

Aus der Orthopädischen Klinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. R. Krauspe

Einfluss von Parathormon auf die FGF-23-
Expression osteoblastär stimulierter humaner
Knochenmarkzellen *in vitro*

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Daniela Hofen

2010

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung
der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Marcus Jäger
Korreferent: Priv. Doz. Dr Wild

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorliegende Doktorarbeit ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, das benutzte Schrifttum vollständig erwähnt habe und dass die Doktorarbeit an keiner anderen Fakultät vorgelegt wurde.

Düsseldorf, den 20.08.2010

Meinen Eltern

Im Gedenken an meine Großeltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|--------|
| <u>Abkürzungsverzeichnis</u> | - 1 - |
| | |
| <u>1. Einleitung</u> | - 5 - |
| 1.1. Mesenchymale Stammzelle | - 5 - |
| 1.2. Knochen | - 6 - |
| 1.2.1. Osteoblastendifferenzierung | - 7 - |
| 1.2.2. Osteoklastendifferenzierung | - 9 - |
| 1.3. Fibroblast-Growth-Factor-23 | - 11 - |
| 1.4. Renale Osteopathie | - 15 - |
| 1.5. Zielsetzung der Arbeit | - 26 - |
| | |
| <u>2. Methoden</u> | - 27 - |
| 2.1. Versuchsaufbau | - 27 - |
| 2.2. Teriparatid (Forsteo ^R) | - 27 - |
| 2.3. Zellgewinnung | - 29 - |
| 2.4. OSTEO-Differenzierung / -Medium | - 30 - |
| 2.5. Versuchsansatz | - 32 - |
| 2.6. Versuchsende | - 33 - |
| 2.7. Immunzytochemie | - 34 - |
| 2.7.1. Osteocalcin | - 35 - |
| 2.7.2. RANKL / RANK | - 35 - |
| 2.7.3. CD34 / CD105 | - 36 - |
| 2.8. Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) | - 36 - |
| 2.8.1. FGF-23 | - 37 - |
| 2.8.2. TRAP5b | - 37 - |
| 2.8.3. Ostase | - 38 - |
| 2.9 RNA-Isolation mittels Qiuagen RNA-Isolations-Kit | - 39 - |

| | |
|--|--------|
| 2.10. RT-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | - 39 - |
| 2.10.1. Runx-2 | - 43 - |
| 2.11. Calcium- und Phosphat-Messung | - 43 - |
| | |
| <u>3. Ergebnisse</u> | - 47 - |
| 3.1. Immunzytochemie | - 47 - |
| 3.2. ELISA | - 54 - |
| 3.2.1. TRAP-5b | - 54 - |
| 3.2.2. Ostase | - 55 - |
| 3.2.3. FGF-23 | - 57 - |
| 3.3. RNA-Isolation und Amplifikation mittels PCR | - 60 - |
| 3.4. Calcium- und Phosphat-Messung | - 62 - |
| 3.4.1. Calciummessung | - 62 - |
| 3.4.2. Phosphatmessung | - 64 - |
| 3.5. Osteoblastäre Differenzierung | - 66 - |
| | |
| <u>4. Diskussion</u> | - 67 - |
| | |
| <u>5. Zusammenfassung</u> | - 75 - |
| | |
| <u>6. Tabellenanhang</u> | - 77 - |
| 6.1. Material | - 77 - |
| 6.2. Abbildungen | - 79 - |
| | |
| <u>7. Literaturverzeichnis</u> | - 84 - |
| | |
| <u>8. Lebenslauf</u> | - 97 - |
| | |
| <u>9. Danksagung</u> | - 98 - |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| ABC | Avidin-Biotin-Complex |
| AC | Adenylatcyclase |
| ACDA | Anticoagulant Citrate Dextrose Solution Formula A |
| AG | Antigen |
| AK | Antikörper |
| aNV | akutes Nierenversagen |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| Aqua dest. | Destilliertes Wasser |
| AS | Aminosäuren |
| ASC | adult stem cells |
| BAP | bone alkaline phosphatase |
| BGP | bone carboxyglutamic acid-containig-protein |
| BGW | Bindegewebe |
| BMP | Bone morphogenic protein |
| BMP-2 | Bone morphogenic protein-2 |
| BMP-7 | Bone morphogenic protein-7 |
| bp | Basenpaare |
| BSP | Bone sialoprotein |
| °C | Grad Celsius |
| Ca ²⁺ | Calcium |
| cAMP | cyclisches Adenosinmonophosphat |
| C-terminal | Carboxy-Ende der Aminosäure |
| CD | Cluster of differentiation |
| CD34 | Cluster of differentiation 34 |
| CD105 | Cluster of differentiation 105 |
| CD73/90/45/14 | Cluster of differentiation 73/90/45/14 |
| CD11b/19/79alpha | Cluster of differentiation 11b/19/79alpha |
| CFU-M | Colony Forming Unit Megakaryocyte |
| cNI | chronische Niereninsuffizienz |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CPC | Cresolphthalein-Complexon |
| d | Tage |
| D | Deutschland |
| DAB | Diaminobenzidin |

| | |
|-------------------------------|--|
| DAG | osteogener Stimulationscocktail aus Dexamethason, Ascorbinsäure-2-Phosphat und β -Glycerolphosphat |
| DMEM | Dulbeco's Modified Eagles Medium |
| DMP1 | Dentin matrix protein 1 |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| E | Extinktion |
| ECM | extrazelluläre Matrix |
| EDTA | Ethylendiaminetetraessigsäure |
| ELISA | Enzyme-linked-immunosorbent-assay |
| EPO | Erythropoetin |
| ESC | endothelial stem cells |
| FCS | Fetal Calf Serum (Rinderserum) |
| FGF | Fibroblast-Growth-Factor |
| FGF-7 | Fibroblast-Growth-Factor-7 |
| FGF-19 | Fibroblast-Growth-Factor-19 |
| FGF-21 | Fibroblast-Growth-Factor-21 |
| FGF-23 | Fibroblast-Growth-Factor-23 |
| FGFR | Fibroblast-Growth-Factor-Rezeptor |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GFR | Glomeruläre Filtrationsrate |
| h | Stunden |
| H ⁺ | Wasserstoff |
| H ₂ O | Wasser |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HLA-DR | human leucocyte antigens (DR = Klasse II, genetische Information auf Chromosom 6) |
| HPT | Hyperparathyreoidismus |
| hptsf. | hauptsächlich |
| HRP | Meerrettichperoxidase |
| HSC | hematopoetic stem cells |
| HSPG | Heparansulfat-Proteoglykane |
| HWZ | Halbwertszeit |
| i.E. | internationale Einheiten |
| IGF-1 | Insulin-Growth-Factor-1 |
| IgG | Immunglobulin-G |
| IP ₃ | Inositoltrisphosphat |
| ITZ | Internationales Transplantationszentrum |

| | |
|------------------|--|
| K ⁺ | Kalium |
| kbp | kilo Basenpaare |
| kDa | kilo Dalton |
| KM | Knochenmark |
| KOF | Körperoberfläche |
| LSM | Lymphozytenseparationsmedium |
| MAPK | MAP-Kinase (mitogen activated protein) |
| M-CSF | Macrophage colony stimulating factor |
| MEPE | matrix extracellular phosphoglycoprotein |
| Mg ²⁺ | Magnesium |
| min | Minuten |
| mRNA | messenger Ribonukleinsäure |
| MSC | mesenchymal stemm cells |
| MW | Mittelwerte |
| Na ⁺ | Natrium |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaOH | Natronlauge |
| NSD | Nebenschilddrüsen |
| N-terminal | Amino-Ende der Aminosäure |
| OC | Osteocalcin |
| PAS | Periodic acid Schiff stain |
| PBS | phosphate-buffered-saline (isotonischer Phosphatpuffer) |
| PBST | isotonischer Phosphatpuffer mit 0,1% Tween 20 |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PGE ₂ | Prostaglandin E ₂ |
| Phex | phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidase located on chromosome X |
| pHPT | primärer Hyperparathyreoidismus |
| pNPP | para-Nitrophenylphosphat |
| PNS | Peripheres Nervensystem |
| P/S/G | Penicillin/Streptomycin/Glutamin |
| PTH | Parathormon |
| RANK | rezeptor aktivator of NF-κB |
| RANKL | RANK-Ligand |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RLT | Puffer zur RNA-Isolation, enthält Guanidinthiocyanat |

| | |
|----------------|--|
| rpm | rounds per minute |
| RT | Raumtemperatur |
| Runx-2 | Runt related transcription factor 2 |
| SAW | Standardabweichung |
| sec | Sekunden |
| sFRP4 | serum frizzle related protein 4 |
| sHPT | sekundärer Hyperparathyreoidismus |
| sog. | so genannten |
| Str. | Stratum |
| TGF | Tumor-Growth-Factor |
| TGF- β | Tumor-Growth-Factor- β |
| TGF- β 1 | Tumor-Growth-Factor- β 1 |
| TGF- β 3 | Tumor-Growth-Factor- β 3 |
| TMB | Tetramethylbenzidin |
| TNF | Tumor-Nekrose-Faktor |
| TRAP | Tartrat-resistente saure Phosphatase |
| TRAP5b | Tartrat-resistente saure Phosphatase 5b |
| u.a. | unter anderem |
| UKD | Universitätsklinikum Düsseldorf |
| UV | Ultraviolett |
| v.a. | vor allem |
| z.B. | zum Beispiel |
| VDP | Vitamin D-bindendes Protein |
| Wnt | Signalprotein (<i>Wg</i> für <i>Wingless</i> und <i>Int-1</i>) |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

1. Einleitung:

Die Renale Osteopathie stellt eine der wichtigsten Folgekrankheiten und Komplikationen der chronischen Niereninsuffizienz (cNI) dar. Sie umfasst Knochenerkrankungen, die als Auswirkung einer Störung des Calcium-, Phosphat- und Vitamin D₃-Stoffwechsels auftreten und deren erste charakteristische Veränderungen (gesteigerte Knochenresorption; Mineralisationsstörung) bereits in frühen Stadien der Niereninsuffizienz bei einer glomerulären Filtrationsrate (GFR) von 20-70 ml/min nachzuweisen sind ¹.

Auf pathophysiologischer Ebene sind vor allem die Veränderungen im Vitamin D₃-Haushalt und ein entstehender sekundärer Hyperparathyreoidismus (sHPT) von entscheidender Bedeutung, wobei ein Vitamin-D₃-Mangel für den Mineralisationsdefekt verantwortlich ist, während sich die erhöhten Parathormonwerte vorwiegend in einer Steigerung der Knochenresorption widerspiegeln ¹.

Trotz der Kenntnisse über die übergeordneten pathophysiologischen Abläufe der Krankheitsentstehung, einer bereits lang andauernden Forschung und guter Therapieansätze besteht die Renale Osteopathie als regelmäßig auftretende Komplikation bei Patienten mit cNI fort, was bei einer Inzidenz der cNI von 10/100.000/Jahr (Westeuropa) ² die medizinische, soziale und ökonomische Bedeutung offenbart.

1.1.Mesenchymale Stammzelle:

Der Begriff der Stammzelle impliziert, dass eine Zelle undifferenziert und unbegrenzt teilungsfähig ist, wobei jede mitotische Teilung zusätzlich zur Tochterzelle, mit der Fähigkeit zur Differenzierung, erneut eine Stammzelle (asymmetrische Teilung) hervorbringt³.

Stammzellen kommen im menschlichen Körper während der Embryonalzeit vor (embryonale Stammzellen) und sind zu diesem Zeitpunkt noch in der Lage einen vollständigen Organismus zu bilden, was diesen Zellen die Bezeichnung „totipotent“ einbrachte ⁴. Dem gegenüber stehen die so genannten „pluripotenten“ Stammzellen, welche keinen kompletten Organismus bilden können, aber dennoch die Potenz besitzen, in unterschiedliche Gewebe- und Zelltypen zu differenzieren ⁴.

Auch im adulten Organismus lassen sich in einigen Geweben Zellen mit hohem Regenerationspotential detektieren, so genannte adulte Stammzellen (ASC). Sie sind vor allem in Knochenmark, lymphatischen Organen, Fettgewebe, Zentralem Nervensystem (ZNS), Pankreas und dem Gastrointestinaltrakt zu finden ⁵. Von Bedeutung hierbei ist die Tatsache, dass es sich bei der Gruppe der ASC um eine Mischpopulation handelt, welche sich abhängig vom Gewebetyp und von der lokalen Mikroumgebung verschiedenartig differenzieren ⁶. So können sich zum Beispiel aus Stammzellen des Knochenmarks sowohl hämatopoetische (HSC) als auch endotheliale (ESC) oder mesenchymale Stammzellen (MSC) entwickeln ⁵.

Mesenchymale Stammzellen, die bereits frühzeitig im Jahre 1968 beschrieben wurden ⁷, sind weder totipotent noch pluripotent, verfügen aber über die Fähigkeit, sich in unterschiedliche Zelltypen zu differenzieren, was auch als „multipotent“ bezeichnet wird ⁵. Es besteht beispielsweise die Möglichkeit zur Differenzierung in Osteozyten⁸, Chondrozyten⁸, Myozyten^{9, 10}, Fibrozyten¹¹ oder Adipozyten^{12, 13}. In Anlehnung an diese Charakteristika beinhaltet eine der anerkanntesten Definition für MSC drei wesentliche Erkennungsmerkmale der MSC, zu denen zum einen die Fähigkeit zählt, unter kulturellen Bedingungen adhärent in Kulturschalen zu wachsen. Zum anderen müssen die MSC CD105, CD73 sowie CD90 exprimieren, während eine Expression von CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79alpha, CD19 und HLA-DR Oberflächen-Moleküle fehlt. Ferner müssen MSC in der Lage sein, sich in vitro sowohl in Osteoblasten als auch Adipozyten und Chondroblasten zu differenzieren ¹⁴.

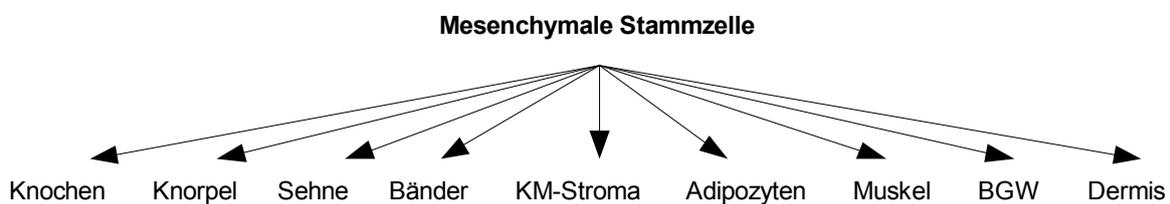


Abb. 1: Differenzierungspotential einer mesenchymalen Stammzelle

Im Vergleich zu anderen Stammzellen, wie HSC oder ESC, verfügen MSC nicht über spezifische Oberflächenmoleküle (z.B. CD34 bei HSC) ¹², wenngleich verschiedene charakteristische Marker wie zuvor angeführt exprimiert werden. Ebenfalls weisen sie Zytokinrezeptoren, Wachstumsfaktoren sowie extrazelluläre Matrixrezeptoren auf.

1.2. Knochen:

Knochen stellt ein dynamisches Gewebe dar, dessen Aufgaben im Organismus Stützfunktion, Fortbewegung, Schutz innerer Organe, Blutbildung sowie Speicherung von Calcium (Ca^{2+}), Magnesium (Mg^{2+}) und Phosphat umfassen¹⁵. Er setzt sich neben den Knochenzellen (Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten) zu 80% aus anorganischem (Hydroxylapatit = Wasser und Calciumphosphat $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{Ca}(\text{OH})_2$ ¹⁶) und zu 20% aus organischem Material, auch Osteoid (die noch nicht verkalkte, von Osteoblasten abgegebene Grundsubstanz) genannt, zusammen¹⁷. Bestandteile des Osteoid stellen Kollagen Typ I (90%), Proteoglykane und Vitamin K-abhängige Peptide (z.B. Osteocalcin) (5%), Zytokine und in der ECM gespeicherte Wachstumsfaktoren (3%) sowie Osteonectin (2%) dar. Aufgrund seiner Affinität zu den Kollagenmolekülen lagert sich Hydroxylapatit longitudinal an diese an, wodurch eine

Verbundstruktur der druckfesten Mineralkristalle und der zugfesten Kollagenfibrillen entsteht, die den Knochen biegefest macht¹⁶.

Für die Knochenentwicklung stehen zwei mögliche Wege zur Verfügung, die desmale und chondrale Ossifikation. Während bei der desmalen Ossifikation der Knochen aus Bindegewebs-Vorstufen entsteht (Gesichts- und Schädelknochen), liegt bei der chondralen Ossifikation ein knorpelig angelegtes Skelett zugrunde, aus dem sich der reife Knochen bildet¹⁸.

Auch nach Beendigung der Wachstumsphase laufen im Knochen Auf- und Abbauprozesse ab, um den Knochen den verschiedenen mechanischen Erfordernissen anzupassen. Das Skelettsystem des Erwachsenen unterliegt hierbei einem ständigen Umbau, *remodelling* genannt¹⁶. Osteoklasten resorbieren und Osteoblasten sorgen für die Synthese neuen Knochens. Aktive Osteoklasten bilden an ihrer, der mineralisierten Matrix zugewandten, resorptiven Seite einen Faltenbesatz aus, in dessen Membran eine H⁺-ATPase enthalten ist¹⁹. Mittels dieser pumpen die Osteoklasten, in der Zelle durch das Enzym Carboanhydrase entstandene, H⁺-Ionen in die zwischen ihnen und der Knochenmatrix gelegenen Lakunen¹⁹. Durch den so entstehenden extrazellulären pH-Wert von 4,5 kommt es zur Auflösung der Calcium-Phosphat-Verbindungen. Der saure pH-Wert schafft zusätzlich das notwendige Milieu für die ebenfalls von Osteoklasten sezernierten lysosomalen Enzyme (Metalloproteinase-1, Kathepsin K)²⁰. Neben ihrer Sekretionstätigkeit endozytieren die Osteoklasten die beim Knochenabbau anfallenden Matrixbestandteile²¹. Insgesamt ist ein Osteoklast durch seine resorptiven Eigenschaften in der Lage pro Zeiteinheit die gleiche Menge Knochen abzubauen, die von 100 bis 150 Osteoblasten aufgebaut worden ist. Die beim Knochenabbau entstehenden Resorptionslakunen stimulieren die Osteoblastendifferenzierung aus in der Nachbarschaft gelegenen Vorläuferzellen, welche in die Lakunen einwandern und dort zu reifen Osteoblasten differenzieren, die wiederum mit der Synthese von Osteoid beginnen. Durch diesen kontinuierlich stattfindenden Vorgang des *remodellings* werden pro Jahr ungefähr 10% der gesamten Knochenmasse erneuert, was bedeutet, dass innerhalb von 10 Jahren das gesamte Skelett einmal vollständig erneuert wird¹⁶, wofür ein exaktes Gleichgewicht und Zusammenspiel von Osteoblasten- und Osteoklastentätigkeit (= *coupling*) von größter Bedeutung ist.

1.2.1. Osteoblastendifferenzierung:

Osteoblasten sind die knochenaufbauenden Zellen²² des Skelettsystems. Sie synthetisieren die Knochengrundsubstanz (Proteoglykane, Kollagen, Glykoproteine), geben diese dort ab, wo sie mit Knochengrundsubstanz in Berührung kommen und sind an der Osteoklastendifferenzierung beteiligt^{23, 24}. Bei den Osteoblasten handelt es sich um, während der Synthesephase kubische bis hochprismatische, sonst flache Zellen, die nicht mehr teilungsfähig sind und als Zeichen aktiver proteinbildender Zellen raues Endoplasmatisches

Retikulum und Golgi-Apparate enthalten^{25, 26}. Des Weiteren verfügen sie über PAS-positive (Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung = *periodic acid schiff stain*) Granula, in denen sich wahrscheinlich neutrale Glykoproteine für die Knochengrundsubstanz befinden^{25, 26}.

Osteoblasten leiten sich ab von mesenchymalen Stammzellen¹⁶, wobei der Differenzierungsweg von der Stammzelle zum fertigen Osteoblast ein sehr komplexer, bisher nicht vollständig geklärter Prozess ist, in den viele verschiedene Faktoren einbezogen sind. Der Differenzierungsweg läuft über die Stammzelle zur osteogenen Progenitorzelle und weiter über den Präosteoblast zum reifen Osteoblast, der wiederum zum Osteozyt werden kann¹⁶. Zu unterscheiden sind die einzelnen Zwischenstufen vor allem anhand ihrer Syntheseleistung, die zum Osteoblast hin stetig zunimmt.

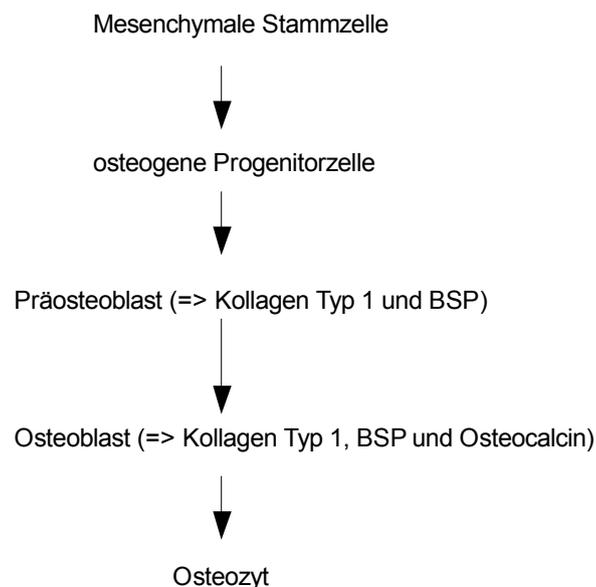


Abb. 2: Osteoblastendifferenzierung

Die komplexe Differenzierung zum Osteoblasten verläuft von der mesenchymalen Stammzelle über eine osteogene Progenitorzelle hin zum Präosteoblast. Aus diesem entwickelt sich der reife Osteoblast, der zum Osteozyt werden kann.

Zu den wichtigsten in die Differenzierungskaskade involvierten Faktoren zählen neben der Tumor-Growth-Factor-(TGF)- β -Familie inklusive der Bone-Morphogenic-Proteins (BMP)²⁷, die Proteine der Wingless-(Wnt)-Familie²⁸, der Transkriptionsfaktor Runx-2 sowie die intrazellulären Smad-Proteine⁵. Neben der Beeinflussung der Differenzierung von der Stammzelle zum Osteoblast, haben all diese Faktoren untereinander gegenseitig modulierende Wir-

kungen. So wirken beispielsweise TGF- β , BMP-7 und BMP-2 über eine gesteigerte Runx-2-Expression fördernd für die osteoblastäre Differenzierung, wobei TGF- β lediglich die frühe osteoblastäre Differenzierung fördert, die Differenzierung in späten Stadien jedoch inhibiert⁵. Der Transkriptionsfaktor Runx-2 greift entscheidend in das Zellwachstum und die Expression phänotypischer Gene ein und reguliert so die osteoblastäre Differenzierung²⁹. Häufig interagiert und wirkt er synergistisch zusammen mit Smad-Proteinen, welche wiederum durch den Einfluss von BMP und TGF- β freigesetzt werden³⁰. Die endgültige Reifung der mesenchymalen Stammzellen zum funktionsfähigen Osteoblasten wird u.a. durch Parathormon (PTH), Insulin-Growth-Factor-1 (IGF-1) und Prostaglandin E₂ (PGE₂) vermittelt²⁸. Negativ auf diesen komplexen Vorgang greifen die Proteine Twist 1 und 2 ein, die einen inhibitorischen Effekt auf Runx-2 und somit auf die osteoblastäre Differenzierung ausüben³¹.

1.2.2. Osteoklastendifferenzierung:

Osteoklasten stellen die knochenabbauenden Zellen dar, sind abgeleitet vom Monozyten-Makrophagensystem und entstehen durch Fusion mononukleärer Vorläuferzellen³². Für die Differenzierung der Osteoklasten spielen die Faktoren *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) und *receptor activator of NF- κ B ligand* (RANKL) eine entscheidende Rolle²⁸. Die Tatsache, dass diese beiden Wirkstoffe von Osteoblasten synthetisierte Substanzen darstellen, verdeutlicht die Bedeutung der Osteoblasten für die Osteoklastendifferenzierung.

Osteoklastische Vorläuferzellen, abgeleitet von hämatopoetischen Stammzellen, verlassen die Blutbahn und gelangen in die Nähe von Osteoblasten, welche nun über M-CSF und RANKL die osteoklastäre Differenzierung regulieren, denn ohne diese beiden Stoffe ist eine Differenzierung der Vorläuferzellen zu reifen Osteoklasten nicht möglich. M-CSF bindet an den vorhandenen Oberflächenrezeptor c-Fms und ist vor allem für die frühe Osteoklastogenese entscheidend, wohingegen RANKL nach Interaktion mit seinem Rezeptor RANK die vollständige Ausreifung zu Osteoklasten reguliert²⁸. Inhibierend auf diesen Prozess wirkt das ebenfalls von Osteoblasten synthetisierte Osteoprotegerin ein, das an RANK bindet und so eine kompetitive Hemmung bewirkt, die die durch RANKL vermittelten Effekte unterbindet²⁸.

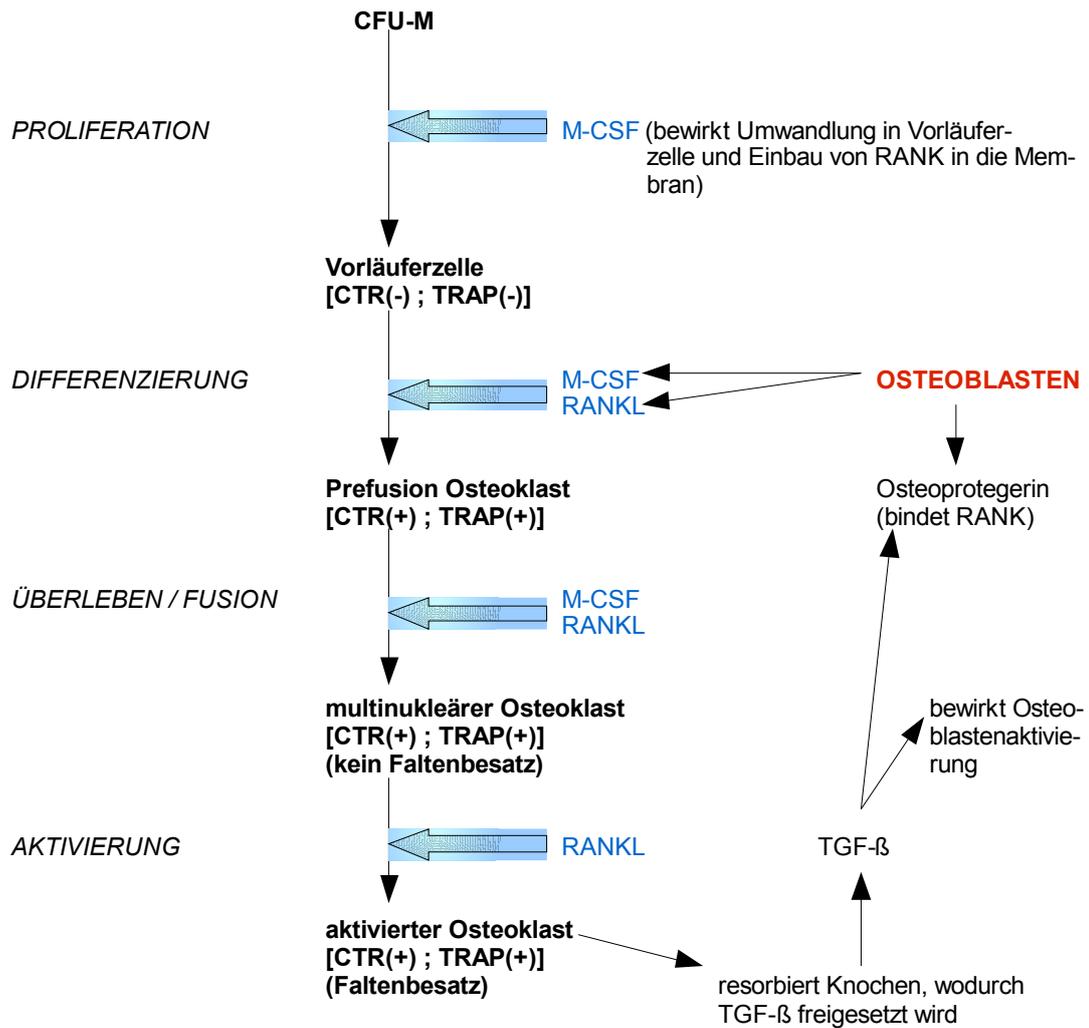


Abb. 3: Osteoklastendifferenzierung
 Osteoklastische Vorläuferzellen, abgeleitet von hämatopoetischen Stammzellen, differenzieren unter Einfluss der osteoblastären Faktoren M-CSF und RANKL zu reifen Osteoklasten. Inhibitorisch auf die Osteoklastogenese wirkt das von Osteoblasten produzierte Osteoprotegerin.

1.3. Fibroblast-Growth-Factor-23:

Die Familie der Fibroblast-Growth-Factors umfasst eine Gruppe von Zytokinen, die für viele biologische Vorgänge des Organismus von Bedeutung sind.

FGF-23 mit einer Größe von 32kDa³³ gehört zusammen mit FGF-19 und FGF-21 der FGF-19-Subfamilie an³⁴ und setzt sich aus insgesamt 251 Aminosäuren (AS) zusammen, von denen N-terminal 24 als Signalpeptid fungieren³⁵. Das Gen für FGF-23 ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 lokalisiert (12p13), wobei es anlehnend an die FGF-19-Subfamilie zusammen liegt mit den genetischen Informationen für FGF-19 und FGF-21, mit denen FGF-23 ungefähr 24% bzw. 22% Übereinstimmungen hinsichtlich der AS-Sequenz aufweist³⁶. Die Ähnlichkeiten der AS-Sequenzen zwischen FGF-23 und anderen FGF beschränken sich jedoch auf die N-terminalen AS, C-terminal liegen keinerlei Homologien vor³⁷.

FGF-23 ist der einzige Vertreter der FGF-Familie, der von einer Prokonvertase gespalten wird³⁸. Durch Trennung der Peptidbindung zwischen den Positionen Arginin¹⁷⁹ und Serin¹⁸⁰ entstehen so ein N-terminales (18kDa) sowie ein C-terminales (12kDa) Fragment, wobei die genauere biologische Bedeutung dieses physiologischen Vorgangs noch nicht abschließend geklärt ist³⁸. Für die biologische Aktivität allerdings ist lediglich die gesamte Länge von 251 AS entscheidend, sie wird durch Spaltung aufgehoben³⁹.

