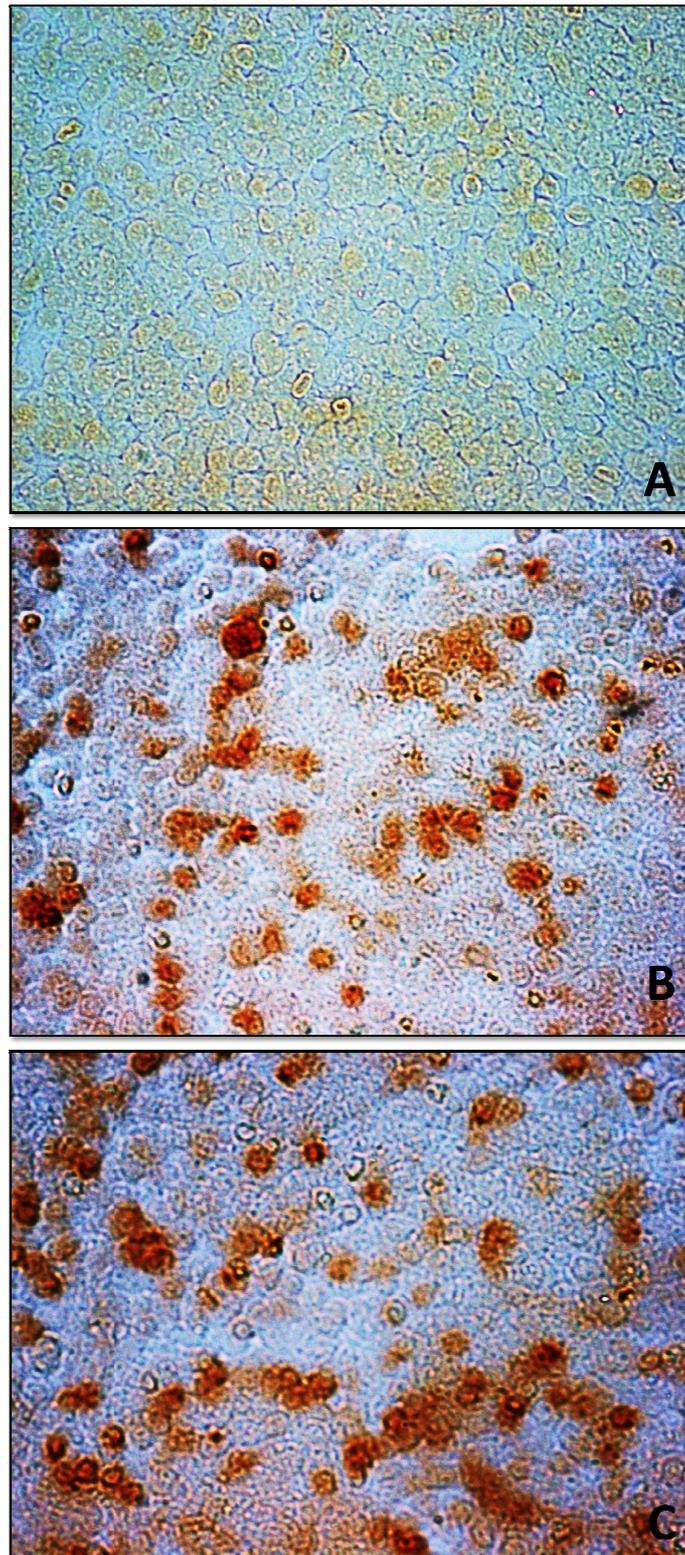


Abbildung 3.8: MRP6-Expression in HEK-Zellen: Dargestellt sind HEK-Zellen, die mit den unterschiedlichen Konstrukten (A = pSG5, B = pSG5-Abcc6-C3H/He, C = pSG5-Abcc6-C57BL/6) transfiziert und anschließend mit einem MRP6-S20 Antikörper immunhistologisch angefärbt wurden. Die bräunlich gefärbten Zellen exprimieren das MRP6-Protein. Die Zellen wurden in einer 100-fachen Vergrößerung unter einem Durchlichtmikroskop fotografiert.

3.3.5.2.2 Western Blot

Aus den mit den beiden *Abcc6*-Varianten (pSG5-*Abcc6*-C3H/He, pSG5-*Abcc6*-C57BL/6) transfizierten HEK-Zellen wurden Proteine isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. So konnte verdeutlicht werden, dass in den mit dem Leervektor pSG5 transfizierten HEK-Zellen kein MRP6 exprimiert wurde, wohingegen die mit pSG5-*Abcc6*-C3H/He oder pSG5-*Abcc6*-C57BL/6 transfizierten Zellen beide das 165kDa große MRP6 exprimierten. Hieraus konnte geschlossen werden, dass das transfizierte Konstrukt funktionsfähig war und ausgehend von der cDNA-Matrize das MRP6 hergestellt wurde. Während des Western Blots wurde α -Actin als Ladekontrolle verwendet. Nachfolgende Abbildung 3.9 zeigt die Blotmembran des Western Blots.

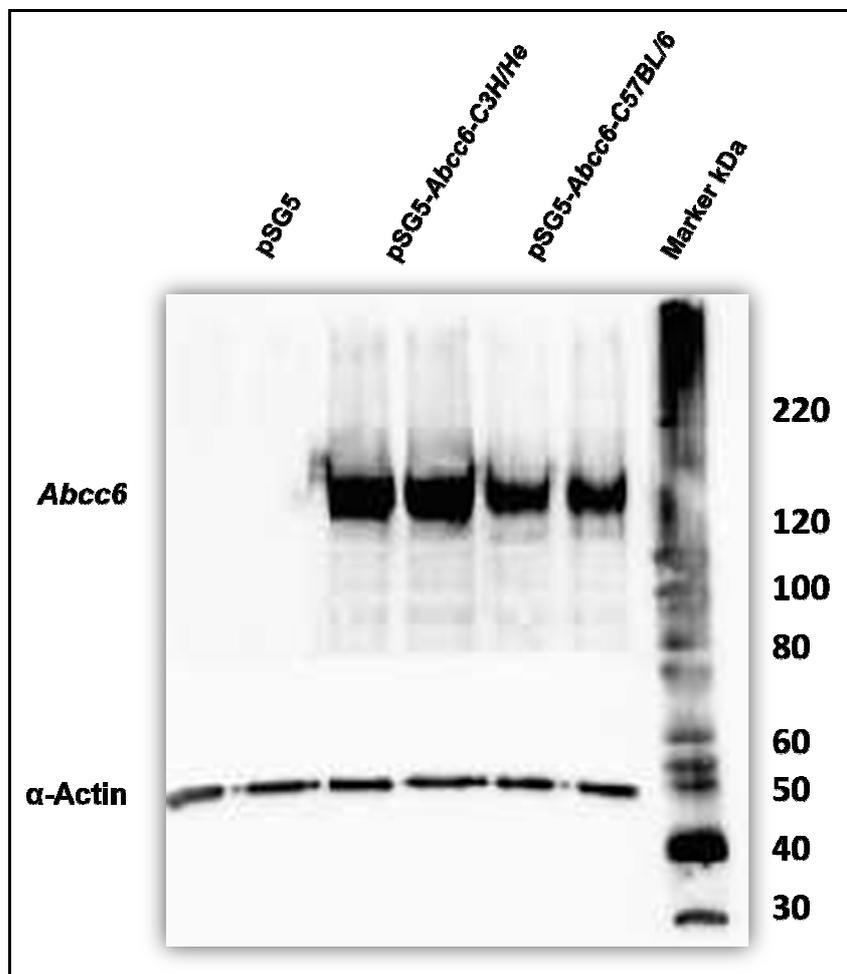


Abbildung 3.9: Western Blot Membran mit dem MRP6-Protein: Dargestellt ist eine Western Blot Membran. Als Ladekontrolle wurde α -Actin aufgetragen. Proteinproben (pSG5, pSG5-*Abcc6*-C3H/He und pSG5-*Abcc6*-C57BL/6) gewonnen aus transfizierten HEK-Zellen wurden aufgetragen.

3.4 Etablierung eines *in vitro* Zellkulturmodells für Verkalkungsprozesse

3.4.1 Induktion der Verkalkung

Um einen Verkalkungsprozess bei mesenchymalen Stammzellen der Linie C3H10T1/2 gezielt zu initiieren, ist ein externer Stimulus erforderlich, der die Zellen in die Differenzierungsrichtung Osteozyt lenkt. Die beiden anorganischen Phosphate β -Glycerophosphat und Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) wurden auf ihre osteogene Potenz hin untersucht.

3.4.1.1 β -Glycerophosphat

Verkalkungsprozesse können durch β -Glycerophosphat induziert werden. In dieser Arbeit wurden verschiedene Konzentrationen getestet und dem Nährmedium von C3H10T1/2 Zellen zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 21 d wurden die Zellen fixiert und mit dem kalziumspezifischen Farbstoff Alizarin Red S angefärbt. Das Ausmaß der Färbung wurde photometrisch bestimmt und die Menge an Kalzium (μmol) anhand einer Standardreihe abgelesen.

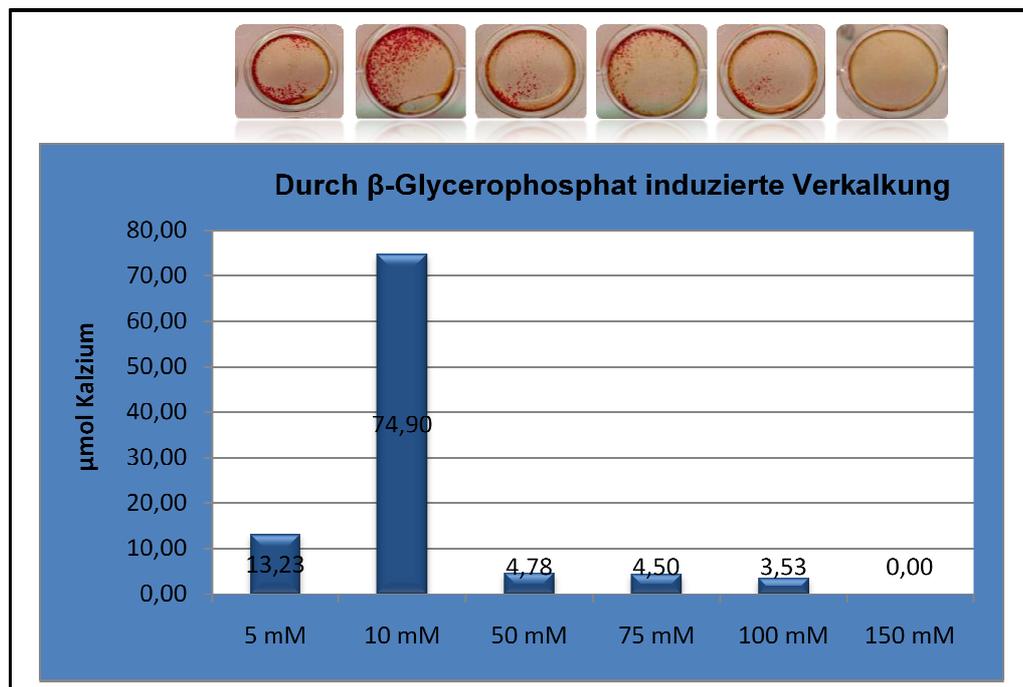


Abbildung 3.10: Durch β -Glycerophosphat induzierte Verkalkung: Die Abbildung veranschaulicht die durch β -Glycerophosphat induzierte Verkalkung von C3H10T1/2 Zellen nach 21 d. Oberhalb der Grafik sind die entsprechenden Wells der Zellkulturplatte nach Alizarin Red S Färbung abgebildet.

Der Abbildung 3.10 kann entnommen werden, dass die Zugabe von 10 mM β -Glycerophosphat zum Medium der Zellen die stärkste Verkalkung hervorrief. Weniger stark verkalkten die Zellen bei Zugabe von 5 mM und noch weniger bei 50, 75 und

100 mM. Bei einer Konzentration von 150 mM β -Glycerophosphat war keine Verkalkung nachweisbar. Dies war dadurch begründet, dass diese hohe Konzentration toxisch auf die Zellen wirkte und diese abstarben. Es konnte beobachtet werden, dass sich die Verkalkung vor allem an den Rändern des Wells ausbildete und die Mitte relativ ausgespart blieb.

Die in der Alizarin Red S Färbung ermittelten Ergebnisse spiegelten sich auch auf molekularer Ebene wieder. Es konnte bestätigt werden, dass die Zellen bei einer β -Glycerophosphatkonzentration von 150 mM abgestorben sind, da auch das housekeeping Gen *18 S* nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Die Expression des Verkalkungsmarkers *Osteocalcin* war bei 5 mM und 10 mM β -Glycerophosphat am stärksten (Abbildung 3.11).

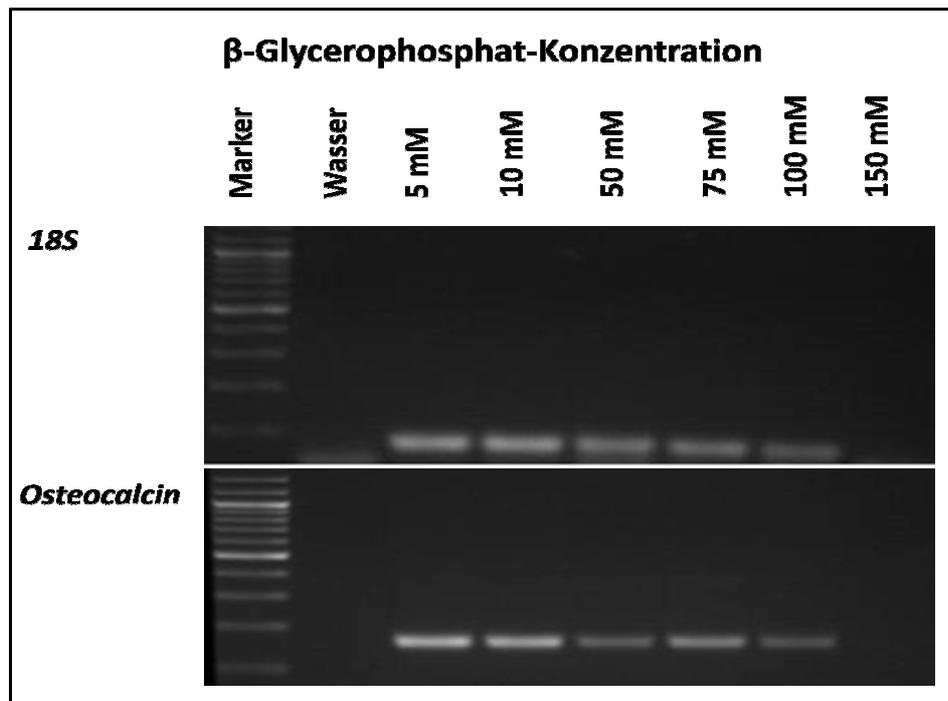


Abbildung 3.11: Molekularer Nachweis der β -Glycerophosphat-induzierten Verkalkung: Dargestellt ist ein Bild einer Gelelektrophorese der PCR-Produkte der PCR mit den Primern für *Osteocalcin*. Erkennbar ist, dass das Gen *Osteocalcin* in jenen Zellen am stärksten exprimiert ist, die mit 5 mM bzw. 10 mM im β -Glycerophosphat Medium kultiviert wurden.

Nach der Initiation der Verkalkung durch β -Glycerophosphat wurde die Verkalkung der Zellen durch zwei kalziumspezifische Färbungen mit Alizarin Red S und Calcein immunhistologisch nachgewiesen. Unter dem Durchlichtmikroskop waren auf den Zellen kleine bräunliche Noduli erkennbar, die sich in einer Färbung mit Alizarin Red S rot anfärben ließen. Dadurch konnte bestätigt werden, dass es sich bei den ausgebildeten

Noduli um Verkalkungen handelte. Auch eine Färbung mit dem ebenfalls kalziumspezifischen Fluoreszenzfarbstoff Calcein fiel positiv aus und führte zu einer grünen Fluoreszenz der Noduli. Die Ausbildung der Verkalkung *in vitro* konnte so immunhistologisch nachgewiesen werden (Abbildung 3.12).

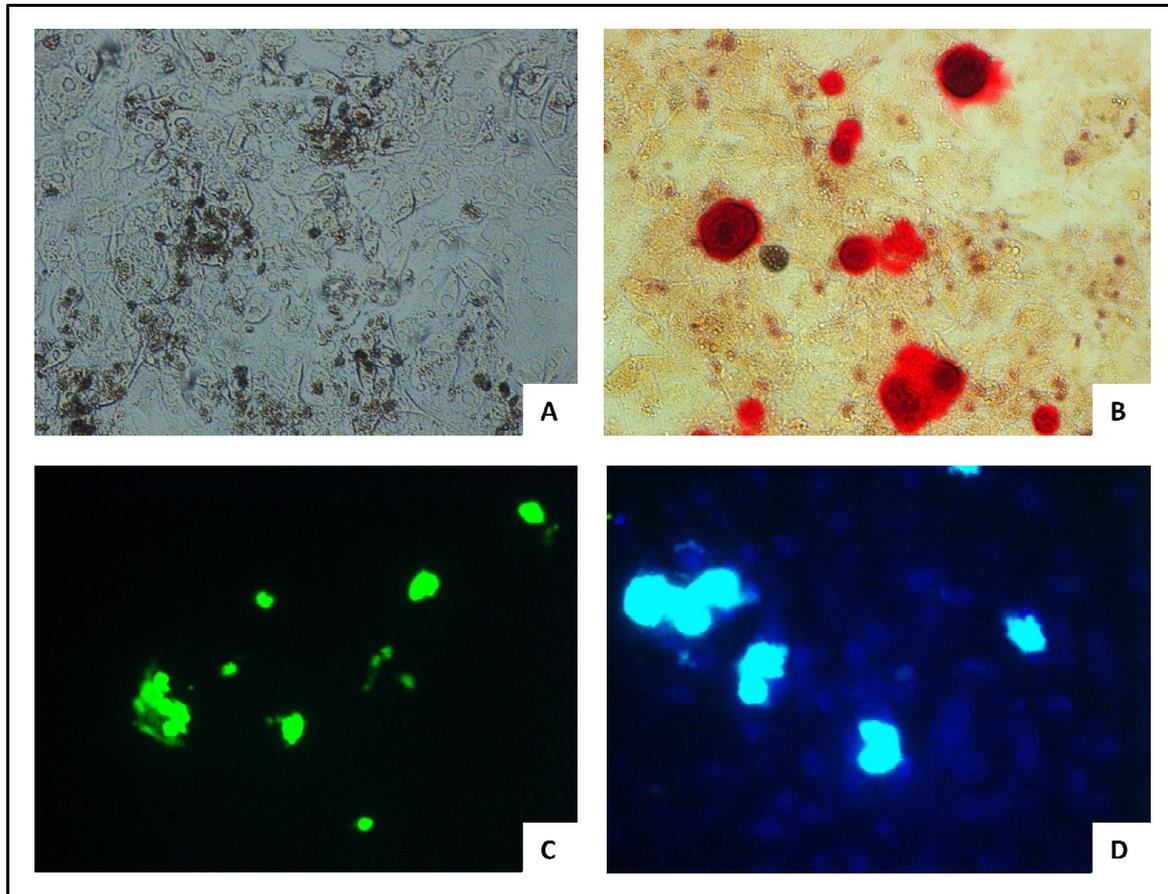


Abbildung 3.12: Immunhistologischer Nachweis der β -Glycerophosphat-induzierten Verkalkung: Die Abbildung zeigt rechts oben eine Durchlichtaufnahme von C3H10T1/2 Zellen, die bräunliche Noduli ausgebildet haben (A). Das linke obere Bild zeigt die Färbung der Zellen mit Alizarin Red S und die rote Anfärbung der Noduli (B). Darunter befinden sich die Aufnahmen der Calceinfärbungen, links nur mit Calcein (C) und rechts mit einer zusätzlichen Färbung der Zellkerne durch DAPI (D). Die Bilder wurden in 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

3.4.1.2 Natriumdihydrogenphosphat

Auch das anorganische Phosphat Natriumdihydrogenphosphat ist dazu geeignet, Verkalkungsprozesse in der Zellkultur zu induzieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden aufsteigende Konzentrationen von Natriumdihydrogenphosphat im Medium verwendet und die Zellen für 21 d kultiviert. Im Anschluss daran wurde aus den Zellen RNA isoliert, durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und mit dieser eine PCR durchgeführt. In dieser PCR wurden ebenfalls Primer für das verkalkungstypische Gen *Osteocalcin* verwendet. Die stärkste Expression des Gens *Osteocalcin* zeigten Zellen, die

mit 4 mM und 7 mM Natriumdihydrogenphosphat kultiviert wurden (Abbildung 3.13).