Die Synthese von FGF-23 ist vorwiegend eine Leistung des Knochens⁴⁰. Vor allem in Osteozyten (hauptsächlich Calvaria, Femurkopf, Mandibula und Röhrenknochen⁴¹) aber auch in den Endothelzellen der venösen Sinusoide des Knochenmarks und des Thymus findet die Expression statt⁴². In geringerem Ausmaß wird FGF-23 ebenfalls in Milz, Gehirn, Jejunum und Leber exprimiert (Knochen>Milz>Gehirn>Jejunum>Leber⁴¹). Auf welchen Wegen vom Organismus in die Regulation dieser Biosynthese eingegriffen wird, ist in vielerlei Hinsicht noch unklar. Als beeinflussende Substanzen, die auf den FGF-23-Spiegel wirken, ließen sich bereits Phosphat⁴³, Vitamin D⁴⁴, Phex (*phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidase located on chromosome X*)⁴², DMP1 (*dentin matrix protein 1*)⁴⁵ und MEPE (*matrix extracellular phosphoglycoprotein*)⁴⁶ identifizieren. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass sowohl Phosphat als auch Vitamin D zu einer gesteigerten FGF-23 mRNA-Expression besonders im Knochen führen⁴¹. Bezüglich Phex und DMP1 zeigten Mutationen dieser beiden Substanzen ebenfalls einen Anstieg der FGF-23-Transkription in Osteozyten, wobei der genauere Regulationsmechanismus unklar ist³⁹. Einzig für Vitamin D konnte die Wirkung hinsichtlich der erhöhten FGF-23-Promotor-Aktivität in Osteoblasten auf ein Vitamin-D-*responsive-element* zurückgeführt werden³⁹.

In Anlehnung an die einzelnen Regulationsfaktoren lassen sich verschiedene angeborene Störungen unterscheiden, die den FGF-23-Haushalt betreffen und für den Organismus schwerwiegende Folgen haben. Unterschieden wird hierbei zwischen X-chromosomal, autosomal-dominant und autosomal-rezessiv vererbten Erkrankungen, welche deutlich erhöhte

FGF-23-Spiegel aufweisen und alle hypophosphatämische Zustände nach sich ziehen³⁹. Erhöhte FGF-23-Werte treten des Weiteren bei der tumorinduzierten Osteomalazie oder bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz auf. Die Auswirkungen der hohen FGF-23-Konzentrationen all dieser Erkrankungen betreffend des Phosphatspiegels lassen die Bedeutung dieses Faktors für den Phosphathaushalt deutlich erkennen, was FGF-23 zusammen mit MEPE, sFRP4 (serum frizzile related protein 4) und FGF-7 die Bezeichnung „Phosphatonin“ einbrachte³³.

Im Hinblick auf die phosphaturische Wirkung von FGF-23 konnte gezeigt werden, dass FGF-23 die Serum Phosphatkonzentration durch eine direkte Inhibition der Phosphatreabsorption im proximalen Tubulus der Nieren senkt³⁴. Hierbei erfolgt eine Reduktion der Expression der Phosphattransporter Na⁺-Pi-2a und Na⁺-Pi-2c in der Membran des proximalen Tubulus^{34 34}. Zusätzlich kommt es unter FGF-23-Einfluss zu einer Abnahme der mRNA der 1- α -Hydroxylase, einem Enzym, das für die Biosynthese des Vitamin D essentiell ist⁴⁷. Bei gleichzeitiger Erhöhung der mRNA des für den Vitamin D-Abbau entscheidenden Enzyms 24-Hydroxylase, resultiert eine Inhibition der Calcitriol-Synthese bei gesteigertem Calcitriol-Abbau mit in der Konsequenz vermindertem Vitamin D-Spiegel⁴⁷. Dieser Effekt wiederum unterstützt die Phosphatspiegel-senkende Wirkung des FGF-23, da Vitamin D für die intestinale Phosphatreabsorption über den Na⁺-Pi-2b-Transporter von Bedeutung ist³⁴. Bei einer Reduktion der Calcitriol-Werte erfolgt eine Verminderung eben dieses intestinalen Transporters, was auch als indirekte Senkung des Phosphatspiegels durch FGF-23 bezeichnet wird. Insgesamt führt FGF-23 somit zu einer Inhibition der Resorption von anorganischem Phosphat sowie zu einer Abnahme des Calcitriol-Spiegels im Serum.

Seine Wirkung entfaltet FGF-23, wie alle Vertreter der FGF-Familie, über zellmembranständige Rezeptoren, wobei die Rezeptorbindungsstelle im N-terminalen Bereich der AS-Sequenz des FGF-23 lokalisiert ist⁴⁸. Innerhalb der Wirkungsweise der FGF gibt es bereits vier bekannte Rezeptoren (FGFR 1-4). Bezüglich der Wirkung von FGF-23 zeigte sich, dass FGF-23 die c-splice-Isoform von FGFR 1, 2 und 3 sowie den FGFR 4, jedoch nicht die b-splice-Isoform von FGFR 1-3 bindet und aktiviert⁴⁹. Ebenfalls wurde festgestellt, dass Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) als Kofaktoren agieren und zu einem FGF:FGFR:HSPG-Signalkomplex führen, der für die Rezeptoraktivität notwendig ist⁵⁰. Zusätzlich konnte ein transmembranäres Protein identifiziert werden, welches für die Rezeptoraktivität von FGF-23 benötigt wird. Dieses als *Klotho* bezeichnete Protein weist Homologien zu β -Glucuronidasen auf und scheint die Gewebespezifität von FGF-23 zu vermitteln⁵¹. Es bindet an die FGF-Rezeptoren und erhöht so ihre Affinität für FGF-23³⁹. Die Koexpression von FGFR und *Klotho* deutet auf Nieren, Nebenschilddrüse, Epiphyse und Plexus choroideus als mögliche Zielgewebe hin³⁹. Knochen, Leber, Lunge, Haut, Milz und Dünndarm hingegen werden aufgrund des Fehlens von *Klotho* nicht als Zielgewebe diskutiert

⁵². Im Hinblick auf die Nieren findet sich die höchste FGFR:*Klotho*-Komplex-Expression im distalen Tubulus, obwohl FGF-23 in seiner Wirkung vorwiegend am proximalen Tubulus angreift ³⁹. Welche genauen Abläufe nach der FGF-23 Bindung an seinen Rezeptor intrazellulär ablaufen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Diesbezüglich bestehen jedoch bereits verschiedene Erkenntnisse. Ein Mausmodell erbrachte beispielsweise die Information, dass FGF-23 die tubuläre PGE₂-Produktion mittels MAP-Kinase-Weg erhöht und PGE₂ wiederum den proximalen tubulären Phosphattransport inhibiert ⁵³.

Zusammenfassend betrachtet hat die bisherige Studienlage bereits viele Informationen zu FGF-23 und seiner Wirkung zusammengetragen, auch wenn Zusammenhänge und Aspekte der Biosynthese-Regulation, der Wirkung und der Wirkmechanismen unklar verbleiben und somit Gegenstand der gegenwärtigen und zukünftigen Forschungen sind.

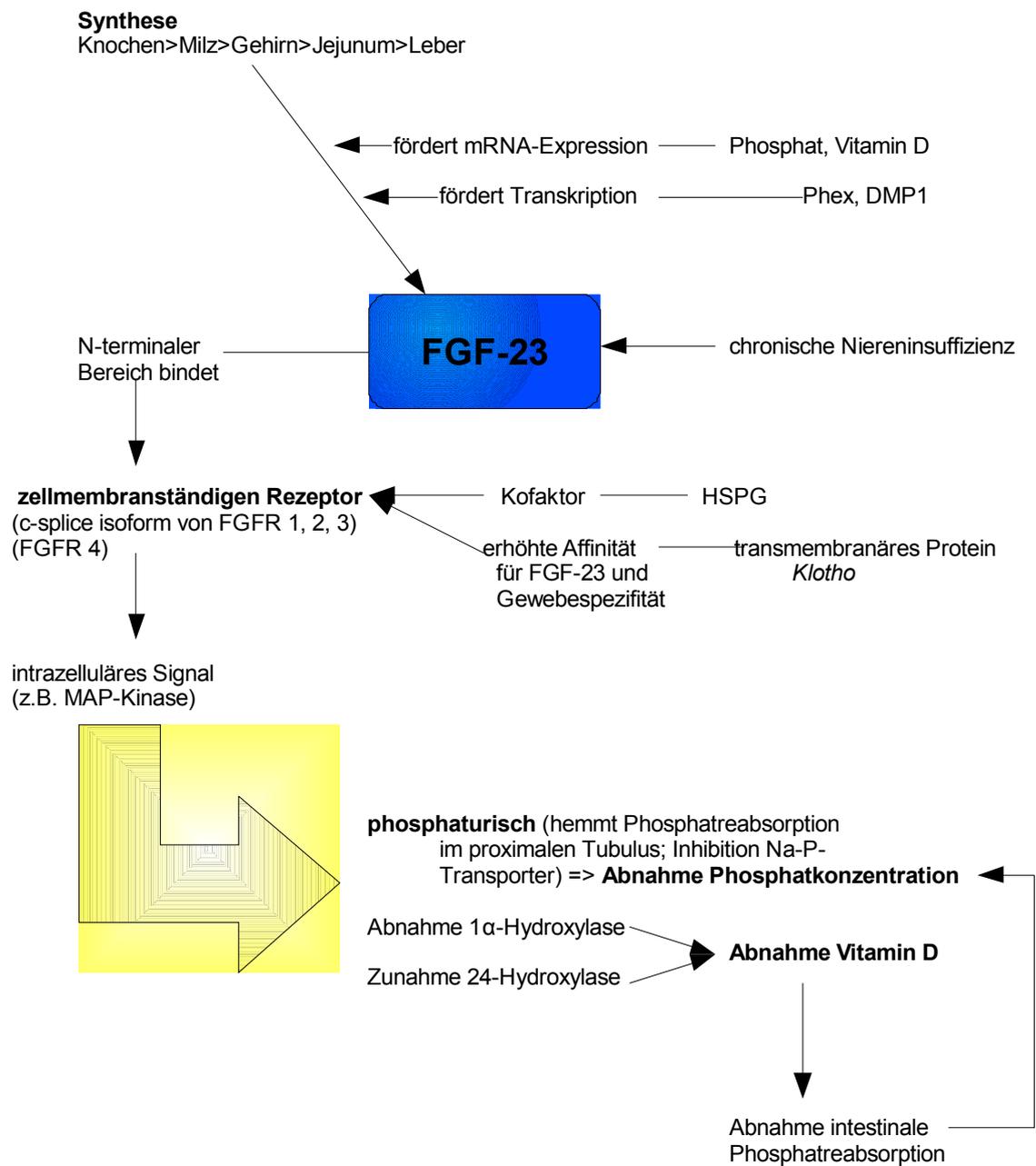


Abb. 4: Physiologie von FGF-23

Die Syntheseleistung von FGF-23 entfällt vorwiegend auf den Knochen und wird reguliert durch verschiedene Faktoren (Phosphat, Vit-D, PheX, DMP1). Auch bei cNI sind die FGF-23-Spiegel erhöht. FGF-23 wirkt über zellmembranständige Rezeptoren, HSPG und Klotho stellen wichtige Kofaktoren dar. Nach Rezeptorbindung und intrazellulärer Signalkaskade resultieren eine Abnahme der Phosphat- und Vit-D-Konzentrationen.

1.4. Renale Osteopathie:

Der Begriff der Renalen Osteopathie beschreibt ein Krankheitsbild, bei dem es im Rahmen einer chronischen Niereninsuffizienz, bedingt durch ein Überwiegen der osteoklastischen Aktivität, zu ossären Veränderungen im Sinne einer Zerstörung der Knochenstruktur kommt. Die Niereninsuffizienz stellt einen Zustand eingeschränkter Fähigkeit der Nieren dar, harnpflichtige Substanzen auszuschcheiden⁵⁴, und kann in eine akute und eine chronische Form untergliedert werden. Der Ausdruck der Insuffizienz steht dabei lediglich für ein funktionelles Bild und erlaubt keinerlei Rückschlüsse auf die Ursache.

Das akute Nierenversagen (aNV) ist definiert als „akut einsetzende rasche Abnahme der Nierenfunktion, die über Tage anhält und prinzipiell reversibel ist“², wohingegen unter chronischer Niereninsuffizienz (cNI) die „Folge einer irreversiblen Verminderung der glomerulären, tubulären und endokrinen Funktionen beider Nieren“² verstanden wird. Zu den Hauptursachen der cNI zählen neben diabetischer Nephropathie, primären und sekundären Glomerulonephritiden, chronisch-tubulo-interstitiellen Erkrankungen auch vaskuläre (hypertensive) Nephropathien sowie polyzystische Nierenerkrankungen². Unmittelbare Auswirkungen sind Versagen der exkretorischen Nierenfunktion (ab einer GFR von <50 ml/min), Störung des Wasser-/Elektrolyt-/Säure-Base-Haushalt (ab einer GFR von <30 ml/min metabolische Azidose mit zunehmender ossärer Kaliumfreisetzung, Zunahme gastrointestinaler Beschwerden, Hyperkaliämie, subjektives Empfinden von Dyspnoe, Zunahme des Eiweißkatabolismus), verminderte inkretorische Nierenfunktion (Abnahme der Freisetzung von Erythropoetin (EPO), Renin, Prostaglandinen und Calcitriol) sowie toxische Organschäden (v.a. Herz-Kreislauf-System, ZNS und PNS, Blut und Blutbestandteile, Haut) durch retinierte harnpflichtige Substanzen². Insgesamt lassen sich nach Sarre vier Stadien der cNI unterteilen:⁵⁴

| | |
|-----------|--|
| Stadium 1 | eingeschränkte Nierenfunktion symptomlos; nur durch Messung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) erfassbar; GFR 70 – 120 ml/min x 1,73 m ² Körperoberfläche (KOF) |
| Stadium 2 | leichte Niereninsuffizienz Anämie, Osteopathie Kreatinin 1,5 – 4 mg/dl GFR 20 – 70 ml/min x 1,73 m ² KOF |
| Stadium 3 | schwere Niereninsuffizienz Anämie, Osteopathie, kompensierte metabolische Azidose, Salz-Wasser-Retention, Polyneuropathie, Gonadendysfunktion Kreatinin 4 – 7 mg/dl GFR 5 – 20 ml/min x 1,73 m ² KOF |
| Stadium 4 | terminale Niereninsuffizienz Urämie, dekompensierte metabolische Azidose Kreatinin >7 mg/dl GFR <5 ml/min x 1,73 m ² KOF |

Tabelle 1: Stadieneinteilung der cNI nach Sarre
Anhand von auftretenden Symptomen, der Kreatininkonzentration und der GFR bezogen auf die Körperoberfläche (KOF) lassen sich insgesamt 4 Stadien der cNI unterteilen, von symptomloser eingeschränkter Nierenfunktion bis hin zu terminaler Niereninsuffizienz.

Die Folgen der cNI reichen von renaler Anämie, aufgrund der verminderten EPO-Bildung, über Störung der renalen Hämodynamik mit Abnahme von Renin und Prostaglandinen bis hin zur Entwicklung eines sekundären Hyperparathyreoidismus mit entstehender Renaler Osteopathie².

Die Renale Osteopathie lässt sich histomorphologisch weiter untergliedern in die adynamische Osteopathie, Osteomalazie, Ostitis fibrosa sowie eine Mischform aus Osteomalazie und Ostitis fibrosa⁵⁵.

Die *adyname Osteopathie*, auch als *low-turnover* Osteopathie bezeichnet, kann ausgelöst werden einerseits durch Aluminiumüberladung des Organismus, andererseits durch verminderte Knochenproduktion, wie zum Beispiel im Rahmen eines Diabetes mellitus, einer Inhibition der Osteoblasten oder in Folge des physiologischen Alterungsprozesses⁵⁵.

Die *Osteomalazie* (Mineralisationsstörung) begründet sich insbesondere auf einen Mangel an Vitamin D.⁵⁵ Mehrere Krankheitsbilder, beispielsweise Niereninsuffizienz, X-chromosomale / Tumorinduzierte Hypophosphatämie aber auch Medikamente oder fehlende Sonnenlichtexposition senken den Vitamin D-Spiegel, infolge dessen es zu einer Abnahme der Knochendichte kommt.⁵⁵

Die *Ostitis fibrosa*, *high-turnover* Osteopathie, basiert pathogenetisch auf der Entwicklung eines sHPT, in dessen Folgen es zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen

Knochenaufbau und –abbau zu Gunsten der osteoklastischen Aktivität kommt⁵⁵. Charakteristisch sind die Proliferation von Osteoblasten mit Zunahme der Osteoblastenzahl auf der Knochenoberfläche sowie eine Zunahme der Osteoklastenzahl mit erhöhter Anzahl an Osteoklasten in den Resorptionslakunen und einer erhöhten Knochenabbaurate⁵⁵. Histologisch lässt sich des Weiteren eine Ansammlung von Fibroblasten an der Spongiosaoberfläche mit peritrabekulärer Fibrose erkennen⁵⁵.

Klinisch lassen sich mehrere Leitsymptome der Renalen Osteopathie erkennen, die Erstmanifestation äußert sich jedoch vorwiegend in Belastungsschmerzen. Zu den weiteren häufig auftretenden Zeichen zählen in erster Linie die proximale Myopathie, Spontanfrakturen insbesondere der Rippen, Wirbelkörper und Schenkelhäse, Knochenschmerzen, Skelettdeformationen im Sinne von Skoliosen und Kyphosen, Bindegewebs-Verkalkungen an Organen und Gefäßen, Amyloidablagerungen und die Pseudogicht^{2, 55}. Beim Auftreten dieser Symptome lässt sich mittels Laboruntersuchungen, Knochenbiopsie und –histologie sowie Knochendichtemessungen inklusive Röntgendiagnostik die Diagnose sichern². Osteoblasten- und Osteoklastenmarker stellen neben intaktem PTH, alkalischer Phosphatase und Serumphosphat (alle drei Parameter erhöht) die wichtigsten Kriterien der Labordiagnostik dar. Radiologische Zeichen zum Nachweis der Renalen Osteopathie sind in Anfangsstadien nicht sehr ausgeprägt und daher vielmehr als Spätzeichen aussagekräftig². Von Bedeutung sind hierbei vor allem subperiostale Erosionen der Phalangen und Osteolysen im Bereich der Symphysenfuge.

Zu den entscheidenden Einflüssen hinsichtlich der Pathogenese der Erkrankung zählen neben erniedrigten Calcitriol-Spiegeln erhöhte Phosphat- und PTH-Werte, wie sie im Rahmen der Niereninsuffizienz und des sich entwickelnden sHPT auftreten.

Calcitriol, in seiner Struktur vom Cholesterin abgeleitet, wird vom Organismus selber synthetisiert, was vorwiegend eine Leistung des Zusammenspiels von Haut, Leber, Nieren, UVB-Licht und verschiedener Enzymsysteme darstellt (siehe Abb. 5).

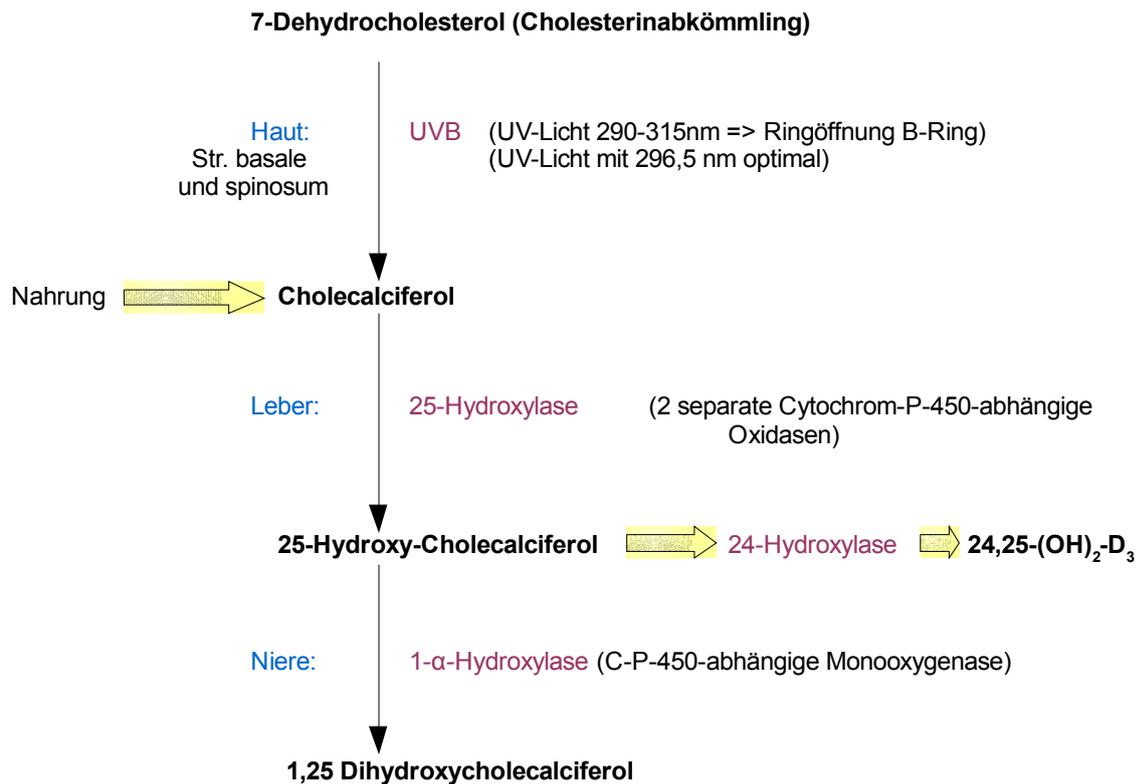


Abb. 5: Synthese von 1,25 Dihydroxycholecalciferol
 Die Bildung von Calcitriol durch den Organismus erfolgt über mehrere Synthesestufen unter der Einwirkung von UVB-Licht in der Haut und verschiedener Enzymsysteme in Leber und Niere.

Durch die Einwirkung des UVB-Lichtes wird das in der Haut abgelagerte 7-Dehydrocholesterol mittels Ringöffnung am B-Ring in Cholecalciferol umgewandelt, welches nach Transport in die Leber an Position 25 hydroxyliert wird¹⁷. Das entstehende 25-Hydroxycholecalciferol erreicht gekoppelt an ein Vitamin D-bindendes Protein (VDP) über den Blutweg die Nieren. Es wird glomerulär filtriert und dann gebunden an Megalin mittels Endozytose in die proximalen Tubuluszellen aufgenommen. Nach Abspaltung des VDP erfolgt die enzymatische Umsetzung zu Calcitriol, dem aktiven Metaboliten des Vitamin D⁵⁵. Bereits in frühen Stadien der cNI (GFR <50 ml/min)⁵⁶ tritt als Folge einer Verminderung der proximalen Tubuluszellen, welche die mitochondriale 1- α -Hydroxylase enthalten, und einer gestörten Aufnahme des Komplexes aus 25(OH)D₃ und VDP in die Tubuluszellen ein Calcitriolmangel auf⁵⁶. Die physiologischen Konsequenzen dieses Mangels für den Organismus äußern sich entsprechend der Wirkungsweise des Calcitriols im Calciumhaushalt und der PTH-Ausschüttung der Nebenschilddrüsen.

Seine Wirkung entfaltet Calcitriol vorwiegend an Darm, Knochen, Nieren und Nebenschilddrüsen, was in einer Erhöhung des Serum-Calcium-Spiegels und einer Inhibition der PTH-Bildung resultiert. Im Darm führt Calcitriol zu einer gesteigerten Expression von

Calbindin und Ca^{2+} -ATPase, die eine erhöhte Calcium-Resorption nach sich ziehen. Des Weiteren kommt es in den distalen Tubuli der Nieren ebenfalls zu einer gesteigerten Rückresorption von Calcium (Ca^{2+})⁵⁷. In den Zellen der Nebenschilddrüse bewirkt Calcitriol neben einer Inhibition der Genexpression und Sekretion von PTH eine Inhibition der Proliferation von Nebenschilddrüsenzellen

Fällt nun im Rahmen der Niereninsuffizienz der Calcitriolspiegel ab, sind die Ca^{2+} -Resorption im Magen-Darm-Trakt und die Ca^{2+} -Rückresorption im Tubulussystem der Nieren deutlich reduziert, was in einer Hypokalzämie resultiert. Die entstehende Hypokalzämie und der Calcitriolmangel haben synergistische Auswirkungen auf den PTH-Spiegel und summieren sich hinsichtlich ihrer Effekte auf die Nebenschilddrüsen. Verminderte Calcitriolwerte führen zu einem Wegfall der Inhibition von PTH-Genexpression, -Sekretion sowie Proliferation der Nebenschilddrüsen-Zellen (NSD). Zusätzlich zu der Calcitriolvermittelten erhöhten PTH-Sekretion wird die Aktivität der NSD ebenfalls durch die Hypokalzämie verstärkt⁵⁸.

Calcium wirkt über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor von 1085 AS, der intrazellulär zu einer Aktivierung des Phosphoinositol-Signaltransduktionsweges führt¹⁷. Kommt es zu einem Abfall der Calcium-Konzentration, erhöht sich in den NSD-Zellen die cAMP-Konzentration, was letztlich eine erhöhte PTH-Sekretion nach sich zieht¹⁷. Im Gegensatz dazu würde ein Anstieg des Calcium-Spiegels über eine verminderte Konzentration an cAMP zu einer Abnahme der PTH-Sekretion führen (siehe Abb.6)¹⁷.

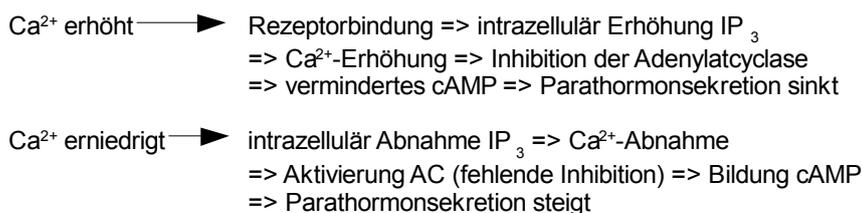


Abb. 6: Wirkung von Calcium auf die Parathormonsekretion
 Eine Erhöhung des Calciumspiegels führt über intrazelluläre Signale (Adenylatcyclase, cAMP) zu einer Abnahme der PTH-Sekretion, wohingegen erniedrigte Calciumkonzentrationen eine gesteigerte PTH-Sekretion nach sich ziehen.

Liegt physiologischerweise ein Verhältnis von pulsatiler zu tonischer PTH-Sekretion von 30% zu 70% vor, erhöht sich bei Hypokalzämie die pulsatile Sekretion um das Zehnfache⁵⁵. Zusätzlich konnte eine Down-Regulation der Calcium-Sensing-Rezeptoren der hyperplasti-

schen NSD-Zellen bei sHPT demonstriert werden⁵⁹. Auswirkungen der Hypokalzämie finden sich jedoch nicht nur in Bezug auf die PTH-Sekretion, sondern auch im Hinblick auf die Knochenstruktur, wo sich Mineralisationsstörungen des Osteoids im Sinne einer Osteomalazie finden lassen.

Einen weiteren wesentlichen Faktor für die Entstehung der Renalen Osteopathie stellt die Entwicklung einer Hyperphosphatämie dar. Sie tritt bei niereninsuffizienten Patienten ab einer GFR von <30 ml/min ein⁵⁶ und weist Phosphatspiegel von über 3 mmol/l auf⁵⁵ (physiologische Phosphat-Konzentration 0,8 - 1,4 mmol/l)⁵⁸. Der Organismus versucht mittels PTH und FGF-23, welche beide phosphaturisch wirksam sind, die über die Norm erhöhten Konzentrationen zu senken, was als effiziente Gegenregulation allerdings unzureichend ist, da eine gesteigerte Exkretion aufgrund der Niereninsuffizienz nicht möglich ist⁶⁰. Erschwerend kommt hinzu, dass durch eine gesteigerte Calciumresorption aus dem Knochen ebenfalls Phosphat vermehrt anfällt. Die so entstehende Hyperphosphatämie hat Effekte sowohl auf den PTH- und Calcitriol-Spiegel als auch auf die Ca^{2+} -Konzentration.

Durch die Hyperphosphatämie wird in den NSD-Zellen die PTH-Sekretion stimuliert². Unter physiologischen Bedingungen wird Phosphat über einen Na^+ -Pi-1-Transporter in die NSD-Zellen aufgenommen und an eine Phosphat-bindendes-Protein gebunden⁵⁵. Sind die Phosphat-Konzentrationen erhöht, verringert sich der Transport und es wird weniger Phosphat internalisiert⁵⁵. Das Phosphat-bindende-Protein liegt „frei“ in den Zellen vor und bindet in Folge dessen an die entsprechende Domäne der PTH-mRNA, woraufhin deren Abbau durch RNAsen blockiert und die Stabilität verbessert wird, was wiederum in einer gesteigerten PTH-Syntheserate resultiert⁵⁵.

Des Weiteren inhibiert Phosphat in den Nieren die 1- α -Hydroxylase⁵⁵ und führt mittels einer Komplexierung von freiem Calcium zu einer Hypokalzämie, zwei Effekte, die die pathogenetische Wirkung von bereits bestehendem Calcitriolmangel und Hypokalzämie zusätzlich verstärken.

Die Auswirkungen von erhöhten Phosphatspiegeln auf den Calciumhaushalt sind jedoch nicht nur hinsichtlich der Stimulation der PTH-Sekretion von Bedeutung, denn die Komplexierung von Ca^{2+} hat gleichfalls Folgen für das Gefäßsystem des Organismus. Bei Überschreiten des Calcium-Phosphat-Produktes von $>(5\text{mmol/l})^2$ werden extraossäre Verkalkungen in Weichteilen und Gefäßen begünstigt. Die Präzipitation des Calciums wiederum unterstützt über ein Absinken der Ca^{2+} -Konzentration im Plasma die Stimulation der PTH-Sekretion.

Insgesamt tragen der Mangel an Calcitriol, Hypokalzämie und Hyperphosphatämie zu erhöhten PTH-Werten mit der Entwicklung eines sHPT bei.

Der Begriff des Hyperparathyreoidismus bezeichnet ein Krankheitsbild, welches durch eine Überfunktion der NSD-Zellen mit einer vermehrten Produktion von PTH gekennzeichnet ist².

Unterschieden werden können allgemein primärer, sekundärer und tertiärer Hyperparathyreoidismus (HPT). Während beim primären HPT die Ursache in einer Erkrankung der Nebenschilddrüse selbst liegt (80% solitary Adenome) und eine Hyperkalzämie resultiert, zeichnet sich der sHPT durch extraglanduläre Ursachen aus, deren gemeinsames Charakteristikum die Hypokalzämie darstellt². Zugrunde liegen können sowohl renale, intestinale (unzureichende Zufuhr / Resorption Ca^{2+} , z.B. Morbus Crohn; Medikamente z.B. Antiepileptika) als auch hepatische (Leberzirrhose, Cholestase) Störungen, wobei die häufigsten Ursachen im Bereich der Nieren zu finden sind (v.a. cNI)². Der sHPT ist hierbei Folge einer Störung der endokrinen Funktion mit unzureichender Calcitriol-Bildung sowie der exokrinen Funktion mit Abnahme der Phosphat-Ausscheidung der Nieren⁵⁸. Im Gegensatz dazu spricht man bei der Kombination von sHPT und sich entwickelnder Hyperkalzämie von einem tertiären HPT. Die Ursache findet sich zumeist in einem Missverhältnis von PTH-Sekretion und -Bedarf².

Parathormon, ein Polypeptid bestehend aus 84 AS,⁵⁵ wird als Vorläufermolekül Prä-Pro-PTH (115 AS¹⁷) gebildet und nach Abspaltung der Prä- und Pro-Sequenz an das Blut abgegeben, wo es bei nur sehr kurzer Halbwertszeit (HWZ) schnell in zwei Fragmente gespalten wird⁵⁸. Das entstehende aminoterminal (N-terminale) Fragment aus den AS 1-34 ist für die biologische Aktivität essentiell⁵⁸. Das ebenfalls entstehende C-terminale Bruchstück (AS 35-84) gewährleistet eine Verlängerung der HWZ im Serum⁶¹. PTH entfaltet seine Wirkung über einen G-Protein-gekoppelten PTH-1-Rezeptor der vorwiegend in den Tubuli der Nieren und den Osteoblasten exprimiert wird⁵⁵, wonach Nieren und Knochen die Hauptwirkorte darstellen. In den Nieren erfolgt eine Aktivierung der 1- α -Hydroxylase mit entsprechender Calcitriol-Produktion¹⁷. Ferner wird im distalen Tubulus (Pars convoluta) die Ca^{2+} -Rückresorption gefördert bei gleichzeitig erhöhter Ausscheidung von Phosphat, Na^+ , K^+ , H_2O und AS im proximalen Tubulus¹⁷. Parathormon hemmt hierbei die Phosphatreabsorption, indem der $\text{NaPi}2$ -Kotransporter endozytiert und lysosomal abgebaut wird⁶². Durch die vermehrte Calcitriolproduktion übt PTH ebenfalls indirekte Effekte auf die Ca^{2+} -Resorption im Darm aus. Am Knochen führt PTH zu einer Calciummobilisation, wobei unterschieden werden muss zwischen einer Mobilisation aus der löslichen Form (rasche Wirkung) und der Freisetzung von Calcium über die Aktivierung von Osteoklasten (prolongierte Wirkung). Entscheidend ist hierbei, dass eine negative Calciumbilanz am Knochen nur bei pathologisch erhöhten PTH-Konzentrationen auftritt, da unter physiologischen Bedingungen eine Osteoblastenaktivierung folgt.

PTH ist durch seine Wirkung auf den Knochen in wesentlichem Maße an der Entstehung der Renalen Osteopathie beteiligt. Liegen die PTH-Werte im Normbereich (12-72 ng/l) wird die Knochenneubildung über eine Vermehrung von Osteoblasten-Vorläuferzellen induziert. Sind

die PTH-Spiegel jedoch über die physiologischen Konzentrationen angehoben wird die Syntheseleistung der Osteoblasten gehemmt und die osteoklastische Aktivität gesteigert.

PTH nimmt Einfluss auf das RANK-RANKL-System sowie die osteoblastäre Faktorfreisetzung und übt so seine physiologischen Effekte auf den Knochen aus. Unter PTH-Exposition wird RANKL vermehrt in die Plasmamembran der Osteoblasten eingebaut und interagiert mit seinem an Osteoklasten vorhandenen Membranrezeptor RANK⁶³. Folgen dieser Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor sind Osteoklasten-Differenzierung und –Aktivierung⁶⁴. Im „gesunden“ Organismus würde in diesem Zusammenhang eine erneute Osteoblasten-Aktivierung und somit Knochenneubildung folgen. Bei erhöhten PTH-Werten liegt die osteoklastische Aktivität jedoch deutlich über der osteoblastären. Neben dem verschobenen Gleichgewicht zugunsten der Osteoklasten wird von den Osteoblasten ein nur unzureichend mineralisierender Geflechtknorpel gebildet (Ostitis fibrosa).

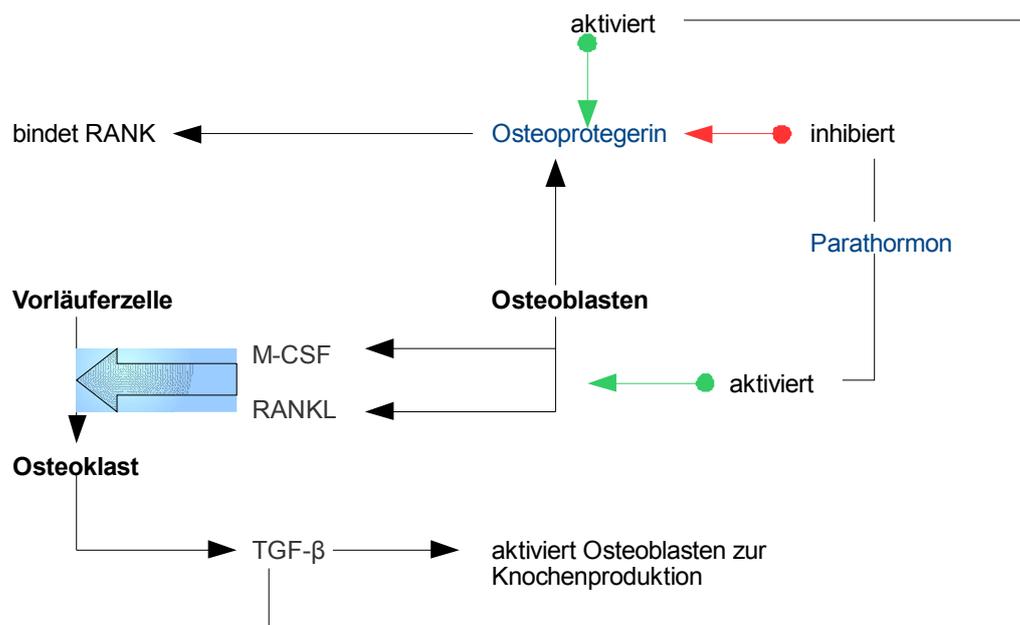


Abb. 7: Gleichgewicht zwischen Knochenabbau und -aufbau
 Parathormon führt mittels RANKL-Einbau in die Osteoblastenmembran zu einer Osteoklasten-Aktivierung und somit zum Knochenabbau. Physiologischerweise kommt es hierbei ebenfalls zur Osteoblasten-Aktivierung mit Knochenneubildung, so dass keine negative Knochenbilanz resultiert.

Unvollständig geklärt ist im Zusammenhang mit den pathologischen Veränderungen am Knochen die Frage, welche osteoblastären Faktoren durch PTH exprimiert und freigesetzt werden oder ob gänzlich andere Faktoren / Stoffe zusätzlich in die Pathophysiologie dieser

Erkrankung eingreifen. In diesem Kontext spielt insbesondere FGF-23 eine wichtige Rolle, welches selbst phosphaturische und 1- α -Hydroxylase inhibitorische Wirkungen aufweist. Eine verminderte GFR, wie sie bei der cNI auftritt, führt nachgewiesenermaßen zu einer vermehrten FGF-23-Expression, was wiederum einen Synergismus hinsichtlich des sich entwickelnden pathogenetisch bedeutsamen Calcitriolmangels bedeutet. Letztlich wird somit die Steigerung der PTH-Sekretion weiter unterstützt. Ebenfalls wurde gezeigt, dass die Hauptsyntheseleistung der FGF-23-Expression auf den Knochen entfällt. Ungewiss bleibt jedoch, ob im Zusammenhang der Renalen Osteopathie FGF-23 neben seinen Auswirkungen auf den Phosphat- und den Calcitriolhaushalt weitere Wirkungen aufweist, die für die entstehenden Knochenveränderungen mitverantwortlich oder andere Faktoren in dieser Pathologie bedeutsam sind. Es wird diskutiert, ob FGF-23 möglicherweise die PTH-Sekretion fördert, die Knochenmineralisation inhibiert oder ob PTH stimulierende Effekte auf die FGF-23-Spiegel aufweist. Eine endgültige Aussage bezüglich einer möglichen pathogenetischen Bedeutung von FGF-23 im Rahmen der pathophysiologischen Vorgänge der Renalen Osteopathie ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich, da die bisherige Studienlage keine eindeutigen Ergebnisse erzielt hat, sondern immer noch ein großes Spektrum an Möglichkeiten vorstellbar ist.

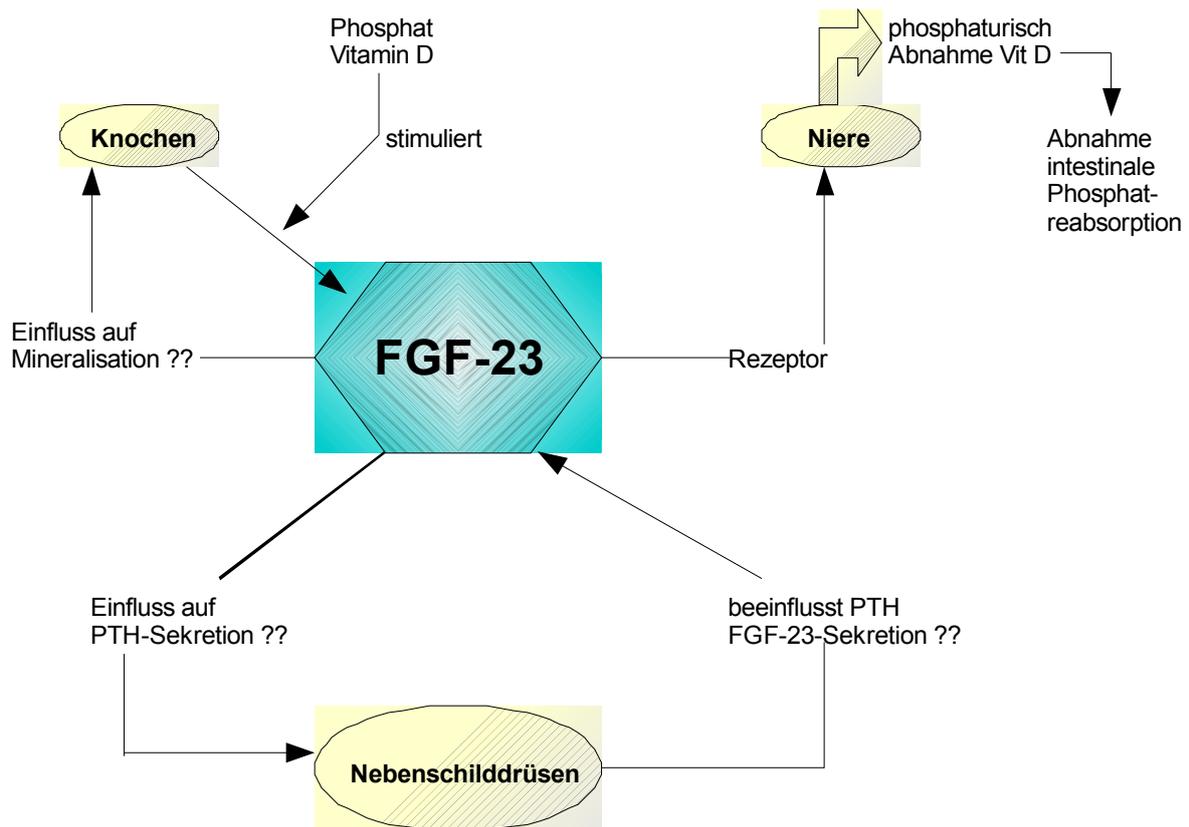


Abb. 8: Mögliche Pathophysiologie von FGF-23

FGF-23, ein von Knochenzellen produzierter Faktor, führt bekanntermaßen zu einer Abnahme der Phosphat- und Vitamin D-Konzentrationen, zwei Stoffe, die umgekehrt ebenfalls in die Synthese von FGF-23 eingreifen. Unklar ist, welcher Zusammenhang zwischen FGF-23 und Parathormon besteht und ob FGF-23 am Knochen ebenfalls Effekte im Hinblick auf Mineralisationsstörungen hervorruft.

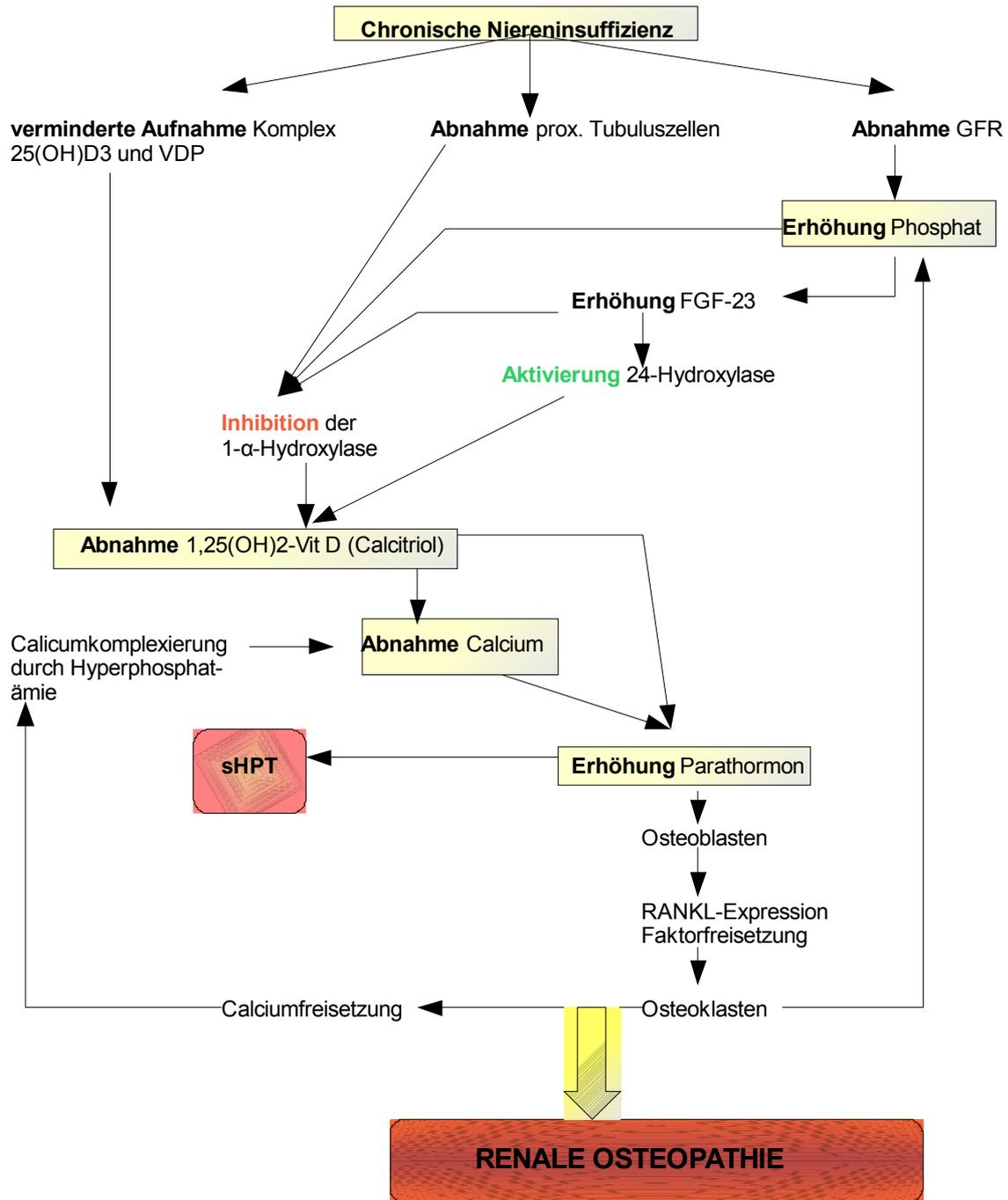


Abb. 9: Pathophysiologie der Renalen Osteopathie
 Die Pathophysiologie der Renalen Osteopathie stellt einen komplexen Zusammenhang zwischen der zugrunde liegenden Niereninsuffizienz und den daraus resultierenden Folgen (Hyperphosphatämie, Vitamin-D-Mangel, Hypokalzämie) dar. Durch den sich entwickelnden sHPT kommt es zu einem Überwiegen der osteoklastischen Aktivität und somit zum Krankheitsbild der Renalen Osteopathie.

1.5. Zielsetzung der Arbeit:

Aufgrund der bisher unvollständigen Datenlage zur Bedeutung von FGF-23 für die osteoblastäre Differenzierung wird in dem folgenden in vitro-Modell die FGF-23-Expression an humanen KM-Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen untersucht.

2. Methoden:

2.1. Versuchsaufbau:

Humane Knochenmarkzellen von drei verschiedenen Spendern (Patienten A, B und C) wurden jeweils mit 10 pmol/l, 100 pmol/l sowie ohne PTH über 30 Tage kultiviert. Die KM-Spender erfüllten die Kriterien zur KM-Spende der Bundesärztekammer und wurden über die Verwendung von KM zu wissenschaftlichen Zwecken präoperativ aufgeklärt. Die Indikation zur KM-Entnahme erfolgte nicht studienbedingt, sondern im Rahmen der KM-Spende zur Transplantation in Kooperation mit dem ITZ am UKD.

Pro Spenderknochenmark wurden je 2 x 24-Well Platten (1 x 10 pmol/l, 1 x 100 pmol/l PTH) (je 228.000 Zellen/24 ml), 2 x T175-Kulturflaschen (1x 10 pmol/l, 1 x 100 pmol/l PTH) (je 766.000 Zellen/40ml) und jeweils eine Negativkontrolle ohne PTH besiedelt. Schwerpunkte für die anschließenden Auswertungen entfielen auf Immunzytochemie, ELISA, Calcium- und Phosphatmessungen sowie auf die Isolierung der RNA, um Unterschiede innerhalb der verschiedenen Parathormonkonzentrationen zu detektieren. Während der 30-tägigen Kultivierungsphase wurden hierfür, neben einer regelmäßigen Fotodokumentation der Zellen durch Lichtmikroskopie, einmal wöchentlich pro 24-Well Platte und T175-Kulturflasche jeweils 1,5ml Zellkulturüberstand für die anschließend durchzuführenden ELISAs und Calcium- / Phosphatbestimmungen gepoolt gesammelt und bei -80°C eingefroren. Die Erneuerung des Kulturmediums fand im Wechsel von 3 und 4 Tagen statt. Das Medium wurde dazu jedes Mal frisch angesetzt. Nach beendeter Kultivierung erfolgte wiederum gepooltes Sammeln der Zellkulturüberstände, sowie die Fixierung und Färbung der an den 24-Well Platten adhären-ten Zellen für die Immunzytochemie und Aufnahme der Zellen aus den T175-Kulturflaschen für die RNA-Isolation in RLT-Puffer.

2.2. Teriparatid (Forsteo[®]):

Teriparatid, bestehend aus den 1-34 N-terminalen (=> rhPTH1-34) der insgesamt 84 Aminosäuren des Parathormons (=> Propyl-hPTH), beinhaltet in seiner Struktur lediglich die für die biologische Aktivität des PTH essentiellen AS. Die genaue Sequenz setzt sich aus folgender AS-Abfolge zusammen (siehe Tabelle 2):

S-V-S-E-I-Q-L-M-H-N-L-G-K-H-L-N-S-M-E-R-V-E-W-L-R-K-K-L-Q-V-H-N-F

| Abkürzung | AS | Formel | Molekülmasse [g/mol] | Anzahl Molekül | Masse Molekül |
|-----------|-----------------|---|-------------------------|-------------------|------------------|
| S | L-Threonin | C ₄ H ₉ NO ₃ | 119,12 | 3 | 357,36 |
| H | L-Histidin | C ₆ H ₉ N ₃ O ₂ | 155,16 | 1 | 155,16 |
| E | L-Glutaminsäure | C ₅ H ₉ NO ₄ | 147,13 | 3 | 441,39 |
| M | L-Methionin | C ₅ H ₁₁ NO ₂ S | 149,21 | 2 | 298,42 |
| I | L-Isoleucin | C ₆ H ₁₃ NO ₂ | 131,17 | 1 | 131,17 |
| Q | L-Glutamin | C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃ | 146,15 | 2 | 292,3 |
| N | L-Asparagin | C ₄ H ₈ N ₂ O ₃ | 132,12 | 3 | 396,36 |
| G | Glycin | C ₂ H ₅ NO ₂ | 75,07 | 1 | 75,07 |
| H | L-Histidin | C ₆ H ₉ N ₃ O ₂ | 155,16 | 2 | 310,32 |
| L | L-Leucin | C ₆ H ₁₃ NO ₂ | 131,18 | 5 | 655,9 |
| R | L-Arginin | C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂ | 174,20 | 2 | 348,4 |
| V | L-Valin | C ₅ H ₁₁ NO ₂ | 117,15 | 3 | 351,45 |
| W | L-Tryptophan | C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂ | 204,23 | 1 | 204,23 |
| D | Aspartic acid | C ₄ H ₇ NO ₄ | 133,10 | 1 | 133,1 |
| F | L-Phenylalanin | C ₉ H ₁₁ NO ₂ | 165,19 | 1 | 165,19 |
| K | L-Lysin | C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ | 146,19 | 3 | 438,57 |
| | | | SUMME | 34 | 4754,39 |

Tabelle 2: Aminosäuresequenz des Teriparatids

Um den Einfluss von PTH auf die FGF-23-Expression osteoblastär stimulierter humaner KM-Zellen zu untersuchen, wurde die Substanz Teriparatid (Forsteo[®]) verwendet. Bei Teriparatid handelt es sich um die N-terminalen 34 Aminosäuren des Parathormons.

Entsprechend ergibt sich bezüglich des Molekulargewichtes ein Wert von 4754 g/mol (Molmasse von 4754 => 1 M entspricht 4754 g Teriparatid).

Das von Lilly-Deutschland GmbH (Bad Homburg) gelieferte Produkt beinhaltet eine Ampulle Forsteo[®] mit einer Konzentration an Teriparatid von 20 µg / 80 ml (=>250 µg/ml). Bei dem Produkt handelte es sich um eine Injektionslösung in einem vorgefüllten Injektor in Na-Acetat-Puffer und mit m-Cresol 3,0 mg/ml als Konservierungsmittel.

2.3. Zellgewinnung:

Um die FGF-23-Expression und die osteoblastäre Differenzierung unter PTH-Exposition an humanen Knochenmarkzellen *in vitro* zu untersuchen, wurde Knochenmark von drei verschiedenen Spendern (Patienten A, B und C) verwendet. Das Knochenmark wurde mittels einer Jamshidi-Vakuumaspiration vom hinteren Beckenkamm gewonnen und mit ACDA-Lösung (*anticoagulant citrate dextrose solution formula A*) sowie 2000 i.E. Heparin/ml antikoagulatorisch versetzt. Alle Knochenmarkspender erfüllten die Ein- und Ausschlusskriterien zur primären Knochenmarktransplantation nach den aktuellen Richtlinien der Bundesärztekammer. Eine rechtskräftige Aufklärung und Einverständniserklärung der Spender lag vor. Bei allen drei Spendern erfolgte die Knochenmarkpunktion in der Orthopädischen Klinik des Universitätsklinikums in Düsseldorf. Das gewonnene Knochenmark wurde nach Entnahme für die anschließende Kultivierungs- und Expansionsphase aufbereitet.

Das Knochenmark wurde nach 1:1 Verdünnung mit PBS auf 10 ml Lymphozytenseparationsmedium (LSM) geschichtet, anschließend erfolgte eine Dichtegradientenzentrifugation bei 1800 rpm/20°C/20 Minuten (siehe Abb. 10).

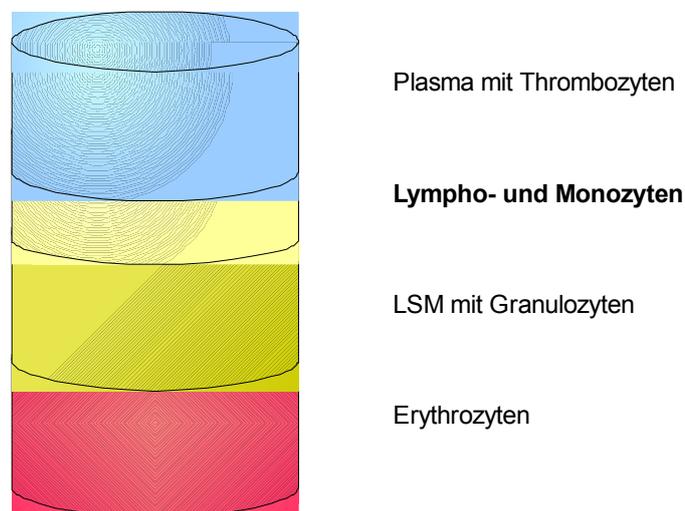


Abb. 10: Ergebnis der Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation diente dazu, das Knochenmark in die einzelnen Bestandteile zu separieren, um anschließend lediglich die Lymphozytenschicht abzupipettieren. Nach der Zentrifugation zeigen sich insgesamt 4 verschiedene Schichten (Plasma mit Thrombozyten, Lympho- und Monozyten, LSM mit Granulozyten, Erythrozyten).

Die Lymphozytenschicht wurde abpipettiert, in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert (1800 rpm/20°C/5min). Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet mit 20 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (1800 rpm/20°C/5min). Im Anschluss an den letzten Zentrifugationszyklus wurde nach Dekantierung das Zellpellet mit 7 ml Min-Medium (siehe unten) resuspendiert und in eine T25-Kulturflasche überführt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank (Binder, Deutschland) bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Während der Kultivierung und Expandierung der Zellen wurde das Medium zweimal wöchentlich gewechselt, wobei die noch nicht adhärenen Zellen per Zentrifugation (1800 rpm/20°C/5min) sedimentiert, das Zellpellet mit 7 ml Medium resuspendiert und in eine T23-Kulturflasche überführt wurde. Nach erfolgreicher Kultivierung wurden die konfluenten Zellen nach 14 Tagen Kulturdauer trypsinisiert. Hierfür wurden die Zellen zweimal mit jeweils 5 ml PBS gewaschen und anschließend mit je 3 ml / T25 Kulturflasche Trypsin-EDTA im Brutschrank bei 37°C/5 % CO₂ für 8 Minuten inkubiert. Mikroskopisch wurde das vollständige Ablösen der Zellen vom Kulturflaschenboden überprüft und gegebenenfalls noch adhärenente Zellen mittels eines sog. Zellschabers mechanisch abgelöst. Das Trypsin wurde durch die Zugabe von 3 ml Medium (DMEM) inaktiviert, die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (1800 rpm/20°C/5min). Nach Dekantierung des Überstandes und Resuspension mit 1 ml PBS wurden die Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt, anschließend noch einmal mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (1800 rpm/20°C/5min). Nach Dekantierung und Resuspendierung wurden sind die Zellen in definierter Zellzahl (5000 Zellen/cm²) in größere Kulturflaschen überführt. Der Mediumwechsel erfolgte weiterhin zweimal pro Woche. Während des Mediumwechsels wurde das Zellwachstum per Lichtmikroskopie kontrolliert.

2.4. OSTEO-Differenzierung / -Medium

Aufgrund der Zielsetzung, neben der FGF-23 Expression ebenfalls die osteoblastäre Differenzierung unter PTH-Exposition zu untersuchen, war es notwendig, ein Medium zu verwenden, welches in den humanen Knochenmarkzellen die Entwicklung zu reifen Osteoblasten induziert.

Als Grundmedium diente mit 30% FCS versetztes DMEM (Low Glucose), welchem neben P/S/G noch Ascorbinsäure-2-phosphat, β-Glycerolphosphat und Dexamethason für die osteoblastäre Differenzierung zugefügt wurden⁶⁵.

MIN-Medium (30% FCS)

35 ml DMEM (Low Glucose)

15 ml FCS

500 µl Penicillin/Streptomycin/Glutamin (finale Konzentration: Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml, Glutamin 2mM)

Zusätze:

50 mM Ascorbic-Acid-2-phosphat

β-Glycerolphosphat

Dexamethason

Für den Versuch wurden pro Knochenmark 3 x 24-Well Platten und 3 x T175 Kulturflaschen für 3 verschiedene PTH-Konzentrationen verwendet.

Mediumansatz:

| | |
|---------|-------------------------------|
| 66,6 ml | DMEM (Low Glucose) + 30% FCS |
| 66 µl | Ascorbinsäure-2-phosphat |
| 1,3ml | β-Glycerolphosphat |
| 666µl | Dexamethason 10 ⁻⁵ |
| 666µl | P/S/G |

Die Gesamtmenge von 69,3 ml wurde vor jedem Mediumwechsel neu angesetzt und die entsprechenden PTH-Konzentrationen von 10 pmol/l und 100 pmol/l beigefügt. Die hierfür notwendigen Mengen an Teriparatid wurden anhand der Gesamtmenge an Medium, des Molekulargewichtes von Teriparatid, der in der Ampulle vorhandenen und der zu erzielenden Konzentration Teriparatids im endgültigen Medium rechnerisch ermittelt.

Medium mit 10pmol/l PTH-Konzentration:

Teriparatid: 4754 g/mol Forsteo^R: 250 µg/ml

=> 0,0132 µl bzw. 132 µl einer 1:10 Verdünnung ad 69,3 ml Medium

Medium mit 100pmol/l PTH-Konzentration:

=> 0,132 µl ad 69,3 ml Medium

Die pro PTH-Konzentration angesetzten 69,3 ml wurden jeweils auf eine 24-Well Platte (24 ml => 1 ml/Well) und eine T175-Kulturflasche (40 ml) verteilt.

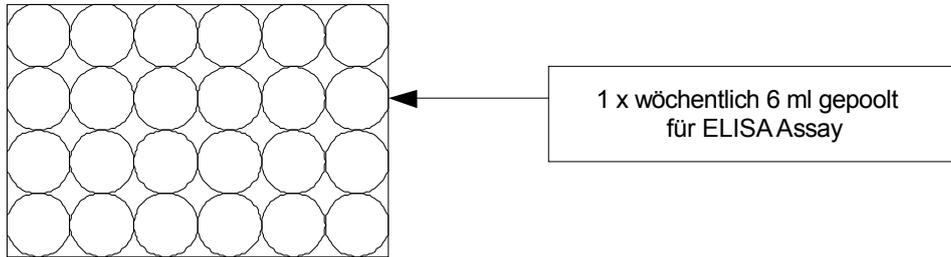
2.5. Versuchsansatz

Für das Ansetzen des Versuches mit jeweils drei 24-Well Platten und drei T175-Kulturflaschen wurde pro Ansatz eine Zellzahl von $2,93 \times 10^6$ Zellen verwendet (Aussaat 5000 Zellen/cm²). Nach der Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen entsprechend der Zellzahl so resuspendiert, dass sich eine Zellmenge von 1×10^6 Zellen/ml ergab. Diese Zellsuspension wurde dann entsprechend der gewünschten Zellzahlen zum Medium hinzugegeben, für die 24-Well Platten 228 µl zu 24 ml Medium (entspricht 228.000 Zellen/24 ml) und für die T175-Kulturflaschen 766 µl zu 40 ml Medium (entspricht 766.000 Zellen/40 ml). Im Anschluss erfolgte die Verteilung auf die jeweiligen Platten und Kulturflaschen sowie die Kultivierung im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂. Der Mediumwechsel erfolgte zweimal wöchentlich, wobei einmal pro Woche die Zellkulturen bei 10facher und 20facher Vergrößerung in der Durchlichtmikroskopie für eine morphologische Analyse fotodokumentiert wurden.

Ebenfalls wurden einmal wöchentlich die Zellkulturüberstände gepoolt für die später durchzuführenden ELISAs und Calcium- / Phosphatmessungen gesammelt. Dies erfolgte bei den 24-Well Platten jede Woche aus der gleichen Reihe (siehe Abb. 11).