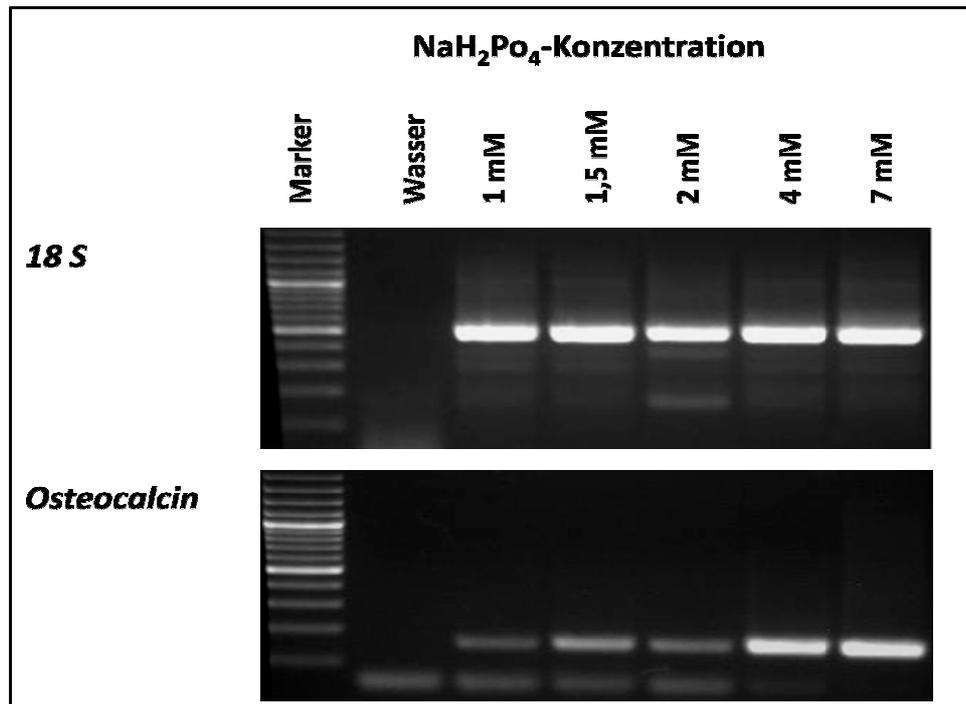


Abbildung 3.13: Molekularer Nachweis der NaH_2PO_4 -induzierten Verkalkung: Dargestellt ist ein Bild einer Gelelektrophorese der PCR-Produkte mit den Primern für Osteocalcin. Erkennbar ist, dass das Gen Osteocalcin in jenen Zellen am stärksten exprimiert ist, die mit 4 mM bzw. 7 mM Natriumdihydrogenphosphat im Medium kultiviert wurden.

Nach der Initiation der Verkalkung durch Natriumdihydrogenphosphat wurde die Verkalkung der Zellen ebenfalls histologisch nachgewiesen. Es wurden wiederum Alizarin Red S und Calcein verwendet. Auch hier zeigten sich unter dem Durchlichtmikroskop kleine bräunliche Noduli auf den Zellen, die sich in einer Färbung mit Alizarin Red S rot anfärben ließen und nach einer Färbung mit Calcein grün fluoreszierten (Abbildung 3.14).

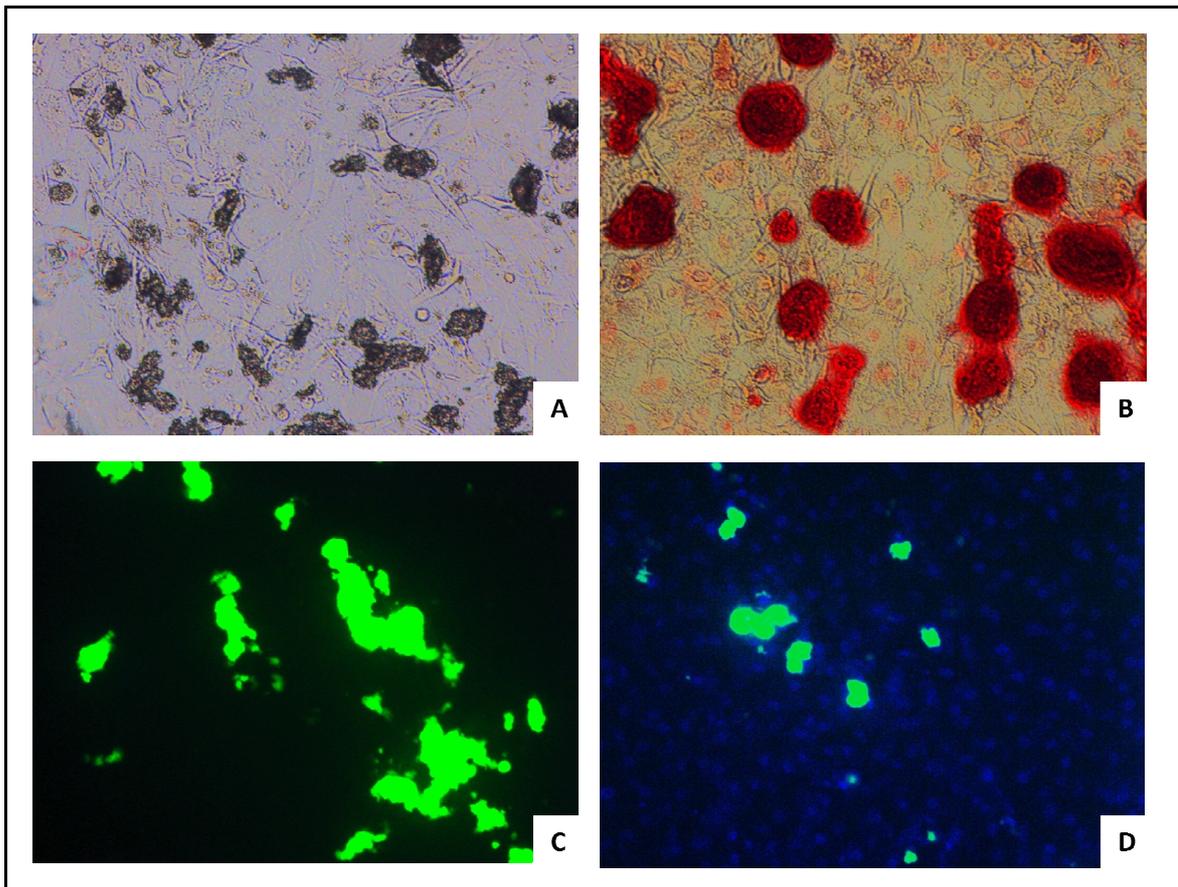


Abbildung 3.14: Histologischer Nachweis der NaH_2PO_4 -induzierten Verkalkung: Die Abbildung zeigt rechts oben eine Durchlichtaufnahme von C3H10T1/2 Zellen, die bräunliche Noduli ausgebildet haben (A). Das linke obere Bild zeigt die Färbung der Zellen mit Alizarin Red S und die rote Anfärbung der Noduli (B). Darunter befinden sich die Aufnahmen der Calceinfärbungen, links nur mit Calcein (C) und rechts mit einer zusätzlichen Färbung der Zellkerne durch DAPI (D). Die Bilder wurden in 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

3.5 Einfluss der Varianten des Gens *Abcc6* auf die Entwicklung von Verkalkung *in vitro*

Um den Einfluss der Varianten des Gens *Abcc6* auf Verkalkungsprozesse *in vitro* zu untersuchen, wurden C3H10T1/2 Zellen mit den verschiedenen Varianten des Gens *Abcc6* transfiziert und die Verkalkung durch Zugabe von 6 mM Natriumdihydrogenphosphat zum Medium induziert. Natriumdihydrogenphosphat wurde als Induktor ausgewählt, da es im Vergleich zu β -Glycerophosphat zu einer gleichmäßigeren Verteilung der Verkalkung in den einzelnen Wells führte. Das Experiment wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten (3 d, 7 d und 21 d) beendet, um jeweils das Ausmaß der Verkalkung sowie auf molekularer Ebene die Expression verkalkungstypischer Gene zu untersuchen.

3.5.1 Verlauf der Verkalkungsentwicklung

3.5.1.1 Zeitlicher Überblick

Um die Verkalkung der Zellen zu quantifizieren, wurden eine Kalzium- und eine Proteinbestimmung durchgeführt. Die Menge des gemessenen Kalziums in μmol wurde anschließend auf die Menge von 1 mg Protein normalisiert. Diese Bestimmung wurde jeweils mit Zellen durchgeführt, die 3 d, 7 d und 21 d mit einem phosphathaltigen Medium oder mit DMEM kultiviert wurden. Bei allen Zellen, die mit DMEM kultiviert wurden, konnte keine Verkalkung gemessen werden. Nach Auswertung der Messergebnisse ergab sich der in Abbildung 3.15 dargestellte zeitliche Verlauf der Verkalkungsentwicklung.

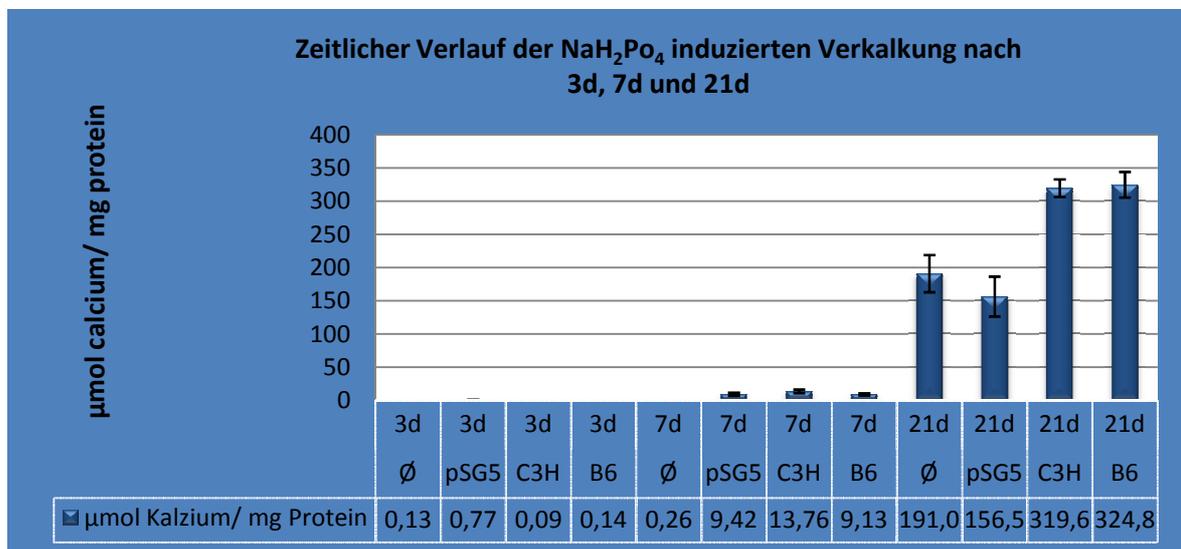


Abbildung 3.15: Zeitlicher Verlauf der NaH_2PO_4 induzierten Verkalkung: Nach 3 Tagen war noch kein Kalzium in den Zellen messbar. Nach 7 Tagen entwickelten vor allem die Zellen, die mit einem Vektor (pSG5, pSG5-Abcc6-C3/HeJ, pSG5-Abcc6-C57BL/6) transfiziert wurden Verkalkungen. Nach 21 Tagen waren bei allen Proben starke Verkalkungen messbar und es waren keine Unterschiede zwischen den Gruppen mehr zu erkennen. Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte aus jeweils neun Einzelmessungen.

Aus den Messungen ergab sich, dass die phosphatinduzierte Verkalkung zwischen dem dritten und dem siebten Tag begonnen haben musste. In dieser frühen Phase der Verkalkung scheinen noch Unterschiede zwischen den mit unterschiedlichen Vektoren transfizierten Zellen zu bestehen. Nach 21 d waren diese Effekte wieder aufgehoben, da in allen Zellen starke Verkalkungen messbar waren.

3.5.1.2 C3H/He bedingte Zunahme der Verkalkung nach 7 Tagen

Ein interessanter Zeitpunkt in der Entwicklung von Verkalkungen *in vitro* schien somit nach 7 d erreicht zu sein. Aus diesem Grund wurden die Messergebnisse von diesem Zeitpunkt noch einmal genauer analysiert. Dabei zeigte sich, dass die untransfizierten Zellen weiterhin kaum verkalkt waren. Zellen, die den Leervektor pSG5 trugen und solche die die C57BL/6-Variante trugen, zeigten ein ähnlich starkes Maß an Verkalkung von 9,42 (pSG5) und 9,13 (pSG5-Abcc6-C57BL/6) μmol Kalzium/mg Protein. Zellen, die die C3H/He-Variante von Abcc6 trugen, verkalkten mit 13,76 μmol Kalzium/mg Protein am stärksten. Um die Signifikanz dieses Unterschiedes in der Verkalkung zwischen mit C3H/He und C57BL/6 transfizierten Zellen zu ermitteln, wurde mit den Messwerten ein t-Test gerechnet. Hierbei ergab sich, dass die Unterschiede im Ausmaß der Verkalkung zwischen mit pSG5 und mit pSG5-Abcc6-C57BL/6 transfizierten Zellen und solchen, die mit pSG5-Abcc6-C3H/He transfiziert waren, jeweils signifikant waren (pSG5 vs. pSG5-Abcc6-C3H/He $p = 0,0063$; pSG5-Abcc6-C57BL/6 vs. pSG5-Abcc6-C3H/He $p = 0,0058$). Der Unterschied zwischen mit pSG5 und mit pSG5-Abcc6-C57BL/6 war mit einem p-Wert von 0,7321 nicht signifikant.

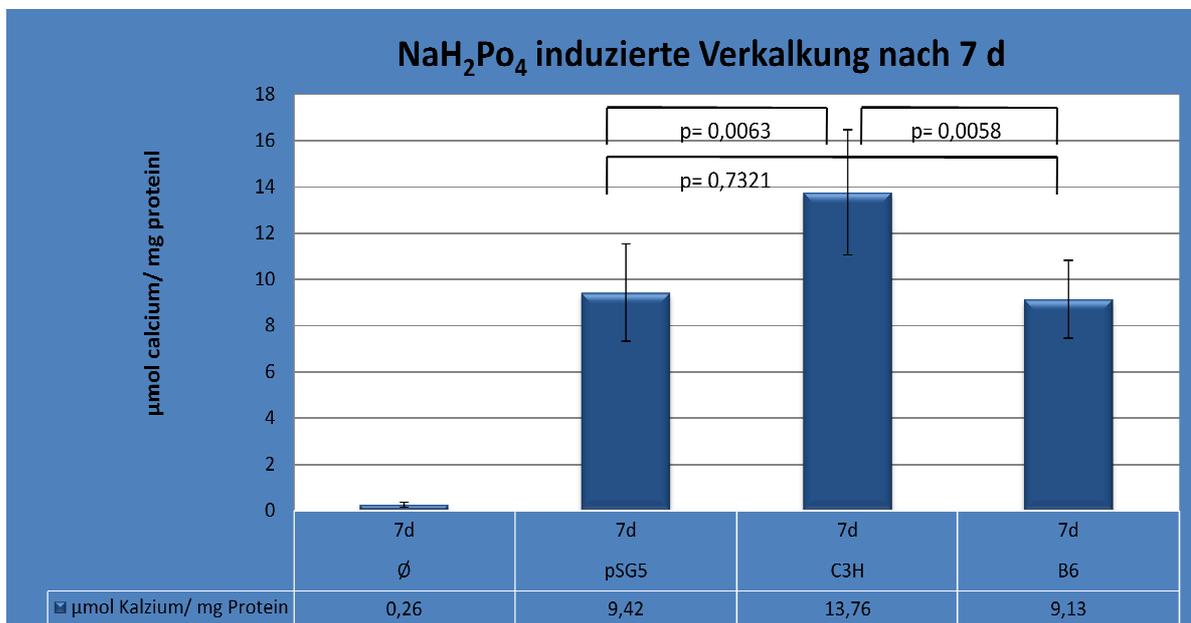


Abbildung 3.16: NaH₂PO₄ induzierte Verkalkung nach 7d: Diese Abbildung zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus der Abbildung 3.14 und fokussiert sich auf die Messung nach 7 Tagen. Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte aus jeweils neun Einzelmessungen.

3.6 Analyse der Expression von Transkriptionsfaktoren der Osteogenese *in vitro* und *in vivo*

Um näheren Aufschluss darüber zu gewinnen, auf welche Gene die *Abcc6*-induzierte Verkalkung Einfluss hat, wurden *in vitro* und *in vivo* gewonnene cDNA-Proben auf die Expression von Transkriptionsfaktoren untersucht. Bei der Auswahl dieser dienten Transkriptionsfaktoren der Osteogenese als Anhaltspunkt. Es wurde davon ausgegangen, dass zwischen physiologischen und pathologischen Verkalkungsprozessen Ähnlichkeiten bestehen und daher in beiden Prozessen die gleichen Gene und Transkriptionsfaktoren involviert sind. Folgende Transkriptionsfaktoren (Tabelle 3.2) wurden ausgewählt:

Name des Gens	Ensembl Transkript ID
Runx2	ENSMUST00000077846
Sox9	ENSMUST00000000579
Vdr	ENSMUST00000023119
Nfkb1	ENSMUST00000029812 ENSMUST000000106275 ENSMUST000000106276
Twist1	ENSMUST00000049089
Msx1	ENSMUST00000063116
Msx2	ENSMUST00000021922
Smad1	ENSMUST00000066091 ENSMUST000000109885
Smad2	ENSMUST00000025453
Smad3	ENSMUST00000034973 ENSMUST000000113930 ENSMUST000000113931
Smad4	ENSMUST00000025393 ENSMUST000000114939

Tabelle 3.2: Untersuchte Transkriptionsfaktoren der Osteogenese

Zur Untersuchung der Expression dieser Transkriptionsfaktoren wurde für die *in vitro* und *in vivo* Analysen der gleiche strukturelle Versuchsaufbau angewendet. Zunächst wurde die Expression der Transkriptionsfaktoren in den isolierten cDNA-Proben mittels konventioneller PCR untersucht. Konnte eine Expression festgestellt werden, wurde diese durch eine semiquantitative real-time PCR quantifiziert. Um ein reineres und

spezifischeres Ergebnis zu erzielen, wurde die real-time PCR danach für einige Transkriptionsfaktoren, die Unterschiede in der Expression gezeigt hatten, noch einmal unter Verwendung einer entsprechenden FAM-Sonde wiederholt.