Kultivierung für Immunzytochemie und ELISA

Platte



Kultivierung für PCR und Calcium/Phosphat-Messung

Flasche

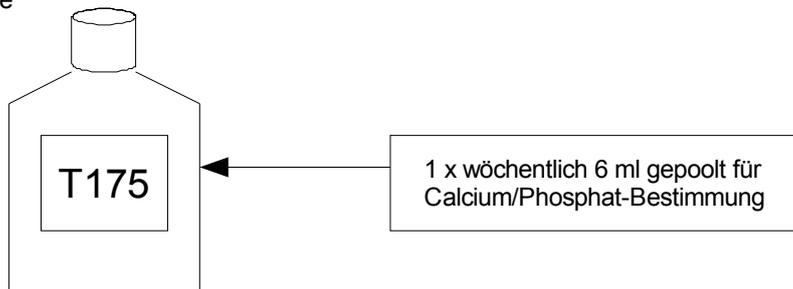


Abb. 11: Gepooltes Sammeln von Zellkulturüberständen
Einmal wöchentlich wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und für die später durchzuführenden Versuche (ELISA, Calcium/Phosphat-Messung) aufbewahrt. Das gepoolte Sammeln der Überstände erfolgte bei den 24-Well-Platten jede Woche aus der gleichen Reihe.

2.6. Versuchsende:

Nach einer Kultivierungsdauer von 30 Tagen wurde der Versuch beendet. Hierbei wurden die Zellen erneut bei lichtmikroskopisch 10facher und 20facher Vergrößerung fotografiert und die Zellkulturüberstände erneut gesammelt.

Die zellbesiedelten 24-Well Platten wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten mit 4 % PFA fixiert. Im Anschluss daran wurden sie dreimal mit *Aqua dest.* gewaschen und nach Zugabe von 1 ml PBS pro Well bei 4°C im Kühlschrank bis zur immunzytochemischen Färbung über Nacht aufbewahrt.

Die zellbesiedelten T175-Kulturflaschen wurden zweimal mit je 30 ml PBS gewaschen und trypsinisiert. Das Zellpellet wurde nach der letzten Zentrifugation in 350 µl RLT-Puffer aufgenommen und bei -80°C gelagert.

2.7. Immunzytochemie:

Immunzytochemische Färbungen dienen neben der Detektion von FGF-23 dem Nachweis der Osteoblastenmarker Osteocalcin und RANKL, des Osteoklastenmarkers RANK sowie CD34 und CD105.

Für die Durchführung wurden die zellbesiedelten 24-Well Platten bei Beendigung der Kultivierungsphase zweimalig mit PBS gewaschen und für 5 Minuten in 0,3 % H₂O₂ / PBS inkubiert, um die endogene Peroxidase zu eliminieren. Anschließend wurde mit PBS gewaschen und die Platten mit den verdünnten Primärantikörpern (siehe unten) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einem PBS-Spülgang wurde der jeweilige spezifische Sekundärantikörper hinzugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach einem erneuten Waschschriff mit PBS wurde der AB-Komplex mit HRP für eine Stunde bei RT zugegeben. Zur Darstellung der AG-AK-Bindung wurde nach einem weiteren Waschschriff mit PBS das Substrat DAB zugesetzt. Die Farbreaktion wurde nach 2 Minuten gestoppt und anschließend eine Haemalaun-Gegenfärbung durchgeführt (siehe Abb. 12, Tabelle 3).

Für semiquantitative Analysen der Proben mittels Lichtmikroskopie (40fache Vergrößerung) wurde das folgende Punktesystem verwendet: negativ (-), weniger als 10 positive Zellen (+), 10 – 50 positive Zellen (++), mehr als 50 positive Zellen (+++).

Antikörperverdünnungslösung:

PBSTA: bestehend aus PBS mit 0,1% Triton X 100 und 2% Albumin.

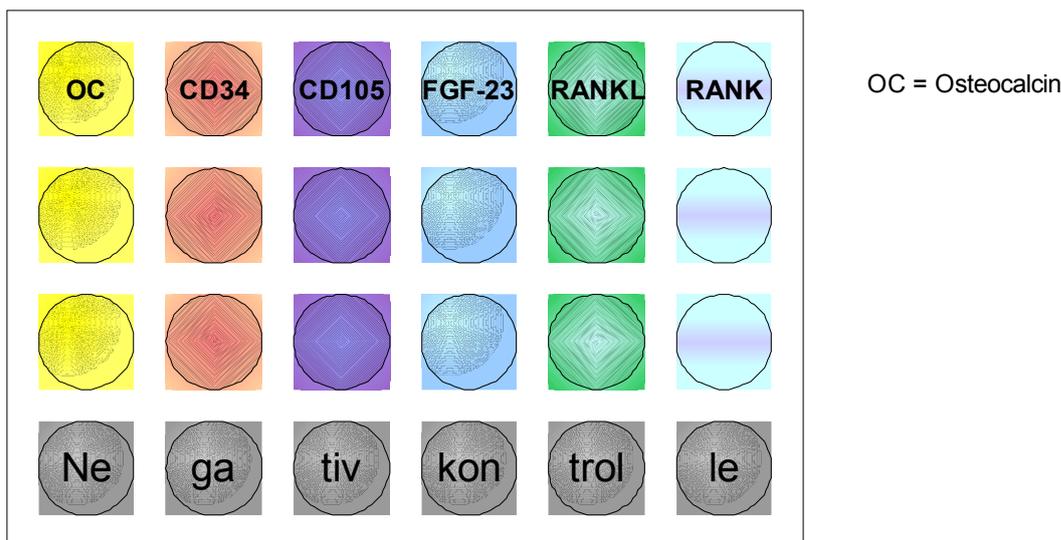


Abb. 12: Immunzytochemische Färbungen

In der Immunzytochemie wurden verschiedene Marker untersucht (OC, CD34, CD105, FGF-23, RANKL, RANK). Hierzu wurden die 24-Well-Platten mit entsprechenden Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert und die Antigen-AK-Reaktion mittels einer Farbreaktion dargestellt. Die unterste horizontale Reihe der 24-Well-Platten diente als Negativkontrolle, weshalb dort kein 1. AK, sondern nur das entsprechende IgG hinzugegeben wurde.

| | | | | | | |
|--------------------------|---------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| Antikörper | Osteocalcin | CD34 | CD105 | FGF-23 | RANKL | RANK |
| Spezies | Goat | Mouse | Mouse | Goat | Rabbit | Goat |
| Hersteller | Santa Cruz | DAKO | DAKO | Santa Cruz | Santa Cruz | Santa Cruz |
| Arbeitsverdünnung | 1:200 / PBSTA | 1:20 / PBSTA | 1:20 / PBSTA | 1:250 / PBSTA | 1:100 / PBSTA | 1:250 / PBSTA |

Tabelle 3: Verwendete AK und Arbeitsverdünnungen für die Immunzytochemie

2.7.1. Osteocalcin:

Osteocalcin (OC), auch als *bone carboxylglutamic acid-containing-protein* (BGP) bezeichnet, stellt das häufigste nicht-kollagene Protein des Knochens dar⁵⁷. Es ist ein Protein von 5,8kDa, das sich aus 49 AS zusammensetzt⁶⁶, in der Primärstruktur drei γ -Carboxyglutaminsäurereste aufweist⁶⁶ und einen Anteil von 2% am totalen Knochenprotein hat⁶⁷. Die Synthese des Osteocalcins erfolgt in Osteoblasten und Odontoblasten, ist ein von Vitamin D stimulierter Prozess und ist ferner ein Vitamin K-abhängiger Vorgang⁶⁸. Ungefähr 80% des synthetisierten Osteocalcins werden im Anschluss in der Knochenmatrix eingelagert^{69, 70}.

Die Funktion des Osteocalcins ist nicht vollständig geklärt, aber es wird vermutet, dass es mittels seiner γ -Carboxyglutaminsäurereste direkt mit dem Hydroxylapatit des Knochens interagiert und möglicherweise dessen Bildung induziert⁷¹.

Da Osteocalcin während der Knochenneubildung freigesetzt wird, gilt das Protein als sensibler und spezifischer Marker der Osteoblasten-Funktion und der Osteoid-Mineralisation^{69, 72}.

2.7.2. RANKL / RANK

RANK (*rezeptor activator of NF- κ b*) und RANKL (RANK-Ligand) gehören zu der Familie der TNF/TNF-Rezeptoren⁷³. RANK wird von Osteoklastenvorläuferzellen exprimiert und bindet das von Osteoblasten, Stromazellen und T-Lymphozyten gebildete RANKL¹⁷. Die Interaktion von RANKL mit seinem Rezeptor führt durch die eintretende Stimulierung von RANK zu einer terminalen Differenzierung und Aktivierung der Osteoklastenvorläuferzellen zu Osteoklasten¹⁷.

Die RANKL-Expression der Osteoblasten wird durch Parathormon gesteigert¹⁷. Um ein ausgeglichenes Verhältnis bezüglich der Osteoklastenaktivierung zu erhalten, ist ein Gegenspieler für die RANKL-Wirkung notwendig, Osteoprotegerin, welches ebenfalls von Osteoblasten sezerniert wird^{74, 75}. Es bindet kompetitiv RANK und verhindert so die Aktivierung durch RANKL. Für das Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und Knochenabbau ist ein ausgewogenes Verhältnis von RANKL / Osteoprotegerin notwendig^{76, 77}.

2.7.3. CD34 / CD105

CD34 und CD105 (CD = *cluster of differentiation*) stellen Oberflächenmoleküle an der Plasmamembran verschiedener Zellen dar.

CD34 wird von hämatopoetischen Zellen exprimiert, synonym auch als gp105-120 bezeichnet und hat eine Größe von 105-120 kDa⁷⁸. Seine Funktion ist noch weitestgehend unbekannt, vermutet wird eine Beteiligung im Bereich der Zelladhäsion und der Hemmung der Hämatopoese⁷⁸.

CD105, auch als Endoglin bezeichnet, setzt sich zusammen aus zwei 95 kDa Untereinheiten, die über zwei Disulfidbrücken verbunden sind⁷⁹. Es ist ein Marker für mesenchymale Zellen und wird zellulär ebenfalls von Endothelzellen exprimiert. Es fungiert als Rezeptor für TGF- β 1 und TGF- β 3^{80, 81}.

2.8. Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA):

ELISA stellt ein immunologisches Nachweisverfahren dar. Antigen-Antikörper-Reaktionen werden mittels enzymvermittelter Farbreaktionen nachgewiesen und erlauben die quantitative Erfassung von Konzentrationen an Proteinen, Hormonen, Tumormarkern, Viren oder Pharmaka in einer zu untersuchenden Probe.

Für die Arbeit wurden drei verschiedene ELISAs durchgeführt. Neben FGF-23 wurden ebenfalls der Osteoklastenmarker TRAP5b und der Osteoblastenmarker Ostase mittels dieser Methode bestimmt. Grundlage aller drei Untersuchungen waren photometrische Messungen eines enzymvermittelten Substratumsatzes, der Ausdruck der stattgefundenen Antigen-Antikörper-Reaktion war. Neben der Probe wurden ebenfalls immer auch Standard und Kontrollen in die Durchführung mit einbezogen. Mit Hilfe der Ergebnisse der Standardlösung wurde mit den ermittelten Extinktionswerten eine Standardkurve erstellt (y-Achse: Extinktion, x-Achse: Konzentration des Antigens). Die gesamten Untersuchungen erfolgten im Dreifachansatz. Aus den Ergebnissen der Proben wurden Mittelwerte gebildet, die mit Hilfe der Standardkurve in zugrunde liegende Konzentrationen umgerechnet werden konnten.

2.8.1. FGF-23:

Der Nachweis von FGF-23 erfolgte über einen Sandwich-ELISA, bei dem zwei verschiedene Antikörper verwendet wurden, die an unterschiedlichen Stellen des Antigens binden. Der erste der beiden Antikörper, auch *coating-AK* genannt, ist hierbei fest an das Well der Mikrotiterplatte gebunden. Nach Inkubation der zu testenden Probe, der Standard- und Kontrolllösung in den Wells wird, nach Waschung der Platte zum Entfernen überschüssigen Materials, der zweite AK (*detection-AK*) hinzugegeben, an dessen Ende ein Enzym gebunden ist. Erneute Inkubation und Waschung folgen. Nach Zugabe eines entsprechenden Substrates, das von dem Enzym umgesetzt wird, kann diese Reaktion über photometrische Messungen zu einer Konzentrationsbestimmung des Antigens in der untersuchten Probe herangezogen werden.

Im Falle des FGF-23-ELISAs handelte es sich bei dem Beschichtungs-AK um einen AK, der den C-terminalen Teil von FGF-23 bindet, wohingegen der Nachweis-AK N-terminal ansetzte. Als Enzym wurde Meerrettichperoxidase (HRP) verwendet, welcher als Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) diente. Photometrische Messungen wurden gemäß Herstellerangaben sowohl bei 620 nm und 450 nm durchgeführt.

2.8.2. TRAP5b

Bei der TRAP handelt es sich um eine eisenhaltige Phosphorylase, die mindestens 5 Isoenzyme einschließt, welche typischerweise in Prostata, Knochen, Thrombozyten, Erythrozyten und Milz vorkommen^{82, 83}. Die Isoform 5a besteht aus einer Polypeptidkette von 35kDa und wird von Makrophagen und dendritischen Zellen sezerniert^{84, 85}. Sie macht 90% der im humane Blut zirkulierenden TRAP aus und zeigt ein *pH*-Optimum bei einem *pH*-Wert von 5,2^{85, 86}. Die Isoform 5b besitzt weitere 2 Untereinheiten von 16 und 23kDa mit einem *pH*-Wert-Optimum bei 5,8^{84, 85}. Gebildet wird sie von Makrophagen und Osteoklasten. Da Makrophagen lediglich eine inaktive Form der TRAP5b sezernieren, reflektiert die Aktivität der TRAP5b gut die Anzahl bzw. Aktivität von Osteoklasten. Die Funktion der TRAP5b liegt in einer Beteiligung bei der Knochenresorption. Osteoklasten sezernieren Enzyme wie beispielsweise Kathepsin K zum Matrixabbau in die Resorptionslakunen⁸⁷. Die Matrixbestandteile werden im Anschluss zusammen mit Kathepsin K zur Transzytose endozytiert⁸⁷. In den Osteoklasten fusionieren nun TRAP-haltige Vesikel mit den Transzytosevesikeln, wodurch TRAP über Abspaltung eines Polypeptids durch Einwirken von Kathepsin K zu TRAP5b aktiviert wird⁸⁷. Mittels TRAP5b werden Sauerstoffmetabolite regeneriert, die den terminalen Abbau der Matrixbestandteile bewirken⁸⁷. Der Vesikelinhalt wird an der basolateralen Seite der Osteoklasten ans Blut abgegeben, wo TRAP5b inaktiviert und in Plasma und Leber mittels Proteinasen metabolisiert wird.

Aufgrund seiner Funktion kann TRAP5b als Marker der Knochenresorption, der Progressionsrate metabolischer Knochenerkrankungen und als Osteoklastenmarker angesehen werden⁸⁸.

Die Mikrotiterplatte für den TRAP5b-ELISA war beschichtet mit Anti-TRACP-AK (Maus). Neben den Proben, der Standard- und Kontrolllösungen wurde weiterhin Freisetzungsgrenz in die Wells pipettiert, um eine Dissoziation der TRAP5b von Bindungsproteinen und so eine Bindung an die AK zu ermöglichen. Nach Inkubation und Waschung der Platte erfolgte die Zugabe von para-Nitrophenylphosphat (pNPP) als Substrat, welches von der freigesetzten Phosphorylase enzymatisch umgesetzt wurde. Es folgte eine weitere Inkubation bevor die Reaktion mit NaOH gestoppt wurde. Die photometrische Auswertung wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm nach Herstellerangaben vollzogen.

2.8.3. Ostase

Ostase, auch *bone alkaline phosphatase* (BAP) genannt, ist ein knochenspezifisches Isoenzym der alkalischen Phosphatase (AP). Es gibt mehrere Formen der AP, deren Informationen von insgesamt vier Genen kodiert werden⁸⁹. Unterschieden werden können eine nichtgewebsspezifische Phosphatase, aus der durch posttranslationale Modifikation Leber-AP, Knochen-AP und Nieren-AP entstehen, Darm-AP, Plazenta-AP und Keimzellen-AP⁹⁰. Bei der Ostase handelt es sich um ein von Osteoblasten synthetisiertes tetrameres Glykoprotein, das über einen carboxyterminalen Glykophosphatidylinositolanker an der Zellmembran der Osteoblasten befestigt ist⁹¹. Über eine Phospholipase wird sie als Homodimer aus der Membran freigesetzt und ins Blut abgegeben, wobei der Serumspiegel den metabolischen Osteoblastenstatus widerspiegelt⁸⁹.

Im Falle des Ostase-Nachweises wurden Proben sowie Standard- und Kontrolllösungen in die Wells hinzupipettiert, welche Anti-BAP-AK enthielten. Als Substrat diente nach Inkubation und Waschung pNPP, dessen enzymatische Umsetzung durch die Ostase nach erneuter Inkubation und Beendigung der Reaktion mit NaOH bei 405 nm nach Herstellerangaben photometrisch bestimmt wurde.

2.9 RNA-Isolation mittels Qiuagen RNA-Isolations-Kit:

Um verschiedenste osteoklastäre und osteoblastäre Syntheseprodukte auf molekularer Ebene nachzuweisen, sollte eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt werden. Hierzu musste zu Beginn die in den Knochenmarkzellen enthaltene RNA isoliert werden.

Das bei Versuchsende aus den Kulturflaschen gewonnene Zellpellet wurde zunächst in 350 µl RLT-Buffer aufgenommen und resuspendiert. Im Anschluss wurde die Probe nach Herstellerangaben auf QIAshredder pipettiert, für 2 Minuten (min) bei 1300 rpm und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert und 350 µl 70%igen Ethanol zum Lysat hinzugegeben. Eine Durchmischung dieser Lösung erfolgte mittels mehrmaligem Pipettieren. Die nun 700 µl umfassende Probe wurde im Verlauf auf eine RNeasy-Säule pipettiert und für 15 Sekunden (sec) bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Danach wurden zusätzlich 350 µl RW1-Buffer auf die RNeasy-Säulen pipettiert, eine erneute Zentrifugation für 15 sec bei 10000 rpm durchgeführt und der Durchfluss abermals verworfen. Im Anschluss wurden 10 µl DNase I und 70 µl RDD-Buffer gemischt, auf die Membran pipettiert und für 15 min bei RT inkubiert. Erneut wurden 350 µl RW1-Buffer auf RNeasy-Säulen pipettiert und für 15 sec bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss und das Sammelröhrchen wurden verworfen und die RNeasy-Säule in ein neues 2 ml Sammelgefäß gesetzt. Im Anschluss wurden 500 µl RPE-Buffer auf die RNeasy-Säule pipettiert. Es erfolgte eine wiederholte Zentrifugation bei 10000 rpm für 15 sec, gefolgt von einem Verwerfen des Durchflusses. Dieser Vorgang wurde einmalig mit 500 µl RPE-Buffer wiederholt, diesmal zusätzlich das Sammelröhrchen verworfen und die RNeasy-Säulen in ein neues 2 ml Sammelgefäß gesetzt. Eine fünfminütige Zentrifugation bei 13000 rpm und RT mit offenen Deckeln folgte, um die Membranen zu trocknen. Die RNeasy-Säule wurde in ein neues 1,5 ml Tube gesetzt, 50 µl RNase-freies Wasser hinzugegeben und das Gemisch für 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Nach Zugabe von 1 µl RNasin zu 50 µl Eluat erfolgte die RNA-Konzentrationsbestimmung aus einer 1:10 Verdünnung. Ein Gemisch aus 10 µl RNA und 90 µl RNase-freiem Wasser wurde für die anschließende PCR aufgehoben.

2.10. RT-Polymerase-Kettenreaktion (PCR):

Die isolierte RNA wird zunächst in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels PCR amplifiziert.

PCR stellt ein Verfahren dar, das es ermöglicht Nukleinsäure-Fragmente in vitro zu amplifizieren. Eine Standard-PCR erlaubt dabei das Kopieren von bis zu 3.000 Basenpaaren (3 kbp) langer DNA-Fragmente. Die Verwendung bestimmter Polymerase-Gemische und Additive sowie optimale Bedingungen hingegen machen eine Vervielfältigung von Fragmenten der Länge 20-40 kbp möglich.

Die PCR in ihrem gesamten Umfang umfasst mehrere sich wiederholende Zyklen, wobei jeder Zyklus aus Denaturierung, Anheftung von Oligonukleotiden und der Extension zu neuen Doppelsträngen besteht. Für die Denaturierung wird die doppelsträngige DNA auf ca. 90°C erhitzt (*anealing*), um über Auslösung der Wasserstoffbrückenbindungen die beiden Stränge voneinander zu trennen. Im Anschluss an die Auftrennung des Doppelstranges erfolgt eine Abkühlung des Gemisches auf 15°C, was für eine Anlagerung der Primer, bestehend aus 15-20 komplementärer Basen, zwingende Voraussetzung ist. Die Zugabe von DNA-Polymerase und Desoxyribonucleotiden führt im Anschluss an die Primeranlagerung zu einer Neuproduktion von zu den Einzelsträngen komplementären Nukleinsäuresequenzen. Von entscheidender Bedeutung für den Gesamtprozess ist die Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase, die bei Hitze nicht denaturiert wird. Hierzu dient eine taq-Polymerase aus thermophilen Bakterien (*Thermus aquaticus*). Bei mehrfacher Wiederholung dieses Zyklus erfolgt eine exponentielle Zunahme an amplifizierter DNA. Die entstandenen PCR-Produkte werden im Anschluss mittels Agarose-Gelelektrophorese anhand ihrer Größe identifiziert. Es handelt sich hierbei um ein Verfahren, bei dem DNA in ein Agarose-Gel überführt und mit Hilfe angelegter Spannung zur Bewegung gebracht wird, wobei sich die kürzeren Stränge schneller als die längeren in Richtung des Pluspols bewegen. Die Länge der untersuchten Produkte wird über einen Vergleich mit einer parallel zur Probe laufenden DNA-Leiter, die Fragmente bekannter Größe beinhaltet, ermittelt.

Im Hinblick auf die Fragestellung dieser Arbeit diente die PCR dem Nachweis der Expression von Osteocalcin, RANKL, CD34, CD105, TRAP und Runx-2.

Quiagen OneStep RT-PCR Kit (Cat. No. 210212)

| | Primer | Größe in bp |
|----------|---------------|--------------------|
| 1 | GAPDH | 755 |
| 2 | OC | 209 |
| 3 | RANKL | 354 |
| 4 | CD34 | 265 |
| 5 | CD105 | 498 |
| 6 | TRAP5b | 298 |

Mastermix für 21Tubes

| | |
|---------------------|---------------|
| Rnasin 1:4 | 23 µl |
| Enzym-MIX | 23 µl |
| dNTP-Mix 10mM | 23 µl |
| 5 x RT-PCR-Buffer | 115 µl |
| 5 x Q-Solution | 115 µl |
| Rnase-freies Wasser | 207 µl |
| Gesamt | 506 µl |

| RNA | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | K |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Mastermix | 22 µl |
| 3' Primer 20 pmol | 1 µl |
| 5' Primer 20 pmol | 1 µl |
| RNA | 1 µl | -- |
| Endvolumen | 25 µl |

Tabelle 4: Durchführung der PCR für die Marker OC, RANKL, CD34, CD105 und TRAP5b

Quiagen OneStep RT-PCR Kit (Cat. No. 210212)

| | Primer | Größe in bp |
|----------|---------------|--------------------|
| 1 | GAPDH | 755 |
| 2 | RANKL | 354 |
| 3 | Runx-2 | 452 |

Mastermix für 21Tubes

| | |
|---------------------|---------------|
| Rnasin 1:4 | 40 µl |
| Enzym-MIX | 40 µl |
| dNTP-Mix 10mM | 40 µl |
| 5 x RT-PCR-Buffer | 200 µl |
| 5 x Q-Solution | 200 µl |
| Rnase-freies Wasser | 360 µl |
| Gesamt | 880 µl |

| RNA | 1 | 2 | 3 | K |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|
| Mastermix | 22 µl | 22 µl | 22 µl | 22 µl |
| 3' Primer 20 pmol | 1 µl | 1 µl | 1 µl | 1 µl |
| 5' Primer 20 pmol | 1 µl | 1 µl | 1 µl | 1 µl |
| RNA | 1 µl | 1 µl | 1 µl | -- |
| Endvolumen | 25 µl | 25 µl | 25 µl | 25 µl |

Tabelle 5: Durchführung der PCR für die Marker RANKL und Runx-2

2.10.1. Runx-2

Runt related transcription factor 2 (Runx-2) ist ein typischer und osteoblastenspezifischer Transkriptionsfaktor, der für die osteoblastäre Differenzierung von Bedeutung ist⁹². Er trägt zur Umwandlung mesenchymaler Vorläuferzellen zu Osteoblasten bei⁹².

2.11. Calcium- und Phosphat-Messung

Die Calcium- und Phosphat-Messungen wurden mit Hilfe eines Spektralphotometers durchgeführt. Cresolphthalein-Complexon reagiert dabei mit Calcium zu einem rot-violetten Farbstoff, während für die Phosphatbestimmung Ammoniummolybdat, Schwefelsäure und Phosphat zu einem anorganischen Phosphormolybdat-Komplex reagieren. Beide Reaktionen können im Anschluss photometrisch gemessen und quantifiziert werden.

Phosphat FS (flüssig stabil):

| | |
|----------------------------|-----------------------|
| Reagenz 1 => Glycin-Puffer | 50 mmol/l |
| Schwefelsäure | |
| Detergenz | |
| Reagenz 2 => Glycin-Puffer | 50 mmol/l |
| Ammoniummolybdat | 0,4 mmol/l |
| Standard (Phosphor) | 5 mg/dl (1,61 mmol/l) |

Calcium CPC FS

| | |
|--|-----------------------|
| Reagenz 1 => Ethanolamin <i>pH</i> 10,7 | 600 mmol/l |
| Detergenzien | |
| Reagenz 2 => 2-Cresolphthalein-Complexon | 0,06 mmol/l |
| 8-Hydroxychinolin | 7 mmol/l |
| Salzsäure <i>pH</i> 1,1 | 20 mmol/l |
| Standard | 10 mg/dl (2,5 mmol/l) |

Tabelle 6: verwendete Reagenzien für die Calcium/Phosphat-Messungen

Cresolphthalein-Complexon (CPC) reagiert mit Calcium, dessen Extinktion bei einer Wellenlänge von 570 nm liegt. Das ebenfalls enthaltene Hydroxychinolin dient der Elimination even-

tuell vorhandener Magnesiummoleküle, die die Reaktion von Calcium und CPC stören würden.

Phosphat bildet zusammen mit Ammoniummolybdat und Schwefelsäure einen anorganischen Phosphormolybdat-Komplex, der bei 340 nm ein Absorptionsmaximum aufweist.

Die zu untersuchenden während der Kultivierungsphasen gepoolt gesammelten Proben werden in einem Mikrotiterplatten-Ansatz gegen einen Leerwert und den Standard gemessen. Zuerst erfolgt die Zugabe des ersten Reagenz mit anschließender Extinktionsbestimmung (E1). Danach wird Reagenz 2 hinzugegeben und eine erneute Extinktionsmessung (E2) durchgeführt.

Phosphatmessung:

| Well Lösung | Leerwert (Aqua dest.) | Standard | Probe |
|---|--------------------------|----------|--------|
| | 2 µl | 2 µl | 2 µl |
| R1 | 160 µl | 160 µl | 160 µl |
| E1 : Extinktion nach 5 Minuten bei 340 nm messen | | | |
| R2 | 40 µl | 40 µl | 40 µl |
| E2 : Extinktion nach 10 Minuten bei 340 nm messen | | | |

Calciummessung:

| Well Lösung | Leerwert (Aqua dest.) | Standard | Probe |
|---|--------------------------|----------|--------|
| | 4 µl | 4 µl | 4 µl |
| R1 | 200 µl | 200 µl | 200 µl |
| E1 : Extinktion nach 5 Minuten bei 570 nm messen | | | |
| R2 | 50 µl | 50 µl | 50 µl |
| E2 : Extinktion nach 10 Minuten bei 570 nm messen | | | |

Tabelle 7: Durchführung der Calcium/Phosphatmessung

Mittels der bestimmten Extinktionen kann die in den Proben vorliegende Calcium- bzw. Phosphatkonzentration rechnerisch ermittelt werden.

Extinktion Probe und Standard : E2 - E1

Extinktion Leerwert : E2 - E1

Probe – Leerwert = ΔE Probe

Standard – Leerwert = ΔE Standard

Phosphat: $(\Delta E \text{ Probe} / \Delta E \text{ Standard}) \times \text{Konzentration Standard} = \text{Phosphor mg/dl}$

Phosphor mg/dl $\times 0,3229 = \text{Phosphor mmol/l} = \text{Phosphat mmol/l}$

Phosphor mg/dl $\times 3,06619 = \text{Phosphat mg/dl}$

Calcium: $(\Delta E \text{ Probe} / \Delta E \text{ Standard}) \times \text{Konzentration Standard} = \text{Calcium mg/dl}$

Calcium mg/dl $\times 0,2495 = \text{Calcium mmol/l}$

(Angaben gemäß Herstellerinformation)

Der Messbereich der Calciumbestimmung beläuft sich auf einen Bereich von 0,2 – 20 mg/dl (0,05 – 5,0 mmol/l). Bei Überschreitung muss die Probe 1:1 mit 0,9% NaCl verdünnt und das Ergebnis mit 2 multipliziert werden. Für Phosphat liegt der entsprechende Bereich zwischen 0,2 – 30 mg/dl (0,065 – 9,69 mmol/l). Liegen höhere Werte vor, wird ebenfalls mit 0,9% NaCl (1:10) verdünnt und mit 10 multipliziert.

3. Ergebnisse

3.1. Immunzytochemie:

In der immunzytochemischen Untersuchung wurden neben FGF-23 auch die Osteoblastenmarker Osteocalcin und RANKL, der Osteoklastenmarker RANK sowie die Oberflächenmoleküle CD34 (hämatopoetische Vorläuferzellen) und CD105 (Marker für mesenchymale Stammzellen) bestimmt.

Anhand dieses Versuches war es möglich herauszufinden, ob der entsprechende Marker auf Proteinebene in den Zellen vorhanden war.

Osteocalcin ist in diesem Zusammenhang in allen 3 Patienten-Knochenmark nachweisbar und lässt rein qualitativ keinen Unterschied hinsichtlich der PTH-Konzentration erkennen (siehe Abb. 13).

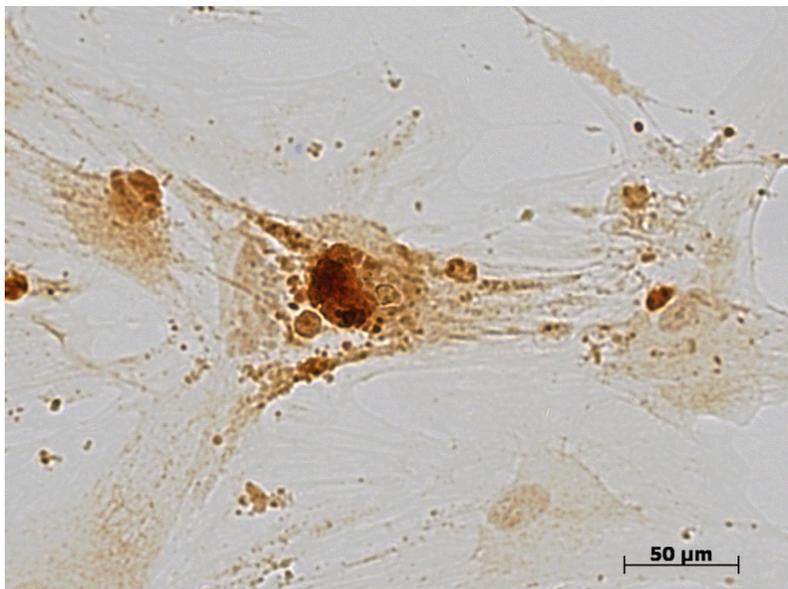


Abb. 13: immunzytochemische Färbung des Osteoblastenmarkers Osteocalcin.
Osteocalcin war bei allen 3 Spendern immunzytochemisch nachweisbar. Es ließ sich kein Unterschied bzgl. der PTH-Konzentration erkennen.
Hier dargestellt die Färbung für Patient C und ohne Verwendung von PTH.