Da es sich bei *Osteocalcin* um einen Verkalkungsmarker der Osteoblastenentwicklung handelt, der erst relativ spät im Verkalkungsprozess exprimiert wird (Cheng *et al.*, 2003), wurde in den folgenden Versuchen *Osteopontin* als Verkalkungsmarker verwendet, da jetzt mit Proben gearbeitet wurde, die nur 7 d phosphathaltigem Medium ausgesetzt waren. Auch die verwendeten *in vivo* Proben aus den Herzen von Mäusen wurden nach einer Zeitspanne von einem bzw. drei Tagen nach Kryopexie des Myokards gewonnen.

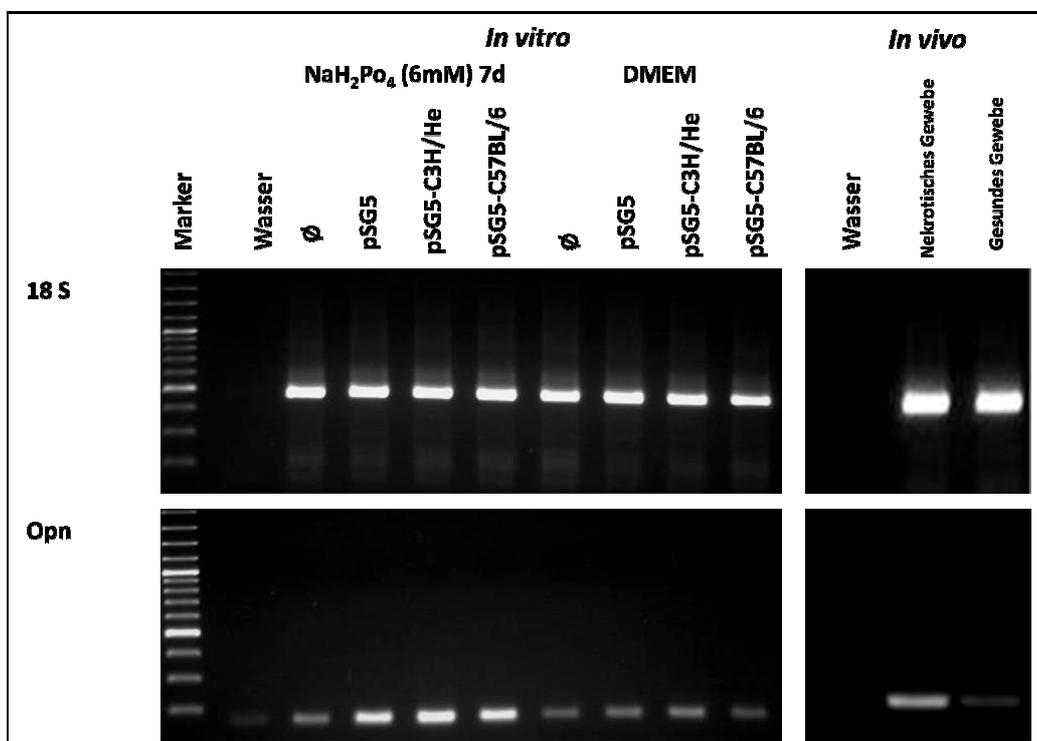


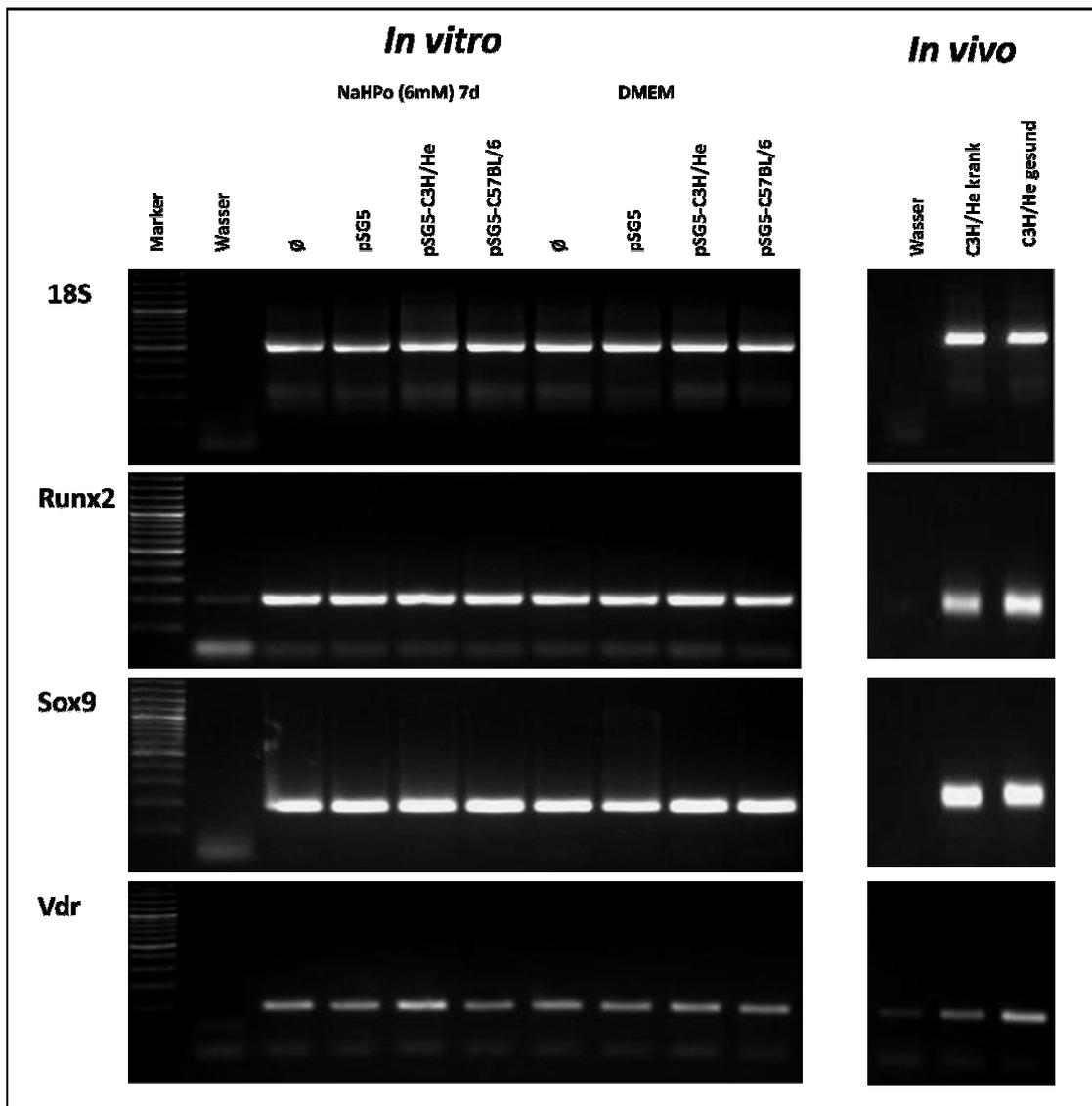
Abbildung 3.17: Molekularer Verkalkungsnachweis mit Osteopontin: Abgebildet sind Elektrophoresegele, auf die die PCR-Produkte mit dem Primer für Osteopontin und dem Primer für das housekeeping-Gen 18 S aufgetragen sind. Ø gibt dabei die Zellen an, die nicht transfiziert wurden.

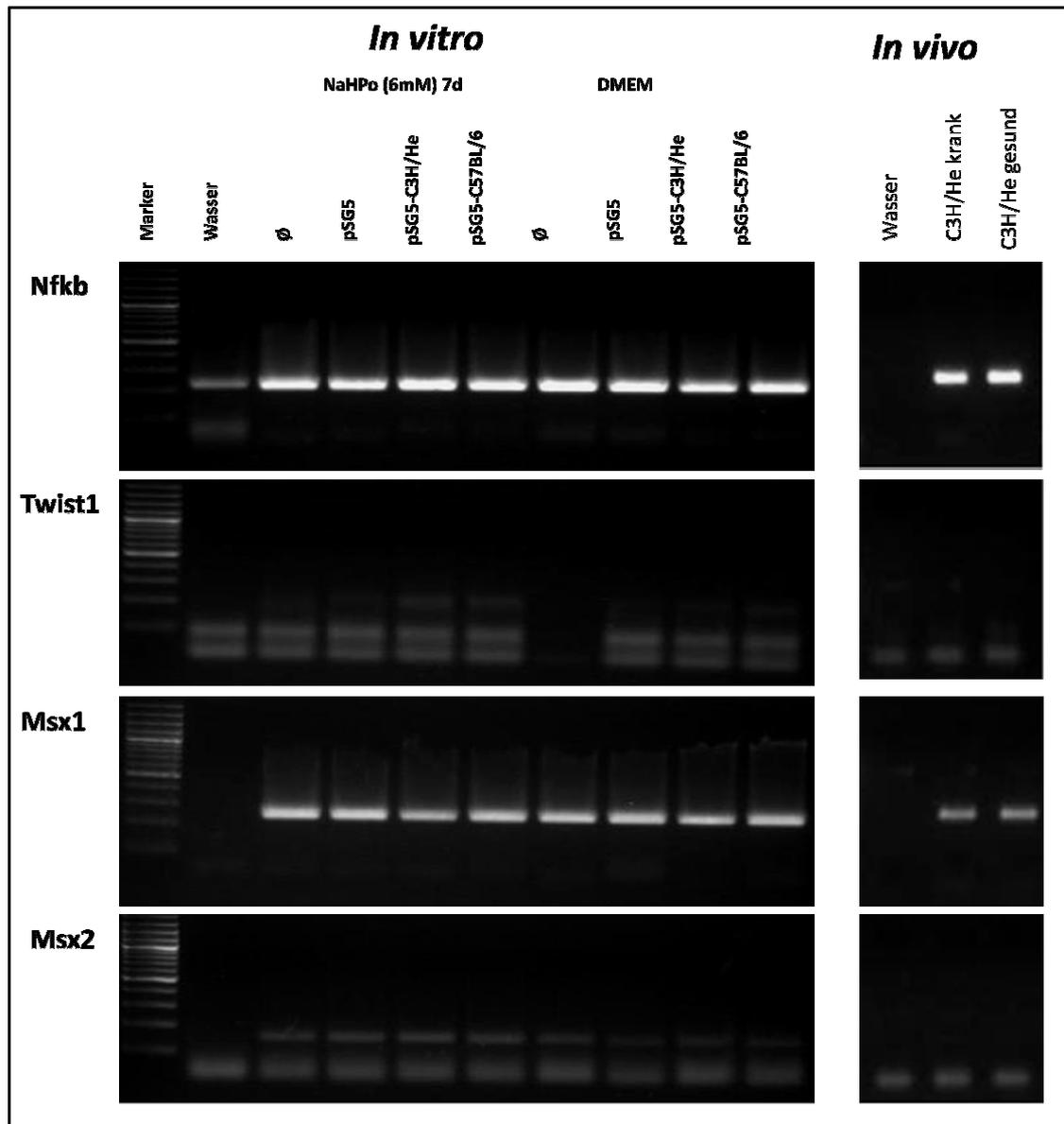
In der Abbildung 3.17 werden die durch Kalzium- und Proteinbestimmung ermittelten Ergebnisse bestätigt. Es zeigt sich, dass der verkalkungstypische Marker *Osteopontin* am stärksten in den Zellen exprimiert wird, die zum einen mit phosphathaltigem Medium kultiviert wurden und zum anderen mit einem Vektor transfiziert wurden. Auch in den *in vivo* nach Myokardkryopexie gewonnenen Gewebeproben zeigten sich ähnliche

Expressionsmuster des Verkalkungsmarkers *Osteopontin* mit einer stärker ausgeprägten Expression im nekrotischen Gewebe.

3.6.1 Analyse der Transkriptionsfaktorexpression *in vitro* und *in vivo* mittels konventioneller PCR

Für die oben beschriebenen Transkriptionsfaktoren wurden Primer designt und die *in vitro* und *in vivo* gewonnene cDNA auf die Expression dieser Faktoren untersucht. Für die PCR wurden cDNA-Proben verwendet, die aus Zellen gewonnen wurden, die für 7 d mit einem phosphathaltigen Medium oder mit DMEM kultiviert wurden und die mit den unterschiedlichen Vektorvarianten transfiziert wurden. Die *in vivo* cDNA-Proben stammten aus nekrotischem und gesundem Herzgewebe des Mausstammes *C3H/He*. Nachfolgende Abbildung stellt die Expression der Transkriptionsfaktoren in der konventionellen PCR dar. Die Expression von *18 S* diente als Standard und zeigt an, dass die verwendeten Proben auch cDNA enthalten. Die Beschriftung mit \emptyset bezeichnet die Zellen, die nicht mit einem Vektor transfiziert wurden.





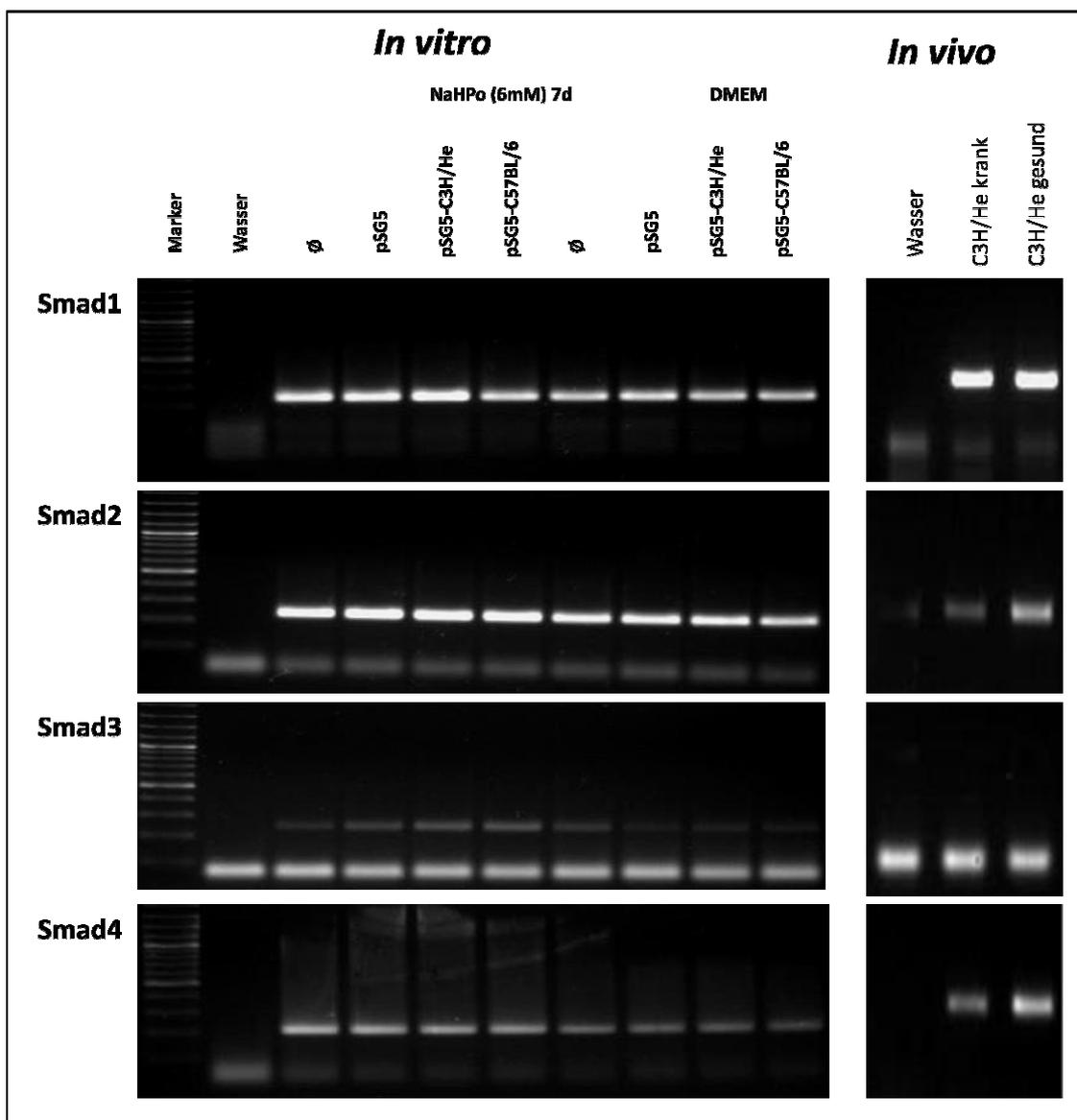


Abbildung 3.18: Expression osteogener Transkriptionsfaktoren: Die Abbildung zeigt 12 Ausschnitte von Elektrophoresegelelen zum Test der Expression osteogener Transkriptionsfaktoren *in vitro* und *in vivo*.

Die folgende Tabelle 3.3 fasst die in Abbildung 3.18 dargestellten Expressionsergebnisse zur besseren Veranschaulichung noch einmal zusammen.

Transkriptionsfaktor	Expression			
	<i>In vitro</i> (NaHPo)	<i>In vitro</i> (DMEM)	<i>In vitro</i> (nekrotisch)	<i>In vitro</i> (gesund)
Runx2	+	+	+	+
Sox9	+	+	+	+
Vdr	+	+	+	+
Nfkb	+	+	+	+
Twist1	-	-	-	-
Msx1	+	+	+	+
Msx2	-	-	-	-
Smad1	+	+	+	+
Smad2	+	+	+	+
Smad3	-	-	-	-
Smad4	+	+	+	+

Tabelle 3.3: Übersicht über die Expression osteogener Transkriptionsfaktoren *in vitro* und *in vivo*.

Aus der Abbildung 3.18 und der Tabelle 3.3 geht hervor, dass folgende Transkriptionsfaktoren *in vitro* exprimiert wurden: *Runx2*, *Sox9*, *Vdr*, *Nfkb*, *Msx1*, *Smad1*, *Smad2* und *Smad4*. Nicht exprimiert waren: *Twist1*, *Msx2* und *Smad3*. Im Herzgewebe des Mausstammes *C3H/He* ergab sich das gleiche Expressionsmuster. Somit wurden *in vitro* und *in vivo* die gleichen Expressionsmuster gefunden. Außerdem fiel auf, dass bei den *in vitro* analysierten Proben unabhängig ob die Behandlung mit phosphathaltigem oder mit Normalmedium erfolgte, jeweils das gleiche Expressionsmuster detektiert wurde.

3.6.2 Analyse der Transkriptionsfaktorexpression mittels semiquantitativer real-time PCR

3.6.2.1 Transkriptionsfaktoren *in vitro*

Die Transkriptionsfaktoren, die in der konventionellen PCR eine Expression gezeigt hatten, wurden mittels real-time PCR quantitativ untersucht. Für die Auswertung der

Ergebnisse wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet. Als Referenzproben wurden die untransfizierten mit DMEM behandelten Proben festgelegt.

Die in der konventionellen PCR ermittelte Expression der Transkriptionsfaktoren konnte auch in der real-time PCR bestätigt werden. Allerdings ergaben sich zwischen den unterschiedlich behandelten und unterschiedlich transfizierten Gruppen keine Unterschiede. Die ermittelten Expressionsniveaus der einzelnen Transkriptionsfaktoren lagen alle in einem Bereich von 0,3 bis 1,39 und schwankten somit nur leicht um den Wert 1, der dem Expressionsniveau der Referenzprobe entsprach.

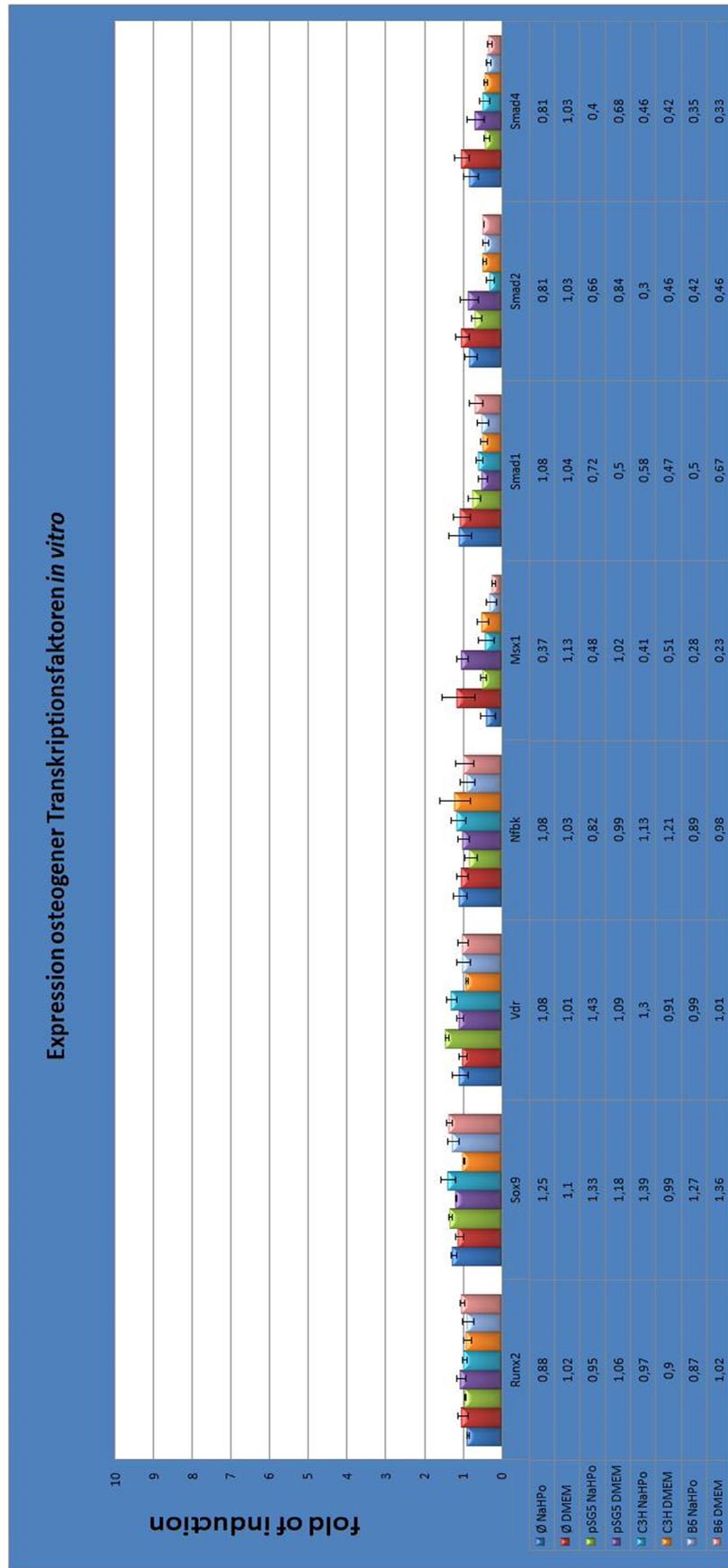


Abbildung 3.19: Expression osteogener Transkriptionsfaktoren *in vitro*: Dargestellt ist das Expressionsniveau osteogener Transkriptionsfaktoren *in vitro*, normalisiert auf den Referenzwert der Probe Ø DMEM.

3.6.2.2 Transkriptionsfaktoren *in vivo*

Für die Analyse der Expression der Transkriptionsfaktoren *in vivo* wurden cDNA-Proben untersucht, die nach Durchführung einer Kryopexie aus den Herzen von Mäusen der Stämme *C3H/He* und *C57BL/6* entnommen wurden. Es wurde jeweils eine Probe aus gesundem und aus nekrotischem Myokardgewebe entnommen. Die Entnahme erfolgte einen und drei Tage nach der Kryopexie. Als Kontrolle diente gesundes Herzgewebe einer Maus des Stammes *C57BL/6*, bei der lediglich eine abdominale Inzision aber keine Kryopexie des Myokards durchgeführt wurde.

In vivo zeigten sich anders als *in vitro* Unterschiede zwischen nekrotischem und gesundem Gewebe sowie auch zwischen den beiden untersuchten Mausstämmen *C3H/He* und *C57BL/6*. Eine Erhöhung der Expression über das 5-fache (fold of induction = 5) wurde als signifikante Erhöhung festgelegt.

Beim Stamm *C57BL/6* zeigten sich im gesunden Gewebe keine Unterschiede im Expressionsniveau einen und drei Tage nach Induktion der Verkalkung durch Myokardkryopexie. Auch im nekrotischen Gewebe dieser Stämme ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gewebeproben einen und drei Tage nach Kryopexie. Anders verhielt es sich im für die Entwicklung einer DCC prädisponierten Stamm *C3H/He*. Einen Tag nach der Myokardkryopexie konnte schon eine leichte Erhöhung der Expression folgender Gene festgestellt werden: *Runx2*, *Nfkb* und *Smad2*. In nekrotischem Gewebe waren im Vergleich zur Kontrolle nach 3 d die osteogenen Transkriptionsfaktoren *Runx2*, *Sox9*, *Vdr* und *Nfkb* mindestens um das 5-fache erhöht. Dabei war die Erhöhung der Expression von *Runx2* mit 30,26 besonders stark. Diese Erhöhung in nekrotischem Gewebe 3 d nach Kryopexie war gegenüber dem Wert in nekrotischem Gewebe 1 d nach Kryopexie mit einem p-Wert von 0,0028 signifikant. Verglichen mit dem nekrotischen Gewebe des Stammes *C57BL/6* 3 d nach Kryopexie ergab sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied in der Expression von *Runx2* (p = 0,0004).

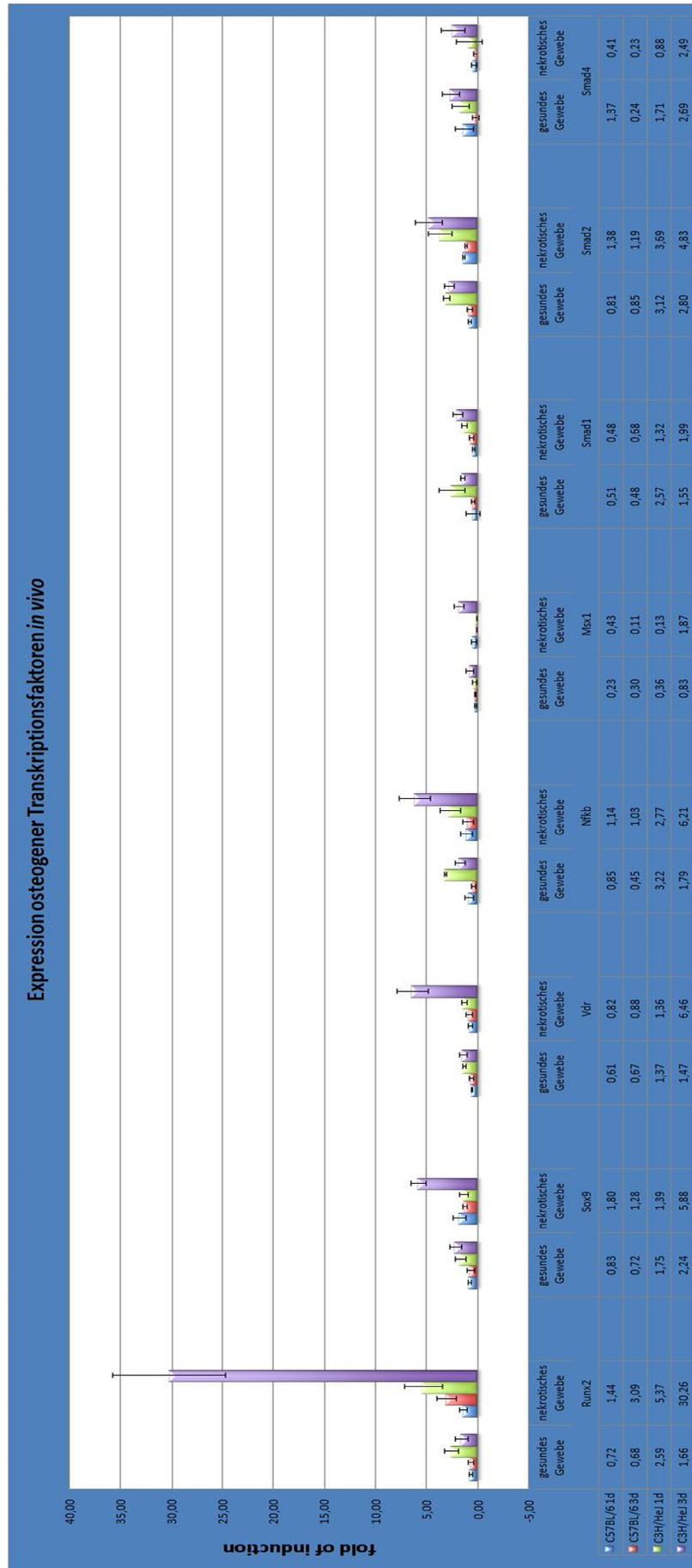


Abbildung 3.20: Expression osteogener Transkriptionsfaktoren in vivo: Dargestellt ist das Expressionsniveau osteogener Transkriptionsfaktoren in vivo, normalisiert auf den Referenzwert einer Gewebeprobe aus einer C57BL/6 Maus 3d nach einer abdominalen Inzision.

4. Diskussion

Das Gen *Abcc6* ist ursächlich für zwei Erkrankungen: Pseudoxanthoma elasticum (PXE) beim Menschen und Dystrophe Kardiale Verkalkung (DCC) bei Mäusen. In letzter Zeit konnten sowohl beim Menschen als auch bei der Maus mehrere Mutationen im Gen *Abcc6* identifiziert werden, die die jeweilige Erkrankung auslösen. Die den Erkrankungen zugrunde liegenden pathologischen Prozesse sind bisher jedoch noch ungeklärt. Unsere Arbeitsgruppe hatte einen großen Anteil daran, das Gen *Abcc6* als ursächliches Gen für die kardiale Verkalkung bei Mäusen zu identifizieren (Aherrahrou *et al.*, 2008). Dabei wurde beobachtet, dass der Stamm *C3H/He* für die Ausbildung einer DCC prädisponiert, der Stamm *C57BL/6* hingegen resistent ist und dass sich die Genvariante beider Stämme durch sieben Punktmutationen voneinander unterscheiden, die zum Austausch von sieben Aminosäuren im resultierenden MRP6 führen. Im ebenfalls untersuchten Stamm *New-Zealand-Black* zeigte sich ein verkalkender Phänotyp, es konnten aber nur zwei der bei *C3H/He* gefundenen Mutationen identifiziert werden (unpublizierte Daten).

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein Zellkulturmodell für Verkalkung zu etablieren. Außerdem sollte ein cDNA-Konstrukt von *Abcc6* hergestellt werden, das die sieben Punktmutationen des für Verkalkung prädisponierten Mausstammes *C3H/He* enthielt. Die Rolle der identifizierten Mutationen auf die Initiation und die Entwicklung von Verkalkung sollte in diesem Modell funktionell untersucht werden. In unseren Ergebnissen konnten wir zeigen, dass die Mutationen im Gen *Abcc6* den Verkalkungsprozess *in vitro* fördern. *In vivo* konnten wir den Transkriptionsfaktor *Runx2* als Schlüsselgen für Verkalkung identifizieren und Osteopontin als ein durch *Runx2* reguliertes downstream Gen.

4.1. *In vitro* Zellkulturmodell für Verkalkung

In vitro Modelle werden in der Forschung für die Untersuchung unterschiedlichster Fragestellungen verwendet. Im Allgemeinen kann man sagen, dass sie sich besonders eignen, sehr individuelle und spezielle Fragestellungen zu beantworten. Sie ermöglichen die Analyse einzelner Aspekte unter Ausschluss ungewollter Einflüsse. Zudem haben *in vitro* Modelle den Vorteil, dass die Versuchsbedingungen gut kontrollierbar, das Experiment somit gut wiederholbar und dessen Ergebnisse vergleichbar sind. Ein Nachteil

dieser Modelle besteht in der begrenzten Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf *in vivo* Verhältnisse.

In dieser Arbeit wurde ein *in vitro* Zellkulturmodell mit der murinen mesenchymalen Stammzelllinie C3H10T1/2 etabliert. Diese Zellen besitzen eine fibroblastenartige Morphologie und können sich nach äußerer Stimulation in Osteozyten, Chondrozyten oder Adipozyten differenzieren. Zur Differenzierung der Zellen in die osteogene Richtung können verschiedene Substanzen verwendet werden, wobei besonders anorganische Phosphate wie β -Glycerophosphat und Natriumdihydrogenphosphat häufig zum Einsatz kommen (Giachelli *et al.*, 2005a; Giachelli CM, 2001).

In dieser Arbeit wurden zunächst unterschiedliche Konzentrationen von β -Glycerophosphat auf ihre verkalkungsinduzierende Wirkung getestet. Es zeigte sich, dass die von vielen Arbeitsgruppen zur Induktion von Verkalkung in der Zellkultur verwendete Konzentration von 10 mM β -Glycerophosphat (Byon *et al.*, 2008) die stärkste Verkalkung hervorrief. Allerdings bildeten sich die Kalziumkristalle hauptsächlich in den Randzonen der Wells mit ungleichmäßiger Verteilung aus. Deshalb wurde ein weiterer Versuch angeschlossen, in dem unterschiedliche Konzentrationen des ebenfalls anorganischen Phosphates Natriumdihydrogenphosphat getestet wurden.

Im Gegensatz zu β -Glycerophosphat liegt das Phosphat bei der Zugabe von Natriumdihydrogenphosphat zum Medium sofort in freier Form vor und muss nicht durch ein Enzym abgespalten werden. Von Giachelli CM (2003) und Jono *et al.* (2000) konnte in einem Modell mit humanen Glattmuskelzellen gezeigt werden, dass die Zugabe von 2 mM anorganischen Phosphates zum Medium die Ausbildung von Kalziumkristallen bewirkte.

Unsere Experimente zeigten, dass eine Zugabe von 4 mM bzw. 7 mM Natriumdihydrogenphosphat zum Medium in den Zellen die stärkste Verkalkung hervorrief. Bei geringeren Konzentrationen von 1 - 2 mM Natriumdihydrogenphosphat konnte dagegen nur sehr wenig Verkalkung beobachtet werden. Da sich die bei 4 und 7 mM ausgebildeten Kalziumkristalle außerdem gleichmäßig auf die Fläche der Wells verteilten, wurden für die nachfolgenden Versuche eine Konzentration von 6 mM Natriumdihydrogenphosphat zur Induktion der Verkalkung verwendet. Die Zellen wurden mit den unterschiedlichen Vektorkonstrukten transfiziert und für jeweils 3 d, 7 d und 21 d mit phosphathaltigem Medium oder DMEM Medium inkubiert. Beck *et al.* (2000) beschreiben in ihrer Arbeit, dass der Weg von der Induktion bis zur Ausbildung von

Verkalkungen ein gut regulierter Prozess ist, der eine Zeitspanne von zwei bis drei Wochen einnimmt.

Nach einer dreitägigen Inkubation der Zellen mit dem phosphathaltigen Medium wurde das Ausmaß der Verkalkung zum ersten Mal analysiert. Es zeigte sich bei allen Zellpopulationen (untransfiziert, mit pSG5, pSG5-*Abcc6-C3H/He* und pSG5-*Abcc6-C57BL/6* transfiziert) lediglich ein leichter Beginn einer Verkalkungsreaktion ohne signifikante Unterschiede zwischen den Populationen.

Zum zweiten Analysezeitpunkt nach sieben Tagen wiesen die transfizierten Zellen im Gegensatz zu den untransfizierten Verkalkungen auf. Dabei zeigte die Zellpopulation, die mit der *C3H/He*-Variante von *Abcc6* transfiziert war, eine stärkere Verkalkung als diejenigen Populationen, die mit der *C57BL/6*-Variante oder dem Leervektor pSG5 transfiziert waren (13,76 $\mu\text{mol}(C3H/He)$ vs. 9,42 μmol (pSG5) und 9,13 μmol (*C57BL/6*)).

Nach einer dreiwöchigen Inkubation konnte bei allen Zellpopulationen eine starke Verkalkung beobachtet werden, so dass zwischen den einzelnen Populationen kein Unterschied mehr bestand.

Für das unterschiedliche Ausmaß der Verkalkung gibt es mehrere Erklärungsansätze. Es fällt auf, dass die Zellen nach einer Inkubationszeit von drei Tagen noch nahezu keine Anzeichen von Verkalkung zeigen. Erst nach einer Woche sind deutliche Verkalkungen erkennbar und es zeigen sich Unterschiede zwischen den mit den einzelnen Vektorvarianten transfizierten Zellen. Außerdem zeigt sich, dass nach drei Wochen alle Zellen unabhängig davon ob und mit welchem Vektor sie transfiziert worden sind, verkalken.

Nach einer dreitägigen Inkubation mit phosphathaltigem Medium konnten noch keine Kalzium-/Phosphatkristalle nachgewiesen werden. Dies ist wahrscheinlich darin begründet, dass die Differenzierung zu osteoblastenähnlichen Zellen drei Tage nach der Induktion der Differenzierung durch Natriumdihydrogenphosphat noch nicht abgeschlossen ist. Da die Zellen noch keinen osteoblastenähnlichen Phänotyp ausweisen, konnten auch noch keine Kalzium-Phosphatkristalle formiert werden.