Auch für RANK ist eine ähnliche Tendenz zu erkennen. Mittels des immunhistochemischen Verfahrens ist eine positive Reaktion bei allen drei Patienten detektierbar, jedoch ist dies auch hierbei ohne erkennbaren Einfluss der verschiedenen PTH-Zugaben (siehe Abb. 14).

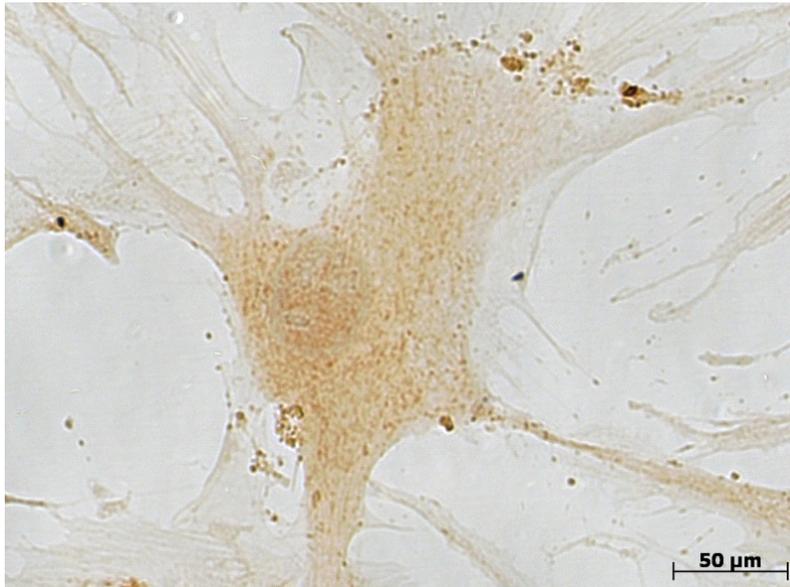


Abb. 14: immunzytoschemische Färbung des Osteoklastenmarkers RANK.
RANK war bei allen 3 Spendern immunzytochemisch nachweisbar. Es ließ sich kein Unterschied bzgl. der PTH-Konzentration erkennen.
Hier dargestellt die Färbung für Patient C und ohne Verwendung von PTH.

Der Osteoblastenmarker RANKL verhält sich ebenfalls übereinstimmend zu den vorher beschriebenen Markern. In allen untersuchten Knochenmarkszellen der drei Spender konnte RANKL nach einer in vitro-Stimulation mit DAG über 30 d nachgewiesen werden, erneut unabhängig von der verwendeten PTH-Konzentration (siehe Abb. 15).

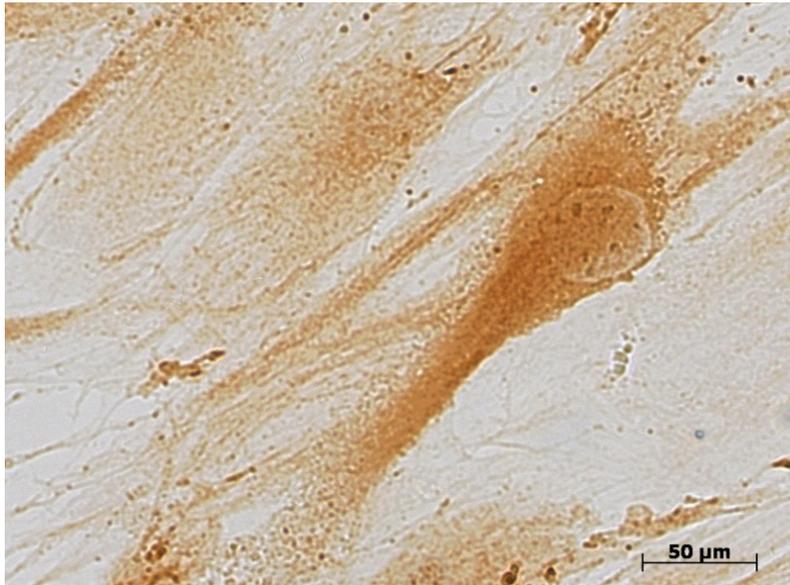


Abb. 15: immunzytochemische Färbung des Osteoblastenmarkers RANKL.
RANK war bei allen 3 Spendern immunzytochemisch nachweisbar. Es ließ sich kein Unterschied bzgl. der PTH-Konzentration erkennen.
Hier dargestellt die Färbung für Patient C und 10 pmol/l PTH.

Gleichartige Resultate finden sich auch für den Endothelzellmarker CD105. Parallel zu den bereits beschriebenen Markern zeigt sich eine positive Reaktion für alle drei Patienten, abermals ohne erkennbaren Einfluss von PTH (siehe Abb. 16).

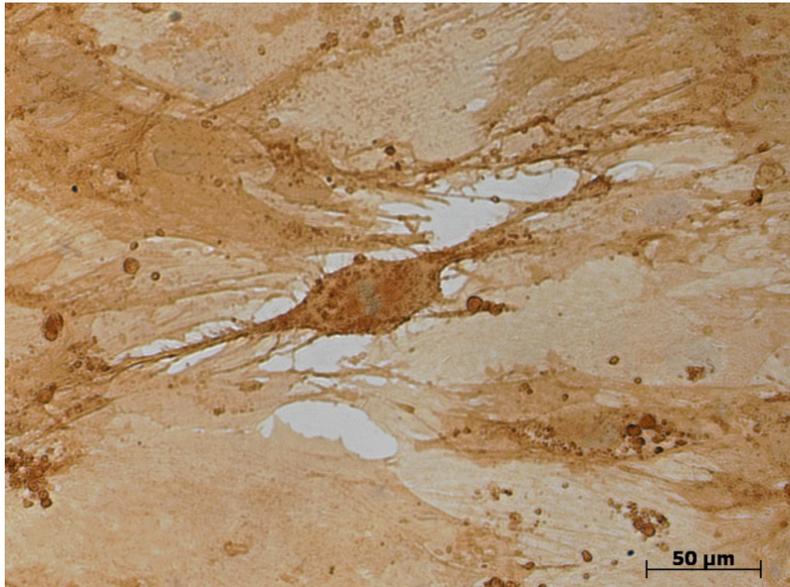


Abb. 16: immunzytochemische Färbung des Endothelzellmarkers CD105.
CD105 war bei allen 3 Spendern immunzytochemisch nachweisbar. Es ließ sich kein Unterschied bzgl. der PTH-Konzentration erkennen.
Hier dargestellt die Färbung für Patient C und 100 pmol/l PTH.

Im Gegensatz dazu zeigt sich bei FGF-23 ein davon abweichendes Ergebnis. Es findet sich zwar ebenfalls in den Zellkulturen aller drei Patienten, jedoch scheint eine Abhängigkeit der immunzytochemischen Färbereaktion von den verwendeten PTH-Werten vorzuliegen. In aufsteigender PTH-Konzentration finden sich qualitativ betrachtet zunehmende FGF-23-Spiegel (siehe Abb.17).

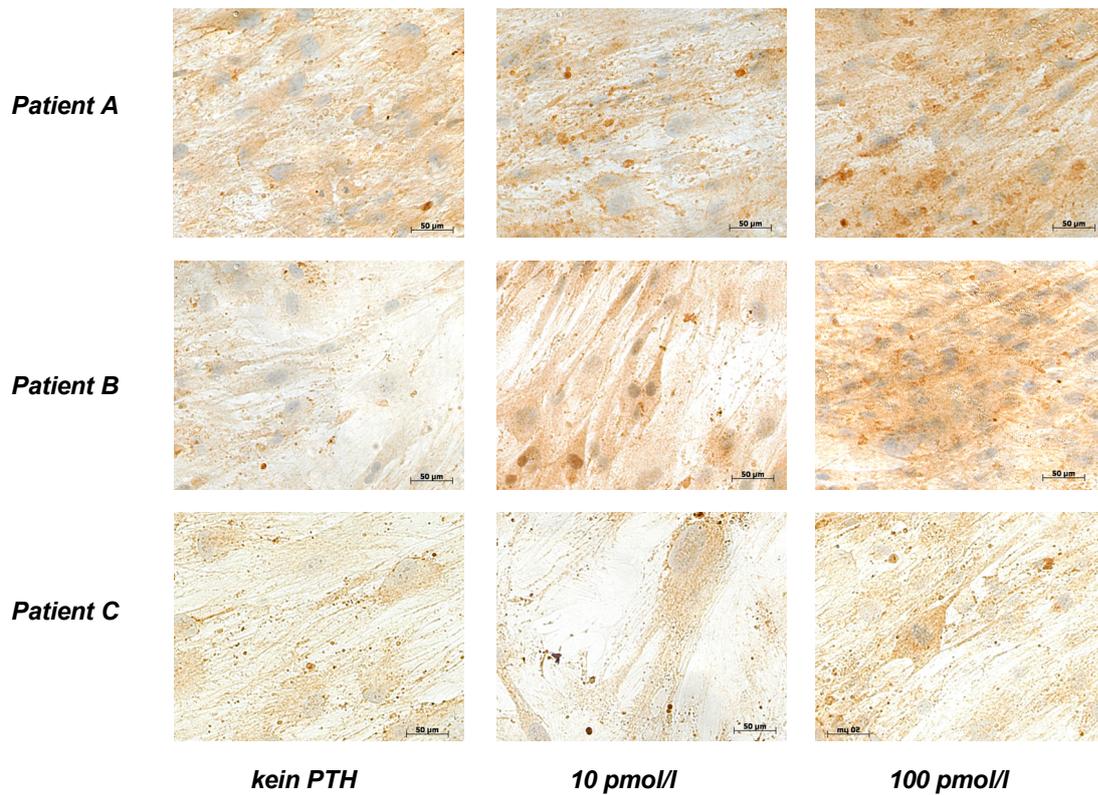


Abb. 17: Immunzytochemische Anfärbung von FGF-23
Die immunzytochemische Färbung von FGF-23 in humanen KM-Zellen zeigt eine PTH-Abhängigkeit mit der stärksten Reaktion bei 100 pmol/l.

Der Oberflächenmarker CD34 wurde immunzytochemisch nicht nachgewiesen (siehe Abb. 18).

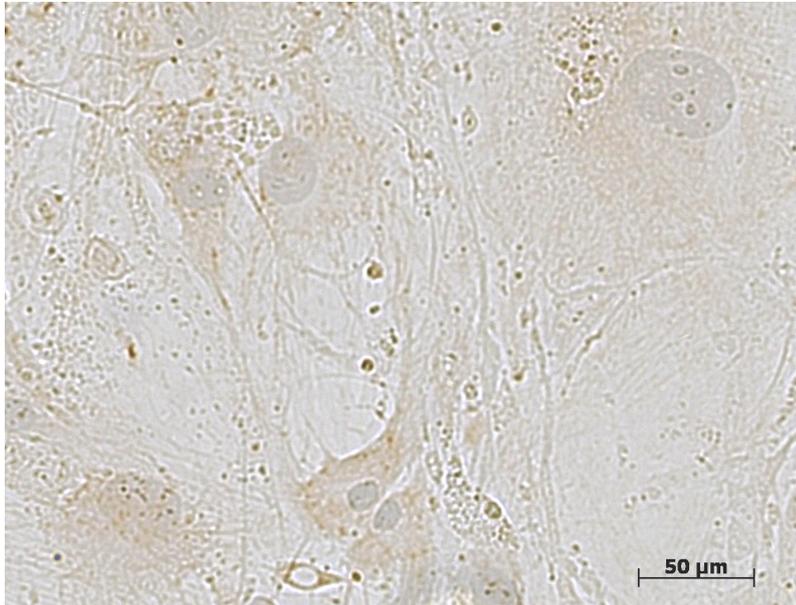


Abb. 18: immunzytochemische Färbung des Oberflächenmarkers CD34.
CD34 wurde immunzytochemisch nicht nachgewiesen
Hier dargestellt die Färbung für Patient C und 100 pmol/l PTH.

Hinsichtlich der semiquantitativen Auswertung der Immunzytochemie ergibt sich für die verschiedenen Patienten und die unterschiedlichen Parathormon-Konzentrationen folgendes Resultat (siehe Tabelle 8):

| | Patient A | | | Patient B | | | Patient C | | |
|-------------|--------------|-----|-----|--------------|-----|-----|--------------|-----|-----|
| | PTH [pmol/l] | | | PTH [pmol/l] | | | PTH [pmol/l] | | |
| | negativ | 10 | 100 | negativ | 10 | 100 | negativ | 10 | 100 |
| Osteocalcin | ++ | ++ | ++ | + | + | + | ++ | ++ | ++ |
| RANK | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| RANKL | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ |
| CD105 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| FGF-23 | + | ++ | +++ | + | + | +++ | + | + | ++ |
| CD34 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Tabelle 8: Semiquantitative Erfassung der immunzytochemischen Färbungen
Die semiquantitative Erfassung definierter Antigene zeigt den mesenchymalen (CD105) und den osteogenen (Osteocalcin, RANKL, RANK) Ursprung der Zellen.

3.2. ELISA:

3.2.1. TRAP-5b:

Die mittels ELISA ermittelten Werte für die Osteoklasten-spezifische TRAP-5b weisen innerhalb der Ergebnisse der Patienten A und B vergleichbare Werte auf. Es zeigt sich, dass das reine OSTEO-Medium ohne PTH-Zugabe in den ersten drei Wochen keinen Effekt auf die Höhe des TRAP-5b-Spiegels hat, während sich zur vierten Woche hin die Konzentration erhöht. Eine Zugabe von 10 pmol/l PTH zum OSTEO-Medium bleibt ohne Effekt, wenngleich die Werte bereits einen leichten Anstieg ab der dritten Woche zeigen. Die entsprechenden Ansätze mit Konzentrationen von 100 pmol/l PTH hingegen weisen bereits in der ersten Woche der Kultivierung höhere TRAP-5b-Konzentrationen auf. Diese unterliegen jedoch über den Zeitraum von vier Wochen kaum bzw. nur einer minimalen Zunahme (siehe Abb. 19 und 20 im Tabellenanhang). In den Ergebnissen für Patient C finden sich entsprechende Tendenzen bezüglich der Wochen zwei, drei und vier, wie sie bei Patient A und B auftreten. Allerdings weichen die Konzentrationen für die Ansätze ohne PTH und 10 pmol/l PTH in der ersten Woche von diesem Trend deutlich ab, es liegen höhere Werte als bei den anderen beiden Patienten vor. Des Weiteren bewegen sie sich in einem Bereich, in dem sich auch die TRAP-5b-Konzentration des 100 pmol/l Ansatzes des Patienten C befinden (siehe Abb. 21 im Tabellenanhang).

Die in der zellfreien Mediumkontrolle gemessenen TRAP-5b-Werte beliefen sich auf $<0,5$ U/l.

Um eventuelle Effekte der Parathormon-Konzentration zu detektieren, wurden aus den ermittelten Werten die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SAW) berechnet. Hier lässt sich der bereits beschriebene Trend klar wieder erkennen. Eine Konzentrationszunahme an TRAP-5b findet sich für die Kulturen ohne und mit 10 pmol/l PTH- erst ab der vierten bzw. dritten Woche, wohingegen die TRAP-5b-Werte bei 100 pmol/l PTH bereits in der ersten Woche höher liegen, jedoch nur eine minimale Steigerung über die vier Wochen erfahren (siehe Abb. 22).

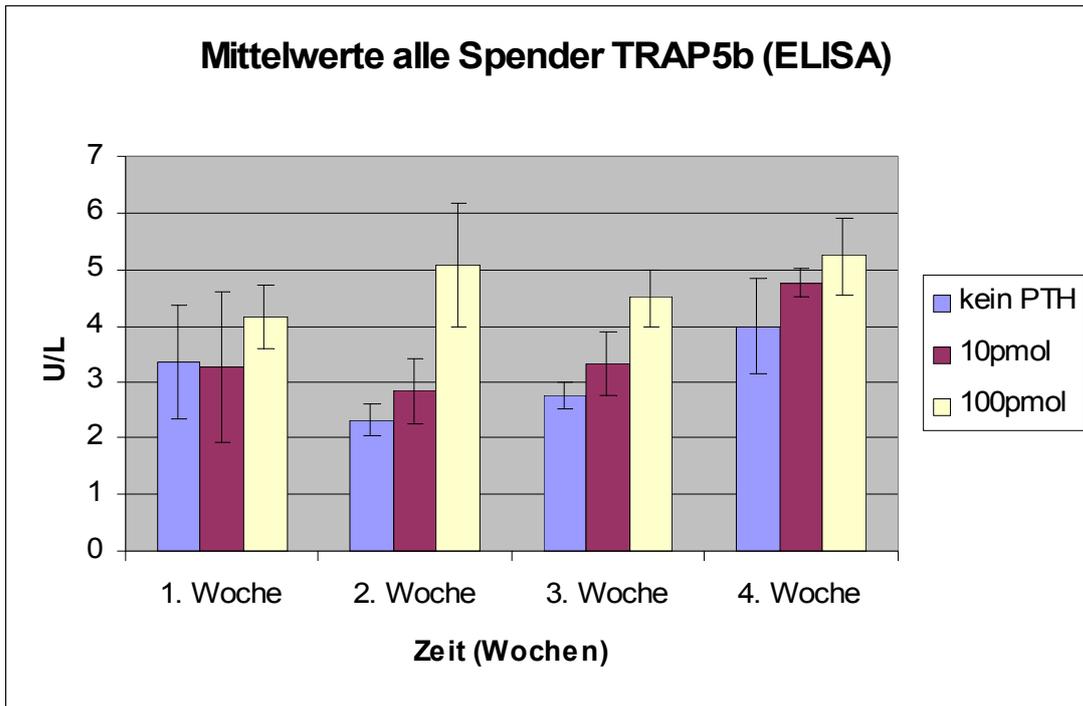


Abb. 22.: Mittelwerte und Standardabweichungen der ELISA-Ergebnisse für TRAP-5b
Für die 0 pmol/l und 10 pmol/l PTH-Ansätze findet sich eine Konzentrationszunahme der TRAP-5b erst ab der 4. bzw. 3. Woche. Die TRAP-5b-Werte bei 100 pmol/l PTH liegen bereits in der 1. Woche deutlich höher, erfahren jedoch nur eine minimale Steigerung im Verlauf der 4 Wochen.
Die Ergebnisse zeigen, dass ein Anstieg der PTH-Konzentration erhöhte TRAP-5b-Werte nach sich zieht.

Die Ergebnisse spiegeln deutlich wieder, dass ein Anstieg der PTH-Konzentration erhöhte TRAP-5b-Werte nach sich zieht.

3.2.2. Ostase:

In den Auswertungen der ELISAs, die zur Detektion des Osteoblastenmarkers Ostase durchgeführt wurden, finden sich für die Patienten A und C ähnliche Entwicklungen hinsichtlich der Ostase-Konzentrationen, wohingegen die entsprechenden Werte des Patienten B teilweise davon abweichen. Für Patient A und C lassen sich über den 4-wöchigen Kultivierungszeitraum konstante Ostase-Spiegel ohne relevante Steigerung sowohl in den Ansätzen ohne PTH-Zugabe als auch in den 10 pmol/l PTH Ansätzen erkennen. Die gemessenen Ostase-Werte liegen hier sehr nahe, für den 0 pmol/l PTH-Ansatz von Patient C sogar unterhalb der unteren Nachweisgrenze und weisen keine steigende Entwicklung auf. Anders die Ergebnisse bei einem Medium von 100 pmol/l PTH. Bereits ab der ersten Woche liegen deutlich höhere Konzentrationen an Ostase vor, was sich in den folgenden Wochen zwei, drei und vier fortsetzt (siehe Abb. 23 und 24 im Tabellenanhang).

Für Patient B lassen sich lediglich für die PTH-Konzentrationen von 0 pmol/l und 100pmol/l, nicht jedoch für 10 pmol/l, vergleichbare Tendenzen wie bei den anderen beiden Patienten finden. Auch bei Patient B lagen die Ostase-Werte der Wochen eins bis drei für 0 pmol/l PTH unterhalb der unteren Nachweisgrenze und stiegen in der vierten Woche lediglich auf 7 µg/L an. Gleichfalls weist der 100 pmol/l Ansatz, wie bereits bei Patient A und C festgestellt, in allen vier Wochen deutlich höhere Konzentrationen an Ostase auf. Lediglich der 10 pmol/l PTH-Ansatz unterscheidet sich maßgeblich von den anderen beiden Patienten. Die Ostase-Spiegel beginnen zwar in Woche 1 mit ähnlich niedrigen Werten wie bei Patient A und C, jedoch kommt es in den folgenden Wochen zu einer Konzentrationssteigerung, im Laufe derer sie sich den Ergebnissen des 100 pmol/l Ansatzes sehr stark annähern und in der vierten Woche sogar angleichen (siehe Abb. 25 im Tabellenanhang).

Die in der reinen Mediumkontrolle ermittelten Werte für Ostase lagen bei <7,0 µg/l.

Auch aus den ELISA-Ergebnissen für Ostase wurden Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet, welche die bereits beschriebenen Tendenzen gut widerspiegeln. Bedingt durch die oft unterhalb der Nachweisgrenzen gelegenen Ostase-Konzentrationen zeigen sich für die Ansätze ohne PTH-Zugabe sehr niedrige Mittelwerte, die über den Zeitraum von 4 Wochen keine wesentliche Veränderung aufweisen. Wie an den Werten zu erkennen ist, hat bereits die Zugabe von 10 pmol/l PTH zum Medium einen stimulierenden Einfluss auf die Ostase-Konzentration. Die weitere Steigerung der PTH-Zugabe auf 100 pmol/l führt zu einer zusätzlichen Zunahme der Ostase-Spiegel und fast zu einer Verdopplung der Werte im Vergleich zu 10 pmol/l PTH (siehe Abb. 26)

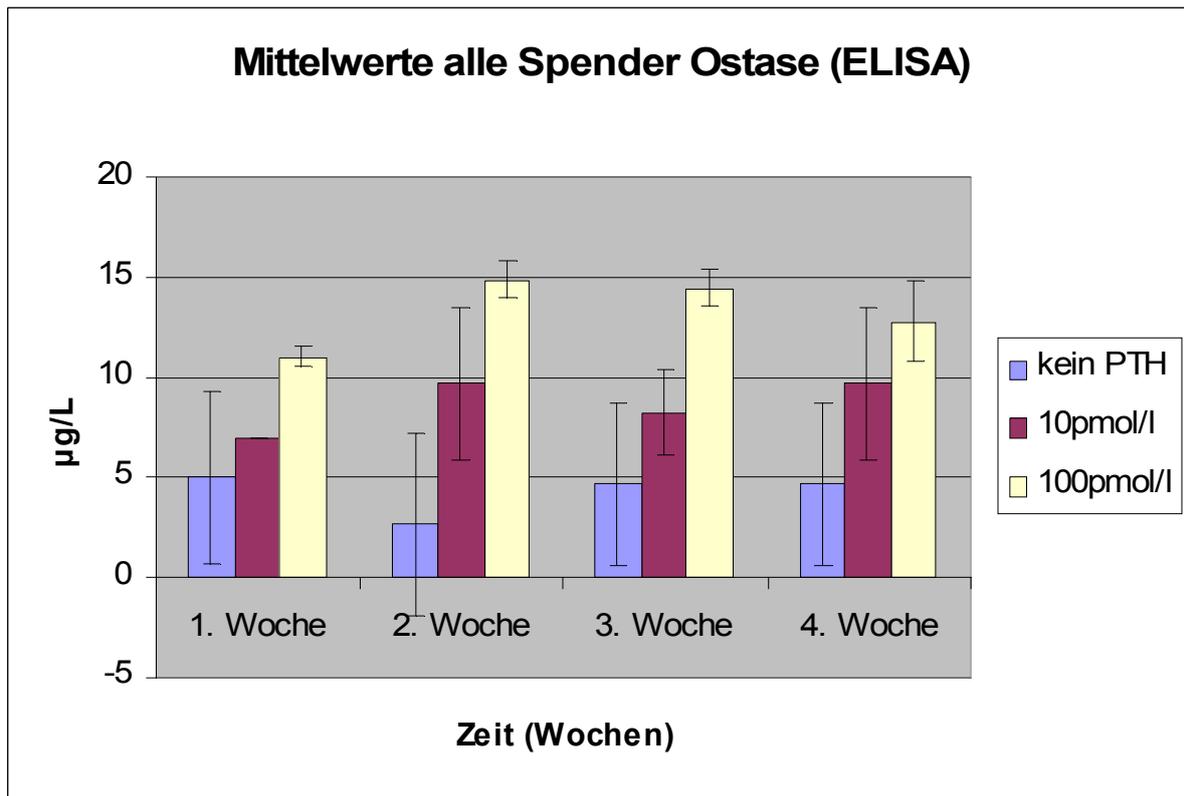


Abb. 26: Mittelwerte und Standardabweichungen der ELISA-Ergebnisse für Ostase
 Bereits ab der 1. Woche sind PTH-Zugaben von 10 pmol/l im Vergleich zum 0 pmol/l Ansatz mit höheren Ostase-Konzentrationen assoziiert. Eine Erhöhung der PTH-Zugabe auf 100 pmol/l führt zu einer weiteren Steigerung der Ostase-Konzentrationen, ein Effekt, der in allen vier Wochen zu erkennen ist.
 Die Ergebnisse weisen auf einen positiven Effekt hinsichtlich des PTH-Einflusses auf die Ostase-Produktion hin. Ein Anstieg von PTH bei humanen Knochenmarkzellen resultiert in einer Erhöhung des Ostase-Spiegels.

Insgesamt rufen demnach höhere PTH-Konzentrationen höhere Werte des Osteoblastenproduktes Ostase hervor.

3.2.3. FGF-23:

Für alle drei Patienten finden sich in den ELISA-Ergebnissen über die 4 Wochen ansteigende FGF-23-Werte sowohl für 0 pmol/l, 10 pmol/l als auch für 100 pmol/l PTH. Die stärkste absolute Konzentrationszunahme findet sich bei Patient A und B in dem 100 pmol/l PTH-Ansatz. Bei beiden Patienten finden sich für diesen Ansatz in allen vier Wochen höhere FGF-23-Werte als in den anderen beiden Ansätzen. Anders bei Patient C. Hier liegen die FGF-23-Konzentrationen für den Ansatz ohne PTH-Zugabe in der zweiten und vierten Woche über denen des 100 pmol/l Ansatzes und weisen entsprechend, über den Zeitraum von vier Wochen, die stärkste Konzentrationszunahme auf (siehe Abb. 27, 28 und 29 im Tabellenanhang).

Im direkten Vergleich der FGF-23-Konzentrationen in Woche vier für die 10 pmol/l und 100 pmol/L PTH-Ansätze der jeweiligen Patienten zeigt sich, dass bei allen drei Patienten eine ähnliche Konzentrationsdifferenz der beiden Ansätze vorliegt. Bei Patient A liegen die FGF-23-Werte bei 100 pmol/l in Woche vier 5,5 pg/ml über denen für 10 pmol/l. Bei Patient B beläuft sich diese Differenz auf 4,9 pg/ml und bei Patient C auf 4,8 pg/ml, was bedeutet, dass bei allen drei Patienten, trotz unterschiedlicher absoluter Konzentrationszunahmen über den Zeitraum von vier Wochen, im Endeffekt eine ähnliche Zunahme der FGF-23-Werte des 100 pmol/l PTH-Ansatzes im direkten Vergleich zum 10 pmol/l Ansatz vorliegt.

Die in der reinen Mediumkontrolle bestimmten Werte beliefen sich auf <2,0 pg/ml.

Um den möglichen Effekt von PTH auf den FGF-23-Spiegel besser zu detektieren, wurden aus den ermittelten Ergebnissen Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Dabei lässt sich der Trend kontinuierlich ansteigender FGF-23-Konzentrationen ebenfalls erkennen. Des Weiteren zeigt sich, wie auch zum größten Teil in den Einzelgrafiken feststellbar, dass mit Ausnahme der ersten Woche die Werte für 100 pmol/l PTH über denen für 0 pmol/l und 10 pmol/l PTH liegen (siehe Abb. 30).

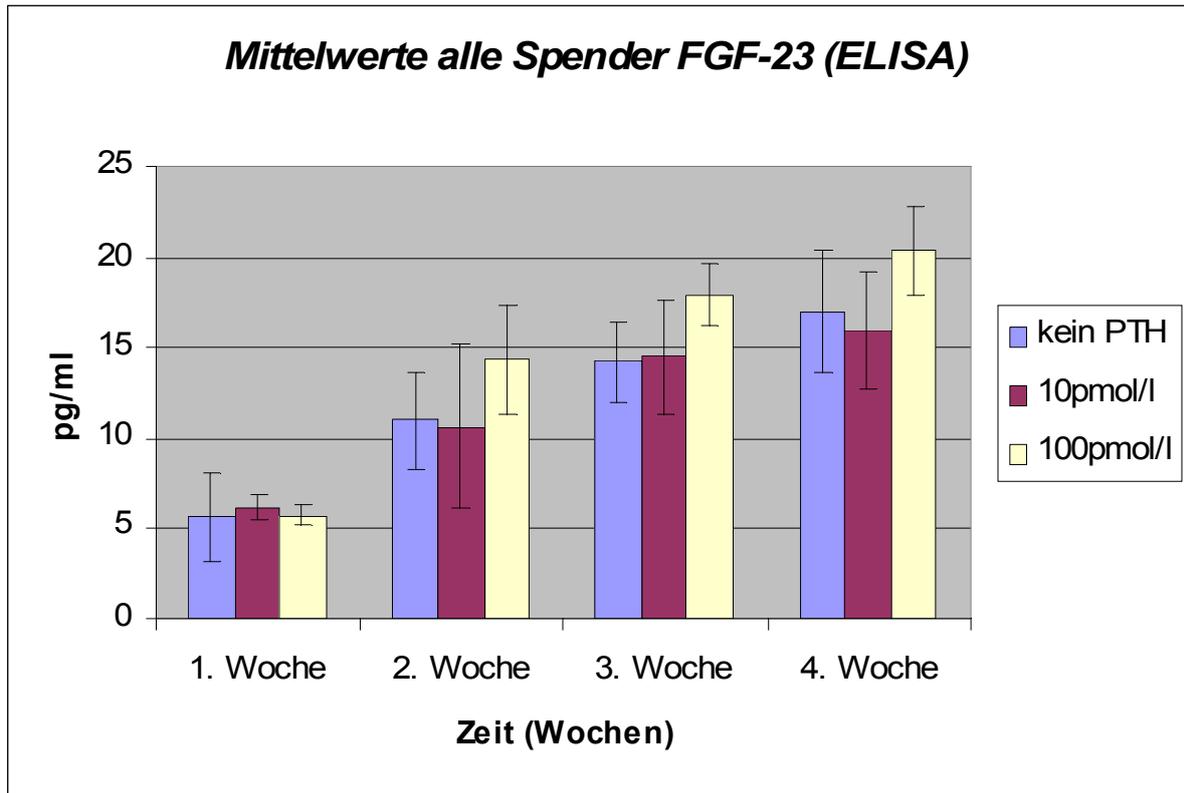


Abb. 30: Mittelwerte und Standardabweichungen der ELISA-Ergebnisse für FGF-23
Es ist ein Trend kontinuierlich ansteigender FGF-23-Konzentrationen für jeden PTH-Ansatz erkennbar. Es zeigt sich weiterhin, dass die Werte für 100 pmol/l PTH mit Ausnahme der 1. Woche über denen für 0 pmol/l und 10 pmol/l PTH liegen. Die Ergebnisse weisen auf einen positiven Effekt hinsichtlich des PTH-Einflusses auf die FGF-23-Produktion hin. Ein Anstieg von PTH bei humanen Knochenmarkzellen resultiert in einer Erhöhung des FGF-23-Spiegels.