Die einwöchige Inkubation der Zellen zeigte Unterschiede im Ausmaß der Verkalkung zwischen den einzelnen Zellpopulationen. Ein Aspekt, der diese Unterschiede erklären könnte, ist die Transfektion selbst. Es fällt auf, dass alle Zellen, die transfiziert wurden, zu

diesem Zeitpunkt verkalkten, diejenige Zellpopulation, die nicht transfiziert wurde, aber nicht. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Zellen durch die Transfektion enormem Stress ausgesetzt sind. Zum einen wird durch die Transfektion vorübergehend die Integrität der Zellmembran gestört, zum anderen nimmt die Zelle neue, zusätzliche cDNA in sich auf. Diese wird abgelesen und das kodierte Protein hergestellt. Hierzu muss die Zelle im Vergleich zur untransfizierten mehr Ressourcen und Energie aufwenden, die dann weniger für die Abwehr von Verkalkungsprozessen zur Verfügung stehen. Die Größe des transfizierten Vektors scheint dabei aber keine Rolle zu spielen, denn die mit dem pSG5-Leervektor transfizierten Zellen verkalkten genauso stark wie die, die mit dem wesentlich größeren pSG5-*Abcc6-C57BL/6* Vektor transfiziert wurden.

Nach einer dreiwöchigen Inkubation konnten bei allen Zellpopulationen Verkalkungen nachgewiesen werden. Dieser Effekt könnte darin begründet liegen, dass die Zellen dem anhaltenden konstanten Reiz des erhöhten Phosphates im Nährmedium keine Abwehrmechanismen mehr entgegensetzen konnten und es so zu einer Verkalkung kam. Da die in diesem Experiment durchgeführte Transfektion nur eine transiente war, ist es zudem wahrscheinlich, dass nach drei Wochen der Einfluss der Transfektion nur noch abgeschwächt vorhanden war, weil die Zellen weniger Vektoren in sich trugen. Somit ist der zuvor durch die unterschiedlichen Vektoren hervorgerufene Effekt zu diesem Zeitpunkt nicht mehr messbar. Um dies auszuschließen, wäre zukünftig eine stabile beispielsweise virale Transfektion der Zellen sinnvoll.

Abschließend lässt sich somit nicht erklären, warum die Zellen, die mit dem pSG5-*Abcc6-C3H/He* Vektor transfiziert wurden, nach sieben Tagen stärker verkalkten, als die anders oder gar nicht transfizierten Zellen. Deshalb soll im Folgenden noch einmal näher auf die Funktion des MRP6 eingegangen werden.

4.2 Hypothesen zur Funktionsstörung von MRP6

Um das unterschiedliche Ausmaß der Verkalkung zwischen prädisponierten und resistenten Mausstämmen sowie zwischen den unterschiedlich transfizierten Zellen verstehen zu können, ist es notwendig, die Funktion des durch *Abcc6* kodierten MRP6 näher zu analysieren.

MRP6 ist ein ABC-Transporter in der Zellmembran und wird hauptsächlich in Leber und Niere exprimiert. Über seine Funktion ist wenig bekannt. Da zu MRP1 eine 45 %ige Homologie besteht, geht man davon aus, dass sich auch die Funktionen beider Proteine ähneln. Choi (2005) schrieb über MRP1, dass es an der zellulären Entgiftung mitwirkt und für die Resistenz von Zellen gegenüber Chemotherapeutika beteiligt ist. Es wird daher davon ausgegangen, dass auch MRP6 als Effluxpumpe arbeitet und Stoffwechselprodukte aus der Zelle eliminiert sowie eine Schutzfunktion gegenüber oxidativem Stress übernimmt (Klement et al., 2005; Matsuzaki et al., 2005).

Es ist zu vermuten, dass sich die Morphologie der *C3H/He*- und der *C57BL/6*-Varianten des MRP6 aufgrund der sieben Aminosäureaustausche voneinander unterscheidet und dass durch diese Austausche unterschiedliche Funktionen des Proteins gestört sind, die wiederum die unterschiedlich starke Verkalkung der Zellen erklären könnten. Zur Funktionsstörung von MRP6 gibt es zwei Erklärungsansätze. Zum einen wäre es denkbar, dass der Einbau des Proteins in die Zellmembran gestört ist und zum anderen wäre es möglich, dass der Einbau in die Zellmembran zwar funktioniert, die Transportfunktion aber gestört ist.

- Würde der Einbau des Proteins in die Zellmembran gestört sein, würde es im Zytoplasma der Zelle akkumulieren. Dort würde es dann von Proteinasen abgebaut werden, was erhöhten Stress und Energieverbrauch für die Zelle bedeuten würde. Zudem würde eine Akkumulation des Proteins innerhalb der Zelle einen kompletten Funktionsverlust bedeuten, da überhaupt kein Transport in den Extrazellularraum mehr möglich wäre.
- Der zweite Erklärungsansatz für den Funktionsverlust des Proteins liegt in der Störung des Transportmechanismus trotz korrektem Einbau in die Zellmembran.
 - Ist MRP6 eine Effluxpumpe und für die zelluläre Entgiftung zuständig, könnte es bei einer gestörten Funktion zu einer Akkumulation toxischer Substanzen im Zellinneren kommen, die die Zelle schädigen und sekundär zu einer Verkalkung führen.
 - Außerdem wäre es denkbar, dass über MRP6 ein verkalkungsinhibierender Stoff in den Extrazellularraum transportiert wird und so die Verkalkung des

Zellverbandes aktiv verhindert wird. Ist diese Funktion gestört oder das Protein nicht in die Zellmembran eingebaut (s.o.), werden Verkalkungsprozesse nicht mehr gehemmt und die Zelle verkalkt.

- Durch die Änderung der Morphologie des Proteins könnte die Pore des Kanals auch dahingehend verändert sein, dass die Transportfunktion unspezifischer wird und so das Gleichgewicht zwischen Intra- und Extrazellularraum gestört ist.

Um näheren Aufschluss über die MRP6-Morphologie sowie den Einfluss des Austausches der sieben Aminosäuren auf die Funktion des Proteins zu erhalten, wurde von Frau Stephanie Tennstedt aus unserer Arbeitsgruppe ausgehend von der 3D-Struktur des *Abcb1a* (*Mus musculus*, PDB-Code: 3G5U_A) eine homologe 3D-Struktur des MRP6 berechnet. Die ersten 253 Aminosäuren sowie die Aminosäuren D850-G869 konnten dabei nicht modelliert werden, da für diesen Bereich keine geeignete 3D-Referenzstruktur als Template zur Verfügung stand. Die erhaltene Struktur zeigt, dass die Mutationen A726V und I947T in der Domain-Domain Region gelegen sind. In der ATP-Region des Proteins liegen die Mutationen A726V, S1476N, V1448L und Q1401H. Mit Hilfe dieses Modells wird es möglich, die Position der Aminosäureaustausche innerhalb des Proteins zu lokalisieren. Außerdem lassen sich auch die Lagebeziehungen der Aminosäuren zu funktionell wichtigen Bereichen des Proteins wie des ATP- bindenden Bereichs oder der Interaktionszone der beiden Proteindomänen darstellen. Somit erlaubt es die Generation neuer Hypothesen zur Funktion von MRP6 und ermöglicht die Planung neuer Experimente. Nachfolgende Abbildung 4.1 zeigt das Homologiemodell von MRP6.

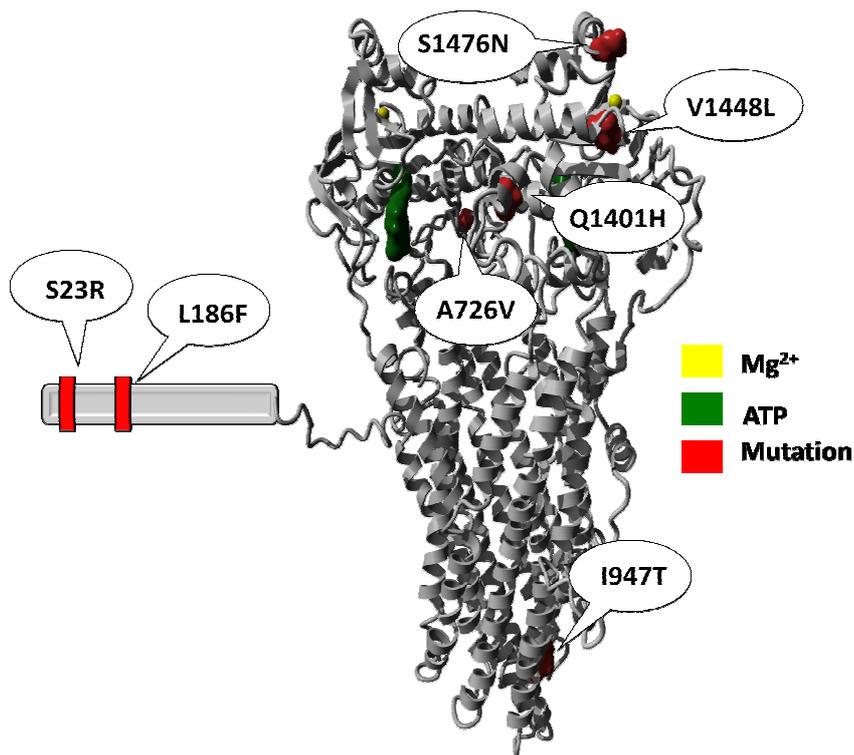


Abbildung 4.1: Homologiemodell von MRP6: Das dargestellte Modell basiert auf der Röntgenkristallstruktur des murinen *Abcb1a*, PDB-Code: 3G5U_A. Hierbei konnten die Abschnitte M1-E253 und D850-G869 nicht verwendet werden, da für diese Bereiche kein entsprechendes Template in der Datenbank zur Verfügung stand. Die Positionen der Aminosäureaustausche innerhalb des Proteins sind rot dargestellt.

Um näher eingrenzen zu können, worin die Funktionsstörung der *C3H/He*-Variante des Proteins genau liegt, sind noch weitere Untersuchungen nötig. Einen ersten Hinweis darauf, welche der sieben Aminosäureaustausche den stärksten Einfluss hat, gibt der *New-Zealand-Black* Mausstamm. Wie von Aherrahrou *et al.* 2007 mittels *in silico mapping* festgestellt wurde, verkalkt dieser Mausstamm phänotypisch, hat genotypisch aber nur zwei der sieben Punktmutationen des Stammes *C3H/He*, V706A und T927I. Diese Beobachtung legt nahe, dass diese beiden Mutationen den größten Funktionsverlust des Proteins zur Folge haben. Weitere Experimente unserer Arbeitsgruppe konnten zudem zeigen, dass die Stabilität von MRP6 von den beiden Mutationen V706A und T927I weitgehend unbeeinflusst bleibt. Enthält das Protein allerdings alle sieben Mutationen (*C3H/He*) sind sowohl Funktion als auch Stabilität von MRP6 gestört (unpublizierte Daten).

4.3. Transkriptionsfaktoren der Osteogenese

Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit bestand darin, genauere Einblicke in den Pathomechanismus der Verkalkung *in vivo* zu erlangen. Aufgrund der Annahme, dass es zwischen pathologischen und physiologischen Verkalkungsprozessen viele Überschneidungen gibt, ist es denkbar, dass Transkriptionsfaktoren der Osteogenese, wie *Runx2*, *Sox9*, *Vdr*, *Nfkb*, *Twist1*, *Msx1*, *Msx2*, *Smad1*, *Smad2*, *Smad3* und *Smad4* in diesen Prozessen eine Rolle spielen. In dieser Arbeit wurde die Expression dieser Transkriptionsfaktoren *in vivo* und *in vitro* untersucht.

Im *in vitro* Modell zeigte sich bei der Analyse des Expressionsniveaus der oben genannten Transkriptionsfaktoren kein Unterschied zwischen den mit *C3H/He*- und den mit *C57BL/6*-transfizierten Zellen. Die Expression der Transkriptionsfaktoren lag lediglich auf einem basalen Niveau. Dies kann dadurch erklärt werden, dass es sich bei den Zellen um mesenchymale Stammzellen handelt, die durch die Zugabe von Phosphat zum Nährmedium in eine osteogene Differenzierungsrichtung gedrängt wurden und somit auch Transkriptionsfaktoren der Osteogenese exprimieren. Dadurch lässt sich auch erklären, dass bei beiden Populationen eine Expression von Transkriptionsfaktoren gemessen werden konnte.

Im Gegensatz zum *in vitro* Modell konnte *in vivo* drei Tage nach der Myokardkryopexie auf Expressionsebene ein Unterschied zwischen beiden Mausstämmen gefunden werden. Als Proben für die Untersuchung dienten nekrotisches/verkalktes und gesundes Myokardgewebe von prädisponierten *C3H/He*- und resistenten *C57BL/6*-Mäusen. Im Unterschied zum *in vitro* Modell muss hierbei betont werden, dass beim Mausstamm *C57BL/6* keine Verkalkungen nachgewiesen werden konnten. Bei der Analyse des Expressionsniveaus fiel vor allem der Transkriptionsfaktor *Runx2* auf, dessen Expression im nekrotischen/verkalkten Herzgewebe des Stammes *C3H/He* drei Tage nach der Kryopexie um das 10-fache höher (3,09 (*C57BL/6*) vs. 30,26 (*C3H/He*)) als im nekrotischen Herzgewebe des Stammes *C57BL/6* war. Der Transkriptionsfaktor *Runx2* könnte somit bei der Entstehung der Verkalkung in DCC-prädisponierten *C3H/He* Mäusen *in vivo* eine Schlüsselrolle spielen.

Für die Unterschiede der *in vivo* und *in vitro* erhobenen Expressionsdaten der Transkriptionsfaktoren der Osteogenese sind folgende Erklärungsansätze denkbar.

- Für das *in vitro* Modell wurde die murine mesenchymale Stammzelllinie C3H10T1/2 verwendet und durch Zugabe eines anorganischen Phosphates zum Nährmedium in die osteogene Differenzierungsrichtung gedrängt. Da die Zellen dadurch eine osteoblastenartige Morphologie besitzen, ist es verständlich, dass sie zu einem gewissen Grundniveau Transkriptionsfaktoren der Osteogenese exprimieren, welches in der konventionellen und der real-time PCR gemessen wurde. Bei diesem Modell handelt es sich zudem um ein abgeschlossenes System, in dem nur der durch die C3H10T1/2 Zellen selbst hervorgerufene Effekt gemessen werden kann. Dies ist ein entscheidender Unterschied im Vergleich zu einem *in vivo* Modell, in dem unterschiedliche Zelltypen, Mediatoren, Zytokine und Verstärkersysteme die Expression von Transkriptionsfaktoren beeinflussen können.
- Die Gewebeproben aus den Herzen der Mäuse bestanden hauptsächlich aus Kardiomyozyten und Fibroblasten und evtl. einigen residenten Stammzellen. Diese Zellen exprimieren unter Normalbedingungen wenig bis keine Transkriptionsfaktoren der Osteogenese. Die gemessene Expression von Transkriptionsfaktoren der Osteogenese kann damit aller Wahrscheinlichkeit nach durch die Myokardkryopexie und die darauffolgende Reaktion des Gewebes auf die Verletzung gedeutet werden. Es könnte durch den von außen applizierten starken Reiz auch zu einer Differenzierung der residenten Stammzellen in die osteogene Richtung gekommen sein, die dann durch die Expression der entsprechenden Transkriptionsfaktoren zum gemessenen Ergebnis beigetragen haben könnten.
- Ein weiterer Faktor, der die Unterschiede zwischen den *in vitro* und *in vivo* gemessenen Ergebnissen erklären könnte, ist die Art der Verkalkungsentstehung. Die erhöhte Phosphatkonzentration im Nährmedium des *in vitro* Modells führte zu einer metastatischen Verkalkung der Zellen. *In vivo* wurde durch eine Kryopexie das Myokard geschädigt und es kam zu einer Nekrose des geschädigten Gewebes. Dieses verkalkte anschließend durch dystrophe Verkalkung, da die Kalzium- und Phosphatlevel im Plasma im Normbereich lagen. Die unterschiedliche Entstehung der Verkalkungen könnte auch unterschiedliche Regulationsprozesse und Expressionsniveaus von Transkriptionsfaktoren zur Folge haben. Bei der Betrachtung der unterschiedlichen Verkalkungsentstehung muss außerdem berücksichtigt werden, dass die Kryopexie des Myokards einen wesentlich stärkeren Reiz darstellt als die

erhöhte Phosphatkonzentration im Medium der Zellkultur. Zudem könnte die Reaktion auf den Reiz *in vivo* auch durch Zytokine oder Hormone aus anderen Geweben potenziert werden.

4.4 *Runx2* – Schlüsselgen für Verkalkungsprozesse *in vivo*?

Der Transkriptionsfaktor *Runx2* gilt als Schlüsselfaktor in der Differenzierung von Osteoblasten und Chondrozyten. Bei der Maus liegt *Runx2* auf Chromosom 17 und hat daher keine direkte Beziehung zum Gen *Abcc6*, das auf Chromosom 7 lokalisiert ist. *Runx2*-knock-out Mäusen fehlen funktionsfähige Osteoblasten und die Umformung des Knorpelvorläufermodells in Knochengewebe durch enchondrale Osteogenese sowie auch der Prozess der direkten Osteogenese sind gestört (Inada et al., 1999). Beim Menschen führen Mutationen im *Runx2* Locus zur autosomal-dominanten Erkrankung Cleidocraniale Dysplasie, bei der die Schlüsselbeine nicht angelegt werden, die Fontanellen zwischen den Schädelknochen sich nicht schließen und betroffene Individuen eine sehr kleine Körperstatur sowie eine abweichende Anzahl von Zähnen aufweisen (Franceschi und Xiao, 2003). Im Gegensatz dazu konnte in Knochenmetastasen ein erhöhtes Expressionsniveau von *Runx2* nachgewiesen werden (Schroeder et al., 2005). Diese entscheidende Rolle von *Runx2* konnten Byon et al. (2008) in einem *in vitro* Modell bestätigen, indem sie durch die Überexpression von *Runx2* in glatten Gefäßmuskelzellen einen Verkalkungsprozess initiieren und diesen durch die Blockade von *Runx2* mittels *shRNA* verhindern konnten. Erhöhte Expressionslevel von *Runx2* konnten auch in atherosklerotischen Läsionen gefunden werden. Allerdings ist noch nicht geklärt, ob die erhöhte Expression ein Resultat der Verkalkung in den Gefäßen war oder diese durch die erhöhte Expression ausgelöst wurde (Byon et al., 2008). Die Mechanismen über die *Runx2* seine Wirkung entfaltet, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist aber bekannt, dass einige Hauptgene für Knochenmatrixproteine wie *Coll* und *Osteocalcin* Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor *Runx2* besitzen und die Expression dieser Gene durch *Runx2* induziert oder ihr Promotor aktiviert werden kann. Bei der Beeinflussung dieser Osteoblastentypischen Gene scheint ein *cis*-Element im Promotor als Bindungsstelle für *Runx2* zu dienen (Shirakabe et al., 2001).

Runx2 selbst wird dabei wiederum von einigen anderen Molekülen beeinflusst. Seine Aktivität kann beispielsweise durch posttranslationale Phosphorylierung oder Protein-Protein-Interaktion modifiziert werden (Franceschi und Xiao, 2003). *Msx2* scheint die

Aktivität von *Runx2* zu hemmen, wobei diese hemmende Wirkung wiederum von *Dlx5* reguliert wird (Shirakabe *et al.*, 2001).