Hinsichtlich des hinterfragten PTH-Einflusses auf die FGF-23-Produktion weisen die Ergebnisse auf einen positiven Effekt hin und zeigen, dass ein Anstieg von PTH bei Knochenmarkzellen in einer Erhöhung des FGF-23-Spiegels resultiert.

3.3. RNA-Isolation und Amplifikation mittels PCR:

Die als housekeeping Gen verwendete GAPDH war bei allen drei Spender in allen Ansätzen bei einer Größe von 755 bp regelrecht vorhanden.

Osteocalcin (209 bp Größe), CD105 (498 bp Größe) und TRAP-5b (298 bp Größe) ließen eine Expression für jeden Spender in allen Ansätzen erkennen. Die Expression blieb hierbei ohne erfassbaren Einfluss von PTH.

Der Osteoblastenmarker RANKL (354 bp Größe) hingegen zeigte hinsichtlich des Expressionsprofils der drei verschiedenen Spender Unterschiede. Bei Spender A ließen sich Banden lediglich bei fehlendem PTH und 10 pmol/l PTH detektieren. Spender B wies Banden für kein und 100 pmol/l PTH auf, wohingegen sich bei Spender C keine Banden zeigten.

Auch der Oberflächenmarker CD34 (265 bp Größe) ließ Unterschiede in den PCR-Ergebnissen erkennen. So waren Banden bei den Spendern B und C in allen Ansätzen zu finden, wohingegen Spender A lediglich eine Bande bei fehlender PTH-Zugabe zeigte.

Das Expressionsprofil für den osteoblastären Transkriptionsfaktor Runx-2 (452 bp Größe) ließ bis auf den 100 pmol/l PTH Ansatz des Spenders C Banden für alle Ansätze der drei Spender erkennen.

Die Ergebnisse der PCR sind in den Abbildungen 31 a - d und der Tabelle 9 dargestellt.

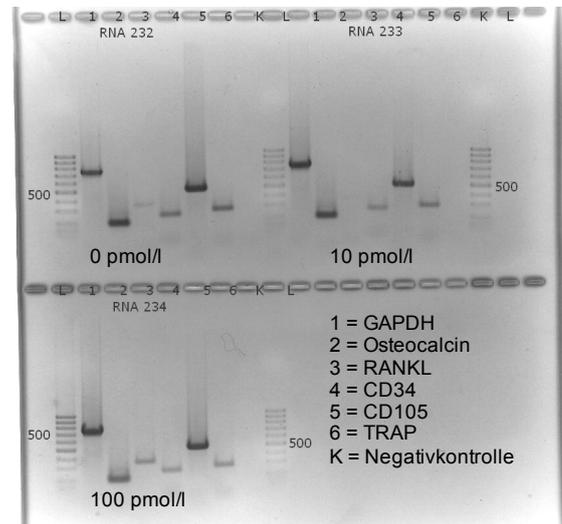
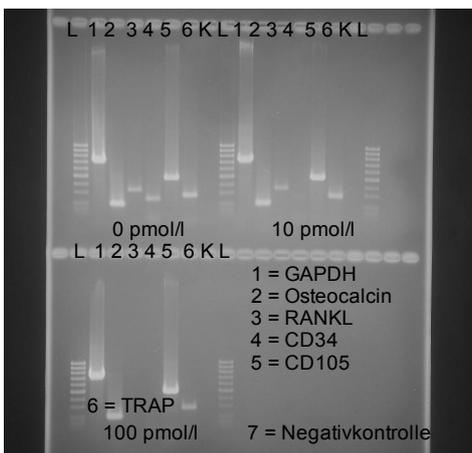


Abb. 31a: PCR der jeweiligen Ansätze des Patienten A. **Abb. 31b: PCR der jeweiligen Ansätze des Patienten B.**

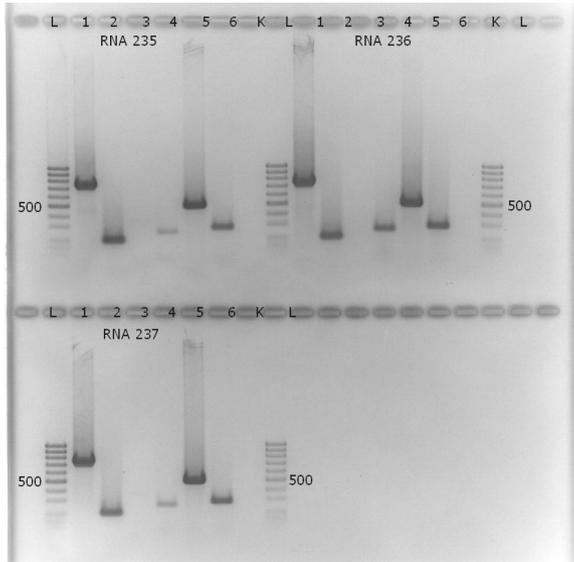


Abb. 31c: PCR der jeweiligen Ansätze des Patienten C.

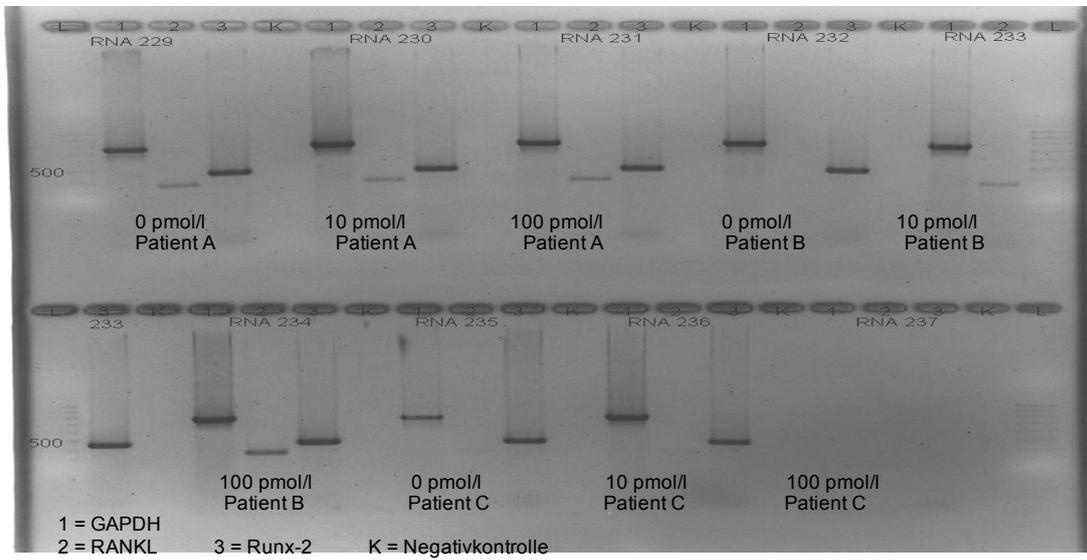


Abb. 31 d: PCR der jeweiligen Ansätze der Patienten A, B und C.

| | Patient A | | | Patient B | | | Patient C | | |
|--------------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|------------|
| | 0 pmol/l | 10 pmol/l | 100 pmol/l | 0 pmol/l | 10 pmol/l | 100 pmol/l | 0 pmol/l | 10 pmol/l | 100 pmol/l |
| Osteocalcin | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| RANKL | + | + | - | + | - | + | - | - | - |
| CD34 | + | - | - | + | + | + | + | + | + |
| CD105 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| TRAP | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Runx-2 | + | + | + | + | + | + | + | + | - |

Tabelle 9: Ergebnisse der PCR für alle Ansätze der 3 Spender

3.4. Calcium- und Phosphatmessung:

3.4.1. Calciummessung

Die photometrisch im Zellkulturüberstand bestimmten Calciumkonzentrationen der drei Patienten weisen, wenn auch in den Einzeldiagrammen zum Teil kleinere Unterschiede erkennbar sind, in der Gesamtbetrachtung eine ähnliche Entwicklung auf.

Bei allen drei Patienten zeigt sich für das Medium ohne PTH-Zugabe, trotz unterschiedlicher Verläufe in den Wochen eins bis drei, eine Zunahme der Calciumkonzentrationen zur vierten Woche hin. Ähnliche Gemeinsamkeiten lassen sich auch für eine Konzentration von 100 pmol/l PTH erkennen. Die Ergebnisse sowohl von Patient A und B als auch von Patient C weisen einen Abfall der Calcium-Werte von der dritten zur vierten Woche auf. In den ersten drei Wochen unterscheidet sich Patient C jedoch von den anderen beiden, da bei ihm in Woche drei ein erneuter Konzentrationsanstieg erfolgt. Im Hinblick auf eine PTH-Konzentration von 10 pmol/l lässt sich ebenfalls eine gemeinsame Tendenz innerhalb der drei Patienten erkennen, wenngleich auch hier Unterschiede detektierbar sind. Bei allen drei Patienten zeigen sich in den Wochen eins bis drei kontinuierlich ansteigende Calciumkonzentrationen. Diese sind bei Patient A und C gefolgt von einem Abfall in der vierten Woche, wohingegen die Calcium-Werte bei Patient B eine weitere Steigerung erfahren (siehe Abb. 32, 33 und 34 im Tabellenanhang).

Aus den gemessenen Werten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Hierbei zeigt sich für das Medium ohne PTH-Zugabe eine in den ersten drei Wochen sinkende Calciumkonzentration, gefolgt von einem Anstieg in der vierten Woche um 27,7% im Vergleich zur dritten Woche. Für eine Zugabe von 10 pmol/l oder 100 pmol/l PTH zum OSTEO-Medium hingegen findet sich in Woche eins bis drei eine Erhöhung des Calcium-Spiegels, wobei die Konzentrationszunahme für 10 pmol/l PTH stärker ausfällt als für 100 pmol/l PTH. In der vierten Woche allerdings kommt es bei beiden PTH-Konzentrationen zu einem Abfall der Calcium-Werte. Hierbei sinkt der Calcium-Spiegel um 28,5% für 10 pmol/l PTH und um 24,3% für 100 pmol/l PTH (siehe Abb. 35).

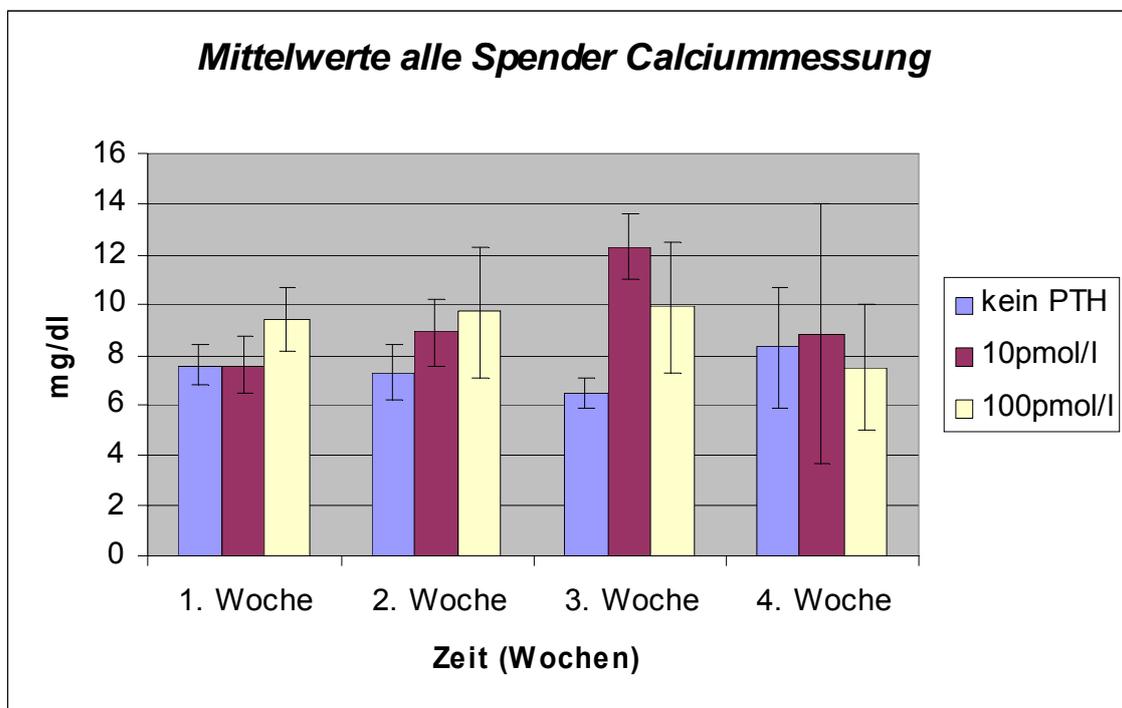


Abb. 35: Mittelwerte und Standardabweichungen der Calciummessungen
Insgesamt zeigt sich, dass die Calciumkonzentration im Zellkulturüberstand bei 10 pmol/l und 100 pmol/l leicht erhöht ist im Vergleich zum Ansatz ohne PTH-Zugabe. PTH nimmt demnach zwar Einfluss auf den Calcium-Spiegel, eine weitere Erhöhung der PTH-Konzentration bleibt jedoch ohne erkennbaren Effekt.

Insgesamt zeigt sich, dass die Calciumkonzentration im Zellkulturüberstand bei 10 pmol/l und 100 pmol/l PTH leicht erhöht ist im Vergleich zu 0 pmol/l. Parathormon scheint demnach einen Einfluss auf den Calcium-Spiegel zu nehmen, eine weitere Erhöhung der PTH-Konzentration bleibt jedoch ohne erkennbaren Effekt.

3.4.2. Phosphatmessung:

Die im Zellkulturüberstand ermittelten Phosphat-Werte weisen im Vergleich der drei verwendeten PTH-Ansätze nur geringe Konzentrationsspannen auf. Bei allen drei Patienten liegen die Phosphat-Werte für 0 pmol/l, 10 pmol/ und 100 pmol/l PTH relativ nahe beieinander. Im Hinblick auf die Konzentrationsentwicklung über die vier Wochen zeigt sich für das Medium ohne PTH-Zugabe eine Erhöhung der Phosphat-Spiegel in den ersten drei Wochen bei allen Patienten. Lediglich in Woche vier unterscheidet Patient B sich mit weiter ansteigenden Phosphatkonzentrationen von den anderen beiden Patienten, bei denen es zu einem Abfall von Phosphat kommt. Für eine PTH-Zugabe von 10 pmol/l liegen deutlich unterschiedlichere Entwicklungen innerhalb der drei Patienten vor. Steigt bei allen der Phosphat-Spiegel in der zweiten Woche an, zeigen nur Patient A und B auch in der dritten Woche eine Phosphat-Erhöhung, bei Patient C hingegen kommt es zu einem Absinken. Anders in der vierten Woche, hier weisen sowohl Patient B als auch C eine Konzentrationszunahme auf, während der Phosphat-Spiegel bei Patient A abfällt. Bei einer PTH-Konzentration von 100 pmol/l zeigen sich identische Entwicklungen für Patient A und B. Die Phosphat-Spiegel fallen zur zweiten Woche hin ab, gefolgt von einem Anstieg in Woche drei und vier. Patient C weicht von dieser Tendenz ab. Bis Woche drei finden sich kontinuierlich ansteigende Phosphat-Werte, in Woche vier erfolgt keine weitere Erhöhung im Vergleich zu Woche drei (siehe Abb. 36, 37 und 38 im Tabellenanhang).

Mittelwerte und Standardabweichungen, die aus den gemessenen Konzentrationen berechnet wurden, zeigen ebenfalls deutlich, dass die Phosphat-Werte in den einzelnen Wochen für die unterschiedlichen PTH-Konzentrationen sehr nahe beieinander liegen. Für 0 pmol/l PTH erfolgt eine Steigerung von Phosphat über die ersten drei Wochen, bei einem leichten Abfall in der vierten Woche. Ein kontinuierlicher Anstieg der Phosphat-Spiegel hingegen zeigt sich für 10 pmol/l PTH. Eine PTH-Konzentrationserhöhung auf 100 pmol/l resultiert in einem Abfall von Phosphat in der zweiten Woche bei im Anschluss steigenden Werten.

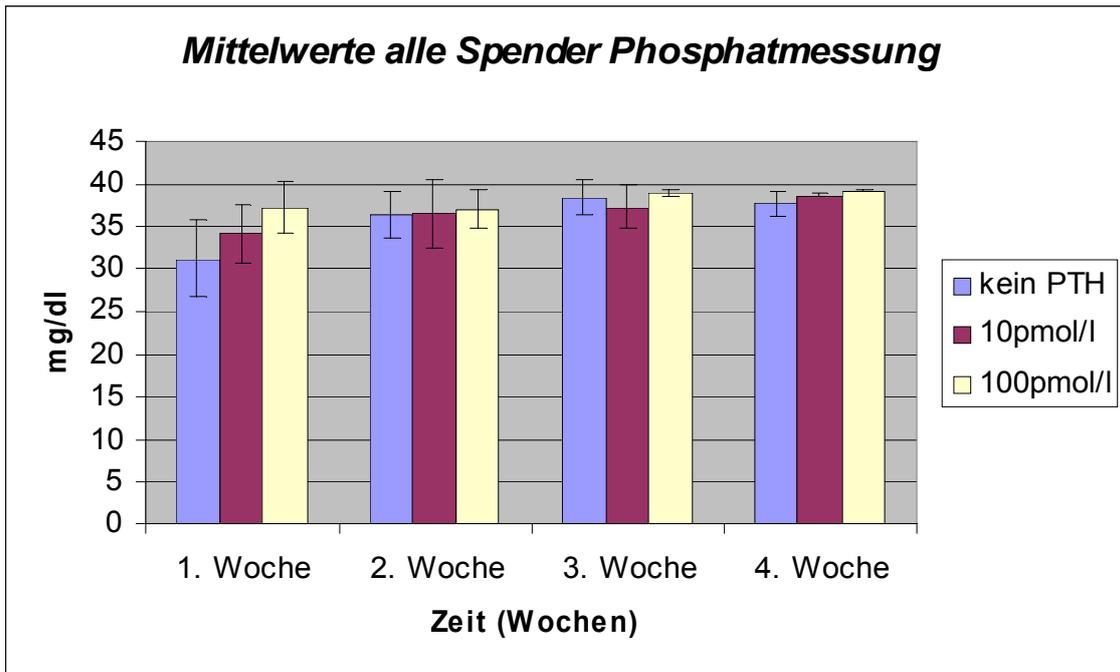
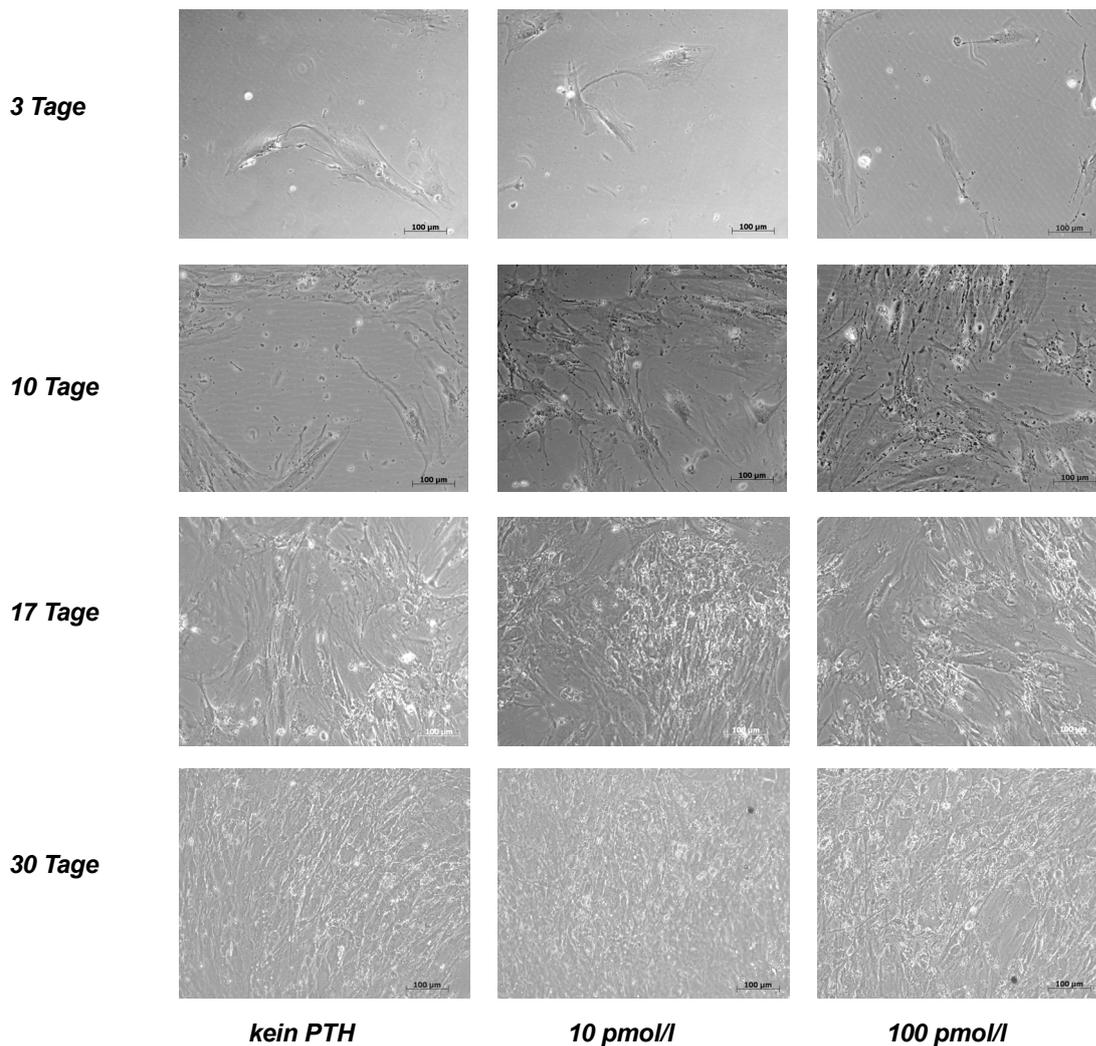


Abb. 39: Mittelwerte und Standardabweichungen der Phosphatmessungen.
Die PTH-Konzentrationen der einzelnen Wochen weisen keinen wesentlichen Unterschied hinsichtlich der verwendeten PTH-Konzentrationen auf. Die Phosphat-Werte liegen sehr nahe beieinander. Insgesamt ist eine Zugabe von PTH zum Medium und eine weitere Erhöhung der PTH-Konzentration ohne nennenswerten Einfluss auf die Phosphat-Konzentration im Zellkulturüberstand.

Insgesamt sind eine Zugabe von Parathormon zum Medium und eine weitere Erhöhung der PTH-Konzentration ohne nennenswerten Einfluss auf die Phosphat-Werte im Zellkulturüberstand.

3.5. Osteoblastäre Differenzierung:

Die für die Arbeit verwendeten humanen Knochenmarkzellen wurden mit verschiedenen Substanzen (Ascorbinsäure-2-phosphat, β -Glycerolphosphat und Dexamethason) zu einer osteoblastären Differenzierung angeregt. Der Erfolg dieser Stimulation wurde neben der Detektion osteoblastärer Marker mittels ELISA und PCR bereits während der Kultivierungsphase lichtmikroskopisch überprüft. Hierzu erfolgte wöchentlich eine Fotodokumentation der Zellen, welche eine kontinuierlich zunehmende Zellzahl und einen steigenden Zellverband zeigte (siehe Abb. 40).



**Abb. 40: Fotodokumentation der Zellen während der Kultivierungsphase (20fache Vergrößerung)
Es zeigt sich eine kontinuierlich zunehmende Zellzahl und ein steigender Zellverband.**

4. Diskussion:

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zum einen die osteoblastäre Differenzierung humaner Knochenmarkzellen sowie die FGF-23-Konzentrations-Entwicklung unter Parathormon-Exposition zu untersuchen. Mit Hilfe von ELISA, Immunzytochemie, PCR sowie Calcium- und Phosphatmessung wurden hierfür neben der Bestimmung von FGF-23 verschiedene Marker sowohl der osteoklastären als auch der osteoblastären Differenzierung nachgewiesen.

FGF-23 ist ein wichtiger Faktor bei der Regulation des Phosphat- und Vitamin D-Haushaltes. In verschiedenen Studien ließen sich Osteozyten und Osteoblasten als Biosyntheseort von FGF-23 nachweisen⁹³. Positiv beeinflusst wird diese Synthese von Phosphat und Calcitriol, den beiden Stoffen, in deren Physiologie FGF-23 maßgeblich eingreift. Es inhibiert die 1 α -Hydroxylase und führt so zu erniedrigten Vitamin D-Konzentrationen. Ferner reduziert es am proximalen Tubulussystem der Nieren den NaPi2a-Cotransporter, was in einer gesteigerten Phosphat-Ausscheidung resultiert. Parathormon fördert ebenfalls die renale Phosphatausscheidung, im Gegensatz zu FGF-23 induziert es jedoch die 1 α -Hydroxylase.

Beiden Stoffen kommt aufgrund ihrer phosphaturischen Wirkung eine Bedeutung bei der chronischen Niereninsuffizienz zu, bei der aufgrund der eingeschränkten Nierenfunktion eine Hyperphosphatämie resultiert. Neben der Hyperphosphatämie kommt es bei chronischer Niereninsuffizienz des Weiteren zu erniedrigten Calcitriol-Spiegeln und einer Hypokalzämie, was zusammen bei vielen Patienten im Endstadium der Erkrankung zu der Entwicklung eines sHPT führt. Um dem vorzubeugen bzw. entgegenzuwirken, werden die Patienten entsprechend mit Calcitriol therapiert, auch wenn in diesem Zusammenhang die optimale PTH-Konzentration, die im Serum vorliegen sollte, unklar ist.

Es konnte gezeigt werden, dass Störungen in der Regulation des Phosphat- und Parathormon-Haushaltes zu der hohen Mortalitätsrate der Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz beitragen. Die Studie „*Fibroblast growth factor 23 and Mortality among Patients undergoing hemodialysis*“ von Guitiérrez⁹⁴ postulierte ferner FGF-23 als unabhängigen Risikofaktor für die Mortalität bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Endstadium.

Tatsächlich verbleibt die pathogenetische Bedeutung von FGF-23 im Rahmen der chronischen Niereninsuffizienz und ihrer Folgeerkrankungen weiter ungewiss. Zu klären bleibt vor allem, ob Parathormon die Synthese von FGF-23 beeinflusst und ob FGF-23 Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel hat, die für die Entstehung der Renalen Osteopathie von pathophysiologischer Bedeutung wären. Insbesondere der isolierte Effekt von Parathormon auf die Biosynthese von FGF-23 ist von großem klinischen Interesse, da unklar ist, über welche Mechanismen / Faktoren es zum Krankheitsbild der Renalen Osteopathie kommt.

In diesem Kontext wurden in der vorliegenden Arbeit einerseits die osteoblastäre Differenzierung und andererseits die Entwicklung der FGF-23-Konzentration unter Parathormon-Exposition untersucht.

Obwohl physiologische Vorgänge von FGF-23 im Organismus hinsichtlich des Phosphat- und Vitamin-D-Haushaltes bereits bekannt sind, bleibt unklar, ob es eine Beziehung zwischen FGF-23 und Parathormon gibt und ob FGF-23, als von Knochenzellen synthetisierter Faktor, Effekte am Knochen aufweist. Einen möglichen Hinweis liefern die Tatsachen, dass Parathormon über seinen PTH-1-Rezeptor an Osteoblasten wirksam wird und gleichzeitig die Hauptsyntheseleistung für FGF-23 auf den Knochen entfällt. Vor allem Osteoblasten und Osteozyten konnten als Ursprung für FGF-23 detektiert werden⁹³, so dass eine Beeinflussung der FGF-23-Konzentration durch Parathormon durchaus denkbar ist. Die für diese Fragestellung anhand von ELISA und Immunzytochemie ermittelten Ergebnisse stützen diese These, denn in beiden Methoden lässt sich die Tendenz eines PTH-Einflusses erkennen. Die Resultate dokumentieren eine potentielle Wirkung der PTH-Konzentration, deren Anhebung zu gesteigerten FGF-23-Werten im ELISA führt, was für eine mögliche Beeinflussung der FGF-23-Synthese durch Parathormon spricht.

Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch in der Studie „*Parathyroid hormone regulates fibroblast growth factor 23 in a mouse model of primary hyperparathyroidism*“ von Kawata⁹⁵. In dieser *in vivo* Studie wurden zwei Mäuse-Populationen im Vergleich untersucht. Eine Wildtyp-Population und eine Gruppe von Mäusen, die das humane *cyclin D1* Onkogen aufwiesen und somit dem Model eines pHPT entsprachen. Ziel der Studie war es, die Rolle von Parathormon auf die FGF-23-Spiegel zu untersuchen. Hierzu wurden Mäuse drei verschiedener Lebensalter aus beiden Populationen unter simultanen Bedingungen (z.B. Ernährung) gehalten und die FGF-23-Expression sowie andere biochemisch bedeutsame Marker (Parathormon, Calcitriol, Calcium, Phosphat, Alkalische Phosphatase) bestimmt. Die Ergebnisse sprechen für eine positive Korrelation zwischen Parathormon und FGF-23. Es konnte gezeigt werden, dass die FGF-23-Konzentration in den Mäusen mit pHPT höher war als in der Wildtyppopulation, was Parathormon als potentiellen Stimulus für die FGF-23-Produktion detektiert. Auch die Studie „*Total parathyroidectomy reduces elevated circulating fibroblast growth factor 23 in advanced secondary hyperparathyroidism*“ von Sato⁹⁶ unterstützt die These einer Stimulation der FGF-23-Expression durch Parathormon. Fünfzehn Patienten mit sHPT wurden einer Parathyreoidektomie unterzogen und sowohl prä- als auch postoperativ (Tag 1, 3, 7 und 10) die FGF-23-Spiegel bestimmt. Es zeigte sich ein zeitabhängiger Abfall der FGF-23-Konzentrationen nach erfolgter Nebenschilddrüsen-Entfernung, was für eine Stimulation der FGF-23-Produktion durch Parathormon spricht. Eine positive Korrelation zwischen Parathormon und FGF-23 ließ sich ebenfalls in der prospektiven Studie „*A prospective study of fibroblast growth factor 23 in children with chronic kidney disease*“ von Magnusson

finden⁹⁷. Dreizehn Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Alter von 4 – 15 Jahren wurden über zwei Jahre betreut und die Knochenentwicklung in Relation zu FGF-23 im Serum untersucht. Ebenfalls betrachtet wurde die Korrelation zwischen Parathormon und FGF-23. Hierbei zeigte sich, dass eine Assoziation zwischen FGF-23 und Parathormon besteht. Einen möglichen Zusammenhang zwischen Parathormon und FGF-23, im Sinne einer Stimulation der FGF-23-Synthese durch Parathormon zeigte auch die Studie „*Hypophosphatemia with Elevations in Serum Fibroblast Growth Factor in a Child with Jansen’s Metaphyseal Chondrodysplasia*“ von Whitney⁹⁸.

Im Gegensatz dazu fand die Studie „*Bone mass does not correlate with the serum fibroblast growth factor 23 in hemodialysis patients*“ von Torres⁹⁹ keine Beeinflussung der FGF-23-Konzentration durch Parathormon. Bei 99 hämodialysepflichtigen Patienten, die dreimal wöchentlich eine Dialyse erhielten, wurden in dieser Studie sowohl Calcium, Phosphat, Parathormon, BAP, Vitamin D als auch FGF-23 über verschiedene Nachweismethoden aus dem Blut bestimmt. Korrelationen ließen sich hierbei lediglich für FGF-23 und Serum-Phosphat, Calcium-Konzentration und dem Calcium-Phosphat-Produkt, nicht jedoch mit PTH finden. In der Studie „*Fibroblast growth factor (FGF)-23 in patients with primary hyperparathyroidism*“ von Hiroyuki¹⁰⁰ zeigten sich zwar bei Patienten mit pHPT weit höhere FGF-23-Konzentrationen als in der Kontrollgruppe, was die These einer FGF-23-Synthesestimulation durch Parathormon stützen würde. Allerdings ließen sich nach Parathyreoidektomie trotz normalisierter PTH-Werte keine Abfälle der FGF-23-Konzentrationen im Serum finden. Ferrari et al konnten in der Studie „*Fibroblast growth factor-23 relationship to dietary phosphate and renal phosphate handling in healthy young men*“ bei gesunden jungen Männern unter phosphatreicher Diät zwar einen Anstieg der FGF-23-Konzentration nachweisen, allerdings zeigte sich dieser unabhängig von Parathormon¹⁰¹. Im Gegensatz dazu ließ sich in der Studie „*Effect of acute changes of serum phosphate on fibroblast growth factor (FGF) 23 levels in humans*“ von Ito bei vier Studienteilnehmern, die eine Phosphatinfusion erhielten, trotz Parathormon-Erhöhung keine Veränderung der FGF-23-Konzentration finden¹⁰².

In der umgekehrten Fragestellung nach einer möglichen Beeinflussung der PTH-Synthese durch FGF-23 bleibt die bisherige Datenlage der wissenschaftlichen Literatur ebenfalls eine endgültige Aussage schuldig. Für die Pathophysiologie der Renalen Osteopathie ist dieser Aspekt jedoch ein weiterer entscheidender Faktor, insbesondere im Hinblick auf den bei chronischer Niereninsuffizienz entstehenden sHPT und die mögliche pathogenetische Bedeutung von FGF-23 bei der Renalen Osteopathie.

Dass FGF-23 einen Einfluss auf die PTH-Produktion haben muss, zeigt die Tatsache, dass die für die Wirkung von FGF-23 notwendige Koexpression von Klotho in den Nebenschilddrüsen vorliegt, was sie als mögliches Zielgewebe hervorhebt³⁹. In der Frage, ob es

hierbei zu einer Stimulation oder Inhibition der PTH-Synthese kommt, beschreiben Krajsnik et al in der Studie „*Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1 α -hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells*“¹⁰³ eine negative Korrelation zwischen FGF-23 und Parathormon. Rindern wurden die Nebenschilddrüsen zum Zweck eines Zellkulturversuchs entnommen. Die NSD-Zellen wurden mit verschiedenen FGF-23-Konzentrationen für 24 Stunden kultiviert und im Anschluss mit PBS gewaschen, frisches Medium hinzugefügt und nach weiteren 4 Stunden der Überstand für PTH-Messungen gesammelt. In den Resultaten zeigte sich eine Konzentrations-abhängige Senkung der PTH-mRNA und der Protein-Sekretion durch FGF-23. Auch wenn unklar bleibt, ob es sich bei diesem Effekt um eine direkte oder indirekte Wirkung handelt, scheint FGF-23 *in vitro* ein negativer Regulator von Parathormon zu sein und somit möglicherweise physiologisch inhibierend in die Biosynthese von Parathormon einzugreifen. Unterstützt wird diese These von der Studie „*The parathyroid is a target organ for FGF-23 in rats*“ von Ben-Dov¹⁰⁴. Ratten wurden unterschiedliche FGF-23-Typen (eine Negativkontrolle) injiziert (4 - 5 Ratten pro FGF-23), entweder als einmalige oder tägliche Injektion über fünf Tage. Bestimmt wurden sowohl Calcium, Phosphat, Kreatinin, Calcitriol und FGF-23 als auch Parathormon aus dem Serum. Ferner wurden den Tieren die Nebenschilddrüsen entfernt und zur RNA- und Protein-Extraktion herangezogen. Neben den zu erwartenden Abfällen des Calcitriols- und des Phosphat-Spiegels zeigte sich ein Absinken des Serum-PTH und der PTH-mRNA, was gleichfalls für eine negative Korrelation zwischen FGF-23 und Parathormon spricht. Die Studie „*Human PTH gene regulation in vivo using transgenic mice*“ von Lavi-Moshayoff¹⁰⁵ konnte ebenfalls nachweisen, dass FGF-23 die PTH-Sekretion senkt.

Insgesamt deutet demnach vieles darauf hin, dass es sich bei Parathormon und FGF-23 um Stoffe handelt, die Bestandteil eines physiologischen Kreislaufes sind. In diesem Kreislauf stimuliert Parathormon in Osteoblasten und Osteozyten die FGF-23-Biosynthese und erfährt durch das sezernierte FGF-23 im Rahmen einer negativen Rückkopplung wiederum eine Inhibition der eigenen Synthese.

Auch die in der Arbeit ermittelten Daten sprechen stark für eine positive Beeinflussung der FGF-23-Biosynthese durch Parathormon. Bei dem verwendeten Zellkultur-Ansatz handelte es sich um ein Vitamin D-freies Model, in dem über den Kultivierungszeitraum weder der Phosphat-Spiegel noch die Calcium-Konzentrationen starke Schwankungen aufwiesen. Somit können sowohl Calcitriol als auch Phosphat, beides physiologische Stimulatoren der FGF-23-Synthese, als Ursprung für die gefundene FGF-23-Erhöhung ausgeschlossen werden. Entsprechend stark ist die Korrelation zwischen zunehmender PTH-Konzentration und FGF-23-Anstieg zu sehen. Die Ergebnisse sprechen somit deutlich für eine positive Beziehung zwischen dem PTH-Haushalt und den vorherrschenden FGF-23-Konzentrationen, eine Tatsache, die Hinweise auf die pathogenetische Bedeutung von FGF-23 bei der Renalen

Osteopathie geben könnte. Die Erkenntnis des Zusammenhangs zwischen Parathormon und ossärer FGF-23-Sekretion würde bedeuten, dass die bei chronischer Niereninsuffizienz aufgrund der Hyperphosphatämie bereits erhöhten FGF-23-Konzentrationen durch den sich entwickelnden sHPT eine weitere Steigerung erfahren würden. Unter Berücksichtigung der momentanen Studienlage würde FGF-23 dann allerdings protektiv in die Pathophysiologie dieser Patienten eingreifen und die PTH-Sekretion senken. Fraglich ist hierbei allerdings, wie ausgeprägt diese Inhibition im Vergleich zum kontinuierlichen Stimulus von Hyperphosphatämie, Hypokalzämie und Calcitriolmangel ist.

Ferner bleibt in diesem Zusammenhang zu klären, ob das im Rahmen des sHPT bei der Renalen Osteopathie erhöhte FGF-23 Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel nimmt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit nicht nur die FGF-23-Konzentrationsentwicklung unter PTH-Exposition sondern auch die osteoblastäre Differenzierung untersucht. Hierfür wurde ein *in vitro* Model mit humanen Knochenmarkzellen entwickelt, die, wie bereits früher beschrieben⁶⁵, zu osteoblastärer Differenzierung stimuliert und deren FGF-23-Sekretion im Verlauf bestimmt wurde.

Für alle kultivierten und untersuchten Knochenmarkzellen der drei Patienten zeigten die immunzytochemischen Färbungen eine positive Reaktion für die Osteoblastenprodukte RANKL und Osteocalcin. Zusätzlich konnte eine Expression dieser Marker in der PCR gezeigt werden, was dafür spricht, dass sie exprimiert und auch synthetisiert wurden. Der osteoblastäre Transkriptionsfaktor Runx-2 konnte auf Expressionsebene ebenfalls nachgewiesen werden, was zusammen mit Osteocalcin und RANKL signalisiert, dass in allen Knochenmarkzellen eine osteoblastäre Differenzierung erfolgte. Im Hinblick auf die verschiedenen PTH-Konzentrationen, die dem Medium zugesetzt wurden, zeigte sich eine davon unabhängige Entwicklung dieser Osteoblastenmarker. Ähnliche Ergebnisse ließen sich auch für den osteoklastären Rezeptor RANK finden, der in der Immunzytochemie bei allen Spendern gleichermaßen und ohne erkennbaren Einfluss der PTH-Zugabe vorhanden war. Hiervon differieren die Resultate für das Osteoblastenprodukt Ostase und die von Osteoklasten synthetisierte TRAP-5b. Für beide Marker zeigte sich eine von Parathormon abhängige Entwicklung: höhere PTH-Konzentrationen waren sowohl mit höheren Ostase- als auch TRAP-5b-Werten im ELISA verbunden. Die beschriebenen Veränderungen der Marker Ostase und TRAP-5b lassen vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen PTH-Konzentration und Knochenstoffwechsel im Sinne von erhöhter osteoklastischer und osteoblastischer Aktivität bei höheren PTH-Werten besteht.

Diese Ergebnisse spiegeln grundlegende pathophysiologische Aspekte in der Krankheitsentstehung der Renalen Osteopathie wieder. Neben erhöhtem Parathormon und Serumphosphat stellt die Alkalische Phosphatase (Ostase), als Ausdruck des metabolischen Osteoblastenstatus, einen der wichtigsten Laborparameter zur Detektion der Erkrankung

dar². Auch die bei der Renalen Osteopathie vorherrschende gesteigerte osteoklastische Aktivität lässt sich in den ermittelten Resultaten feststellen. Die den Osteoklastenstatus reflektierende TRAP-5b deutete auf eine Abhängigkeit der TRAP-5b von den verwendeten PTH-Konzentrationen hin. Höhere PTH-Werte waren mit höheren Konzentrationen an TRAP-5b im ELISA verbunden, was für eine erhöhte osteoklastische Aktivität in den Zellkulturen spricht. Hervorzuheben ist hierbei die Tatsache, dass sich der beschriebene Effekt lediglich im ELISA, nicht jedoch in der PCR finden ließ. Veränderungen zeigten sich somit nur auf Protein- und nicht auf Expressionsebene. Die gesteigerte TRAP-5b-Synthese bei höheren PTH-Konzentrationen kann dementsprechend nicht auf eine vermehrte Expression zurückgeführt werden, sondern scheint auf anderer Ebene beeinflusst zu werden.

Für eine erhöhte osteoklastische Aktivität, wie sie in den Zellkulturen nachweislich vorlag, ist auf physiologischer Ebene die Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten über das RANKL-RANK-System von Bedeutung. Osteoblasten führen über das von ihnen produzierte RANKL, welches mit dem osteoklastären Rezeptor RANK interagiert, zu einer Stimulation der Osteoklastendifferenzierung und sind damit maßgeblich an der vollständigen Ausreifung von Vorläuferzellen zu Osteoklasten beteiligt. Parathormon beeinflusst bekanntermaßen eben diesen Aktivierungsmechanismus, indem es einen vermehrten Einbau von RANKL in die osteoblastäre Plasmamembran bewirkt, was über das RANKL-RANK-System eine Osteoklasten-Differenzierung und –Aktivierung nach sich zieht^{63, 76}. Im Hinblick auf das Krankheitsbild der Renalen Osteopathie und des hierbei vorliegenden gesteigerten Osteoklastenstoffwechsels mit vermehrter Knochenresorption sprechen die in den Versuchen registrierten Befunde jedoch gegen eine pathophysiologische Bedeutung des RANKL-RANK-Systems im Rahmen des vorherrschenden sHPT. Anhand von Immunzytochemie und PCR ließ sich ein Einfluss der PTH-Zugabe weder für RANKL noch für seinen Rezeptor RANK finden, was dafür spricht, dass die gesteigerte osteoklastische Aktivität sich scheinbar nicht auf eben diesen bekannten Signalweg zurückführen lässt. Es muss also andere Faktoren geben, die Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel und somit auf das Gleichgewicht zwischen Osteoblasten und Osteoklasten haben, möglicherweise durch Parathormon beeinflussbar sind und folgedessen in die Pathophysiologie der Renalen Osteopathie eingreifen.

Hinsichtlich der oft diskutierten möglichen Wirkung von FGF-23 auf den Knochenstoffwechsel sind verschiedene Gesichtspunkte zu betrachten. Eine Koexpression von Klotho, wie sie bei den Nebenschilddrüsen detektiert werden konnte, ließ sich im Knochen nicht finden und legt so die Vermutung nahe, dass der Knochen kein Zielgewebe von FGF-23 darstellt. Andererseits weist das Vorhandensein des Rezeptors FGFR-1, über den FGF-23 nachweislich wirksam wird, an Osteoblasten und Osteoklasten, sowie die Tatsache, dass im Tiermodell unter FGF-23-Exposition Veränderungen der Knochenmineralisation auftraten⁹⁹ darauf hin, dass durchaus Knocheneffekte möglich wären. So konnte beispielsweise die Studie

„Overexpression of Fibroblast Growth Factor 23 suppresses osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro“ von Wang¹⁰⁶ zeigen, dass ein möglicher Zusammenhang besteht zwischen FGF-23-Überexpression und Inhibition von Osteoblasten-Differenzierung und Matrix-Mineralisation. Die Effekte von FGF-23 auf die Proliferation von Osteoprogenitorzellen und die Mineralisation des Osteoids in fetalen Rattenknochen bei FGF-23-Überexpression wurden untersucht. Die gefundenen Resultate zeigten einen supprimierenden Einfluss von FGF-23 auf die Knochenmineralisation, während die Proliferation von Progenitorzellen unbeeinflusst blieb. Die Studie „Patterns of FGF-23, DMP1, and MEPE expression in patients with chronic kidney disease“ von Pereira¹⁰⁷ ließ einerseits eine Korrelation zwischen der FGF-23-Expression durch den Knochen und der Plasmakonzentration von FGF-23 sowie andererseits der Expression von *dentin matrix protein 1* (DMP1) im Knochen erkennen. Ferner standen FGF-23 und DMP1 in einem umgekehrten Verhältnis zur Osteoidakkumulation und somit in Verbindung mit der skelettalen Mineralisation. Ebenfalls wurde FGF-23 in Zusammenhang gebracht mit der Knochenregeneration¹⁰⁸. Auch die Studie „Relationship between Plasma Fibroblast Growth Factor-23 Concentration and Bone Mineralization in Children with Renal Failure on Peritoneal Dialysis“ von Wesseling-Perry¹⁰⁹ konnte eine mögliche Assoziation zwischen FGF-23 und Knochenentstehung aufzeigen. Die Studie „Mineralized tissue cells are a principal source of FGF23“ von Yoshiko¹¹⁰ betont ebenfalls neben den physiologischen Auswirkungen von FGF-23 auf den Phosphathaushalt, bedeutsame Effekte dieses Stoffes auf die Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten. Ferner wiesen die Resultate der tierexperimentellen Studie „Parathyroid hormone regulates fibroblast growth factor 23 in a mouse model of primary hyperparathyroidism“ von Kawata⁹⁵ auf einen Zusammenhang zwischen der Expression von FGF-23 und der Expression von Osteocalcin und Alkalischer Phosphatase hin, ein Effekt der sich zum Teil auch in den vorliegenden Daten erkennen lässt. Die Ergebnisse für Ostase zeigten genau wie FGF-23 eine potentielle Beeinflussung durch Parathormon und lassen die Vermutung offen, dass eine Korrelation dieser beiden Marker denkbar ist.

Hingegen zeigte die Studie „A prospective Study of fibroblast growth factor-23 in children with chronic kidney disease“ von Magnusson⁹⁷, dass FGF-23 zwar mit Osteocalcin korrelierte, nicht jedoch mit anderen Markern des Knochenstoffwechsels. Ferner ließ sich kein Zusammenhang zwischen der Knochendichte und FGF-23 finden. Auch die Studie „The relationship between circulating fibroblast growth factor 23 and bone metabolism factors in korean hemodialysis patients“ postulierte, dass FGF-23 keinen direkten Effekt auf die Knochenmineralisation ausübt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen an eine mögliche Beeinflussung des Knochenstoffwechsels durch FGF-23 denken. Hierbei ist neben der gezeigten PTH-vermittelten Erhöhung von FGF-23 vor allem die Tatsache von Bedeutung, dass der gesteigerte Kno-

chenstoffwechsel nicht auf das altbekannte RANK-RANKL-System zurückgeführt werden kann. Sowohl RANK als auch RANKL blieben von den PTH-Konzentrationserhöhungen unbeeinflusst. Anders der Osteoklastenmarker TRAP-5b, dessen Konzentration sich mit steigender PTH-Zugabe stetig erhöhte. Demnach muss auf anderer Ebene in die Physiologie der Osteoklasten eingegriffen werden. Eben hier zeigt sich ein möglicher pathophysiologischer Angriffspunkt für FGF-23, denn trotz Korrelation zwischen PTH und TRAP-5b muss die Erhöhung des Osteoklastenmarkers nicht allein unter dem Einfluss von Parathormon stehen. Ein möglicher Weg über FGF-23 ist durchaus denkbar, kann allerdings an den vorliegenden Ergebnissen nicht mit letzter Sicherheit nachgewiesen werden.

Auch wenn die vorliegende Arbeit für eine Synthesesteigerung von FGF-23 durch Parathormon spricht und somit auch klar auf eine mögliche pathogenetische Bedeutung von FGF-23 bei der Entstehung des Krankheitsbildes der Renalen Osteopathie hinweist, verbleibt eine Abklärung der genauen Auswirkungen / Signalwege von FGF-23 am Knochen und der zu Grunde liegenden Mechanismen über die Parathormon die FGF-23-Synthese erhöht, um die Pathophysiologie der Renalen Osteopathie endgültig zu verstehen und vielleicht neue therapeutische Ansatzpunkte zu finden.

5. Zusammenfassung:

Chronisch niereninsuffiziente (cNI) Patienten entwickeln einen Vitamin D-Mangel, Hypokalzämie sowie Hyperphosphatämie, infolgedessen ein sekundärer Hyperparathyreoidismus auftritt. Die erhöhte Parathormonkonzentration im Serum bedingt am Knochen eine Verschiebung des Osteoblasten / Osteoklasten Gleichgewichtes zugunsten der Osteoklasten mit daraus entstehender Ostitis fibrosa.

Eine verminderte glomeruläre Filtrationsrate, wie sie bei cNI vorkommt, führt des Weiteren zu einer vermehrten FGF-23-Expression, ein von Knochenzellen produzierter Faktor, der phosphaturische und 1- α -Hydroxylase inhibitorische Wirkung aufweist. Unklar ist in diesem Zusammenhang, ob PTH die Synthese von FGF-23 und / oder umgekehrt beeinflusst, bzw. ob FGF-23 Auswirkung auf die Knochenmineralisation hat.

In der vorliegenden Arbeit wurde an humanen KM-Zellen untersucht, ob erhöhte Parathormon-Werte in vitro möglicherweise mit erhöhten FGF-23-Konzentrationen einhergehen.

Knochenmarkzellen dreier Spender wurde hierfür 30 Tage lang mit 10, 100 pM Parathormon sowie ohne PTH unter osteogener Stimulation kultiviert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden mittels RT-PCR, Immunhistochemie, ELISA und photometrischen Messungen die Marker der osteoblastären Differenzierung (Osteocalcin, RANKL, Runx-2 und Ostase), der Osteoklasten-Differenzierung (RANK, TRAP-5b) sowie die FGF-23-Konzentration und die Mineralisationsmarker Calcium und Phosphat bestimmt.

Während die meisten Zellen positiv waren für CD105, einem Marker für mesenchymale Stammzellen, ließen sich keine hämatopoetische Vorläuferzellen (CD34-positiv) detektieren. Für beide Adhäsionsmoleküle fand sich jedoch kein Unterschied bezüglich der Parathormonkonzentration.

Der Transkriptionsfaktor Runx-2 sowie die Osteoblastenprodukte RANKL und Osteocalcin konnten in allen Ansätzen ohne erkennbaren Einfluss der Parathormonkonzentration nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu ließ sich im ELISA für Ostase bei den Knochenmarkzellen zweier Spender ein Effekt für Parathormon finden. Höhere Parathormonkonzentrationen haben höhere Ostase-Werte induziert.

Der osteoklastäre Rezeptor RANK war ebenfalls unabhängig von der Parathormon-Zugabe.

Auch das Osteoklastenprodukt zeigte eine Abhängigkeit von der PTH-Zugabe. Während sich zwar im Expressionsprofil kein Unterschied bezüglich der Parathormonkonzentration zeigte, war einer Erhöhung von Parathormon im ELISA hingegen mit ansteigenden TRAP-5b-Werten verbunden.

Ferner wies das bestimmte FGF-23 Tendenzen eines Parathormon-Einflusses auf. Die Ergebnisse dokumentieren eine potentielle Wirkung der Parathormonkonzentration, deren Anhebung zu gesteigerten FGF-23-Werten im ELISA führt.

Wie angesichts der Resultate für Runx-2 und Osteocalcin erkennbar, erfolgte in allen Knochenmarkzellen unabhängig von der Parathormon-Zugabe eine osteoblastäre Differenzierung.

Die detektierbaren Veränderungen der Marker Ostase und TRAP-5b legen jedoch die Vermutung nahe, dass höhere Parathormonkonzentrationen mit einem erhöhten Knochenstoffwechsel sowohl von osteoblastärer als auch osteoklastärer Seite einhergehen. Die gesteigerte osteoklastäre Aktivität lässt sich allerdings scheinbar nicht auf den bekannten RANKL-RANK-Signalweg zurückführen, da sich für beide Marker kein erkennbarer Einfluss der PTH-Zugabe zeigte.

Hinsichtlich der hinterfragten Wirkung von Parathormon auf die FGF-23-Konzentration zeigt sich eine Tendenz ansteigender FGF-23-Werte mit zunehmender Parathormonkonzentration.

6. Tabellenanhang:

6.1. Material:

Reagenzien / Chemikalien und Kits:

| | <u>Hersteller:</u> |
|---|--|
| PBS (Dulbecos Phosphate Buffer Saline) | (PAA, Cölbe D) |
| Lymphozytenseparationsmedium (LSM) | (PAA, Cölbe D) |
| DMEM Low Glucose (Dulbecos Minimal Essential Medium) | (PAA, Cölbe D) |
| P/S/G (L-Glutamine 200mM mit Penicillin und Streptomycin) | (PAA, Cölbe D) |
| FCS Gold EU-Standard (fetal bovines serum) | (PAA, Cölbe D) |
| Trypsin-EDTA | (PAA, Cölbe D) |
| Ascorbid-Acid-2-phosphat | (Sigma, Taufkirchen D) |
| β-Glycerolphosphat | (Sigma, Taufkirchen D) |
| Dexamethason | (Sigma, Taufkirchen D) |
| Teriparatid (Forsteo ^R) | (Lilly Deutschland GmbH, Bad Homburg) |
| Roti-Histofix 4% säurefrei | (Roth, Karlsruhe D) |
| Aqua dest. | |
| Triton X100 | (VWR, Darmstadt D) |
| ABC (Avidin-Biotin-Complex) | (Biozol, Esching D) |
| DAB (3,3 Diaminobenzidin) | (Sigma, Taufkirchen D) |
| 30% H ₂ O ₂ | (VWR, Darmstadt D) |
| Haemalaun nach Mayer | (VWR, Darmstadt D) |
| Antikörper | |
| - Osteocalcin | (Santa Cruz, Heidelberg D) |
| - RANKL | (Santa Cruz, Heidelberg D) |
| - RANK | (Santa Cruz, Heidelberg D) |
| - CD34 | (DAKO, Hamburg D) |
| - CD105 | (DAKO, Hamburg D) |
| -FGF-23 | (Santa Cruz, Heidelberg D) |
| Ziege-anti-Maus-IgG biotiniliert | (Biozol, Eching D) |
| Ziege-anti-Kaninchen-IgG biotiniliert | (Biozol, Eching D) |
| Kaninchen-anti-Ziege-IgG biotiniliert | (Biozol, Eching D) |

RNeasy Mini-Kit (Quiagen, Hilden D)
 RNase-free DNase-Set (Quiagen, Hilden D)
 Qiashredder Homogenizers (Quiagen, Hilden D)
 Ethanol für die Molekularbiologie (VWR, Darmstadt D)
 Mercaptoethanol für die Molekularbiologie (VWR, Darmstadt D)

Primer

| Abkürzung | 5'forward Primer | 3'Reverse Primer | bp |
|-----------|-----------------------------|-----------------------------|-----|
| OC | agt cca gca aag gtg cag c | ggc cgt aga agc gcc gat | 209 |
| RANKL | cag agc gca gat gga tcc t | gt acc aag agg aca gac tca | 354 |
| TRAP | ctg tcc tgg ctc aag aaa cag | cat agt gga agc gca gat agc | 298 |
| CD34 | cat cac aga aac gac agt caa | ctg cct tga tgt cac tta gg | 265 |
| CD105 | ggc cgc acg ctc gag tg | aca tga gca gct ccg ggc | 498 |

Phosphat FS-Kit (Greiner Biochemica, Hersteller DiaSys Diagnostics Systems GmbH, Holzheim)

Calcium CPC FS-Kit (Greiner Biochemica, DiaSys Diagnostics Systems GmbH, Holzheim)

ELISA-Kits

- TRAP-5b (IDS GmbH, Frankfurt D)
 - Ostase (IDS GmbH, Frankfurt D)
 - FGF-23 (Immundiagnostik, Bensheim, D)

Verbrauchsmittel und Geräte:

Kulturflaschen (NUNC, Wiesbaden D)
 24-Well Platten (NUNC, Wiesbaden D)
 T25-Kulturflaschen (NUNC, Wiesbaden D)
 T175-Kulturflaschen (NUNC, Wiesbaden D)
 Brutschrank (Binder, Tuttlingen D)
 Neubauer Zählkammer (VWR, Darmstadt D)
 Zentrifuge Eppendorf 5810 R (Eppendorf, Hamburg D)
 Spektralphotometer Cary 50 (Varian, Darmstadt D)

6.2. Abbildungen

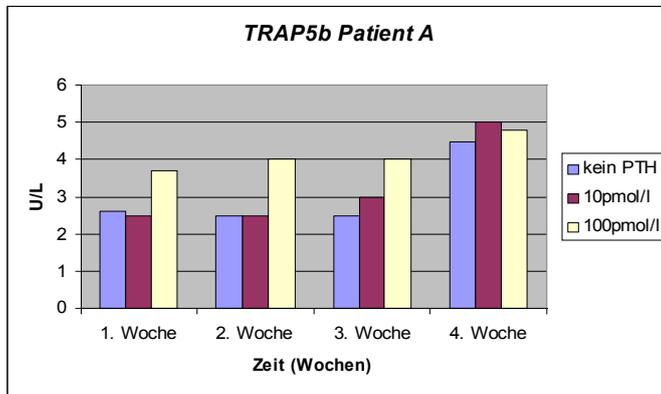


Abb. 19.: ELISA-Ergebnisse TRAP-5b Patient A

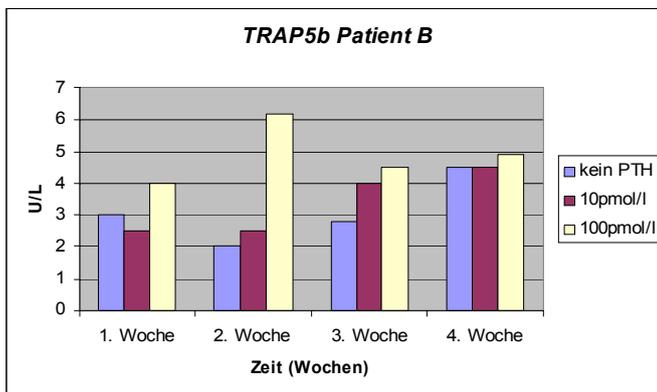


Abb. 20.: ELISA-Ergebnisse TRAP-5b Patient B

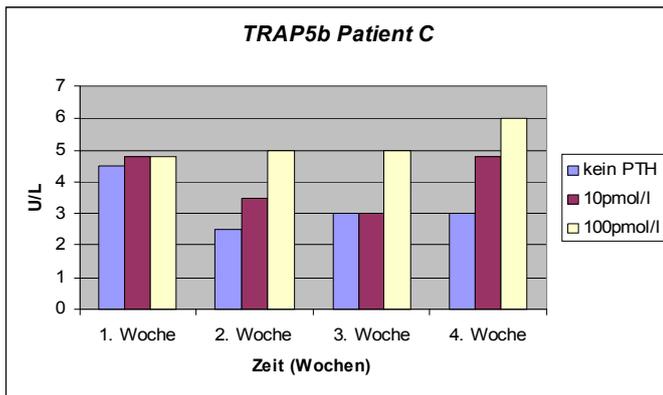


Abb. 21.: ELISA-Ergebnisse TRAP-5b Patient C.

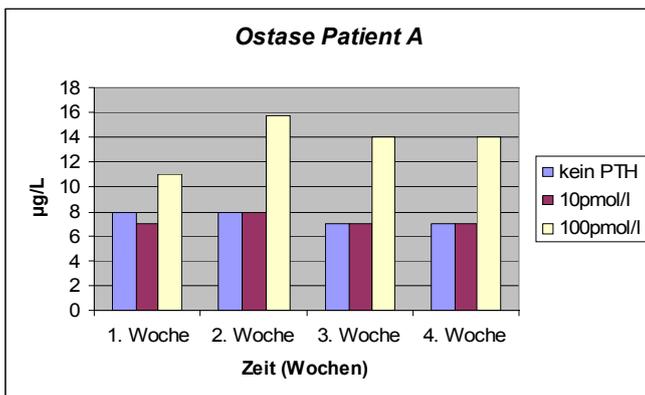


Abb. 23: ELISA-Ergebnisse Ostase Patient A.

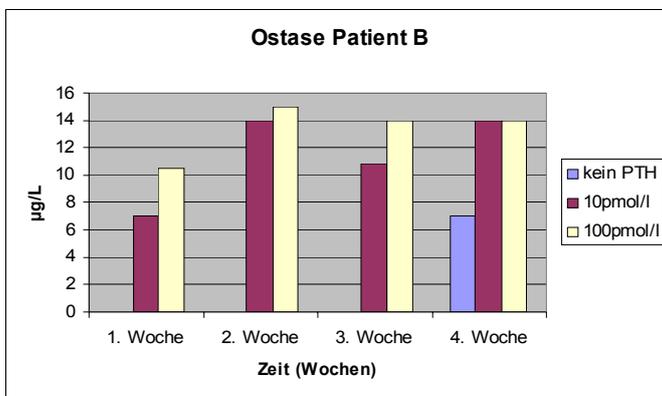


Abb. 24: ELISA-Ergebnisse Ostase Patient B.