Weiteren Aufschluss darüber, in welche Stoffwechselwege der Transkriptionsfaktor *Runx2* involviert ist und welche Gene er reguliert, gibt die Arbeit von Fowlkes *et al.* (2008). In einem Mausmodell zur Untersuchung des Einflusses von Diabetes Typ I auf die Knochenbildung untersuchten sie spezifische osteogene Gene. Sie fanden heraus, dass in Insulin-defizienten Mäusen die Expression von *Runx2* sowie einiger Targetgene wie u.a. *Metalloproteinase-9*, *Alkalische Phosphatase*, *Vdr*, *Osteocalcin*, *Opn* und *Osterix*, signifikant herabgesetzt war. Durch Insulingabe konnte das Ausmaß der Expression dieser Gene wieder auf das Maß in Wildtypmäusen angehoben werden. Im Gegensatz zu diesen *in vivo* ermittelten Ergebnissen konnte in *in vitro* Modellen mit Osteoblasten auch nach längeren Hyperglycämieperioden keine verminderte Expression von *Runx2* und dessen Targetgenen festgestellt werden. Insulingabe führte *in vitro* sogar zu einer verstärkten Expression von *Runx2*.

Diese von Fowlkes *et al.* (2008) beschriebenen Unterschiede in der Expression von *Runx2* *in vivo* und *in vitro* konnten auch in dieser Arbeit festgestellt werden. Die komplizierten Regulationsmechanismen des Transkriptionsfaktors *Runx2* scheinen sich *in vitro* nicht so darstellen zu lassen, wie sie *in vivo* beobachtet werden konnten.

Innerhalb dieser Arbeit wurden die Gewebeproben aus den Herzen von *C3H/He* und *C57BL/6* Mäusen nach Myokardkryopexie auch auf die Expression von Targetgenen untersucht, die downstream des Transkriptionsfaktors *Runx2* liegen, um Erkenntnisse darüber zu gewinnen, wie *Runx2* Einfluss auf den Verkalkungsprozess *in vivo* nimmt. Dabei fanden wir im nekrotischen bzw. verkalkten Myokardgewebe beider Mausstämmen eine erhöhte Expression von *Colla2*, *MMP8*, *MMP13* und *Opn*. Die Expressionsmuster der downstream von *Runx2* gelegenen Gene waren dabei in beiden Mausstämmen sehr ähnlich. Eine Ausnahme stellte die Expression von *Opn* dar, die im nekrotischen Myokard der *C3H/He* Mäuse drei Tage nach Myokardkryopexie ca. um das sechsfache höher als im nekrotischen Myokard der *C57BL/6* Mäuse war. Dieses Resultat bestätigt die Ergebnisse von Shen und Christakos (2005), die den Einfluss des Transkriptionsfaktors *Runx2* auf die Expression von *Opn* in einem Zellkulturmodell untersuchten. Hierbei stellte sich heraus, dass der Einfluss von *Runx2* auf die Expression von *Opn* durch weitere Transkriptionsfaktoren wie *Vdr* verstärkt werden kann (Shen und Christakos, 2005).

4.5 Schlussfolgerungen

Die Erkrankungen Pseudoxanthoma elasticum (PXE) und Dystrophie Kardiale Verkalkung (DCC) teilen viele Charakteristika. Beide sind für ektope Ablagerungen von Kalzium-Phosphat-Kristallen bekannt und werden durch Mutationen im Gen *Abcc6* verursacht. Sowohl *Abcc6*-knock-out Mäuse als auch die in unserer Arbeitsgruppe entwickelte *Dyscalc* Maus wurden als *in vivo* Modelle für den PXE-Phänotyp (Li *et al.*, 2008a; Uitto *et al.*, 2010) und den DCC-Phänotyp verwendet (Kooperation zwischen Dr. Aherrahrou und LeSaux, 2010).

Zur Erklärung des Pathomechanismus und der Funktionsstörung von MRP6, der zur Entstehung dieser ektope Verkalkungen führt, gibt es in der Literatur zwei Hypothesen: die "PXE-Zell-Hypothese" und die "Metabolische Hypothese".

Die "PXE Zell Hypothese" besagt, dass die Zellen der von PXE betroffenen Gewebe durch die Mutationen im Gen *Abcc6* ein defizitäres MRP6 exprimieren. Dadurch ist die Zellaktivität verändert, was eine Verkalkung nach sich zieht (Li *et al.*, 2008a). In Fibroblasten von PXE-Patienten konnten veränderte Zell-Zell-Interaktionen und Zell-Matrix-Interaktionen festgestellt werden, die mit einer Veränderung der Proliferationskapazität einhergingen. Außerdem konnte ein verstärktes Potential zur Degradation beobachtet werden (Jiang *et al.*, 2009). Diese Hypothese würde zu einem Teil auch die *in vitro* beobachteten Ergebnisse erklären können, da sie von einer lokalen Störung des Zellverbandes an sich ausgeht, der dann in dem Gewebe selbst eine Verkalkung nach sich zieht. Die Zellen selbst exprimieren hier das funktionsgestörte Protein woraufhin sie stärker verkalken als solche, die das funktionsfähige Äquivalent exprimieren.

Der Versuchsaufbau in unserer Arbeit bringt es allerdings mit sich, dass man nicht sicher sein kann, dass nicht auch die "Metabolische Hypothese", die im Folgenden erklärt wird, *in vitro* zutreffend ist. Würde es durch die Funktionsstörung des Proteins zu einer Veränderung der Zusammensetzung sezernierter Faktoren kommen, wie es in der „Metabolischen Hypothese“ postuliert wird, könnte sich dieses *in vitro* ja nur auf die sezernierenden Zellen selbst auswirken, da sie nicht über einen Kreislauf mit anderen Geweben in Verbindung stehen.

In der "Metabolischen Hypothese" gehen Li *et al.* (2008a) und Jiang *et al.* (2009) davon aus, dass die Funktionsstörung von *Abcc6* in der Leber zu einer Veränderung der

Zusammensetzung im Blut zirkulierender Faktoren führt, die normalerweise Schutz vor ungewollter Verkalkung gewähren. Kommt es zu einem Ungleichgewicht dieser Faktoren, resultiert daraus nach einem mehrjährigen Verlauf die Ausbildung von Verkalkungen des Bindegewebes. Es besteht eine örtliche Trennung zwischen verkalkendem Gewebe und dem Gewebe, das das funktionsgestörte MRP6 exprimiert. Jiang *et al.* (2009) konnten die "Metabolische Hypothese" untermauern, indem sie *Abcc6*-knock-out Mäusen ein Hauttransplantat von *Abcc6*-Wildtypmäusen verpflanzten, das daraufhin verkalkte. Wurde *Abcc6*-knock-out Mäusen ein Stück Hautgewebe entnommen und *Abcc6*-Wildtypmäusen transplantiert, verkalkte dieses nicht. Diese Resultate ließen darauf schließen, dass zirkulierende Faktoren im Blut der das Transplantat erhaltenden Mäuse für die Entwicklung der Verkalkung verantwortlich waren. Diese Ergebnisse legten nahe, dass es sich bei PXE um eine systemische metabolische Erkrankung handelt.

Durch ein *in vitro* Experiment konnten auch Le Saux *et al.* (2006) die Theorie von PXE als Systemerkrankung bestätigen, indem sie Fibroblasten von PXE-Patienten und gesunden Spendern mit Seren von PXE-Patienten und gesunden Spendern inkubierten und eine abnorme Morphologie der elastischen Fasern der Zellen beobachteten, die mit PXE Serum inkubiert worden waren. Daraus schlossen sie, dass bestimmte Metabolite aus dem Serum der PXE-Patienten hierfür ursächlich waren. Le Saux *et al.* (2006) vermuteten deswegen, dass es sich bei PXE um eine primär systemische Erkrankung mit sekundärer Manifestation im Bindegewebe handelt.

Jiang *et al.* (2009) postulieren folgende mögliche Verbindung zwischen der "PXE-Zell-Hypothese" und der "Metabolischen-Hypothese". Sie gehen davon aus, dass zirkulierende Plasmafaktoren oder ein Mangel/Fehlen dieser Faktoren das metabolische Profil der Target-Zellen z. B. der Fibroblasten im peripheren Bindegewebe beeinflussen und so einen Prozess auslösen, der dort zur ektopten Verkalkung führt.

4.6 Ausblicke

Ein Ziel für die nähere Zukunft muss es sein, weitere Erkenntnisse über die Funktionsstörung von MRP6 zu erhalten und die Faktoren zu identifizieren, die im Serum von PXE-Patienten im Ungleichgewicht sind und zu überschießender ektopter Verkalkung führen. Durch die Identifikation dieser Faktoren wäre es eventuell möglich, neue Strategien für die Behandlung von PXE zu entwickeln. Da die ektopten Verkalkungen bei

PXE-Patienten zumeist erst in der zweiten und dritten Lebensdekade auftreten, könnte bei frühzeitiger Diagnosestellung die volle Ausprägung der Erkrankung verhindern werden, indem die Faktoren im Serum wieder ins Gleichgewicht gebracht werden (Jiang *et al.*, 2009). Es gibt unterschiedliche Arbeitsgruppen, die daran arbeiten den Metaboliten zu identifizieren, der über MRP6 transportiert wird und der ursächlich für die Ausbildung ektopter Verkalkungen bei PXE-Patienten ist. Um Aufschluss darüber zu gewinnen, welche Metabolite über MRP6 transportiert werden, wurde die Struktur von MRP6 näher betrachtet. Auf Grund von Analysen der Strukturhomologie zu anderen ABC-Transportproteinen v. a. zu *Abcc1* vermuteten Jiang *et al.* (2009), dass MRP6 als Efflux-Transportprotein arbeitet und mit Glutathion konjugierte Anionen oder Vitamin K-Derivate als Substrate transportiert. Zu diesen Derivaten zählt v. a. die reduzierte Form von Vitamin K, KH_2 , das ein obligatorischer Co-Faktor der γ -Glutamyl-Carboxylase ist. Dieses Enzym ist u. a. auch für die Aktivierung des Verkalkungsinhibitors Matrix-GLA-Protein zuständig. In Hautläsionen von PXE-Patienten und *Abcc6*-knock-out Mäusen wurde Matrix-GLA-Protein gefunden, das untercarboxyliert und somit inaktiv war (Uitto *et al.*, 2010). KH_2 besonders in seiner mit Glutathion konjugierten Form könnte somit ein Substrat von MRP6 sein, das in der Peripherie über die Aktivierung von Matrix-GLA-Protein eine ektope Verkalkung verhindert.

Ein weiteres Molekül, das einen Einfluss auf die Entwicklung von Verkalkungen bei PXE-Patienten haben könnte, ist der Verkalkungsinhibitor Fetuin-A. Jiang *et al.* (2007) fanden im Serum von PXE-Patienten eine um ca. 30 % geringere Konzentration von Fetuin-A verglichen mit dem Serum gesunder Probanden. Hendig *et al.* (2006) entdeckten weiterhin, dass das Fetuin-A-Level im Serum von mit PXE-Patienten verwandten Personen intermediär zwischen dem Level von gesunden Probanden und dem von PXE-Patienten lag. Uitto *et al.* (2010) stellen dazu die Überlegung an, dass die Erhöhung der Fetuin-A-Level im Blut von PXE-Patienten den ektopten Verkalkungen entgegen wirken könnten. In einem *Abcc6*-knock-out Mausmodell führte das Einbringen eines Fetuin-A cDNA tragenden Expressionsvektors mit leberspezifischem Promotor zu einer Verringerung der Verkalkung.

Einige Arbeitsgruppen arbeiten auch daran, Strategien zu entwickeln, mit denen die Transportfunktion von *Abcc6* wieder hergestellt werden kann. Dies könnte durch das Einbringen von Stammzellen gelingen, die das Potential haben, sich zu Hepatozyten mit funktionsfähigem MRP6 zu differenzieren. Ein anderer Weg bestünde in der

Transplantation einer Leber oder eines Leberlappens eines Spenders, der nicht an PXE leidet. Alle diese Ansätze müssen jedoch noch in ausgedehnten präklinischen Studien am Tiermodell auf ihre Anwendbarkeit und Funktionsfähigkeit überprüft werden (Uitto *et al.*, 2010).

Eine weitere mögliche Behandlungsstrategie bietet die Modifikation der Ernährung. LaRusso *et al.* (2009) konnten durch die Zugabe von Magnesium zum Futter die Ausbildung ektopter Verkalkungen bei *Abcc6*-knock-out Mäusen bis zu einem Alter von sechs Monaten verhindern. Ein hoher Gehalt von Kalzium und Phosphat in der Nahrung verstärkt hingegen das Ausmaß der Verkalkungen (Uitto *et al.*, 2010). Durch diese im Tiermodell gewonnenen Erkenntnisse könnte zukünftig eine speziell für PXE-Patienten zugeschnittene Diät entwickelt werden, die das Auftreten der Verkalkungen möglichst lange hinauszögert.

5. Zusammenfassung

Verkalkungsprozesse spielen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung unterschiedlicher Erkrankungen. Hierbei sind v. a. Erkrankungen des kardiovaskulären Systems wie Arteriosklerose und koronare Herzkrankheit sowie deren Folgen, der Schlaganfall und der Myokardinfarkt zu nennen, da dieser Krankheitskomplex in der westlichen Welt die Statistik der Todesursachen anführt.

Das Gen *Abcc6* hat Einfluss auf die Regulation von Verkalkungsprozessen und kodiert für das multidrug-resistent-protein MRP6, einen ABC-Transporter in der Zellmembran, der hauptsächlich in der Leber und der Niere exprimiert wird. In dem für Dystrophe Kardiale Verkalkung (DCC) prädisponierten Mausstamm *C3H/He* konnten im Vergleich zum DCC-resistenten Stamm *C57BL/6* sieben Punktmutationen im Gen *Abcc6* gefunden werden, die zum Austausch von sieben Aminosäuren im resultierenden MRP6 führen. Das Gen *Abcc6* konnte als ursächliches für DCC identifiziert werden.

Beim Menschen führen unterschiedliche Mutationen im Gen *Abcc6* zu der seltenen genetischen Erkrankung Pseudoxanthoma elasticum (PXE). Bei dieser Erkrankung sind verschiedene Gewebe, hauptsächlich in Haut, Augen und Gefäßen, von abnormen Verkalkungen betroffen.

Ziel dieser Arbeit war es, ein *in vitro* Zellkulturmodell für Verkalkung zu etablieren und den Einfluss der DCC-prädisponierten *C3H/He*- und der DCC-resistenten *C57BL/6*-Variante von *Abcc6* in diesem *in vitro* Modell zu untersuchen. Die Wildtyp-cDNA-Variante (*C57BL/6*) sowie die sieben Punktmutationen enthaltende cDNA-Variante (*C3H/He*) des Gens wurden zunächst hergestellt und in einen pSG5-Expressionsvektor eingebracht. Dieser wurde durch Transfektion in murine mesenchymale Stammzellen der Linie C3H10T1/2 eingebracht und die entsprechende Genvariante somit überexprimiert. Ein Verkalkungsprozess wurde durch die Zugabe von anorganischem Phosphat (6 mM Natriumdihydrogenphosphat) zum Nährmedium induziert. Das Ausmaß der Verkalkung wurde nach Ablauf von drei, sieben und 21 Tagen photometrisch bestimmt und die RNA zur Analyse der Genexpression gewonnen. Nach Analyse des zeitlichen Ablaufs konnte nach drei Tagen keine Verkalkung nachgewiesen werden. Eine beginnende Entwicklung von Verkalkung ließ sich nach sieben Tagen beobachten und weitete sich bis zum 21. Tag stark aus. Als interessanter Zeitpunkt für eine genauere Analyse wurde der Zeitpunkt nach sieben Tagen ausgewählt. Zu diesem Zeitpunkt zeigten mit dem pSG5-Vektor und mit

pSG5-*Abcc6-C57BL/6*-Vektor transfizierte Zellen ein ähnliches Ausmaß von Verkalkung (pSG5: 9,42 μmol , pSG5-*Abcc6-C57BL/6*: 9,13 μmol). Interessanterweise wiesen die Zellen, die mit pSG5-*Abcc6-C3H/He* transfiziert wurde, mit 13,76 μmol eine stärkere Verkalkung auf. Die um das 1,55-fach erhöhte Verkalkung bei mit pSG5-*Abcc6-C3H/He* transfizierten Zellen war im Vergleich zu mit pSG5-*Abcc6-C57BL/6* transfizierten Zellen signifikant ($p = 0,0058$). Der Einfluss der Substitution von sieben Aminosäuren im MRP6 des Mausstammes *C3H/He* auf die Verkalkung konnte in dieser Arbeit somit auch *in vitro* bestätigt werden.

Um genaueren Aufschluss über den der Verkalkung zugrunde liegenden Pathomechanismus zu erhalten, wurde das Expressionsniveau einiger Transkriptionsfaktoren der Osteogenese (*Runx2*, *Sox9*, *Vdr*, *NfκB*, *Twist1*, *Msx1*, *Msx2*, *Smad1*, *Smad2*, *Smad3* und *Smad4*) *in vitro* und *in vivo* mittels real-time-PCR untersucht und miteinander verglichen. Als *in vivo* Proben dienten dabei Myokardgewebe des DCC-pädisponierten Mausstammes *C3H/He* und des DCC-resistenten Stammes *C57BL/6*. Um die Verkalkung des Myokards zu induzieren, wurde zunächst eine Myokardkryopexie durchgeführt und anschließend nach Ablauf von einem bzw. drei Tagen Gewebeproben von gesundem und verletztem Myokard gewonnen.

In vitro zeigte sich lediglich eine basale Expression der untersuchten Transkriptionsfaktoren ohne Unterschiede zwischen den die *C3H/He*- und den die *C57BL/6*-Variante von MRP6 exprimierenden Zellen. Auch zeigten sich keine Unterschiede zwischen Zellen, die mit DMEM und solchen Zellen, die mit phosphathaltigem Medium kultiviert wurden.

In vivo konnte *Runx2* als Schlüsselgen für die Regulation von Verkalkungsprozessen identifiziert werden. Drei Tage nach Myokardkryopexie konnte im verletzten Herzgewebe des Stammes *C3H/He* eine im Vergleich zur Kontrolle um das 30,26-fach erhöhte Expression von *Runx2* gemessen werden. Außerdem konnte eine geringe Expression von *Sox9*, *Vdr*, *NfκB*, *Msx1*, *Smad1*, *Smad2* und *Smad4* gemessen werden. In einem Folgeversuch wurde zusätzlich die Expression von *Runx2* downstream Genen untersucht. Hierbei zeigte sich in beiden Mausstämmen eine erhöhte Expression von *Colla2*, *MMP8*, *MMP13* und *Opn*. Das Expressionsniveau und -muster war dabei in beiden Stämmen ähnlich. Eine Ausnahme bildete die Expression von *Opn*, die im nekrotischen Myokard des Stammes *C3H/He* im Vergleich zum Stamm *C57BL/6* ca. sechsfach erhöht war.