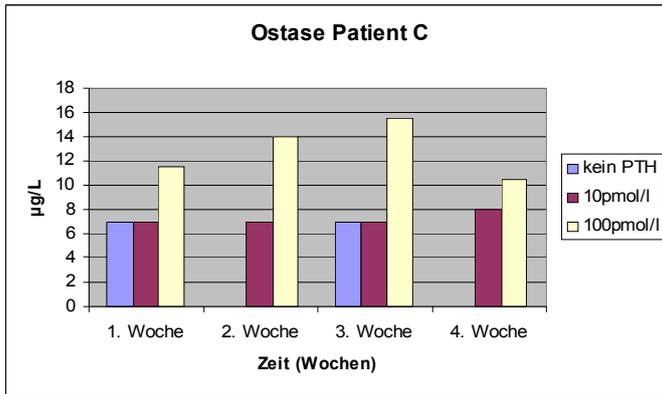


Abb. 25: ELISA-Ergebnisse Ostase Patient C.

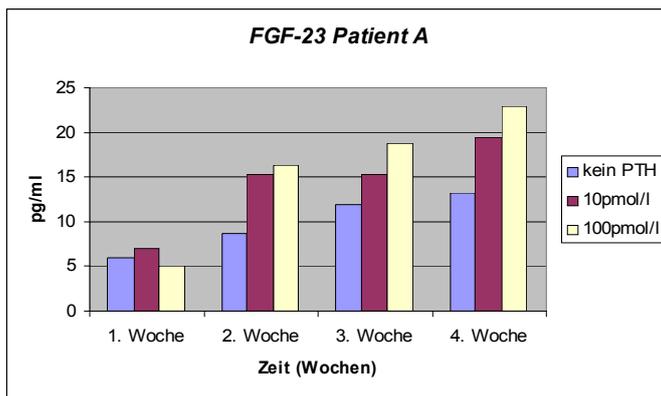


Abb. 27: ELISA-Ergebnisse FGF-23 Patient A.

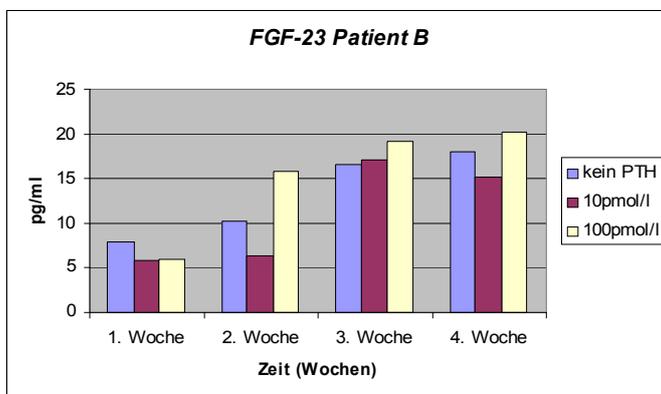


Abb. 28: ELISA-Ergebnisse FGF-23 Patient B.

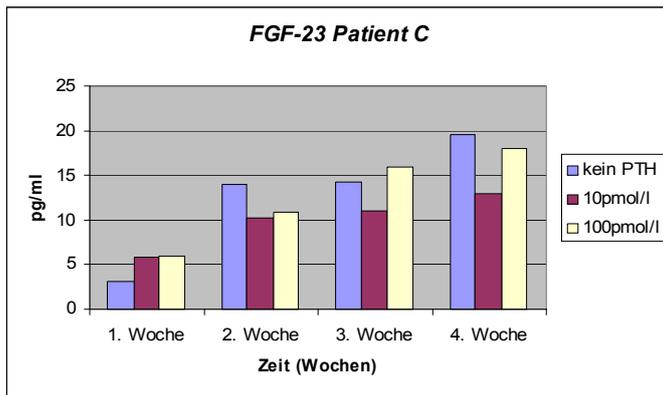


Abb. 29: ELISA-Ergebnisse FGF-23 Patient C.

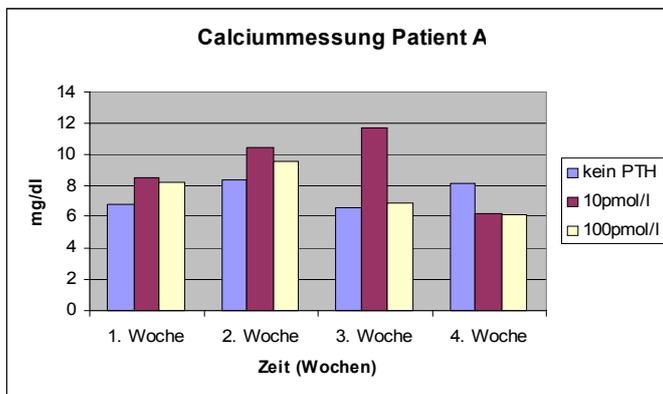


Abb. 32: Calciummessung Patient A.

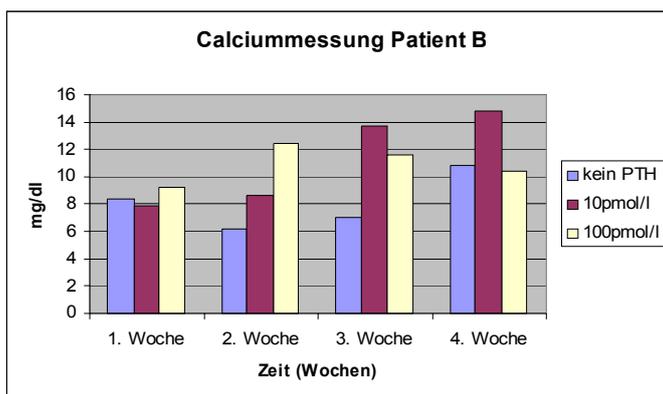


Abb. 33: Calciummessung Patient B.

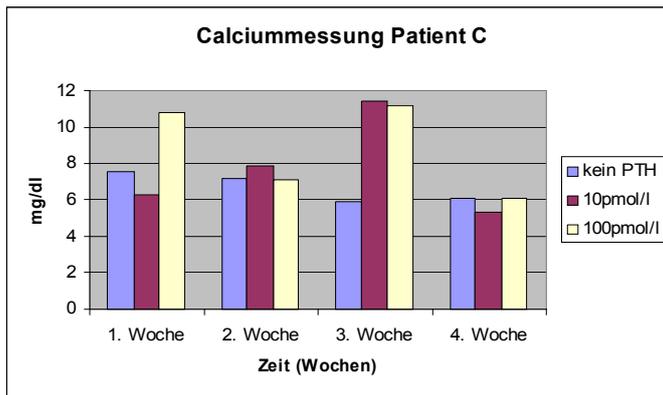


Abb. 34: Calciummessung Patient C.

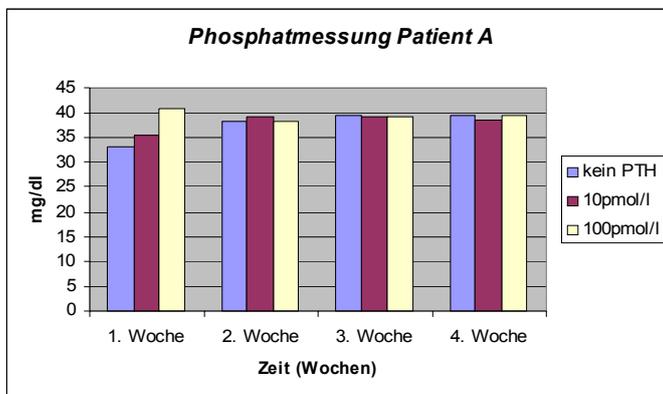


Abb. 36: Phosphatmessung Patient A.

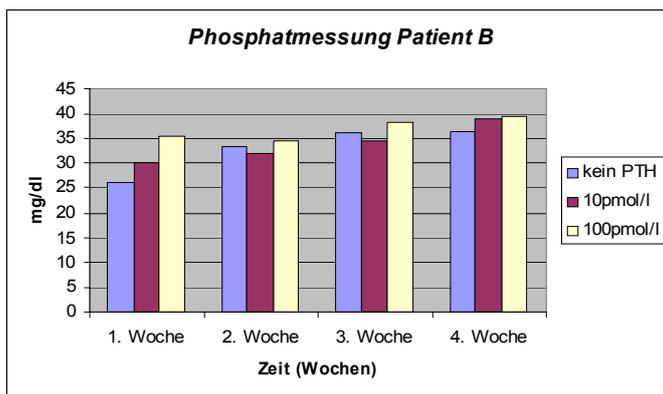


Abb. 37: Phosphatmessung Patient B.

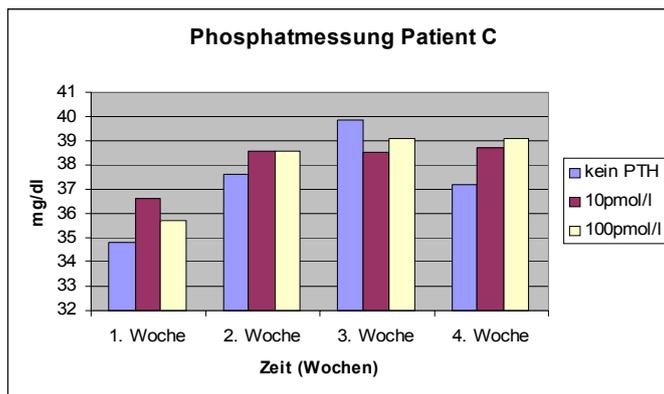


Abb. 38: Phosphatmessung Patient C.

7. Literaturverzeichnis:

1. G. Offermann KS, A. Schulz, G. Delling. Immunoreaktives Parathormon, 25-Hydroxycalciferol und KNochenhistologie bei renaler Osteopathie. Klinische Wochenschrift 54, Springer Verlag 1976:625-632.
2. Herold G. Innere Medizin. 2007.
3. Ulloa-Montoya F. VC, Hu W. Culture System for pluripotent stem cells. J Bio-sci Bioeng 2005; 100(1):12-27.
4. Czyz J WC, Rolletschek A, Blyszcuk P, Cross M, Wobus AM. Potential of embryonic and adult stem cells in vitro. Biol Chem 2003; 384:1391-1409.
5. M. Jäger MS, A. Knipper, Ö. Degistrici, J. Fischer, G. Kögler, P. Wernet, R. Krauspe. In-vitro- und In-vivo-Knochenregenerierung durch mesenchymale Stammzellen aus dem Nabelschnurblut. Der Orthopäde 12 2004:1361-1372.

6. McKinney-Freeman SL MS, Jackson KA, Norwood K, Hirschi KK, Goodell MA. Altered phenotype and reduced function of muscle-derived hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2003; 31.
7. A. J. Friedenstein PKV, Kurolesova A. I., Frolova G. P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenesis and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6: 230-247 1968.
8. Cassiede P. DJE, Ma F., Caplan A.I. Oteochondrogenic potential of marrow mesenchymal progenitor cells exposed to FGF-beta 1 or PDGF-BB as assayed in vivo and in vitro. *J. Bone Miner Res.* 1996; 11 (9):1264-73.
9. Ferrari G. C-DAG, Coletta M., Paolucci E., Stornaivola A., Cossu G., Mavillo F. Muscle Regeneration by Bone Marrow-Derived Myogenic Progenitors. *Science* 1998; 279:1528.
10. Wakitani S. ST, Caplan A.I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1985; 18(12):1417-26.
11. Dennis J.E. CAI. Analysis of the development potential of conditionally immortal marrow-derived mesenchymal progenitor cells isolated from the H-2k^b-tsA58 transgenic mouse. *Connect Tissue Res.* 1996; 35(1-4).
12. Pittenger M.F. AMM, Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143.
13. Jaiswal R.K. JN, Bruder S.P., Mbalaviele G., Marshak D.R., Pittenger M.F. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol. Chem* 2000; 275:9645-9652.
14. Dominici M. LBK, Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini FC., Krause DS., Deans RJ., Keating A., Prockop DJ., Horwitz EM. Minimal criteria for defining

- multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8:315-317.
15. G.A. Rodan. Bone mass homeostasis and bisphosphonate action. *Bone* 1997; 20:1-4.
 16. Rauch RL. *Histologie*. 2003, Thieme Verlag.
 17. G. Löffler PEP. *Biochemie und Pathobiochemie*. 7. Auflage, Springer Verlag.
 18. Cancedda R. CP, Cancedda FD., Dozi B., Quarto R. Development control of chondrogenesis and osteogenesis. *Int J Dev Biol* 2000; 44:707-714.
 19. Schlesinger P.H. BHC, Teitelbaum S.L., Edwards J.C. Characterization og the osteovlast ruffled border chloride channel and it role in bone resorption. *J Biol Chem* 1997; 272(30):18636-43.
 20. Silver I.A. MRJ, Etherington D.J. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res* 1988; 175(2):266-76.
 21. Vaananen H.K. HM. The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *J Cell Sci* 1995; 108:2729-32.
 22. Liu Z. LFF, Lammens J. Dequeker J. Molecular signaling in bone fracture healing and distraction osteogenesis. *Histol Histopathol*. 1999; 14:587-595.
 23. Taheda S. KG. Central control of bone formation. *J Bone Miner Metab* 2001; 19:195-198.
 24. Orlandini S.Z. FL, Benvenuti S., Lasagni L., Franchi A., Masi L., Bernabei P.A., Santini V., Brandi M.L. Osteoblastic and preosteoclastic cells in vitro. *Cell tissue Res*. 1995; 281:33-42.

25. Hart S.M. ER. Biochemical markers of bone turnover. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1999; 8:421-427.
26. Rodan G.A. NM. Gene expression in osteoblastic cells. *Crit Rev Euraryot Gene Expr* 1991; 1:85-98.
27. Roelen BA DP. Controlling mesenchymal stem cell differentiation by TGFβ family members. *J Orthop Sci* 2003; 8.
28. E. Neumann GS. Knochenstoffwechsel - Molekulare Mechanismen. *Rheumatologie* 2007:286-289.
29. Lian JB JA, Zaidi SK et al. Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: Role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit Rev Euraryot Gene Expr* 2003; 14:1-42.
30. Kowanetz M VU, Bergstrom R, Heldin CH, Moustakas A. Id2 and id3 define the potency of cell proliferation and differentiation responses to transforming growth factor β and bone morphogenetic protein. *Mol Cell Biol* 2004; 24:4241-4254.
31. Bialek P. KB, Yang X., Schrock M., Sobic D., Hong N., Wu H., Yu K., Ornitz D.M., Olson E.N., Justice M.J., Karsenty G. A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev Cell* 2004; 6:423-235.
32. Szulczweski D.H. MK. Characterization of bovine osteoclasts on an ionic cement in vitro. *Cells and Material* 1993; 3:83-92.
33. Shaikh A, Berndt T, Kumar R. Regulation of phosphate homeostasis by the phosphatonins and other novel mediators. *Pediatr Nephrol* 2008.
34. Fukumoto S. Physiological regulation and disorders of phosphate metabolism - pivotal role of fibroblast growth factor 23. *Intern Med* 2008; 47:337-43.

35. Fukagawa M, Hamada Y, Nakanishi S, Tanaka M. The kidney and bone metabolism: Nephrologists' point of view. *J Bone Miner Metab* 2006; 24:434-8.
36. Yamashita T, Yoshioka M, Itoh N. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277:494-8.
37. Yan X. YH, Jing X., Yao L., Sawada T., Zhang Y., Liang S., K. S. Fibroblast growth factor 23 reduces expression of type IIa Na⁺/Pi co-transporter by signaling through a receptor functionally distinct from the known FGFRs in opossum kidney cells. *Genes Cells* 2005; 10:489-502.
38. Razzaque MS, St-Arnaud R, Taguchi T, Lanske B. FGF-23, vitamin D and calcification: the unholy triad. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20:2032-5.
39. Shiguang Liu LDQ. How Fibroblast Growth Factor 23 Works. *American Society of Nephrology* 18 2007:16377-164.
40. Liu S GR, Simpson LG, Xiao ZS, Burnham CE, Quarles LD. Regulation of fibroblastic growth factor 23 expression but not degradation by PHEX. *J Biol Chem* 2003; 278:37419-37426.
41. Kolek O. I. HER, Jones M. D., LeSueur L. K., Lipko M. A., Kiela P. R., Collins J. F., Haussler M. R., Ghishan F. K. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ upregulates FGF23 gene expression in bone: the final link in a renal-gastrointestinal-skeletal axis that controls phosphate transport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289:G1036-42.
42. Shiguang Liu JZ, Wen Tang, Xi Jiang, David W. Rowe, L. Darryl Quarles. Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291:E38-E49.
43. Saito H. MA, Ohtomo S., Hirata M., Kusano K., Kato S., Ogata E., Segawa H., Miyamoto K., Fukushima N. Circulating FGF-23 is regulated by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and phosphorus in vivo. *J Biol Chem* 2005; 280:2543-9.

44. Liu S TW, Zhou J, Stubbs JR, Luo Q, Pi M, Quarles LD. Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:1305-1315.
45. Lorenz-Depiereux B BM, Benet-Pages A, Amyere M, Wagenstaller J, Muller-Barth U, Badenhop K, Kaiser SM, Rittmaster RS, Shlossberg AH, Olivares JL, Loris C, Ramos FJ, Glorieux F, Vikkula M, Juppner H, Strom TM. DMP1 mutations in autosomal recessive hypophosphatemia implicate a bone matrix protein in the regulation of phosphate homeostasis. *Nat Genet* 2006; 38:1248-1250.
46. Liu S RP, Vierthaler L, Zhou J, Quarles LD. Phosphorylates acidic serine-aspartate-rich MEPE-associated motif peptide from matrix extracellular phosphoglycoprotein inhibits phosphate regulating gene with homologies to endopeptidase on the X-chromosome enzyme activity. *J Endocrinol* 2007; 192:261-267.
47. Fukagawa M, Nii-Kono T, Kazama JJ. Role of fibroblast growth factor 23 in health and in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005; 14:325-9.
48. Razzaque MS, Lanske B. The emerging role of the fibroblast growth factor-23-klotho axis in renal regulation of phosphate homeostasis. *J Endocrinol* 2007; 194:1-10.
49. Yu X. IOA, Goetz R., Zhang F., Davis S. I., Garringer H.J., Linhardt R. J., Ornitz D. M., Mohammadi M., White K. E. Analysis of the biochemical mechanisms for the endocrine actions of fibroblast growth factor-23. *Endocrinology* 2005; 146:4647-56.
50. Ornitz DM. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: Complex interaction essential for development. *Bioessays* 2000; 22:108-112.

51. Kurosu H OY, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Baum MG, Schiavi S, Hu MC, Moe OW, Kuro-o M. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J Biol Chem* 2006; 281:6120-6123.
52. Kuro-o M MY, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname, T Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997; 390:45-51.
53. Syal A, Schiavi S, Chakravarty S, Dwarakanath V, Quigley R, Baum M. Fibroblast growth factor-23 increases mouse PGE2 production in vivo and in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290:F450-5.
54. Pschyrembel W. *Klinisches Wörterbuch*. 2002 259. Auflage, de Gruyter Verlag.
55. M. Schömig. *Renale Osteopathie*. 2005 1. Auflage Uni Med Verlag.
56. S. Horn. *Renale Osteopathie*. *Journal für Mineralstoffwechsel* 2001; 8(3):20-24.
57. Dörner K. *Klinische Chemie und Hämatologie*. 5. Auflage Thieme Verlag.
58. Siewert J.R. HF, Rothmund M. *Praxis der Viszeralchirurgie*. 2000 Springer Verlag.
59. Gogusev J. SP, Hory B., Giovannini M., Goureau Y., Sarfati E., Drueke T.B. Depressed expression of calcium receptor in parathyroid gland tissue of patients with hyperparathyroidism. *Kidney Int* 1997; 51:328-36.
60. Fukagawa M. NS, Fujii H., Hamada Y., Abe T. Regulation of parathyroid function in chronic kidney disease (CKD). *Clin Exp Nephrol* 2006; 10(3):175-9.

61. Martin K.J. FJJ, Conrades M.B., Hrusko K.A., Klahr S., Stapolsky E. Selective uptake of the synthetic amino terminal fragment of bovine parathyroid hormone by isolated perfused bone. *J Clin Invest* 1978; 62:256-61.
62. Hernando N. FJ. PTH-induced downregulation of the type IIa Na/P(i)-cotransporter is independent of known endocytic motifs. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11(11):1961-8.
63. Burgess T.L. QY. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *Cell Biol* 1989; 145(3).
64. Wittrant Y. TS, Chipoy C., Padrines M., Blanchard F., Heymann D., Rédini F. RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumors and associated osteolysis. *Biochimica et Biophysica Acta, - Reviews on cancer* 2004; 1704:49-57.
65. Jäger M FT, Denck H, et al. Proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in vitro. *J. Orthop. Res.* 2005; 26:1440-1448.
66. L. Fraker. Biochemical markers of bone turnover. *Clin Biochem* 1993; 26:431-432.
67. Hauschka P.V. LJB, Gallop P.M. Vitamin K and mineralizatuin. *Trend Biochem Sci* 1978; 3:75-78.
68. Seibel M.J. RSP, Bilezikian J.P. Serum undercarboxylated osteocalcin and the risk of hip fractures. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:717-718.
69. Seibel M.J. WHW, Zeigter R. Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels. *Klin Lab* 1993; 39:717-727 & 839-850.
70. P.D. Delmas. Biochemical markers of bone turnover. *Acta Orthop. Scand* 1995; 66:170-182.

71. Lian J.B. GCM. Osteocalcin: Biochemical considerations and clinical applications. *Clin Orthop* 1998; 226:267-291.
72. Stracke H. SA, Moeller D., Rossol S., Schatz H. Effect of growth hormone on osteovlasts and demonstration of somatomedin-C/IGF I in bone organ culture. *Acta Endocrinol* 1984; 107:16-24.
73. Keck A.-V. PM. Knochenstoffwechsel bei malignen Erkrankungen. *J Miner Stoffwechsel* 2003; 10 (2):6-11.
74. Hofbauer L.C. DCR, Spelsberg T.C., Riggs B.L., Khosta S. Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenic protein -2 and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 250:776-81.
75. Hofbauer L.C. LDL, Dunstan C.R., Spelsberg T.C., Riggs B. L., Khosta S. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone* 1999; 25:255-9.
76. Gori F. HLC, Dunstan C.R., Spelsberg T.C., Khosla S., Riggs B.L. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology* 2000; 141:4768-76.
77. Hofbauer L.C. GF, Riggo B.L., Lacey D.L., Dunstan C.R, Spelsberg T.C., Khosta S. Stimulation of osteoprotegerin ligand an inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 1999; 140:4382-9.
78. Krause D.S. FMJ, Clivin C.I., May W.S. CD34: Structure, biology and clinical utility. *Blood* 1996; 87:1-13.

79. Gougos A. LM. Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol* 1988; 141(6):1925-33.
80. Cheifetz S. BT, Cales C. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1992; 267(27):19027-30.
81. Barbara N.P. WJL, Letarte M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem* 1999; 274(2):584-94.
82. Oddie G.W. SG, Angel N.Z., Walsh N., Gudat L.W., defersey J., Cassady A.I., Hamilton S.E., Hume D.A. Structure, Function and Regulation of Tartrate-resistant Acid Phosphatase. *Bone* 2000; 27(5):575-584.
83. Lamp E.C. DHG. Biology of tartrate-resistant Acid Phosphatase. *Leuk Lymphoma* 2000; 39(5-6):477-84.
84. Halleen J.M. HTA, Karp M., Kakonen S.M., Pettersson K., Vaananen H.K. Characterization of serum tartrate-resistant acid phosphatase and development of a direct two site immunoassay. *Bone Mine Res* 1998; 13:683-7.
85. Janokila A.J. PRN, Parthasarathy L.K., Seelan R.S., Hsuetz Y.C., Rissanen J. Properties and expression of human tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5a by monocyte-derived cells. *J Leukoc Biol* 2005; 77:209-18.
86. Janokila A.J. TK, Sun S.Z., Yam L.T. Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as serum marker for osteoclastic activity. *Clin Chem* 2001; 47:74-80.
87. Salo J. LP, Mulari M., Metsikko K., Vaananen H.K. Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. *Science* 1997; 276:270-3.

88. C. Minkin. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 1982; 34:285-290.
89. Lindemann FK. Etablierung und Bewertung von Knochenstoffwechselfparametern im Labor eines Krankenhauses mit Maximalversorgung. Aus der Abteilung Klinische Chemie, Klinikum links der Weser 2005.
90. Horney B.S. FAJ, Meckensie A., honor D.J., Buczkowski S. Alkaline phosphatase isoenzymes in feline serum using an agarose gel alkaline phosphatase kit method. *Can J. Vet Res* 1992; 56:373-5.
91. D.W. Moss. Perspectives in alkaline phosphatase research. *Clin Chem* 1992; 38:2486-2499.
92. Salnigcarnboriboon R. TK, Komori T., Nakashima K., Ezura Y., Noda M. Runx2 is a target of Mechanical Unloading to Alter Osteoblastic Acticity and Bone Formation in Vivo. *Endocrinology* 2006; 147:2296-2305.
93. Feng JQ, Wer MK, Quarles LD, Bonewald LF, White KEard LM, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B, Yu X, Rauch F, Davis SI, Zhang S, Rios H, Drez. Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet* 2006; 38:1310 - 1315.
94. Gutierrez O. MM, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, Smith K, Lee H, Thadhani R, Jüppner H, Wolf M. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 2008; Aug 7; 359(6):548-92.
95. Kawata T, Imanishi Y, Kobayashi K, et al. Parathyroid hormone regulates fibroblast growth factor-23 in a mouse model of primary hyperparathyroidism. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:2683-8.
96. Sato T. TY, Ueki T., Goto N., Matsuoka S., Katayama A., Haba T., Uchida K., Nakanishi S., Kazama J. J., Gejyo F., Yamashita T., Fukagawa M. Total para-

- thyroidectomy reduces elevated circulating fibroblast growth factor 23 in advanced secondary hyperparathyroidism. *Am J Kidney Dis* 2004; 44:481-7.
97. Magnusson P HS, Swolin-Eide D. A prospective study of fibroblast growth factor-23 in children with chronic kidney disease. *Scand J Clin Lab Invest*. 2010; Feb;70(1):15-20.
 98. Whitney W. Brown HJ, Craig B. Langman, Heather Price, Emily G. Farrow, Kenneth E. White, Kenneth L. McCormick. Hypophosphatemia with Elevations in Serum Fibroblast Growth Factor 23 in a Child with Jansen's Metaphyseal Chondrodysplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; January; 94(1):17-20.
 99. Torres P. U. FG, Vernejoul M. C., Silve C., Prié D. Bone mass does not correlate with the serum fibroblast growth factor 23 in hemodialysis patients. *Kidney Int*; 73:102-107.
 100. Hiroyuki Yamashita TY, Masashi Miyamoto, Takashi Shigematsu, Junichiro James Kazama, Takashi Shimada, Yuji Yamazaki, Seiji Fukumoto, Masafumi Fukagaw, Shiro Noguchi. Fibroblast growth factor (FGF)-23 in patients with primary hyperparathyroidism. *European Journal of Endocrinology* 2004; 151:55-60.
 101. Ferrari S.L. BJP, Rizoli R. Fibroblast growth factor-23 relationship to dietary phosphate and renal phosphate handling in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:1519-1524.
 102. Ito N. FS, Takeuchi Y. Effect of acute changes of serum phosphate on fibroblast growth factor (FGF) 23 levels in healthy young men. *J Bone Miner Metab* 2007; 25.
 103. Krajisnik B, Marsell, Ljunggren, Akerström, Jonsson, Westin, Larsson. Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1 α -hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *Journal of Endocrinology* 2007:125-131.

104. Ben-Dov G, Lavi-Moshayoff, Goetz, Kuro-o, Mohammadi, Sirkis, Naveh-Many, Silver. The parathyroid is a target organ for FGF-23 in rats. *The Journal of Clinical Investigation* 2007; 117:4003-4008.
105. Vardit Lavi-Moshayoff JS, Tally Naveh-Many. Human PTH gene regulation in vivo using transgenic mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 297:713-719.
106. Wang Y, Yamamoto, Minamizaki, Kozai, Tanne, Aubin, Maeda. Overexpression of Fibroblast Growth Factor 23 Suppresses Osteoblast Differentiation and Matrix Mineralisation in Vitro. *Journal of bone and mineral research* 2008; 23:939-948.
107. R. Pereira HJ, C. Azucena-Serrano, O. Yadin, I. Salusky, K. Wesseling-Perry. Patterns of FGF-23, DMP1, and MEPE expression in patients with chronic kidney disease. *Bone* 2009; 45:1161-1168.
108. Goebel S LJ, Rammoser U, Seefried L, Wintgens KF, Seufert J, Duda G, Jakob F, Ebert R. FGF23 is a putative marker for bone healing and regeneration. *J Orthop Res.* 2009; 27(9):1141-6.
109. Katherine Wesseling-Perry RCP, Hejing Wang, Robert M. Elashoff, Shobha Sahney, Barbara Gales, Harald Jüppner, Isidro B. Salusky. Relationship between Plasma Fibroblast Growth-Factor-23 Concentration and Bone Mineralisation in Children with Renal Failure on Peritoneal Dialysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(2):511-517.
110. Yoshiko Y, Wang H, Minamizaki T, et al. Mineralized tissue cells are a principal source of FGF23. *Bone* 2007; 40:1565-73.

8. Lebenslauf:

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum: 10.03.1984
Geburtsort: Mönchengladbach

BILDUNGSWEG

1990 - 1994 **Grundschule, Mönchengladbach**
1994 - 2003 **Gymnasium, Mönchengladbach, Abschluss Abitur**
2003 - 2009 **Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf**
Herbst 2005: 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Herbst 2009: 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

BERUFLICHER WERDEGANG

Seit 01/2010 Assistenzärztin in der Kinderheilkunde

VERÖFFENTLICHUNGEN

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, Berlin 10/2008
„Ein in vitro Modell zur renalen Osteopathie“

9. Danksagung:

Mein Dank gilt insbesondere Herrn Priv. Doz. Dr. med. Marcus Jäger, der mir diese Arbeit ermöglichte, mich herbei immer unterstütze und mir die gesamte Zeit über mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Ich hätte mir keine bessere Betreuung und keinen besseren Doktorvater wünschen können.

Ein weiteres großes Dankeschön gilt Frau Sabine Lensing-Höhn, die mir während der aufwendigen Laborzeit zur Seite gestanden hat und dank der ich auch in den schwierigsten Situationen nie den Mut und vor allem nicht die Lust an der Laborarbeit verloren habe.

Ich möchte mich bei diesen beiden Personen herzlichst für alles bedanken, was sie während dieser gesamten Zeit für mich getan haben, ich werde es ihnen nie vergessen.

Des Weiteren möchte ich Frau Dr. rer. nat. Monika Herten danken, die sich die Mühe gemacht und die Zeit genommen hat, mir zu helfen, in der Fülle der Ergebnisse nicht den Überblick zu verlieren.

Als letztes, aber eigentlich allen voran, möchte ich mich aufs herzlichste bei meinen Eltern bedanken. Dafür, dass sie all die Jahre uneingeschränkt hinter mir standen, mich immer und mit voller Kraft unterstützt und nie den Glauben an mich verloren haben. Ohne euch wäre ich heute nicht da, wo ich bin. Danke!