6. Literaturverzeichnis

Aherrahrou Z, Axtner SB, Kaczmarek PM, Jurat A, Korff S, Doehring LC, Weichenhan D, Katus HA, Ivandic BT: "A locus on chromosome 7 determines dramatic up-regulation of *Osteopontin* in dystrophic cardiac calcification in mice", *American Journal of Pathology*, Vol. 164, No. 4, pp. 1379-1387, (2004)

Aherrahrou Z, Doehring LC, Ehlers E, Liptau H, Depping R, Linsel-Nitschke P, Kaczmarek PM, Erdmann J, Schunkert H: "An Alternative Splice Variante in *Abcc6*, the Gene Causing Dystrophic Calcification, Leads to Protein Deficiency in *C3H/He* Mice", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 283, No.12, pp.7608-7615, (2008)

Aherrahrou Z, Doehring LC, Kaczmarek PM, Liptau H, Ehlers E, Pomarino A, Wrobel S, Götz A, Mayer B, Erdmann J, Schunkert H: "Ultrafine mapping of *Dyscalc* to an 80-kb chromosomal segment on chromosome 7 in mice susceptible for dystrophic calcification", *Physiol Genomics* 28, pp.203-212, (2007)

Atkinson BL, Fantle KS, Benedict JJ, Huffer WE, Gutierrez-Hartmann A: "Combination of Osteoinduced Bone Proteins Differentiates Mesenchymal C3H10T1/2 Cells Specifically to the Cartilage Lineage", *Journal of Cellular Biochemistry* 65, pp.325-339, (1997)

Beck GR, Zerler B, Moran E: "Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Vol.97, No.15, pp.8352-8357, (2000)

Beck K, Hayashi K, Nishiguchi B, Le Saux O, Hayashi M, Boyd CD: "The distribution of *Abcc6* in normal mouse tissues suggests multiple functions for this ABC-Transporter", *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, Vol.51, pp.887-902, (2003)

Böcker W, Denk H, Heitz PhU: "Pathologie", Kapitel 19: Herz, S. 462-463, Kapitel 20: Gefäße, S.484-494, 3. Auflage, Elsevier Urban & Fischer, München, (2004)

Brunnert SR, Altman NH: "Dystrophic cardiac calcinosis in mice: abnormal myocardial response to freeze-thaw injury", *American Association for Laboratory Animal Science* 40 (6), pp.616-619, (1990)

Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, McDonald JM, Chen Y: "Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor *Runx2* by AKT signaling", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.283, No.22, pp.15319-15327, (2008)

Cheng S-L, Shoa J, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA: "*Msx2* Promotes Osteogenesis and Suppresses Adipogenic Differentiation of Multipotent Mesechymal Progenitors", *The Journal of Biological Chemistry* 14, Vol. 278, No. 46, pp.45969-45977, (2003)

Choi C-H: "ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal", *Cancer Cell International* 5:30,(2005)

- Eaton GJ**, Custer RP, Johnson FN, Stabenow KT: "Dystrophic Cardiac Calcinosis in Mice", American Journal of Pathologie 90, No.1, pp.173-182, (1978)
- Fowlkes JL**, Bunn RC, Liu L, Wahl EC, Coleman HN, Cockrell GE, Perrien DS, Lumpkin Jr. CK, Thrailkill KM: "Runt-related transcription factor 2 (*Runx2*) and *Runx2*-related osteogenic genes are down-regulated throughout osteogenesis in Typ 1 Diabetes Mellitus", Endocrinology 149, pp.1697-1704, (2008)
- Franceschi RT**, Xiao G: "Regulation of the osteoblast-specific transcription factor *Runx2*: Responsiveness to multiple signal transduction pathwasy", Journal of Cellular Biochemistry 88, pp.446-454, (2003)
- Gebbers J-O**; "Atherosclerosis, cholesterol, nutrition, and statins – a critical review", German Medical Science, Vol.5, ISSN 1612-3174, (2007)
- Giachelli CM**: "Ectopic calcification: new concepts in cellular regulation", Zeitschrift für Kardiologie 90: Suppl 3, III/31-III/37, (2001)
- Giachelli CM**: "Vascular calcification: *In vitro* evidence for the role of inorganic phosphate", Journal American Society of Nephrology 14, pp.300-304, (2003)
- Giachelli CM**: "Vascular Calcification Mechanisms", Journal of the American Society of Nephrology 15, pp.2959-2964, (2004)
- Giachelli CM**: "Inducers and inhibitors of biomineralization: lessons from pathological calcification", Orthodontics & Craniofacial Research 8, pp.229-231, (2005)
- Giachelli CM**, Speer MY, Li X, Rajachar RM, Yang H: "Regulation of Vascular Calcification: Roles of Phosphate and Osteopontin", Circulation Research 96, pp.717-722, (2005a)
- Gorgels TGMF**, Hu X, Scheffer GL, van der Wal AC, Toonstra J, de Jong PTVM, van Kuppevelt TH, Levelt CN, de Wolf A, Loves WJP, Scheper RJ, Peek R, Bergen AAB: "Disruption of *Abcc6* in the mouse: novel insight in the pathogenesis of pseudoxanthoma elasticum", Human Molecular Genetics, Vol.14, No.13, pp.1763-1773, (2005)
- 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", Clinical Chemistry 52, No.2, pp.227-234, (2006)
- Hendig D**, Schulz V, Eichgrün J, Szliska C, Götting C, Kleesiek K: "New *Abcc6* gene mutations in German pseudoxanthoma elasticum patients", Journal of Molecular Medicine 83, pp.140-147, (2005)
- Heng BC**, Cao T, Stanton LW, Robson P, Olsen B: "Review: Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage *in vitro*", Journal of Bone and Mineral Research, Vol.19, No.9, pp.1379-1394, (2004)
- Hofbauer LC**, Schrader J, Niebergall U, Viereck V, Burchert A, Hörsch D, Preisser KT, Schoppet M: "Interleukin-4 differentially regulates osteoprotegerin expression and induces calcification in vascular smooth muscle cells", Journal of Thrombosis and Haemostasis 95, pp.708-714, (2006)

- Hu X**, Plomp A, Wijnholds J, ten Brink J, van Soest S, van den Born LI, Leys A, Peek R, de Jong PTVM, Bergen AAB: "Abcc6/MRP6 mutations: further insights into the molecular pathology of pseudoxanthoma elasticum", *European Journal of Human Genetics* 11, pp.215-224, (2003)
- Inada M**, Yasui T, Nomura S, Miyake S, Deguchi K, Himeno M, Sato M, Yamagiwa H, Kimura T, Yasui N, Ochi T, Endo N, Kitamura Y, Kishimoto T, Komori T: "Maturational disturbance of chondrocytes in *Cbfa1*-deficient mice", *Developmental Dynamics* 214, pp.279-290, (1999)
- Ivandic BT**, Qiao J, Machleder D, Liao F, Drake TA, Lusic AJ: "A locus in chromosome 7 determines myocardial cell necrosis and calcification (dystrophic cardiac calcinosis) in mice", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Vol.93, pp.5483-5488, (1996)
- Jiang Q**, Endo M, Dibra F, Wang K, Uitto J: "Pseudoxanthoma elasticum is a metabolic disease", *Journal of Investigative Dermatology*, Vol.129, pp.348-354, (2009)
- Jiang Q**, Li Q, Uitto J: "Aberrant mineralization of connective tissue in a mouse model of Pseudoxanthoma Elasticum: Systemic and local regulatory factors", *Journal of Investigative Dermatology*, Vol.127, pp.1392-1402, (2007)
- Jono S**, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM: "Phosphate Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Calcification", *Circulation Research* 87, e10-e17, (2000)
- Klement JF**, Matsuzaki Y, Jiang Q, Terlizzi J, Choi HY, Fujimoto N, Li K, Pulkkinen L, Birk DE, Sundberg JP, Uitto J: "Targeted Ablation of the *Abcc6* Gene Results in Ectopic Mineralisation of Connective Tissues", *Molecular and Cellular Biology*, Vol 25, No.18, pp.8299-8310, (2005)
- Korff S**, Riechert N, Schoensiegel F, Weichenhan D, Autschbach F, Katus HA, Ivandic BT: "Calcification of myocardial necrosis is common in mice", *Virchows Archiv* 448, pp.630-638, (2006)
- LaRusso J**, Li Q, Jiang Q, Uitto J: "Elevated dietary magnesium prevents connective tissue mineralization in a mouse model of pseudoxanthoma elasticum"; *Journal of Investigative Dermatology*, pp.1388-1394,(2009)
- Le Saux O**, Bunda S, Van Wart CM, Douet V, Got L, Martin L, Hinek A: "Serum factors from Pseudoxanthoma elasticum patients alter elastic fiber formation *in vitro*", *Journal of Investigative Dermatology* 126, pp.1497-1505, (2006)
- Li Q**, Grange DK, Armstrong NL, Whelan AJ, Hurley MY, Rishavy MA, Hallgren KW, Berkner KL, Schurgers LJ, Jiang Q, Uitto J: "Mutations in the *GGCX* and *Abcc6* genes in a family with Pseudoxanthoma Elasticum", *Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 129,pp.553-563(2008)
- Li Q**, Jiang Q, Uitto J: "Pseudoxanthoma elasticum: Oxidative stress and antioxidant diet in a mouse model (*Abcc6*^{-/-})", *Journal of Investigative Dermatology*, Vol.128, pp.1160-1164, (2008a)
- Li X**, Yang H, Giachelli CM: "Role of the Sodium Phosphate Cotransporter Pit-1, in Vascular Smooth Muscle Cell Calcification", *Circulation Research* 98, pp.905-912, (2006)

Livak KJ, Schmittgen TD: "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method", *METHODS* 25, pp.402–408, (2001)

Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G: "Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein", *Nature* 386, pp.78-81, (1997)

Lüllmann-Rauch R: "Histologie Verstehen – Lernen – Nachschlagen", Kapitel 8.4 Knochen, S. 122-140, Thieme Verlag Stuttgart, (2003)

Matsuzaki Y, Nakano A, Jiang Q, Pulkkinen L, Uitto J: "Tissue-Specific Expression of the *Abcc6* Gene", *Journal of Investigative Dermatology* 125, pp.900-905, (2005)

Meng H, Vera I, Che N, Wang X, Wang SS, Ingram-Drake L, Schadt EE, Drake TA, Lusic AJ: "Identification of *Abcc6* as the major gene for dystrophic cardiac calcification in mice through integrative genomics", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Vol.14, No.11, pp.4530-4535, (2007)

Merx MW, Schäfer C, Westenfeld R, Brandenburg V, Hidajat S, Weber C, Ketteler M, Jahnke-Dechent W: "Myocardial stiffness, cardiac remodelling, and diastolic dysfunction in calcification-prone *Fetuin-A*-deficient mice", *Journal of the American Society of Nephrology* 16, pp.3357-3364, (2005)

Mie M, Ohgushi H, Yanagida Y, Haruyama T, Kobatake E, Aizawa M: "Osteogenesis coordinated in C3H10T1/2 cells by adipogenesis- dependent BMP-2 expression system", *Tissue Engineering*, Vol.6, No.1, pp.9-18, (2000)

Murshed M, Schinke T, McKee MD, Karsenty G: "Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins", *The Journal of Cell Biology*, Vol.165, No.5, pp.625-630, (2004)

Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ: "Review Article: Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Cross talk with the osteoblastic program", *Cellular and Molecular Life Science*, Vol.66, No.2, pp.236-253, (2008)

Pressemitteilung Nr. 385, Statistisches Bundesamt, 2007

Proudfoot D, Skepper JN, Shanahan CM, Weissberg PL: "Calcification of Human Vasculature Cells *In Vitro* Is Correlated With High Levels of Matrix Gla Protein and Low Levels of *Osteopontin* Expression", *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 18, pp.379-388, (1998)

Qiao J-H, Xie P-Z, Fishbein MC, Kreuzer J, Drake TA, Demer LL, Lusic AJ: "Pathology of Atheromatous Lesions in Inbred and Genetically Engineered Mice Genetic Determination of Arterial Calcification", *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 14: pp.1480-1497, (1994)

Schinke T, McKee MD, Karsenty G: "Extracellular matrix calcification: where is the action?", *Nature genetics*, Vol.21, pp.150-151, (1999)

Schroeder TM, Jensen ED, Westendorf JJ: “*Runx2*: A master of gene transcription in developing and maturing osteoblasts“, Birth Defects Research 75, pp.213-225, (2005)

Seifert G: “Heterotope (extraossäre) Verkalkung (Kalzinose)-Ätiologie, Pathogenese und klinische Bedeutung“, Pathologie 18, pp.430-438, Springer-Verlag, (1997)

Shanahan CM, Cary NRB, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME: “Medial localisation of mineralization-regulating proteins in association with Mönckeberg’s Sclerosis: Evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification“, Circulation 100, pp.2168-2176, (1999)

Shen Q, Christakos S: ”The Vitamin D Receptor, Runx2, and the Notch Signaling Pathway Cooperate in the Transcriptional Regulation of Osteopontin“, The Journal of Biological Chemistry, Vol.280, No.49, pp.40589-40598, (2005)

Shirakabe K, Terasawa K, Miyama K, Shibuya H, Nishida E: ”Regulation of the activity of the transcription factor *Runx2* by two homeobox proteins, *Msx2* and *Dlx5*“, Genes to Cells 6, pp.851-856, (2001)

Son B-K, Akishita M, Iijima K, Eto M, Ouchi Y: “Review: Mechanism of Pi-induced Vascular Calcification – Regulation of Growth Arrest-Specific Gene 6 (Gas6)-Mediated Survival Pathway“, Journal of Atherosclerosis and Thrombosis Vol.15, No.2, pp.63-68, (2008)

Speer MY, Chien Y-C, Quan M, Yang H-Y, Vali H, McKee MD, Giachelli CM: “Smooth muscle cell deficient in *osteopontin* have enhanced susceptibility to calcification *in vitro*“, Cardiovascular Research 66, pp. 324-333, (2005)

Steitz SA, Speer MY, Curinge G, Yang H, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM: “Smooth Muscle Cell Phenotypic Transition Associated With Calcification: Upregulation of *Cbfa1* and Downregulation of Smooth Muscle Cell Lineage Markers“, Circulation Research. 89, pp.1147-1154, (2001)

Uitto J, Li Q, Jiang Q: “Pseudoxanthoma elasticum: Molecular Genetics and Putative Pathomechanism“, Journal of Investigative Dermatology 130, pp.661-670, (2010)

Wada T, McKee MD, Steitz S, Giachelli CM: “Calcification of Vascular Smooth Muscle Cell Cultures: Inhibition by *Osteopontin*“, Circulation Research. 84, pp.166-178, (1999)

Zhao L, Li G, Chan K-M, Wang Y, Tang P-F: “Comparison of multipotent differentiation potentials of murine primary bone marrow stromal cells and mesenchymal stem cell line C3H10T1/2“, Calcified Tissue International 84 , pp.56-64,(2009)

7. Anhang

7.1 Sequenz des Gens *Abcc6*

Die Sequenz der cDNA des Gens *Abcc6* wurde vom Ensembl Genome Browser heruntergeladen. Rot markiert sind die Positionen der Punktmutationen in der cDNA-Sequenz und am rechten Rand der dazugehörige Aminosäureaustausch sowie die Position der Mutation im resultierenden MRP6 angegeben. Rot unterstrichen sind die zur Sequenzierung verwendeten Primer. Start- und Stopcodon sind hellblau unterlegt.

```

TGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTCGC
CACCATGAACAGCGGCAGAAGCATGGCCACCCCTGGCGAGCAGTGTGCCGGCCTGAGAGT AGG
GTGGAACCAGACCGAGCAGGAACCTGCCGCCTACCACCTGCTGTCCCTGTGCTTCGTGAGS23R

AGCTGCATCTTCCTGGGTGCCCCCTATGTACCTGTGGGTGCTGGGCCCTATCTATCTGCT
CTACATCCACCGGCATGGACGGTGTACCTGCGGATGAGCCACCTGTTCAAGACCAAGAT
GGTGCTCGGGCTGGCTCTGATCCTGCTGTATAACCTTCAACGTGGCCGTGCCCTGTGGCG
GATCCACCAGGGCGTGCCTCAGGCCCCCGAGCTGCTGATCCACCCACCGTGTGGCTGAC
CACCATGAGCTTCGCCACCTTCTGATCCACATGGAACGGCGGAAGGGCGTGC GGAGCAG Primer2_F
CGGCGTGCTGTTCCGGCTACTGGCTGCTGTGCTGCATCCTGCCCGGCATCAACACCGTGCA
GCAAGCCAGCGCCGGCAACCTGCGGAGGAACCCCTGCACCACCTGGCCACCTACCTGTG TTC
CCTGAGCCTGGTGGTGGCCGAGCTGGTGCTGTCCTGGCTGGTGGACCAGCCCCCTTCTT L186F
CAGCGAGGACAGCCAGCCCCCTGAACCCCTGCCCTGAGGCCGAGGCCAGCTTCCCCAGCAA Primer2_R
GGCCATGTTTTGGTGGGCCAGCGCCTGCTGTGGCGGGGCTACAAGAAGCTGCTCGGCC
TAAGGACCTGTGGAGCCTGGGCCGGGAGAACAGCAGCGAGGAACTGGTGTCCAGCTGGA
ACGGGAGTGGCGGCGAGCTGCAACGGCCTGCCCGGCCATAAAGGCCACAGCTCCGTGGG
AGCCCCCGAGACCGAGGCCTTCTCCAGCCTGAGCGGAGCCAGAGAGGCCCCCTGCTGCG
GGCCATCTGGCGGGTGTTCAGAAGCACCTTCTGCTGGGCACCCTGTCCCTGGTGTATCAG
CGACGCCTTCCGGTTCGCCGTGCCAAGCTGCTGTCTCTGTTCCCTGGAGTTCATGGGCGA
CAGAAACAGCAGCGCCTGGACCGGCTGGCTGCTGGCCGTGCTGATGTTCCGCCCTGCCTG
CCTGCAGACCCTGTTTCGAGCAGCAGCACATGTACCGGGCCAAGGTGCTGCAGATGCGGCT Primer2-3_F
GCGGACCGCCATCACCGGCCTGGTGTACCGGAAGGTGCTGGTCCCTGTCTAGCGGCAGCCG
GAAGTCTCTGCCGCCGGAGATGTGGTGAACCTGGTGTCCGTGGACATCCAGCGGCTGGC
CGAGAGCATCATCTACCTGAACGGCCTGTGCTGCTGTTCCTGTGGATCTTCGTGTGCTT Primer2-3_R
TGTGTATCTGTGGCAGCTCCTCGGACCCAGCGCCCTGACCGCCGTCCCGTGTTCCTGAG
CCTGCTGCCCCTGAACCTTCTTCATCACCAAGAAACGGGGCTTCCATCAAGAGGAGCAGAT
GAGGCAGAAGGCTTCCCGGGCTCGGCTGACCAGCAGCATGCTGAGGACCGTGC GGACCAT
CAAGAGCCACGGCTGGGAGCACGCCTTCTGGAACGGCTGCTGCACATCCGGGGCCAGGA
ACTGAGCGCCCTGAAAACCAGCACCTGCTGTTTCAGCGTGTCTCTGGTCTCCTTTCAAGT
GTCCACCTTCTGGTGGCCCTGGTGGTGTTCGCCGTGCACACCCTGGTGGCCGAAGATAA
CGCTATGGACGCCGAGAAGGCCTTCGTGACCCTGACCGTGTGTCATCCTGAACAAGGC
CCAGGCCTTCTGCCCTTCAGCGTGCATCGTGCAGGCCAGAGTGAGCTTCGACAG
GCTGGCCGCTTCTGTGTCTGGAAGAGGTGGACCCCAACGGCATGATCGCCAGCAACAG
CCGGCGGAGCAGCAAGGACCGGATCTCCGTGCACAACGGCACCTTCGCCTGGTCCCAGGA
AAGCCCCCTGCCTGACCGGCATTAATCTGACCCTGCCCCAGGGATGCCTGCTCGCTGT Primer3_F
GGTGGCCCTGTGGGAGCCGGCAAGAGCAGCCTGCTGTCCGCCCTGCTGGGCGAACTGCT

```

GAAGGTGGAGGGCAGCGTGAGCATCGAGGGCTCCGTGGCCTACGTGCCACAGGAAGCCTG
 GGTCAGAACACCAGCGTG **GCC** GAGAACGTGTGCTTCCGGCAGGAACTGGACCTGCCCTG **GTC**
 GCTGCAGAAAGTGTGGACGCCCTGCGCCCTGGGCAGCGACGTGGCCTCCTTCCCTGCCGG **A726V**
 CGTGCACACACCCATCGGCGAGCAGGGCATGAACCTGAGCGGCGGACA **GAAGCAGAGACT** Primer3_R
GAGCCTGGCCAGGGCCGTGTACAAGAAGGCTGCAATCTATCTCCTGGACGACCCCTGGC
 CGCCCTGGATGCCACGTGAGCCAGCAGGTGTTCAAGCAGGTGATCGGCCCTCCGGCCT
 GCTGCAGGGCACCACAAGGATCCTGGTCAACCACACCCCTGCACGTGCTGCCCCAGGCCGA
 CAGAATCCTGGTGTGGCCAATGGCACCATCGCCGAGATGGGCAGCTACCAGGACCTGCT
 GCAGCGGAACGGCGCCCTGGTCCGCTGCTGGACGGCGCCAGACAGCCTGCCGGCACCCA
 CGACGCCGCCACCTCCGACGACCTGGGCGGCTTCCCTGGCGGAGGACGCCCCACCTGCAG
 GCCCGACC **GGCCAGACCTACCGAAG**CCGCCCTGTGAAGGGCCGACACCTCCGAGGT Primer4_F
 CCAGATGGAAGCCAGCCTGGACGATCCCGAGGCTACCGGGCTCACAGCCGAAGAGGACAG
 CGTGAGATACGGCCGGGTGAAG **GATC**ACAATCTACCTGAGCTACCTGCGCGCCGTGGGCAC **ACC**
 CCTCTGTGCACCTACACCTGTTTCTGTTTCTGTGTGTCAGCAGGTGGCCAGCTTCAGCCA **I947T**
 GGGC **TATTGGCTCTCTCTGTGGGC**CGACGACCCCGTGGTGGACGGCCGGCAGATGCACGC Primer4_R
 CGCCCTGCGGGCTGGGTGTTCCGGCTCCTGGGCTGCCTGCAGGCCATCGGCCTGTTTCG
 CAGCATGGCCGCCGTGTTTCTGGGCGGAGCCAGGGCCTCCGACTGCTGTTCCGGTCCCT
 GCTGTGGGACGTGGCCAGAAGCCCTATCGGCTTCTTCGAGCGGACCCCGTGGGCAACCT
 GCTCAACAGGTTCTCAAAGAAACCGACACCCGTGGACGTGGATATCCCCGACAAGCTGCG

 GAGCCTGCTGACCTACGCCTTCGGGCTGCTGGAAGTGGGCCTGGCCGTGACAATGGCCAC
 ACCCCTGGCCATCGTGGCCATCCTGCCCTGATGGTGTGTACGCCGGCTTCCAGAGCCT
 GTACGTGGCCACCTCCTGCCAGCTGCGGCGCTGGAAAGCGCCCGGTACAGCAGCGTGTG
 CAGCCACATGGCCGAGACCTTCCAGGGCTCTCTGGTGGTGCGGGCCTTCCAGGGCCAGGC
 ATCTTTCACCGCCAGCACGACGCCCTGATGGACGAGAACCAGCGGGTGTCTTCCCAA
 ACTGGTGGCTGACAGATGGCTGGCCACAAACCTCGAACTGCTGGGCAACGGGCTGGTGT
 CGTCGCCGC **TACCTGTGCCGTGCTGTCTA**AGGCCACCTGTCCGCCGACTGGTCCGGCTT Primer4-5_F
 CTCTGTCTCTGCCGCCCTGCAGGTGACCCAGACACTGCAGTGGGTGGTGCAGGACTGGAC
C**GACCTGGAAAACAGCATGGT**GGCCGTGGAGCGGGTGCAGGACTACGCCCGATCCCCAA Primer4-5_R
 AGAGGCCCTTGGCGGCTGCCTACATGTGCCGCCAGCCTCTGTGGCCATGCGGAGGCCA
 GATCGAGTTCGGGACTTCGGCCTGCGGCACAGGCCCGAGCTGCCCTGGCCGTGCAGGG
 CGTGAGCCTGAAGATCCACGCCGGCGAGAAAGTGGGCATCGTGGGCCGGACAGGCGCCGG
 AAAGTCCAGCCTGGCCTGGGCGCTGCTGAGACTGCAGGAAGCCGCCGAGGGCAACATCTG
 GATCGACGGCGTGCCATCACCCACGTGGCCCTGCACACACTGCGGAGCCGGATCACCAT
 CATCCCCAGGACCCCGTGTGTTCCCCGGCAGCCTGAGGATGAATCTGGATCTGCTGCA
 GGAAC **ACACCGACGAGGGCATT**TGGGCTGCCCTGGAAACCGTGCAGCTGAAGGCTTTTGT Primer5_F
 GACAAGCCTGCCTGGCCAGCTGCAGTACGAGTGCGCCGGACAGGGCGACGACCTGAGCGT **CAG**
 GGGC **CAC**AAACAGCTGCTGTGTCTGGCCAGAGCCCTGCTGAGAAAGACCCAGATCCTGAT **Q1401H**
 CCTGGATGAGGCCACCGCCAGCGTGGACCCGGCACCGAGATGCAGATGCAGGCAGCTCT **GTC**
 CGAACGGTGGTTACCCAGTGTACA **CTC**CTCTGATCGCCACCGGCTGCGGAGCGTGAT **V1448L**
 GGACTGCGCCAGAGTGCTCGTGATGGATGAGGGCCAGGTGGCCGAGTCCGGC **AAC**CCCGC **AGC**
 CCAGCTCCTGGCCAGAAGGGCCTGTTCTACCGGCTGGCCACGAGAGCGGCCTGGCC **TGS1476N**
ATGAGATCTTATTA **AAGCAGAACTTGTTTATTGCAG**CTTATAATGGTTA Primer5_R

7.2 Oligonukleotidprimer

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden folgende Oligonukleotidprimer verwendet.

Name des Primers	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')
Abcc6-S23R	GCCACCATGAACAGGGGCAGAAGCATGGC	GCCATGCTTCTGCCCTGTTCATGGTGGC
Abcc6-L186F	CAGCGCCGGCAACTTCCGGCAGGAACCCC	GGGGTTCCTGCCGGAAGTTGCCGGCGCTG
Abcc6-A726V	GAACACCAGCGTGGTCGAGAACGTGTGCT	AGCACACGTTCTCGACCACGCTGGTGTTC
Abcc6-I927T	ACGGCCGGGTGAAGACCACAATCTACCTGAG	CTCAGGTAGATTGTGGTATTACCCGGCCGT
Abcc6-Q1401H	CTGAGCGTGGGCCAGAAACAGCTGCTGTG	CACAGCTGTTTCTGGCCACGCTCAG
Abcc6-V1448L	TGGTTCACCCAGTGTACAGTCTCTGATCG	CGATCAGGAGGACTGTACACTGGGTGAACCA
Abcc6-S1476N	TGGCCGAGTCCGGCAGCCCCGCC	GGGCGGGGCTGCCGACTCGGCCA

Tabelle 7.1: Primer zum Einfügen von Punktmutationen in das Gen Abcc6

Name des Primers	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')
pSG5Abcc6-1	GGTCATCATCTGCCTTTCT	GCAGCACAGCAGCCAGTAG
pSG5Abcc6-2	GCCACCTTTCTGATCCACAT	GTCCACCAGGCAGGACCAG
pSG5Abcc6-3	CTGCAGGCATTAATCTGAC	CCAGGCTCAGTCTCTGCTTC
pSG5Abcc6-4	GGCCCAGACCTACCGAAG	GCCCACAGAGAGAGCCAATA
pSG5Abcc6-5	ACACCGACGAGGGCATT	GCTGCAATAAACAAGTTCTGCTTT
pSG5Abcc6-2-3	CTGTTCGAGCAGCAGCACAT	CACAGGCCGTTCCAGGTAGAT
pSG5Abcc6-4-5	TACCTGTGCCGTGCTGTCTA	ACCATGCTGTTTCCAGGTC

Tabelle 7.2: Primer für die Sequenzierung von Teilabschnitten von Abcc6

Name des Primers	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')
Opn	TCTGATGAGACCGTCACTGC	AGGTCCTCATCTGTGGCATC
Bglap2	AAGCAGGAGGGCAATAAGGT	TTTGTAGGCGGTCTTCAAGC

Tabelle 7.3: Primer für Knochenmarker

Name des Primers	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')
β-Aktin	TGTTACCAACTGGGACGACA	CCATCACAAATGCCTGTGGTA
18 S (500 bp)	TCAAGAACGAAAGTCGGAGG	GGACATCTAAGGCATCACA
18 S (200 bp)	GTGGTGTGAGGAAAGCAGACA	TGATCACACGTCCACCTCATC
GAPDH	GACCACAGTCCATGCCATCAC	CCGTTCACTCTGGGATGAC

Tabelle 7.4: Primer für Interne Standards

Name des Primers	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')
Nfkb1	GCCTGCAAAGGTTATCGTTC	AGCCCTAATACACGCCTCT
Vdr	AAGGCTGCAAGGGTTTCTTC	CTTCAAGGCCTCTCCCTCT
Twist1	AGCGCGGCAAGAAATCTG	GCCAGTTTGAGGGTCTGAAT
Sox9	AGGAAGCTGGCAGACCAGTA	CGTTCTTCACCGACTTCCTC
Msx1	CTCTCGGCCATTCTCAGTC	TACTGCTTCTGGCGGAACTT
Msx2	CTCTCGTCAAGCCCTTCG	CTTCCGGTTGGTCTTGTGTT
SMAD1	GCTTACCTGCCTCCTGAAGA	GGACGGATCTGTGAAACCAT
SMAD2	AGGGGAGTGCCTGTGATTA	GCACATTCGGGTAGCTGAT
SMAD3	CCTCCTGGCTACCTGAGTGA	GGGGTCAGTGAAGCCATCTA
SMAD4	GGAGGTGGCCTGATCTACAC	GACGGCTGCCTCAAAGTC
Runx2	AAGTGCGGTGCAAACCTTCT	ACGCCATAGTCCCTCCTTT

Tabelle 7.5: Primer für Transkriptionsfaktoren der Osteogenese

Name des Primers	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (5'-3')
Abcc6-mus	GCCTCTGGACTGCTATGGAG	CGCCAGATAGCCCTGAGTAG
Abcc6-pSG5	AAGCCTGGGTCCAGAACAC	CCAGGCTCAGTCTCTGCTTC

Tabelle 7.6: Primer für das native Abcc6 und das Abcc6 auf pSG5

8. Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. rer. nat. Jeanette Erdmann und Herrn Prof. Dr. med. Heribert Schunkert für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit, die finanzielle Unterstützung und die Möglichkeit die Experimente im Molekulargenetischen Labor der Medizinischen Klinik II der Universität zu Lübeck, dem späteren Institut für Integrative und Experimentelle Genomik, durchführen zu können.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Janine Stegmann, die mich in die Methoden der Zellkultur eingearbeitet hat. Sandra Wrobel danke ich ganz besonders für die gute Zusammenarbeit in der Zellkultur und die ausdauernden Optimierungen der Versuchsbedingungen.

Frau Dipl.-Biol. Anja Medack danke ich für die vielen wertvollen Ratschläge und aufmunternden Worte.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. rer. nat. Reinhard Depping aus dem Institut für Physiologie für die Durchführung einer *In Vitro* Transkription/Translation.

Für die Erstellung des MRP6-Homologiemodells danke ich ganz herzlich Frau Stephanie Tennstedt.

Ein ganz herzlicher und besonderer Dank gilt Herrn Dr. hum. biol. Zouhair Aherrahrou für die vielen wertvollen Anregungen, die intensiven Diskussionen und die hervorragende Betreuung während dieser Arbeit und dafür, dass er sich immer die Zeit genommen hat, alle meine Fragen zu beantworten.

Außerdem möchte ich mich auch recht herzlich bei Stefanie Belz und Annett Thiemig für die Hilfe bei der Durchführung einiger Methoden bedanken. Bei Arnika Wagner (M.Sc.), Frau Dr. rer. nat. Nadine Clausen, Frau Dr. rer. nat. Jennifer Freyer, Frau Dipl.-Biol. Petra Bruse und Herrn Dr. med. Piotr M. Kaczmarek bedanke ich mich für ihre vielfältige Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Vielen lieben Dank auch an meine Familie. Ganz besonders danke ich meinen lieben Eltern, die mir das Studium ermöglichten und mich in jeder Hinsicht unterstützt haben.

9. Lebenslauf

10. Veröffentlichungen

10.1 Publikationen

- **A.-K. Sowa**, F.J. Kaiser, J. Eckhold, T. Kessler, S. Wrobel, L. Doehring, H. Schunkert, J. Erdmann, Z. Aherrahrou: “ Functional interaction of osteogenic transcription factors Runx2 and Vdr in transcriptional regulation of *Opn* during soft tissue calcification”, zur Veröffentlichung angenommen in The American Journal of Pathology am 12.03.2013

10.2 Abstract-Publikationen

- **A.-K. Sowa**, J. Erdmann, L. Doehring, S. Wrobel, H.Schunkert, Z. Aherrahrou: “Overexpression of an *Abcc6*-encoding protein variant from *C3H/He* enhances calcification in mesenchymal stem cell”, **European Heart Journal (2010) 31 (Abstract Supplement)**, 83
- **A.-K. Sowa**, J. Erdmann, H. Schunkert, Z. Aherrahrou: “Strong up-regulation of *Runx2* in DCC-susceptible *C3H/He* mice after freeze-thaw-injury“, **European Heart Journal (2010) 31 (Abstract Supplement)**, 7
- **A.-K. Sowa**, J. Erdmann, H. Schunkert, Z. Aherrahrou: “P647-Up-regulation of *Runx2* and its downstream gene *Opn* in mice predisposed to calcification after injury”, **Clin Res Cardiol 100, Suppl 1, April 2011**
- **A.-K. Sowa**, F.J. Kaiser, J. Eckhold, L. Doehring, H. Schunkert, J. Erdmann, Z. Aherrahrou: “ Functional interactions of the osteogenic -related transcription factors Runx2, Vdr and Nfkb to regulate the transcription of osteopontin (*Opn*) during cardiac calcification in mice”, **Circulation 2011; 124: A15280**
- **A.-K. Sowa**, F.J. Kaiser, J. Eckhold, S. Wrobel, L. Doehring, H. Schunkert, J. Erdmann, Z. Aherrahrou: “Functional interaction of osteogenic transcription factors Runx2 and Vdr in transcriptional regulation of osteopontin (*Opn*) expression during soft tissue calcification in MRP6 deficient mice”, **Clin Res Cardiol 100, Suppl 1, April 2012**

10.3 Vorträge

- **A.-K. Sowa**, J. Erdmann, H. Schunkert, Z. Aherrahrou: “Strong up-regulation of *Runx2* in DCC-susceptible *C3H/He* miceafter freeze-thaw-injury“, **European Society of Cardiology (ESC) Kongress, Stockholm (Schweden), August 2010**

- **A.-K. Sowa**, F.J. Kaiser, J. Eckhold, S. Wrobel, L. Doehring, H. Schunkert, J. Erdmann, Z. Aherrahrou: “Functional interaction of osteogenic transcription factors Runx2 and Vdr in transcriptional regulation of osteopontin (*Opn*) expression during soft tissue calcification in MRP6 deficient mice”, **78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie Mannheim, April 2012** (gehalten von Dr. Z. Aherrahrou)

10.4 Poster

- **A.-K. Sowa**, Z. Aherrahrou, S. Wrobel, J. Erdmann: “Der Einfluss des Gens *Abcc6* auf die Regulation von Verkalkungsprozessen“, **Lübecker Doktorandentag, Juni 2009**
- **A.-K. Sowa**, J. Erdmann, L. Doehring, S. Wrobel, H. Schunkert, Z. Aherrahrou: “Overexpression of an *Abcc6*-encoding protein variant from *C3H/He* enhances calcification in mesenchymal stem cell”, **Nationales Genomforschungsnetzwerk (NGFN) Meeting, Berlin, November 2009**
- **A.-K. Sowa**, J. Erdmann, L. Doehring, S. Wrobel, H. Schunkert, Z. Aherrahrou: “Overexpression of an *Abcc6*-encoding protein variant from *C3H/He* enhances calcification in mesenchymal stem cell”, **European Society of Cardiology (ESC) Kongress, Stockholm (Schweden), August 2010**
- **A.-K. Sowa**, J. Erdmann, L. Doehring, S. Wrobel, H. Schunkert, Z. Aherrahrou: “Overexpression of an *Abcc6*-encoding protein variant from *C3H/He* enhances calcification in mesenchymal stem cell”, **European Atherosclerosis Society (EAS) Kongress, Hamburg, Juni 2010**
- **A.-K. Sowa**, J. Erdmann, H. Schunkert, Z. Aherrahrou: “Strong up-regulation of *Runx2* in DCC-susceptible *C3H/He* mice after freeze-thaw-injury“, **European Atherosclerosis Society (EAS) Kongress, Hamburg, Juni 2010**
- **A.-K. Sowa**, J. Erdmann, H. Schunkert, Z. Aherrahrou: “Strong up-regulation of *Runx2* in DCC-susceptible *C3H/He* mice after freeze-thaw-injury“, **Nationales Genomforschungsnetzwerk (NGFN) Meeting, Berlin, November 2010**
- Z. Aherrahrou, S. Tennstedt, **A.-K. Sowa**, F. Kaiser, A. Dendorfer, J. Erdmann, H. Schunkert: “Homology model of ABCC6 provides insight into the function of mutations causing cardiovascular phenotype”, **Nationales Genomforschungsnetzwerk (NGFN) Meeting, Berlin, November 2010**

ERROR: undefinedfilename

OFFENDING COMMAND: C:\Users\ANN-KA~1\AppData\Local\Temp\PDFCreator\Spool\4A6D82BAC0154C

STACK: