

Aus der
Orthopädischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. J. Eulert

Charakterisierung von sFRP4
als phosphatsensitives Phosphatonin
in mesenchymalen Stammzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Sebastian Kuhnen
aus Vallendar am Rhein

Würzburg, September 2006

Referent: Prof. Dr. med. Franz Jakob

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Walter Sebald

Dekan: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Mai 2007

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern

*Die Ansicht oder Einsicht,
daß das Vollkommene
und die Wissenschaft Stückwerk ist,
darf niemand daran hindern,
doch stets weiterzubauen und
eben doch das Mögliche zu erreichen.*

Hermann Hesse
unveröffentlichter Brief

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Phosphatstoffwechsel	1
1.1.1	Phosphat im Organismus	1
1.1.2	Mechanismen der Regulation	2
1.1.3	Phosphataufnahme	5
1.1.4	Phosphatausscheidung	6
1.1.5	Phosphattransporter	12
1.1.6	Klinik und Pathophysiologie	13
1.2	Osteogene Differenzierung	24
1.2.1	Mesenchymale Stammzellen	24
1.2.2	Osteogene Differenzierungsstadien und -marker	25
1.2.3	Rolle von Phosphat bei der Differenzierung	26
1.2.4	Rolle des Wnt-Pathways / sFRP4	27
1.3	Quantitative real-time-RT-PCR	29
1.3.1	Allgemeines	29
1.3.2	mRNA und RT	30
1.3.3	PCR	32
1.3.4	Quantifizierung; End-Punkt versus real-time	34
1.3.5	real-time-PCR-Prinzip	35
1.3.6	Quantifizierung real-time; absolut versus relativ	36
1.3.7	Normalisierung bei relativer Quantifizierung	38
1.3.8	Darstellung der Daten	39
1.4	Tet-On™ Konstrukt	40
1.4.1	Allgemeines	40
1.4.2	Grundprinzip	40
1.4.3	Bestandteile	41
1.4.4	Protokoll	42
1.4.5	Vorteile und Einsatzmöglichkeiten	43
1.5	Zielsetzung der Arbeit	45

2	Material und Methoden	46
2.1	Material	46
2.1.1	Zellen	46
2.1.2	Nukleinsäuren	46
2.1.3	Chemikalien, Kits und Lösungen.....	48
2.1.4	Geräte und Hilfsmittel	49
2.2	Methoden	50
2.2.1	Zellkultur	50
2.2.2	Vorarbeiten zur RT-PCR.....	51
2.2.3	Konventionelle RT-PCR.....	52
2.2.4	Quantitative real-time-RT-PCR	54
2.2.5	Sequenzierung.....	57
2.2.6	Klonierung von DNA-Fragmenten	58
2.2.7	Tet-On™ Konstrukt.....	60
3	Ergebnisse.....	63
3.1	Konventionelle RT-PCR.....	63
3.1.1	Genexpression hMSC-TERT	63
3.1.2	Genexpression hMSC-TERT / hFOB unter 5 mM Phosphat.....	64
3.2	real-time-RT-PCR	65
3.2.1	Versuchsprotokoll	65
3.2.2	RNA und PCR.....	66
3.2.3	Analyse der Ct-Rohwerte.....	68
3.2.4	PCR-Effizienz.....	70
3.2.5	Gene zur Normalisierung.....	70
3.2.6	Darstellung der Ergebnisse.....	72
3.2.7	hMSC-TERT-Zellen	72
3.2.8	hFOB-Zellen.....	81
3.3	Arbeiten mit dem Tet-On™ Konstrukt	88
3.3.1	Vorversuche.....	88
3.3.2	Erste stabile Transfektion	89
3.4	Klonierung von sFRP4	91

4	Diskussion	95
4.1	Methode der quantitativen real-time-PCR	95
4.2	Phosphatstoffwechsel	110
4.2.1	Phosphatonine und Phosphattransporter.....	110
4.2.2	Einfluss von Phosphat auf hMSC-TERT und hFOB.....	114
5	Zusammenfassung	127
6	Literatur	129

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
ADHR	Autosomal dominante hypophosphatämische Osteomalazie
AP	Alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	complementary DNA / copy-DNA
Col1	Kollagen 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EF1 α	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha
FGF7	fibroblast growth factor 7 / Fibroblastenwachstumsfaktor 7
FGF23	fibroblast growth factor 23 / Fibroblastenwachstumsfaktor 23
G	Guanosin
hFOB	immortalisierte Zelllinie humaner fetaler Osteoblasten
HHRH	Hereditäre hypophosphatämische Rachitis mit Hypophosphatämie
MEPE	matrix extracellular phosphoglycoprotein
mRNA	messenger-RNA
MSC	mesenchymal stem cells / Mesenchymale Stammzellen
MW	Mittelwert
NPT	Natrium-Phosphattransporter
OC	Osteokalzin
OD	Optische Dichte
OP	Osteopontin
PCR	polymerase chain reaction / Polymerasekettenreaktion
PFA	phosphonoformic acid = Foscarnet
PHEX	Phosphate-regulating gene with Homology to Endopeptidases on the X chromosome
Pit-1	Natrium-Phosphat-Transporter Pit1 (auch Glvr1)
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathormon related peptide
REST [®]	relative expression software tool, (Pfaffl, Horgan <i>et al.</i> 2002)
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
sFRP4	secreted frizzled related protein 4
T	Thymin
hMSC-TERT	immortalisierte Zelllinie humaner mesenchymaler Stammzellen
TIO	Tumor-induzierte Osteomalazie
XLH	X-chromosomale Hypophosphatämie

1 Einleitung

1.1 Phosphatstoffwechsel

1.1.1 Phosphat im Organismus

Phosphate sind die auf der Erde am häufigsten vorkommende chemische Form des Phosphors. Sie sind für zahlreiche biologische Prozesse von essenzieller Bedeutung. Sowohl anorganisches Phosphat, das als Salz der Phosphorsäure in Form von Phosphat-Ionen (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO^-) vorliegt, als auch organische Verbindungen, die Phosphatgruppen enthalten, werden als Phosphate bezeichnet. Der anorganische Anteil (65 %) der Knochenmatrix besteht fast ausschließlich aus Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)\text{OH}$), einer typischen mineralischen Form des Phosphats. Doch nicht nur für die Skelettentwicklung, den Knochen- und Mineralstoffwechsel spielt Phosphat eine entscheidende Rolle, es ist auch für zahlreiche Zellfunktionen unerlässlich. Phosphat ist Bestandteil von Phospholipiden in biologischen Membranen, von Nukleotiden in DNA, RNA und Energie-Transfer sowie von phosphorylierten Zwischenstufen zahlreicher zellulärer Signalwege und Reaktionskaskaden. Ein anhaltender Phosphatmangel führt zu gravierenden Problemen der Knochenmineralisierung, die in Osteomalazie und Rachitis enden können, aber auch zu unterschiedlichen Störungen im kardiovaskulären, neurologischen, respiratorischen, hämatologischen und metabolischen System. Durch eine Hyperphosphatämie im Endstadium der chronischen Nierenerkrankung entwickelt sich ein sekundärer Hyperparathyreoidismus mit Osteodystrophie und Kalzifizierungen an Gefäßen und im Bindegewebe. Eine ausgeglichene Phosphathomöostase ist daher entscheidend für einen funktionierenden Organismus. (Berndt, Schiavi *et al.* 2005; Ritz 2005)

Ein normaler, erwachsener Körper enthält 15-23 mol Phosphat. Davon befinden sich ca. 85 % im Knochen, meistens gebunden mit Kalzium in Form von Hydroxylapatit, ca. 14 % liegen intrazellulär fast ausschließlich in Form von Phosphat-Estern vor und nur ca. 1 % zirkuliert in extrazellulären Flüssigkeiten und Plasma als anorganisches Phosphat. Das Verhältnis von intrazellulärem zu

extrazellulärem Phosphat wird somit auf 100:1 geschätzt. Alle Gewebe können Phosphat aufnehmen und abgeben, eine Zirkulation zwischen den verschiedenen Kompartimenten findet statt. Nimmt man organische und anorganische Formen zusammen, findet sich eine Konzentration von 3,9 mmol/l im Plasma. Labor-Tests ermitteln meist die anorganische Form, die im Blut zu 85 % frei in Form von Phosphat-Ionen (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO^-), zu 10 % Protein-gebunden und zu 5 % in Komplexen mit Kalzium, Magnesium oder Natrium vorliegt. Die normale Serum-Konzentration von anorganischem Phosphat liegt für Erwachsene bei 0,8 – 1,45 mmol/l, bei Kindern ist sie höher. Im Laufe des Tages schwankt die Konzentration durchschnittlich um $0,2 \pm 0,03$ mmol/l.

Nach heutigem Verständnis spielen beim Phosphatstoffwechsel ebenso wie beim Kalziumstoffwechsel drei Organe eine entscheidende Rolle: Im Darm wird das oral aufgenommene Phosphat resorbiert, in der Niere erfolgt die Filtration und Rückresorption, der Knochen dient als mengenmäßig bedeutsamer Speicher, aus dem die Ionen bei Bedarf freigesetzt werden können. Da die Phosphataufnahme im Darm nur in geringerem Maße variiert werden kann, stellt die Niere nach bisherigen Erkenntnissen den bedeutendsten Ort zur Regulation der Phosphatbilanz dar. (Prie, Beck *et al.* 2004; Berndt, Schiavi *et al.* 2005; Gaasbeek und Meinders 2005; Ebert, Vogelsang *et al.* 2006; White, Larsson *et al.* 2006)

1.1.2 Mechanismen der Regulation

Die Regulation des Phosphatstoffwechsels wurde lange Zeit in enger Abhängigkeit von der Regulation des Kalziumstoffwechsels betrachtet und verstanden: Dabei führt die Erhöhung der Plasma-Konzentration eines Ions meist zu gegenläufigen Veränderungen des anderen Ions und umgekehrt. An der Kontrolle des Phosphathaushaltes sind zahlreiche Hormone beteiligt. Parathormon (PTH) und Vitamin D-Hormon ($1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3) gehören dabei zu denen am besten erforschten und verstandenen, wobei beide Substanzen ebenso Auswirkungen auf den Kalziumhaushalt haben. PTH und Vitamin D-Hormon fungieren weitgehend als Gegenspieler und werden durch Phosphat dahingehend reguliert, dass durch sie eine ausgeglichene

Phosphatbilanz erhalten wird. Durch die Wirkung von Vitamin D-Hormon wird die Plasma-Phosphatkonzentration erhöht, durch PTH-Wirkungen wird sie erniedrigt. Zusätzlich existieren weitere Faktoren, wie Wachstumshormon (GH) und IGF1, die den Phosphatspiegel zwar verändern, deren Konzentration aber nicht durch den Phosphat-Plasmaspiegel kontrolliert wird. Durch die intensive Forschung der letzten zehn Jahre konnten weitere Substanzen identifiziert werden, die isoliert in den Phosphatstoffwechsel eingreifen und es zunehmend erlauben, seine Rolle im Knochenmetabolismus zu charakterisieren. Diese Substanzen wurden entdeckt bei der Aufklärung molekularer Pathomechanismen von erworbenen und erblichen Erkrankungen des Phosphatstoffwechsels, die durch einen renalen Phosphatverlust gekennzeichnet sind. Auf der Suche nach den Substanzen, denen man diese phosphaturische Wirkung zuschrieb, wurde der Begriff „Phosphatonine“ geprägt. Zum aktuellen Zeitpunkt rechnet man den fibroblast growth factor 23 (FGF23), secreted frizzled related protein (sFRP4), fibroblast growth factor 7 (FGF7) und das matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) zu den Phosphatoninen. FGF23 und sFRP4 induzieren eine negative Phosphatbilanz, indem sie auf direktem Weg die Rückresorption im proximalen Tubulus reduzieren und auf indirektem Weg mittels Hemmung der Vitamin D-Hormon-Synthese die intestinale Aufnahme vermindern. FGF7 und MEPE hemmen ebenfalls die renale Phosphatrückresorption *in vitro* bzw. in der Maus. Eine Hemmung der Vitamin D-Hormon-Synthese konnte nicht gezeigt werden. PHEX wird nicht zu den Phosphatoninen gerechnet, spielt aber auf jeden Fall eine Rolle im pathologischen Phosphatmetabolismus, da eine Mutation dieses Moleküls phosphaturisch wirken kann. (Schiavi und Kumar 2004; Berndt, Schiavi *et al.* 2005; Prie, Beck *et al.* 2005)

1.1.2.1 Vitamin D-Hormon und Parathormon

Vitamin D-Hormon ist die im Körper wirksame Form des Vitamin D und das Endprodukt einer Reaktionskaskade: Zunächst wird ein Teil über die Nahrung direkt als Vitamin D₃ aufgenommen, der überwiegende Teil wird jedoch nach oraler Aufnahme von Provitamin D₃ (7-Dehydrocholesterol) vom Körper selbst gebildet. Dabei wird Provitamin D₃ in der Epidermis unter Sonneneinwirkung

(UV-B) zunächst zu Prävitamin D₃ und anschließend zu Vitamin D₃ (Cholecalciferol) umgewandelt. Von der Haut gelangt Vitamin D₃ in den Blutkreislauf und steht systemisch zur Verfügung. In der Leber wandelt die 25-Hydroxylase das Vitamin D₃ weitgehend unreguliert in die biologisch immer noch unwirksame Form des 25(OH)-Vitamin D₃ um. Erst in den proximalen Tubuluszellen der Niere wird durch Hydroxylierung das biologisch wirksame Vitamin D-Hormon (1,25(OH)₂-Vitamin D, auch 1 α ,25-D₃, 1,25(OH)₂-Cholecalciferol, 1,25-Dihydroxyvitamin D, Kalzitriol) gebildet. Schlüsselenzym für diese Reaktion ist die 1 α -Hydroxylase. (Jakob 1999; Ebert, Jovanovic *et al.* 2004)

Als Wirkung des Vitamin D-Hormons kommt es im Körper zu einer Steigerung der Phosphatretention, indem die Absorption im Darm und die Rückresorption in der Niere erhöht wird.

Parathormon (PTH) ist ein Peptidhormon, das in den Nebenschilddrüsen zunächst gebildet, in Sekretionsvesikeln gespeichert und auf ein adäquates Signal hin von dort in den Blutkreislauf sezerniert wird. Die Parathormon-Synthese wird durch Vitamin D-Hormon und Phosphat kontrolliert, die Sekretion durch den Kalziumgehalt des Blutes (Brent, LeBoff *et al.* 1988; Silver, Moallem *et al.* 1994). Parathormon senkt die Phosphatretention, indem es die renale Phosphat-Exkretion erhöht. Gleichzeitig fördert es aber die Synthese von Vitamin D-Hormon durch Stimulation der 1 α -Hydroxylase in der Niere.

Die Phosphatonine hingegen erhöhen ebenso wie PTH die renale Phosphat-Exkretion, allerdings hemmen FGF23 und sFRP4 die 1 α -Hydroxylase, was zusätzlich zu einer verminderten Phosphatretention führt. Für MEPE und FGF7 konnte eine Auswirkung auf die Vitamin D-Hormon-Synthese nicht beobachtet werden.

Somit kann man nach heutigem Verständnis den folgenden Regelkreis beschreiben: Ein Absinken der Serum-Phosphatkonzentration führt zu einem Anstieg der Serum-Kalzium-Konzentration. Daraus resultiert ein Abfall der PTH-Sekretion, der wiederum zu einer verminderten Phosphatsekretion in der Niere führt, so dass der Serum-Phosphatspiegel normalisiert wird. Gleichzeitig kommt

es über Parathormon-unabhängige Mechanismen durch den Serum-Phosphatabfall zu einer Stimulation der Vitamin D-Hormon-Synthese. Das erhöhte Vitamin D-Hormon bewirkt eine gesteigerte Absorption im Darm, so dass auch diese Achse zu einer Normalisierung des Phosphatspiegels führt. Ein Anstieg der Phosphatkonzentration führt zu den entsprechenden gegenläufigen Reaktionen. (Berndt, Schiavi *et al.* 2005)

1.1.3 Phosphataufnahme

Eine ausreichende Menge an oral zugeführtem Phosphat scheint essenziell für den Organismus und insbesondere den Knochenstoffwechsel zu sein. Die Nahrung in den westeuropäischen Ländern enthält in der Regel sehr viel Phosphat - durchschnittlich 800-1500 mg (20-40 mmol) pro Tag - und ist damit im Überschuss vorhanden. Eine Mangelsituation bei ausgewogen ernährten Personen erscheint daher unwahrscheinlich.

Der genaue Mechanismus der Phosphataufnahme im Darm ist nur ansatzweise charakterisiert. Es gibt eine basale Aufnahme-Kapazität, die in gewissem Maße variiert werden kann. Ungefähr 70 % des oral aufgenommenen Phosphats werden im Darm absorbiert, überwiegend im Jejunum aber auch im Duodenum. Der Transport erfolgt über einen natriumabhängigen aktiven Transporter (NPT2b). Zusätzlich existieren passive Mechanismen, bei denen es zu einer Diffusion von Phosphat-Ionen kommt. Durch intestinale Sekretion, hauptsächlich in Speichel und Gallensekreten, wird täglich 200 mg Phosphat in das Darmlumen abgegeben.

Vitamin D-Hormon kann dabei die Aufnahme von Phosphat im Dünndarm verändern: Hohe Vitamin D-Hormon-Spiegel führen zu einer stärkeren Absorption, niedrige Spiegel reduzieren die Absorption. Die Verabreichung von Vitamin D-Hormon führt zu einer vermehrten Anzahl an Phosphattransportern in der apikalen Membran der intestinalen Zellen (Hattenhauer, Traebert *et al.* 1999). Auch der Phosphatgehalt der Nahrung beeinflusst die intestinale Aufnahme, wobei ein geringer Phosphatgehalt zu einer erhöhten Aufnahmefähigkeit führt, indem ebenfalls die Anzahl der Transporter erhöht wird. Dieser Effekt könnte indirekt und ebenfalls über Vitamin D-Hormon

vermittelt sein, da geringe Serum-Phosphatkonzentrationen die 1α -Hydroxylase in der Niere und somit die Synthese von Vitamin D-Hormon stimulieren. Allerdings zeigen neuere Untersuchungen, dass in Vitamin D-Rezeptor mutanten Mäusen ein Phosphatentzug ebenfalls zu einem Anstieg der Anzahl an Phosphattransportern führt (Segawa, Kaneko *et al.* 2004).

Weitere Regulationsmechanismen der Aufnahme sind nicht bekannt. PTH scheint keine direkte Wirkung im Darm zu haben, allerdings kann PTH die Aufnahme indirekt über Effekte auf die Vitamin D-Hormon-Synthese stimulieren, da PTH ebenso wie geringe Serum-Phosphatkonzentrationen die 1α -Hydroxylase in der Niere und somit die Synthese von Vitamin D-Hormon anregt. Bei Patienten, die unter Behandlung mit 1,25-Vitamin D-Hormon Abkömmlingen stehen, können über das normale Maß hinaus erhöhte Phosphatspiegel beobachtet werden. (Berndt, Schiavi *et al.* 2005; Gaasbeek und Meinders 2005; Ebert, Vogelsang *et al.* 2006)

Bei der oralen Aufnahme im Darm kommt es zu Interaktionen zwischen verschiedenen Nahrungsmitteln, insbesondere zwischen Phosphat und Kalzium, wodurch Phosphat unter dem Verdacht stand, einen Kalziummangel herbeiführen zu können. Aktuelle Untersuchungen zeigen aber, dass dieser Effekt wahrscheinlich überschätzt wurde und die Aufnahme einer Phosphatmenge von einem maximalen Verhältnis von 4:1 zu Kalzium keine gravierenden Störungen hervorrufen dürfte. Erst bei exzessiver Phosphataufnahme kommt es zu einer vermehrten Ausfällung von Kalzium im Darm und somit zu einem Kalziummangel. (Sax 2001; Takeda, Yamamoto *et al.* 2004)

1.1.4 Phosphatausscheidung

Die Niere stellt den wichtigsten Ort der Regulation im Phosphatstoffwechsel dar. In der Niere wird das glomerulär frei filtrierte anorganische Phosphat (100 – 240 mmol/d) zu 80-90 % wieder rückresorbiert (80 – 200 mmol/d). Es gibt eine Reihe von Faktoren, die die Rückresorption von Phosphat beeinflussen können (Tabelle 1). PTH, Vitamin D-Hormon und den Phosphatoninen kommt dabei eine besondere Bedeutung zu. Die Rückresorption erfolgt zu 60-70 % im

proximalen Tubulus und ist angewiesen auf verschiedene Transportermoleküle, wobei der Natrium-Phosphattransporter NPT2 die wichtigste Rolle einnimmt.

Tabelle 1: Beeinflussende Faktoren der renalen Phosphatrückresorption

reduzierte Pi-Rückresorption	erhöhte Pi-Rückresorption
Phosphat-reiche Diät	Phosphat-arme Diät
PTH, PTH related protein	Parathyreodektomie
Volumenausdehnung	Volumenkonzentration
Hyperkalziämie	Hypokalziämie
Carboanhydrasehemmer	Vitamin D-Hormon
Säure-Basen-Störungen	Wachstumshormon (GH)
Hyperkapnie	Hypokapnie
Dopamin	Serotonin
Glukokortikoide	Insulin
Alter	Kalzium-reiche Diät
Calzitonin	Natrium-reiche Diät
Hypokaliämie	
Fasten	
Diuretika	
chronische Hypokalziämie	
Phosphatonine	

Quelle: (Berndt, Schiavi *et al.* 2005; Gaasbeek und Meinders 2005)

In den vergangenen Jahren wurde eine Reihe von Substanzen identifiziert, die eine Rolle im Phosphatstoffwechsel spielen, ihre genaue Funktion kann aber bisher meistens nur ansatzweise beschrieben oder vermutet werden. Entdeckt wurden diese Substanzen auf der Suche nach dem oder den „Phosphatoninen“. Dieser Begriff war geprägt worden zur Beschreibung von Substanzen, die eine Hemmung der renalen Phosphatrückresorption und der 1 α -Hydroxylase bewirken können, wie es bei der Onkogenen Osteomalazie der Fall ist (Econs und Drezner 1994). Bei Patienten mit dieser Erkrankung, die sich durch Hypophosphatämie, renalen Phosphatverlust und normale bis verminderte Vitamin D-Hormon-Spiegel auszeichnet, verschwinden die Symptome nach Entfernung des Tumors (Cai, Hodgson *et al.* 1994). Daher wurde postuliert, Phosphatonine seien die noch zu identifizierenden Substanzen, die die Symptomatik auslösen. Um diese Substanzen zu identifizieren, wurden die Genexpressionsmuster von TIO-assoziierten Tumoren mit denen vergleichbarer Kontroll-Tumoren mittels serieller Analyse der Genexpression (SAGE) verglichen. Dabei fanden sich 364 Gene, die zumindest zweifach stärker exprimiert wurden als in der Kontroll-Gruppe (De Beur, Finnegan *et al.* 2002).

Durch die intensive Forschung in den folgenden Jahren kristallisierten sich aus diesen Kandidaten einige anscheinend bedeutsame Substanzen heraus, die im Folgenden mit ihrem jeweilig aktuellen Erkenntnisstand kurz erläutert werden sollen.

- **Fibroblastenwachstumsfaktoren 23 (FGF23)**

Aufgrund von Sequenzhomologien und der Bindungsfähigkeit an FGF-Rezeptoren wurde FGF23 der Familie der Fibroblastenwachstumsfaktoren zugeordnet (Yamashita, Yoshioka *et al.* 2000; Yu und White 2005). Es handelt sich um ein zirkulierendes Peptid, dessen Konzentration im Serum gemessen werden kann. Seine Rolle im Phosphatstoffwechsel wurde aufgeklärt durch die Untersuchung der Mechanismen der Onkogenen Osteomalazie (Shimada, Mizutani *et al.* 2001; White, Jonsson *et al.* 2001). Vermutlich wird die Aktivität des Phosphattransporters NPT2 durch FGF23 auf Proteinebene gehemmt, so dass es zu einem Phosphatverlust-Syndrom kommt (Shimada, Mizutani *et al.* 2001; Saito, Kusano *et al.* 2003; Larsson, Marsell *et al.* 2004; Shimada, Urakawa *et al.* 2004). Bei klassischer Ausprägung des Krankheitsbildes finden sich deutlich erniedrigte Phosphat-Werte im Serum. Gebildet wird FGF23 durch Osteoblastenvorläuferzellen und an die Zirkulation abgegeben (Riminucci, Collins *et al.* 2003), wobei die Regulation der FGF23-Serumspiegel noch weitgehend unklar ist. Bei einer oralen Zufuhr von Phosphat kommt es zu einem Anstieg der FGF23-Spiegel und damit auch indirekt zu einer Veränderung im Vitamin D-Stoffwechsel (Perwad, Azam *et al.* 2005). Erhöhte Spiegel von FGF23 im Blut finden sich auch bei jeglicher Steigerung des Knochenumsatzes, insbesondere dann, wenn eine gesteigerte Knochenformation vorliegt, um pathologischen Abbau zu kompensieren oder aber um die Knochenheilung zu beschleunigen (Mirams, Robinson *et al.* 2004; Yu, Sabbagh *et al.* 2005). Klinisch kann das z.B. bei Arthritiden der Fall sein oder auch bei bestimmten Formen der Osteoporose (Ebert, Vogelsang *et al.* 2006).

Einen Mechanismus der Regulation von FGF23 stellt die Inaktivierung durch Spaltung dar. FGF23 besitzt eine Spaltstelle für Proteasen, deren Bedeutung bei der molekularen Aufklärung der autosomal dominant vererbten

hypophosphatämischen Rachitis (ADHR) erkannt wurde: Durch eine Mutation wird diese Spaltstelle zerstört, so dass es auf zellulärer Ebene nicht mehr möglich ist, aktives FGF23 abzubauen (White, Jonsson *et al.* 2001; Bai, Miao *et al.* 2003). Dadurch kommt es bei der ADHR auch bei normaler Produktionsrate von FGF23 in den Osteoblasten durch die Akkumulation zu einer verstärkten Wirkung. Zunächst ging man davon aus, dass die Protease PHEX (Phosphate-regulating gene with Homology to Endopeptidases on the X chromosome) für die Spaltung verantwortlich sei, da mit der X-chromosomalen Hypophosphatämie (XLH) Mutationen in dem PHEX-Gen assoziiert sind (HYP Consortium 1995; Bai, Miao *et al.* 2002) und es somit ebenfalls zu einer Akkumulation von FGF23 kam. Inzwischen gibt es aber Hinweise, dass andere Substanzen, wie Subtilisin-ähnliche Proteasen, diese Spaltung übernehmen (Benet-Pages, Lorenz-Depiereux *et al.* 2004) und PHEX selbst nicht in der Lage ist, FGF23 zu spalten (Liu, Guo *et al.* 2003). Eventuell ist PHEX Bestandteil einer Reaktionskaskade, deren weitere Elemente noch aufzuklären sind. Welchen Anteil diese Verstoffwechslung von FGF23 an seiner Gesamt-Regulation einnimmt ist ebenso unklar wie die Regulation der verantwortlichen Proteasen.

- **sFRP4**

Das Protein sFRP4 gehört zu denen am konstantesten überexprimierten Substanzen in Tumoren, die eine Tumor-assoziierte Osteomalazie bewirken können. Rekombinant hergestelltes sFRP4 kann in ansteigenden Konzentrationen die natriumabhängige Phosphataufnahme in OK (opossum kidney)-Zellen hemmen (Berndt, Craig *et al.* 2003). Dieser Effekt erfolgt in einer dosisabhängigen Weise bei Konzentrationen in der Größenordnung von Picogramm pro Liter. Wurde sFRP4 Ratten infundiert, erhöhte das die renale Phosphatausscheidung um den Faktor 2,5 bis 3 sowohl zwei als auch acht Stunden nach Beginn der Infusion (Berndt, Craig *et al.* 2003). Dabei wurden minimale Änderungen in der Serum-Natrium-Konzentration nach zwei Stunden beobachtet, die Kalzium-Konzentration veränderte sich nicht. Die gleichen Effekte konnten bei parathyreoidektomierten Ratten beobachtet werden, so dass es sehr wahrscheinlich ist, dass PTH für diese Effekte nicht erforderlich

ist. Obwohl bei den Ratten eine Hypophosphatämie durch die sFRP4-Infusion erfolgte, konnte keine Änderungen der Konzentration von Vitamin D-Hormon und der 1α -Hydroxylase-mRNA in der Niere festgestellt werden. Eine Gegenregulation des Vitamin D-Systems ist physiologischerweise aber zu erwarten und bei normalen Ratten zu beobachten. Bei sFRP4-Infusion kam es zu einem Abfall der β -Catenin-Konzentration (zur physiologischen Bedeutung siehe 1.2.4) in den Nierenzellen und zu einem Anstieg von phosphoryliertem β -Catenin, so dass sFRP4 als ein Antagonist gegen Wnt-Moleküle in der Niere zu fungieren scheint (Berndt, Craig *et al.* 2003). sFRP4 konnte im Plasma von Gesunden und ebenso bei Patienten mit einer Onkogenen Osteomalazie festgestellt werden. Bei der Onkogenen Osteomalazie wurden keine erhöhten Werte beobachtet, allerdings stand der untersuchte Patient bereits unter Phosphat- und Vitamin D-Hormon-Substitutionstherapie (Berndt, Craig *et al.* 2003). Wie kürzlich veröffentlicht, entfaltet sFRP4 seine phosphaturische Wirkung durch eine Reduktion der Zahl und Aktivität von Typ-IIa-Phosphattransportern im proximalen Tubulus (Berndt, Bialesz *et al.* 2006).

- **MEPE**

MEPE (matrix extracellular phosphoglycoprotein) ist ein weiterer Faktor, der in der Lage ist, den Knochenstoffwechsel zu beeinflussen. Eine Expression findet ausschließlich in Osteoblasten, Osteozyten und Odontoblasten statt. Bei XLH und Onkogener Osteomalazie wird MEPE verstärkt exprimiert (Rowe, de Zoysa *et al.* 2000; Nampei, Hashimoto *et al.* 2004). Es besteht eine Korrelation zwischen dem Serumspiegel von MEPE und den Phosphatspiegeln, Parathormon und der Knochendichte (Jain, Fedarko *et al.* 2004). Injiziert man Mäusen das humane rekombinante Protein entwickelt sich eine Phosphaturie, bei humanen Zelllinien kommt es zu einer verminderten Phosphataufnahme, so dass MEPE zur Gruppe der Phosphatonine gerechnet wurde (Rowe, Kumagai *et al.* 2004). Jedoch hatte ein MEPE-Knockout bei Mäusen keinen Einfluss auf den Phosphatstoffwechsel, es waren aber sowohl die Anzahl und Aktivität der Osteoblasten als auch die trabekuläre Knochendichte erhöht. Das könnte darauf hinweisen, dass MEPE eine inhibitorische Funktion der Mineralisierung („Minhibin“) besitzt (Gowen, Petersen *et al.* 2003; Rowe, Kumagai *et al.* 2004).

- **Fibroblastenwachstumsfaktor 7 (FGF7)**

Bei FGF7 handelt es sich um eine Substanz, die ursprünglich als Wachstumsfaktor für Keratinozyten beschrieben wurde (Gilcrest, Marshall *et al.* 1984). Bei Tumoren, die eine Onkogene Osteomalazie verursachen, wurde FGF7 als potentes und ebenfalls überexprimiertes Protein identifiziert. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine Phosphataufnahme in renalen Tubulus-Zellen (OK-Zellen) durch FGF7 verhindert wird und anti-FGF7-Antikörper den inhibitorischen Effekt abschwächen (Carpenter, Ellis *et al.* 2005). Es ist bisher weder bekannt ob FGF7 im Plasma zirkuliert, noch ob es die Vitamin D-Hormon-Spiegel verändert, noch ob es bei Patienten mit Onkogener Osteomalazie im Plasma erhöht ist. Die Bedeutung von FGF7 für die Phosphatregulation unter pathophysiologischen oder physiologischen Bedingungen ist daher noch weitgehend unklar.

- **PHEX**

PHEX ist ein Protein, das Homologien zu einer Protease aufweist. Es wird nicht zu den Phosphatoninen gezählt. Bei erblichen phosphaturischen Erkrankungen, die X-chromosomal begründet sind, ist PHEX mutiert und eindeutig mit der Krankheitsmanifestation assoziiert. Zunächst vermutete man, dass PHEX in der Lage sei, FGF23 proteolytisch zu spalten und damit zu inaktivieren. Eine Mutation von PHEX würde somit durch Akkumulation von FGF23 phosphaturisch wirken. Inzwischen wird diese Erklärung jedoch angezweifelt, da PHEX offenbar nicht direkt in der Lage ist, FGF23 zu spalten. Wahrscheinlich sind eher Subtilisin-ähnliche Proteasen an diesem Schritt beteiligt, da sich die Spaltung durch Furin hemmen lässt. Es bleibt zu klären, ob PHEX eventuell in eine Proteasekaskade involviert ist und welche Rolle dieser Proteolyseschritt für die Regulation des Phosphatmetabolismus haben könnte. Bisher sind keine Zustände beschrieben, bei denen eine übermäßige Proteaseaktivität zu einem erhöhten FGF23-Abbau mit Krankheitswert führt. (HYP Consortium 1995; Lim, Tan *et al.* 2000; Bai, Miao *et al.* 2002; Benet-Pages, Lorenz-Depiereux *et al.* 2004)

1.1.5 Phosphattransporter

Bisher sind drei unterschiedliche Klassen von Phosphattransportern charakterisiert worden, alle drei werden auch in der Niere exprimiert, dort v. a. im proximalen Tubulus:

Typ I Transporter sind unspezifische Kotransporter, die zusätzlich zu Phosphat eine Reihe von anderen Anionen transportieren und eventuell auch Chlorid-Kanal-Aktivität besitzen. Diese Familie besteht aus drei verschiedenen Mitgliedern (NPT1, NPT3, NPT4), wobei in der vorliegenden Arbeit der Transporter NPT1 untersucht wurde. Ihre genaue Rolle in der Phosphatregulation bleibt unklar. (Prie, Beck *et al.* 2004; Prie, Beck *et al.* 2005)

Die wichtigste Gruppe für die Regulation auf Ebene der Niere ist die Familie der **Typ II** Transporter, zu der die drei Isoformen NPT2a, NPT2b und NPT2c (auch NaPi-IIa, NaPi-IIb, NaPi-IIc) gehören. NPT2b und NPT2c werden neben der Niere auch in Lunge und Dünndarm exprimiert und durch die lokale Phosphatkonzentration reguliert (Prie, Beck *et al.* 2004; Takeda, Yamamoto *et al.* 2004). Der Typ NPT2a ist für die renale Phosphatregulation sehr wichtig. Knockout-Mäuse fallen durch einen renalen Phosphatverlust auf und entwickeln eine Hypophosphatämie (Beck, Karaplis *et al.* 1998). Die Expression von NPT2a in den proximalen Tubuluszellen wird durch PTH und FGF23 nach unten reguliert, so dass vermehrt Phosphat über die Nieren ausgeschieden wird. Dieser Signalweg spielt eine entscheidende Rolle bei allen Syndromen, bei denen erhöhte FGF23-Spiegel auftreten. PTH-Exzess und phosphatreiche Nahrung führen zu einer endozytotischen Internalisierung der Transporter, wodurch eine Phosphaturie entsteht. Wohingegen PTH-Mangel und phosphatarmer Nahrung zu einem vermehrten Einbau von Transportern in die Membran führen (Gaasbeek und Meinders 2005).

In der Familie der **Typ III** Natrium-Phosphattransporter befinden sich zwei Mitglieder, Pit-1 (auch Glvr-1) und Pit-2 (auch Ram1, Glvr-2, A-MuLV). Ursprünglich wurden diese Moleküle als Rezeptoren für Retroviren identifiziert. Sie sind im Körper weit verbreitet, unter anderem in proximalen Tubulus-Zellen der Niere, Osteoklasten, Osteoblasten und Chondrozyten. Die Expression und

Funktion von Pit-1 wird von der extrazellulären Phosphatkonzentration reguliert. Möglicherweise sind Pit-1 und Pit-2 Housekeeping-Gene, die für die Aufrechterhaltung der zytoplasmatischen Phosphatkonzentration erforderlich sind. Über ihre Rolle in der systemischen Phosphatregulation ist wenig bekannt. (Prie, Beck *et al.* 2004; Prie, Beck *et al.* 2005)

1.1.6 Klinik und Pathophysiologie

Bei den bisher bekannten und klinisch relevanten Störungen des Phosphathaushaltes kann es zu einer verminderten Phosphatversorgung des Organismus kommen, aber auch zu einem Überangebot an Phosphat.

Bei Situationen der Unterversorgung ist es wichtig, zwischen einer Hypophosphatämie und einem Phosphatmangel zu unterscheiden. Eine Hypophosphatämie kann zusammen mit erniedrigtem, normalem oder erhöhtem Gesamt-Körper-Phosphat auftreten. Andererseits kann ein Phosphatmangel zusammen mit normalen, erniedrigten oder erhöhten Serum-Phosphatspiegeln einhergehen. Chronische Abweichungen einer der beiden Größen resultieren aber langfristig oft ebenfalls in einem pathologischen Abweichen der anderen Größe. Dabei führt eine Hypophosphatämie, die aufgrund eines wahren Phosphatmangels besteht, zu schweren skelettalen (Osteomalazie) und extraskelettalen (Kardiomyopathie, Myopathie) Störungen, wobei sich die Störungen je nach Entwicklungsgrad des Organismus deutlich unterscheiden. Sowohl Phosphatmangel als auch Hypophosphatämie können aufgrund einer verminderten intestinalen Aufnahme oder eines erhöhten Phosphatverlustes auftreten. Meistens sind beide Störungen aber auf einen pathologischen renalen Phosphatverlust zurückzuführen und treten als chronische Störung in Erscheinung. Für eine Hypophosphatämie kann neben den beiden bereits erwähnten Mechanismen auch noch eine interne Umverteilung als mögliche Ursache auftreten, bei der es zu einer meist akuten Verschiebung von Phosphat aus dem extrazellulären in das intrazelluläre Kompartiment kommt. (Ritz, Haxsen *et al.* 2003; Gaasbeek und Meinders 2005)

Ein Überangebot an Phosphat entsteht in den meisten Fällen aufgrund einer verminderten Ausscheidungsfunktion der Nieren. Solche Situationen stellen fortgeschrittene Stadien der Niereninsuffizienz dar, die neben der Hyperphosphatämie aber ebenso durch Hyperkalzämie und einen sekundären Hyperparathyreoidismus gekennzeichnet sind. Als Folge des Hyperparathyreoidismus kommt es zu einer Knochendemineralisierung mit Frakturen und subkutanen Ablagerungen. Ebenso werden Kalzifikationen an Gefäßen und im Bindegewebe beobachtet. Die vaskulären Kalzifizierungen sind in hohem Maße mit der Koronaren Herzkrankheit assoziiert und führen zu erhöhter Morbidität und Mortalität (Goodman, Goldin *et al.* 2000). (Friedman 2005; Ritz 2005)

Es scheint Hinweise zu geben, dass der zunehmend höhere Gehalt an Phosphat in der Nahrung der Industrienationen Auswirkungen auf die Knochendichte und –stabilität haben kann. Aussagen dazu sind jedoch widersprüchlich und lassen sich in ihrer Gewichtigkeit und Konsequenz bisher nicht sicher einordnen. (Sax 2001)

1.1.6.1 Hypophosphatämie/Phosphatmangel

- **Störungen der Aufnahme**

Eine verminderte orale und intestinale Aufnahme als zugrunde liegender Pathomechanismus für eine Unterversorgung mit Phosphat spielt, von Extremsituationen wie Mangelversorgung in Kriegszeiten, chronischem Alkoholismus und absolutem Verzicht auf Kuhmilch bei der Ernährung von hypotrophen Säuglingen abgesehen, klinisch nur eine untergeordnete Rolle. (Ritz, Haxsen *et al.* 2003; Gaasbeek und Meinders 2005)

- **Störungen der Ausscheidung**

Der Hauptgrund für eine chronische Hypophosphatämie, mit oder ohne Phosphatmangel, ist meistens ein renaler Phosphatverlust. Eine verminderte renale Rückresorption kann durch einen primären oder sekundären **Hyperparathyreoidismus** verursacht werden und stellt einen Aspekt des

Vitamin D-Mangels dar. Auch angeborene Störungen im Vitamin D-Stoffwechsel wirken sich auf den Phosphathaushalt des Körpers aus. Das ist der Fall bei der **Vitamin D abhängigen Rachitis Typ 1**, bei der eine Mutation der 1 α -Hydroxylase vorliegt, oder auch bei der **Vitamin D abhängigen Rachitis Typ 2**, die eine Mutation des Vitamin D-Rezeptors aufweist (Ebert, Schutze *et al.* 2006). Ein Phosphatverlust kann ebenfalls begleitend auftreten bei nicht-selektiven Störungen der tubulären Rückresorption, wie z.B. beim Fanconi-Syndrom mit Glukosurie und Aminoazidurie (Laing, Toye *et al.* 2005).

Die ausgeprägtesten Formen des Phosphatverlustes finden sich aber beim selektiven renalen Verlust, dessen zugrunde liegenden Erkrankungen in den letzten Jahren intensiv erforscht wurden. Die Tumor-induzierte Osteomalazie (TIO) ist eine erworbene Störung, zu den angeborenen Krankheitsbildern gehören die X-chromosomale Hypophosphatämie (XLH) und die autosomal dominante hypophosphatämische Rachitis (ADHR) sowie weitere Erkrankungen, die bisher meist nur ansatzweise beschrieben sind.

Die **Tumor-induzierte Osteomalazie** (TIO, auch Onkogene Osteomalazie) ist ein Krankheitsbild, das gekennzeichnet ist durch Hypophosphatämie, exzessiven renalen Phosphatverlust und Störungen im Vitamin D-Haushalt. Klinisch fallen generalisierte Schmerzen und Muskelschwäche auf. Die TIO tritt auf bei Patienten mit überwiegend gutartigen Tumoren, die meist mesenchymaler Herkunft und oft im Skelettsystem lokalisiert sind. Als assoziierte Tumoren treten häufig Hämangioperizytome auf, aber auch Osteosarkome, Osteoblastome und andere. Eine komplette Entfernung des Tumors führt zu einem Verschwinden der klinischen Symptome und der Skelett-Abnormalitäten (Seufert, Ebert *et al.* 2001). Daher setzte sich die Vorstellung durch, dass die Tumore zirkulierende Faktoren produzieren, als „Phosphatonine“ bezeichnet, die verantwortlich sind für diese Symptome. Im Gegensatz zum Hyperparathyreoidismus und einer Hyperkalzämie bei Malignität, sind PTH, PTHrP und Serum-Kalzium weitgehend normal. Serum-Vitamin D-Hormon-Konzentrationen, die man bei einer Hypophosphatämie als

erhöht erwarten würde, sind bei der TIO normal oder erniedrigt. (Berndt, Craig *et al.* 2003; Ritz, Haxsen *et al.* 2003)

Es besteht der Verdacht, dass auch Prostatakarzinome eine TIO auslösen können (Reese und Rosen 1997).

Die **X-chromosomale Hypophosphatämie (XLH)** ist gekennzeichnet durch Wachstumsverzögerung, Rachitis/Osteomalazie, Hypophosphatämie, gestörte tubuläre Rückresorption und unangemessen normale Vitamin D-Hormon-Spiegel. Die Erkrankung wird X-chromosomal vererbt und ist häufiger als die anderen, phänotypisch variablen, hypophosphatämischen Zustände wie z.B. ADHR. Als ursächlich sind bei diesem Krankheitsbild Mutationen im PHEX-Gen festgestellt worden. Daher nahm man zunächst an, dass es sich bei PHEX um die Protease handelt, welche FGF23 auch physiologischerweise spaltet und damit seine Wirkung beendet (Bai, Miao *et al.* 2002). Inzwischen zeigte sich, dass PHEX nicht direkt in der Lage ist FGF23 zu spalten (Benet-Pages, Lorenz-Depiereux *et al.* 2004), so dass wahrscheinlich andere Proteasen an dem molekularen Mechanismus beteiligt sind.

Die **autosomal dominante Form der hypophosphatämischen Osteomalazie (ADHR)** weist phänotypisch Ähnlichkeiten zur XLH auf, die klinische Ausprägung variiert jedoch sehr stark, ebenso wie das Alter zu Erkrankungsbeginn. Durch positionelles Klonieren fand man heraus, dass die Erkrankung auf einer Missense-Mutation im FGF23-Gen beruht (ADHR Consortium 2000). Sie war somit die erste krankheitsassoziierte Mutation in einem humanen FGF-Gen. Die Mutation zerstört dabei die Spaltstelle für Proteasen, die normalerweise zu einer Inaktivierung führen, so dass FGF23 vermehrt aktiv ist (White, Jonsson *et al.* 2001). Der Phosphatverlust über die Niere ist somit als direkte FGF23-Wirkung zu erklären, ebenso wie die niedrigen Vitamin D-Hormon-Spiegel, da FGF23 die Expression der 1α -Hydroxylase in der Niere hemmt. (Schiavi und Kumar 2004)

Die **hereditäre hypophosphatämische Rachitis mit Hyperkalziurie (HHRH)**, auch Autosomal rezessive hyperkalziurische Rachitis genannt, gleicht phänotypisch der XLH und der ADHR, allerdings sind Serum-Konzentrationen von Vitamin D-Hormon erhöht und es besteht eine Hyperkalziurie. Diese Störung wurde erstmals in einer Beduinenfamilie beschrieben und man vermutete Mutationen im Natrium-Phosphattransporter NPT2a. Wie weitere genetische Untersuchungen jedoch zeigten, konnte NPT2a als verursachendes Gen ausgeschlossen werden, so dass der molekulare Mechanismus dieser Erkrankung weiterhin unklar bleibt. (Jones, Tzenova *et al.* 2001)

Bei einem weiteren seltenen Krankheitsbild, das durch hypophosphatämische Osteoporose und Neigung zur Nierensteinbildung gekennzeichnet ist, wurden **Mutationen im Natrium-Phosphattransporter NPT2a** beschrieben (Prie, Huart *et al.* 2002). Weitere *In-vitro*-Untersuchungen zeigten jedoch, dass diese Mutationen die Funktionalität des NPT2a nicht beeinträchtigen und die Mutation somit den Phänotyp nicht erklären kann (Virkki, Forster *et al.* 2003).

Es existieren Krankheitsbilder, bei denen eine somatische **Mutation** im Gen des **GNAS1**-Proteins zu einer konstitutiven Aktivierung der Adenylat-Zyklase führt. Das ist beim **McCune Albright-Syndrom** der Fall und kann sich auf viele Stoffwechselwege auswirken, in der Regel besonders bei den endokrinen Organen. Die Patienten weisen Knochenmanifestationen auf, die in ihrer Ausprägung sehr unterschiedlich sein können. Offensichtlich liegt dabei eine Störung der Osteoblastendifferenzierung vor (Lumbroso, Paris *et al.* 2004). Ist eine ausreichend hohe Zahl an Osteoblasten betroffen, kommt es zu einer übermäßigen Produktion von FGF23, die die Entstehung einer Hypophosphatämie und Osteomalazie bei diesem Krankheitsbild erklären kann (Yamamoto, Imanishi *et al.* 2005).

- **Störungen durch Umverteilung**

Eine weitere Ursache, v.a bei eher akuten Formen der Hypophosphatämie, ist die interne Umverteilung, bei der es meistens akut zu einer Verschiebung von Phosphat aus dem extrazellulären in das intrazelluläre Kompartiment kommt.

Der normale Phosphat-Plasmaspiegel liegt bei 0,80 – 1,45 mmol/l. Man kann die Hypophosphatämie in leichte (Plasma-Phosphat 0,32-0,65 mmol/l) und schwere Formen (Plasma-Phosphat <0,32 mmol/l) einteilen. Häufiger Auslöser einer Umverteilung ist die intravenöse Gabe von Glukose mit gleichzeitiger Freisetzung oder Gabe von Insulin. Das kann beim „Refeeding“ von unterernährten Patienten auftreten oder bei der Behandlung einer diabetischen Ketoazidose mit Insulin (Gaasbeek und Meinders 2005). Eine andere Ursache der Hypophosphatämie ist die respiratorische Alkalose, bei der der Abfall des Kohlendioxids zu ähnlichen Veränderungen in der Zelle führen kann. Der erhöhte pH-Wert stimuliert die Glykolyse, was zu einer vermehrten Produktion von phosphorylierten Metaboliten und damit zu einer akuten Verschiebung führt. Die dokumentierte Inzidenz der Hypophosphatämie variiert dabei zwischen 0,2 und 2,2 % für alle Patienten, kann bis 21,5 % und höher sein in bestimmten Patienten-Kollektiven. Während eines Krankenhausaufenthaltes steigt die Inzidenz an. Oft liegt eine Kombination der verschiedenen Faktoren vor, die beispielsweise bei Alkoholikern oder post-operativen Patienten auftreten kann. (Gaasbeek und Meinders 2005)

Wie bei den einzelnen Krankheitsbildern schon angedeutet, können die Symptome eines chronischen Phosphatmangels sehr unterschiedlich sein. Angeborene Syndrome wirken sich meist schon in der Wachstumsphase aus und führen zu einem gestörten Längenwachstum, Deformitäten der Extremitäten und generalisierten Knochenschmerzen. Das klinische Bild in dieser Phase entspricht dem der Rachitis. Bei Erwachsenen stehen Osteomalazie, Myopathie, Schwäche und Knochenschmerzen im Vordergrund. Ebenso gibt es Anzeichen dafür, dass ein Phosphatmangel assoziiert sein kann mit einer myokardialen Dysfunktion, neurologischen Manifestationen, respiratorischem Versagen und abnormalen Blutzellen bis hin zur Hämolyse (Gaasbeek und Meinders 2005).

1.1.6.2 Hyperphosphatämie

Ein zunehmendes **Versagen der Nierenfunktion** führt zu einer erhöhten Retention von Phosphat und einer reduzierten Synthese von Vitamin D-Hormon (Slatopolsky, Brown *et al.* 1999). Da Vitamin D die Synthese von PTH und die Zell-Proliferation in der Nebenschilddrüse hemmt, kommt es durch den Vitamin D-Hormon-Mangel direkt zu einer Stimulation der Nebenschilddrüse. Zusätzlich führt das fehlende Vitamin D-Hormon zu einer reduzierten Kalzium-Absorption im Darm, wodurch der Plasma-Kalzium-Spiegel sinkt. Eine Hypokalzämie stellt einen stimulierenden Reiz für die PTH-Sekretion dar, so dass dieser indirekte Weg ebenfalls zur Entstehung eines Hyperparathyreoidismus beiträgt (Brown, Dusso *et al.* 1999). Der sekundäre Hyperparathyreoidismus ist gekennzeichnet durch eine Hyperplasie der Nebenschilddrüse und einer vermehrten Synthese von PTH (Friedman 2005).

Der geänderte Kalzium- und Phosphathaushalt beim sekundären Hyperparathyreoidismus führt zu einer Demineralisation des Knochens mit resultierender Frakturneigung. Die unterschiedlichen Formen der Störungen im Knochenstoffwechsel werden unter dem Begriff renale Osteodystrophie zusammengefasst, es lassen sich die hyperparathyreoide Knochenerkrankung (Osteitis fibrosa), die gemischte urämische Osteodystrophie, die Osteomalazie und die adynamische Knochenerkrankung abgrenzen (Malluche und Faugere 1990). Im Normalfall hat PTH eine anabole Wirkung am Knochen, bei exzessiv hohen Werten, wie sie beim Nierenversagen auftreten, wirkt es jedoch katabol (Silver und Bushinsky 2004). Bei den meisten Patienten mit einer chronischen Nierenerkrankung kommt es daher zu einer Zerstörung des Knochens in Form einer Osteitis fibrosa mit möglicher Zystenbildung, Knochenschmerzen und häufigen pathologischen Frakturen. Für die Pathomechanismen, die zu den verschiedenen Formen der renalen Osteodystrophie führen, kommen zahlreiche komplexe Möglichkeiten in Frage, die sicherlich über die alleinige Wirkung von Parathormon und Phosphat hinausgehen und eventuell auch mit bestimmten Phosphatbindern assoziiert sind (Haas 2004; Ritz 2005).

Ein weiteres Problem bei Patienten mit Nierenversagen im Endstadium stellen subkutane Ablagerungen von Pyrophosphat dar, die die Mobilität der Patienten weiter einschränken.

Lebenslimitierend ist jedoch, dass bei Dialysepatienten eine deutlich höhere Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen und ebenso eine deutlich erhöhte kardiovaskuläre Mortalität beobachtet wird (Foley, Parfrey *et al.* 1998). Man vermutete, dass Kalzifizierungen der Koronararterien, die bei Patienten mit sekundärem Hyperparathyreoidismus zu beobachten sind, die erhöhte Morbidität verursachen. Ebenso wurden bei diesen Patienten metastatische Kalzifikationen im Herz und den unteren Extremitäten festgestellt. Bei der Untersuchung von Risikofaktoren für die kardiovaskuläre Morbidität zeigte sich, dass es gerade die erhöhten Phosphatspiegel sind, die mit einer deutlich erhöhten Gesamt-Mortalität und insbesondere einer deutlich erhöhten kardiovaskulären Mortalität einhergehen (Block, Hulbert-Shearon *et al.* 1998; Ganesh, Stack *et al.* 2001). Ebenso sind erhöhte PTH- und Ca x P-Produkt-Spiegel mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität assoziiert, wohingegen sich Serum-Kalzium und Kalzium-basierte Phosphatbinder in diesen Studien nicht als Risikofaktoren erwiesen.

Zunächst vermutete man, dass die Auswirkungen der Hyperphosphatämie alleine über die Kalzifizierung der Koronararterien vermittelt werde, doch es gibt Anzeichen dafür, dass dieser Prozess komplexer ist (Ketteler, Gross *et al.* 2005). Anfangs ging man davon aus, dass die Kalzifizierungen infolge eines passiven Prozesses auftraten, der in einer Übersättigung der extrazellulären Flüssigkeit mit Kalzium und Phosphat begründet ist. Untersuchungen konnten jedoch eine osteogene Differenzierung von glatten Gefäßmuskelzellen und ebenso eine Dysregulation von Kalzifizierungsinhibitoren identifizieren, die einen wichtigen potenziellen Pathomechanismus darstellen (Jono, McKee *et al.* 2000). Diese *In-vitro*-Untersuchungen an humanen Gefäßmuskelzellen zeigten, dass sich durch ein Anheben der Phosphatkonzentration im Medium von 1,4 mmol/l auf 2 mmol/l Hydroxylapatit bildete und dieser Effekt von der intrazellulären Phosphatkonzentration abhängig war. Bei Blockade des Natrium-Phosphattransporters Pit-1, der für den Phosphattransport in die Zelle

verantwortlich ist, fand keine Kalzifizierung statt. Darüber hinaus beobachtete man die Bildung von Matrix-Vesikeln, die Hoch-Regulation des osteoblastischen Transkriptionsfaktors Cbfa1 und die *de novo* Expression von Knochen-spezifischen Proteinen wie AP, OP, OC unter hohen Phosphatkonzentrationen. Es ist wichtig festzuhalten, dass bereits physiologische Konzentrationen von Kalzium und Phosphat das Kalzium-Phosphat-Löslichkeitsprodukt um mehrere Zehnerpotenzen übersteigen und es einer Erklärung bedarf, warum eine spontane Ausfällung ausbleibt. Anscheinend benötigen Säuger mehr als zehn Faktoren, die eine extraossäre Kalzifikation verhindern. Möglicherweise kommen den Faktoren bzw. Signal-Systemen Matrix GLA Protein (MGP), OPG/RANKL, Fetuin-A und Pyrophosphaten besondere Bedeutung bei der Entstehung extraossärer Kalzifikationen bei terminalem Nierenversagen zu (Ketteler, Gross *et al.* 2005). Interessant ist, dass bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz FGF23 erhöht ist (Jonsson, Zahradnik *et al.* 2003). Diese Beobachtung könnte einerseits vereinbar sein mit einer potenziellen Regulation von FGF23 durch hohe Phosphatspiegel, so wie bei PTH der Fall. Andererseits könnte es auch Ausdruck der reduzierten renalen Clearance sein. Die genaue Rolle von FGF23 bei der terminalen Niereninsuffizienz bleibt noch aufzuklären (Schiavi und Kumar 2004).

Die **familiäre tumorale Kalzinose** ist eine Erkrankung, bei der es zu erhöhten Phosphatspiegeln im Blut kommt, die zu verstärkter Arteriosklerose und extraossären Verkalkungen führen. Nach Aufklärung der molekularen Pathomechanismen spielt auch hier FGF23 eine Rolle. Eine Mutation im FGF23-Gen resultiert in einer Unterbrechung der Prozessierung, so dass FGF23 im Golgiapparat der Zellen akkumuliert. Die Störung lässt sich durch die fehlende Wirkung des reifen, sezernierten FGF23 erklären (Benet-Pages, Orlik *et al.* 2005; Larsson, Yu *et al.* 2005). Ein Enzym, das für die Prozessierung von FGF23 verantwortlich ist, ist die O-Glykosylase GALNT3. Auch bei einer Mutation dieses Enzyms zeigt sich das Krankheitsbild der tumoralen Kalzinose (Topaz, Shurman *et al.* 2004; Ichikawa, Lyles *et al.* 2005).

1.1.6.3 Therapie

- **Hypophosphatämie/Phosphatmangel**

Da bei den meisten Störungen des Phosphathaushaltes, die durch eine Unterversorgung des Körpers gekennzeichnet sind, keine kausalen Therapien zur Verfügung stehen, nimmt die Phosphatsubstitution einen großen therapeutischen Stellenwert ein.

Bei der Tumor-induzierten Osteomalazie ist die komplette Entfernung des Tumors die Therapie der Wahl. Die Oktreotid-Szintigrafie kann dabei zur Tumor-Lokalisation eingesetzt werden. Eine Entfernung ist als kurativ anzusehen und führt zur kompletten Rückbildung der Symptomatik. Ist der Tumor nicht resektabel, kann neben der Phosphatsubstitution auch eine Therapie mit Oktreotiden zu einer Besserung der Symptomatik führen. (Seufert, Ebert *et al.* 2001)

Bei der XLH und ADHR stellt die Phosphatsubstitution und Gabe von Vitamin D-Hormon die Therapie der Wahl dar. Die sicherste Variante der Phosphatsubstitution ist die orale Verabreichung, sie kann allerdings zu gastrointestinalen Beschwerden und Diarrhoe führen. Orale Zubereitungen von Natrium- oder Kaliumphosphat sind möglich, Kuhmilch ist ebenso eine gute und einfach zugängliche Quelle von Phosphat. Eine Tagesdosis von 3000 mg Phosphat sollte angestrebt werden und je nach Verträglichkeit auf mehrere Dosen verteilt werden. Ist eine orale Substitution nicht durchführbar, kann intravenös substituiert werden, allerdings ist aufgrund der hyperosmolaren Lösung ein zentraler Venenkatheter erforderlich. Es existieren mehrere Schemata, starr oder gewichtsabhängig. Eine enge Überwachung ist in jedem Fall erforderlich. Die Gabe von Kalzitriol oder anderen Vitamin D-Analoga sollte bei 0,25 – 1 µg/d liegen. Die Langzeit-Risiken bestehen in einem Hyperparathyreoidismus und einer Nephrokalzinose. Daher ist es erforderlich, Kontrollen von PTH, Serum-Kalzium, Urin-Kalzium, Kreatinin-Clearance und Nieren-Sonografie in regelmäßigen Abständen durchzuführen. Ein Teil der

Patienten benötigt auf längere Sicht eine subtotale Parathyreoidektomie. (Ritz, Haxsen *et al.* 2003)

Bei einer akuten Hypophosphatämie aufgrund einer Umverteilung besteht die Therapie neben der Beseitigung der Ursache ebenfalls in der Phosphatsubstitution. Soweit möglich erfolgt sie oral, bei Bedarf intravenös, wobei eine enge Überwachung nötig ist. Die erforderliche Dosis variiert, ist aber geringer als bei Langzeit-Substitution, der normale Patient benötigt 1000 bis 2000 mg (32-64 mmol) pro Tag für 7-10 Tage zur Wiederherstellung der Körper-Vorräte. Eine zu schnelle Substitution erhöht die Gefahr von Nebenwirkungen wie Hypokalzämie, Hyperkaliämie bei Kalium-haltigen Substitutionsformen, metastatische Kalzifizierung, Volumen-Überschuss, Hybernatriämie, metabolische Azidose und Hyperphosphatämie. (Gaasbeek und Meinders 2005)

- **Hyperphosphatämie**

Die Therapie besteht darin, das oral zugeführte Phosphat durch Diät zu reduzieren, Phosphatbinder einzusetzen und durch eine erhöhtes Kalzium-Angebot die PTH-Sekretion zu drosseln (Friedman 2005).

Die Restriktion des oral aufgenommenen Phosphates stellt eine effektive therapeutische Option dar, ist allerdings oft auch in Kombination mit Hämodialyse nicht ausreichend. Daher muss zusätzlich zu oralen Phosphatbindern gegriffen werden, die die Resorption im Darm reduzieren. Kalziumhaltige Phosphatbinder sind weit verbreitet und erprobt, können allerdings zu einer anhaltenden Hyperkalzämie führen. Für solche Fälle stehen alternative Substanzen zur Verfügung. Um eine ausreichende Versorgung mit Vitamin D zu gewährleisten, werden Vitamin D-Hormon-Derivate oft in Kombination mit Kalzium supplementiert. Kalzिमimetische Substanzen, die über Kalzium-Rezeptoren gezielt die PTH-Sekretion drosseln sollen, befinden sich noch in Entwicklung und Erprobung (Friedman 2005; Ritz 2005).

1.2 Osteogene Differenzierung

1.2.1 Mesenchymale Stammzellen

Das menschliche Knochenmark enthält neben den schon seit längerer Zeit bekannten hämatopoetischen Stammzellen auch eine Population von Stroma-Zellen, die sich unter entsprechenden Bedingungen zu mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten, Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten entwickeln können. Diese Zellen werden als mesenchymale Stammzellen (MSC) oder multipotente Stroma-Mesenchymzellen bezeichnet (Bianco, Riminucci *et al.* 2001). Inzwischen konnten diese Zellen auch in einer Reihe von adulten und fetalen Geweben wie Blut, Nabelschnur-Blut, Plazenta, Herz, Skelettmuskel und Fettgewebe nachgewiesen werden (Vaananen 2005). Die Zellen aus dem Knochenmark gehören dabei zu den am besten charakterisierten und es ist noch nicht abschließend geklärt, inwieweit Unterschiede zwischen den Zellen, die aus den unterschiedlichen Geweben gewonnen wurden, existieren. Es gibt mehrere Möglichkeiten der Isolierung von MSC aus dem Blut und anderen Geweben, dennoch sind noch keine definitiven phänotypischen Marker für MSC bekannt (Kassem 2004).

Embryonale Stammzellen sind pluripotent, MSC werden als multipotente Zellen gesehen, die gegenüber embryonalen Stammzellen ein deutlich eingeschränktes Differenzierungspotenzial besitzen. Nachdem MSC *in vitro* allerdings zu verschiedenen Zelltypen differenziert werden konnten, ist es möglich, dass die Plastizität dieser Zellen bisher eher unterschätzt wurde (Prindull 2005).

Zu dem erforderlichen Mikroenvironment für eine Differenzierung werden sowohl lösliche Faktoren als auch Zell-Zell und Zell-Matrix-Kontakte gehören. Die Aufklärung der spezifischen intra- und extrazellulären Signalwege, die bei diesen Vorgängen eine Rolle spielen, wird auch weiterhin essenzieller Gegenstand der adulten Stammzell-Forschung bleiben. Das Potenzial klinischer Einsatzmöglichkeiten von MSC in Form von Transplantation/Implantation und Tissue Engineering erscheint vielversprechend (Kassem 2004; Vaananen 2005).

1.2.2 Osteogene Differenzierungsstadien und -marker

Knochen und Knorpelgewebe werden zum Binde- und Stützgewebe des Menschen gezählt. Die Knochenstruktur wird dabei durch die extrazelluläre Knochenmatrix und die Knochenzellen gebildet. Die zellulären Anteile lassen sich in knochenbildende (Osteoblasten) und knochenresorbierende (Osteoklasten) Zellen aufteilen. Osteoklasten entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks, wohingegen Osteoblasten aus mesenchymalen Stammzellen (MSC) entstehen.

Ausgehend von diesen multipotenten Stroma-Mesenchymzellen durchlaufen die werdenden Osteoblasten verschiedene Reifungsstufen der Differenzierung, die sich durch die Expression bestimmter Oberflächenantigene voneinander abgrenzen lassen. MSC sind im Vergleich zu ihren Vorgängern durch eine starke Proliferation gekennzeichnet und können sich zu Osteoprogenitorzellen weiterentwickeln. Unter dem Einfluss verschiedener Faktoren entsteht aus den Osteoprogenitorzellen der Prä-Osteoblast, eine direkte Vorstufe des Osteoblasten. Im Knochen sind Prä-Osteoblasten meist in räumlicher Nähe zu Osteoblasten lokalisiert, die Aktivität der Alkalischen Phosphatase lässt sich in diesem Stadium messen. Die Zelle ist zum Osteoblasten ausgereift, wenn sie mit der Biosynthese und der Organisation von extrazellulärer Knochenmatrix beginnt (Aubin 1998). Die Differenzierung von Osteoblasten ist ein Prozess der sich *in vitro* über einen Zeitraum von Wochen erstreckt. Dieser Prozess kann dabei ganz allgemein in drei Phasen eingeteilt werden: Proliferation, Matrix-Reifung und Mineralisierung. Einige Gene wie Alkalische Phosphatase, Kollagen Typ I, Bone Sialoprotein, Osteopontin und Osteokalzin werden zu bestimmten Phasen der Differenzierung in hohem Maße exprimiert (Beck 2003). Während der aktiven Sekretionsphase, die fließend aus der Proliferationsphase hervorgeht, werden Kollagen I und Alkalische Phosphatase angereichert. Die sezernierte Knochenmatrix, als Osteoid bezeichnet, wird im nächsten Schritt mineralisiert, wobei spezifische Knochenmarker wie Bone Sialoprotein (BSP) und Osteopontin exprimiert werden. Osteokalzin gehört zu den spät in der Mineralisierung exprimierten Markern. Das Endstadium der Differenzierung stellen die Osteozyten dar, bei denen es sich um alte

Osteoblasten handelt, die während der Mineralisierungsvorgänge in die Knochenmatrix eingemauert wurden. Die Osteozyten stehen über lange Zellfortsätze untereinander und mit den Osteoklasten in Verbindung. Mit zunehmendem Alter des Osteozyten verringert sich die Zahl der Protein bildenden Zellorganellen. Im Rahmen der Knochenresorption werden die Zellen schließlich abgebaut und phagozytiert oder der programmierte Zelltod eingeleitet.

1.2.3 Rolle von Phosphat bei der Differenzierung

Die extrazelluläre Kalzifizierung ist ein Phänomen, das für die Bildung von Knochengewebe unerlässlich ist und welches eng mit der physiologischen Funktion von Osteoblasten und Osteoklasten verknüpft ist. Die molekularen und zellulären Ereignisse, die dafür erforderlich sind, scheinen bisher nur teilweise verstanden zu sein (Beck 2003). Phosphat ist essenzieller Bestandteil der Knochenmatrix, es scheint aber ebenso erforderlich zu sein für die osteogene Differenzierung. Es existieren inzwischen zahlreiche Zellmodelle der osteogenen Differenzierung, bei denen sich eine osteogene Differenzierung durch ein Differenzierungsmedium, in dem Phosphat enthalten ist, einleiten lässt. *In vitro* steigt bei fortschreitender Differenzierung die Aktivität der Alkalischen Phosphatase an und in Anwesenheit von organischem Phosphat wird freies anorganisches Phosphat produziert (Bellows, Heersche *et al.* 1992). Als Ergebnis des Differenzierungsprozesses entsteht Hydroxylapatit. Obwohl anorganisches Phosphat ein essenzieller Bestandteil des Hydroxylapatits ist, wird in einigen Studien vermutet, dass es ebenso erforderlich ist für die Osteoblastenfunktion während des Differenzierungsprozesses. Es mehren sich also die Anzeichen dafür, dass Phosphat auch als Signalmolekül eine entscheidende Rolle spielt (Bellows, Aubin *et al.* 1991; Tenenbaum, Limeback *et al.* 1992). Bei diesen Prozessen steht man jedoch erst am Beginn ihres Verständnisses.

Auswirkungen von extrazellulärem Phosphat auf zelluläre Funktionen sind in deutlicher Form zu beobachten: Für humane Osteoblasten-ähnliche Zellen

konnte gezeigt werden, dass Phosphatkonzentrationen, die über die physiologischen Werte hinausgehen, eine Apoptose der Zellen verursachen (Meleti, Shapiro *et al.* 2000). Ähnliche Beobachtungen in noch ausgeprägterer Weise, d.h. mit höherer Phosphatsensitivität, konnten bei Chondrozyten gemacht werden (Mansfield, Rajpurohit *et al.* 1999).

An der Prä-Osteoblasten Zelllinie MC3T3-E1 wurden Mikroarray-Untersuchungen durchgeführt, um die Auswirkungen von freiem, anorganischem Phosphat im Medium (10 mM über 72 h) auf die Genexpression zu untersuchen (Kontrolle: 10 mM Sulfat über 72 h). Es zeigten sich eine Reihe von Genen, die sowohl hoch- als auch herunterreguliert werden. Der Natrium-Phosphattransporter Pit-1 wurde unter Phosphateinfluss um den Faktor 2,45 nach oben reguliert (Beck, Moran *et al.* 2003).

1.2.4 Rolle des Wnt-Pathways / sFRP4

sFRP4 gehört zu einer Familie von Proteinen, die Antagonisten des Wnt-Signalweges darstellen. Der **Wnt-Pathway** stellt einen zunehmend besser charakterisierten Weg der Signaltransduktion dar, mit dessen Hilfe Signale der zellulären Umgebung über eine intrazelluläre Reaktionskaskade bis in den Zellkern vermittelt werden. Im Zellkern erfolgt letztendlich eine Expressionsänderung durch den Transkriptionsfaktor β -Catenin. Der Wnt-Pathway zeichnet sich im Vergleich zu anderen Signaltransduktionswegen durch seine Komplexität aus. Als extrazelluläre Signalmoleküle dienen sezernierte Glykoproteine der Wnt-Familie, von denen beim Menschen 19 Mitglieder bekannt sind. Der zelluläre Wnt-Rezeptor besteht aus zwei Komponenten: Zum einen aus einem Mitglied der Frizzled (Fz)-Familie, einem Molekül mit sieben Transmembran-Domänen, von denen beim Menschen 10 Mitglieder bekannt sind. Zum anderen aus einem von zwei existierenden Transmembranproteinen, den low-density-lipoprotein-receptor-related proteins (LRP-5 und LRP-6). Kommt es zu einer Aktivierung durch Wnt, bilden Wnt, Frizzled und LRP-5/6 einen Komplex, dessen intrazellulärer Anteil dann durch die beiden Kinasen GSK3 und CK1 γ phosphoryliert wird. An diesen

intrazellulären, phosphorylierten Anteil des aktivierten Rezeptorkomplexes bindet Axin und steht dadurch nicht mehr für eine mögliche Phosphorylierung und damit Inaktivierung von β -Catenin zur Verfügung. Somit kommt es bei Aktivierung des Signalweges zu einer intrazellulären Akkumulation des Transkriptionsfaktors β -Catenin. (Nusse 2005)

Die bisher bekannten **Antagonisten des Wnt-Pathways** lassen sich in zwei funktionelle Klassen einteilen: Die sFRP-Klasse und die Dickkopf-Klasse. Zur sFRP-Klasse können die Mitglieder der sFRP-Familie, WIF-1 sowie Cerberus gezählt werden. Sie binden direkt an Wnt und ändern somit die Fähigkeit zur Bindung mit dem Wnt-Rezeptor-Komplex. Zur Dickkopf-Klasse gehören verschiedene Proteine der Dickkopf-Familie, die ihre hemmende Wirkung durch Bindung an die LRP5/LRP6-Komponente des Rezeptor-Komplexes entfalten.

Die sFRP-Familie besteht aus acht Mitgliedern, für sFRP1 bis sFRP5 hat sich eine einheitliche Nomenklatur durchgesetzt. Die sFRPs besitzen jeweils eine Zystein-reiche-Domäne (CRD), die 30-50% Sequenz-Übereinstimmung mit der CRD von Frizzled-Proteinen aufweist. (Jones und Jomary 2002; Kawano und Kypta 2003; Nusse 2005)

Der Wnt-Pathway stellt einen essenziellen Signalweg in der Entwicklung, aber auch in der **Proliferation, Differenzierung und Apoptose** dar. Er scheint beteiligt zu sein an Phänomenen wie Embryogenese, Tumorentstehung und neurodegenerativen Erkrankungen (Kawano und Kypta 2003). Bei der Tumorentstehung scheint häufig eine anomale Methylierung der DNA von Mitgliedern der sFRP-Familie zu einer Dämpfung und somit insgesamt zu einer erhöhten Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges zu führen. Beispielsweise reguliert der Wnt-Pathway die normale Apoptose und wird für die normale B-Zell-Entwicklung benötigt, wohingegen eine anomale Aktivierung bei der Chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) zu finden ist, die sich durch eine Unterbrechung der Apoptose erklären lässt. Wie kürzlich veröffentlicht, fand sich vor allem die DNA von sFRP4 aber auch von anderen Mitglieder der sFRP-Familie bei primären CLL-Proben häufig methyliert und damit in ihrer biologischen Wirkung reduziert. (Liu, Raval *et al.* 2006)

1.3 Quantitative real-time-RT-PCR

1.3.1 Allgemeines

Die quantitative real-time-RT-PCR ist eine der Methoden, deren Bedeutung in der biotechnologischen Forschung in den letzten Jahren einen enormen Aufschwung erfahren hat, und die zunehmend zur Methode der Wahl wird für die mRNA-Quantifizierung (Bustin 2000; Bustin 2002). Die kontinuierliche Weiterentwicklung und Evaluierung verschiedener Techniken, Protokolle, aber vor allem diverser Auswertungsschemata haben sie zu einem Standardwerkzeug in der qualitativen und quantitativen Erforschung der Genexpression werden lassen: Ausgehend von isolierter mRNA erfolgt über die Reverse Transkription (RT) und die anschließende PCR eine sequenzspezifische Amplifikation von Nukleinsäure. Die Durchführung als „kinetische“ oder „real-time-PCR“ (Higuchi, Fockler *et al.* 1993; Heid, Stevens *et al.* 1996), bei der bereits während des Reaktionsprozesses durch fluoreszierende Moleküle die Menge an entstandenem Produkt erfasst wird, führt zu Daten, die mittels verschiedener Berechnungsmodelle eine quantitative Auswertung zulassen.

Die real-time-RT-PCR zeichnet sich aus durch eine hohe Sensitivität, eine hohe Spezifität und einen sehr weiten Detektionsbereich. Im Vergleich zu anderen Methoden der mRNA-Quantifizierung reichen oft geringe Mengen an RNA aus und durch einen geringeren Zeitbedarf ist ein höherer Probendurchsatz möglich. Für die absolute oder relative Quantifizierung gibt es eine Reihe von verschiedenen Methoden, die große Möglichkeiten eröffnen, aber auch methodische Probleme mit sich bringen. Zur korrekten Beurteilung von Ergebnissen ist gerade bei den verschiedenen Auswertungsschemata ein Verständnis der methodischen Hintergründe erforderlich.

Die erforderlichen Schritte zur mRNA-Quantifizierung sind in Abbildung 1 zusammengestellt und sollen in den folgenden Abschnitten mit ihren jeweiligen Möglichkeiten und Problemen erläutert werden.

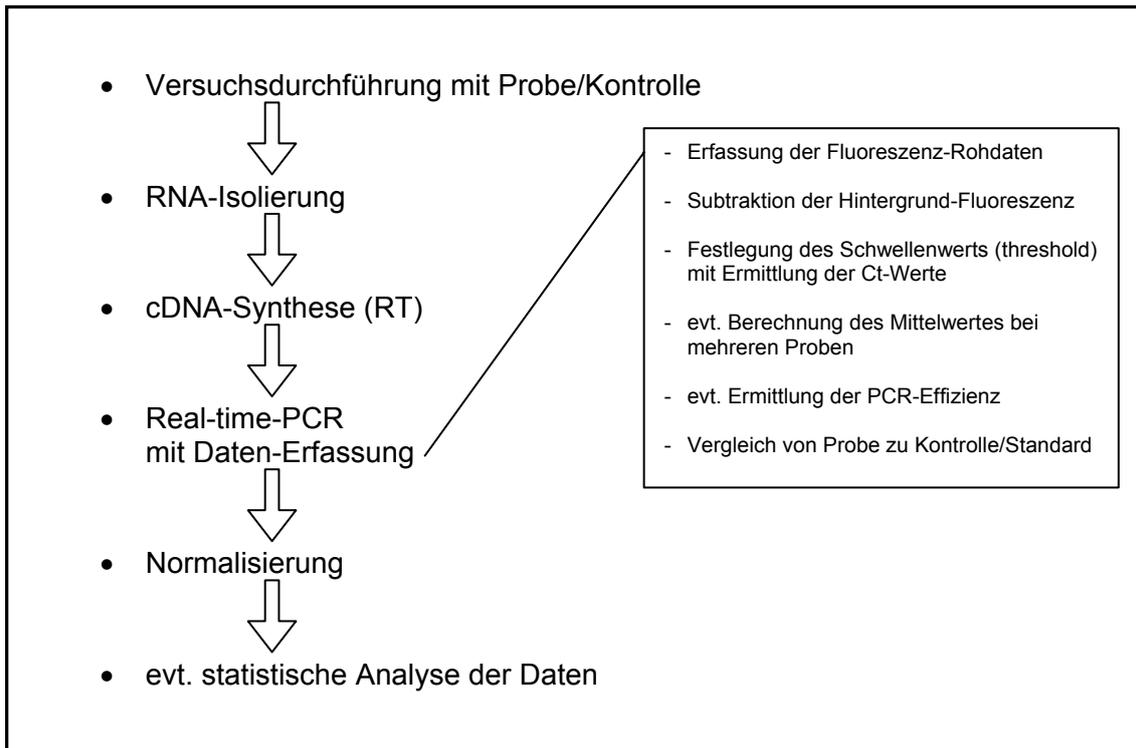


Abbildung 1: mRNA-Quantifizierung mittels quantitativer real-time-PCR

1.3.2 mRNA und RT

Zunächst muss aus dem vorhandenen Probenmaterial die Gesamt-RNA isoliert werden. Dazu stehen mehrere Methoden zur Verfügung, wobei zur RNase-Inaktivierung häufig eine chaotropische Substanz auf Guanidinium-Basis eingesetzt wird (Chomczynski und Sacchi 1987). Um experimentelle Fehler möglichst gering zu halten, ist bereits bei diesem Schritt darauf zu achten, dass annähernd gleiche Proben-Mengen oder Gewebe-Volumina verarbeitet werden (Huggett, Dheda *et al.* 2005).

RNA ist im Vergleich zu DNA ein sehr reaktives Molekül und daher besonders von Degradation gefährdet, was bei der Quantifizierung deutliche Auswirkungen haben kann. Nach der Isolierung muss die RNA somit möglichst schnell in einen stabilen Zustand, der in Form von cDNA gegeben ist, überführt werden. Die Synthese von cDNA aus RNA kann dabei durch die Reverse Transkription (RT) erfolgen an die sich dann eine PCR anschließt; dieses Vorgehen wird als „two-step PCR“ bezeichnet. Bei der „one-step PCR“ erfolgen cDNA-Synthese und PCR-Amplifikation in einem Reaktionsansatz, wodurch möglicherweise

experimentelle Abweichungen durch eine geringere Zahl an Arbeitsschritten reduziert werden können. Allerdings ist aufgrund der empfindlichen RNA dieses Vorgehen nur möglich, wenn die gesamte Reaktion zeitnah zur RNA-Gewinnung erfolgen kann. Außerdem kann in einem Ansatz einer „one-step PCR“ jeweils nur ein Gen untersucht werden, da die reverse Transkription bereits ebenfalls sequenzspezifisch erfolgt. Für die Untersuchung mehrerer Gene sind somit größere Mengen an RNA erforderlich. Bei der „two-step PCR“ kann die gewonnene cDNA hingegen für mehrere PCR-Ansätze verwendet werden. Zusätzlich ist sichergestellt, dass Variationen der Reversen Transkription alle Proben gleichermaßen betreffen und somit die Reproduzierbarkeit höher und die Variabilität geringer ist als bei one-step Ansätzen (Pfaffl 2001). Denn gerade die Reverse Transkription ist für ihre stark schwankende Reaktionseffizienz bekannt. (Wong und Medrano 2005)

Um mit Hilfe des retroviralen Enzyms der Reversen Transkriptase RNA in DNA umzuschreiben, sind Primer erforderlich, die Gen-spezifisch oder Gen-unspezifisch sein können. Gen-spezifische Primer lassen cDNA entstehen, die zu der höchsten Sensitivität bei quantitativen Versuchsansätzen führt (Lekanne Deprez, Fijnvandraat *et al.* 2002). Allerdings entsteht jeweils cDNA, die nur die Untersuchung eines einzelnen Gens ermöglicht. Bei mehreren untersuchten Genen führt das zu einem hohen Bedarf an RNA. Weiter verbreitet ist der Einsatz von Gen-unspezifischen Primern wie „Random hexamer Primer“ oder „Oligo(dT)-Primer“. Random hexamer Primer enthalten alle möglichen Nukleotid-Kombinationen eines 6-Basen Oligonukleotids und transkribieren die gesamte RNA, die allerdings größtenteils aus rRNA besteht. Das kann sowohl zu Problemen bei geringer mRNA-Menge des Zielgens, aber auch zu überhöhten Werten bei der Quantifizierung führen (Zhang und Byrne 1999; Bustin, Benes *et al.* 2005). Oligo(dT)-Primer sind Oligonukleotide, die ausschließlich aus Deoxythymidin bestehen. Diese binden an das polyadenylierte 3'-Ende, das an den meisten mRNAs gefunden wird, und transkribieren somit selektiv mRNA. Diese Primer eignen sich vor allem dann, wenn die gebildete cDNA eine verlässliche Repräsentation des mRNA-Pools

darstellen soll und mehrere Gene aus einer begrenzten Menge an RNA amplifiziert werden sollen (Bustin, Benes *et al.* 2005).

Die Reverse Transkription folgt mathematisch betrachtet einer linearen Reaktionskinetik, es findet keine Amplifikation statt, gemäß der Formel:

$$[cDNA] = [RNA] \times E$$

[cDNA]: cDNA-Konzentration
[RNA]: RNA-Konzentration
E: Effizienz der Reaktion ($0 < E < 1$)

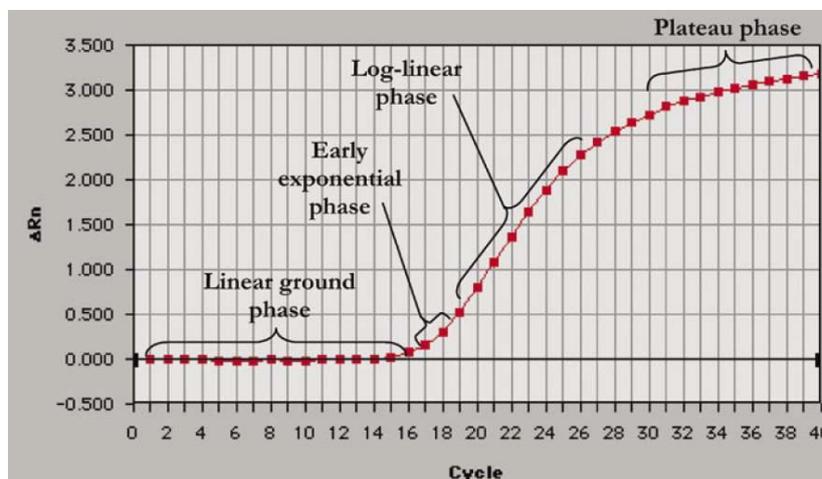
Formel 1: Reaktionskinetik der Reversen Transkription

Einzige Variable ist die Effizienz der Reaktion, die angibt wie viel Prozent der Ausgangs-RNA in cDNA umgeschrieben werden. Diese Reaktion ist sehr empfindlich für Verunreinigungen, so dass die Effizienz zwischen 5% und 90% variieren kann (Ferré 1994). Die enzymatische Aktivität der Reversen Transkriptase kann durch Alkohol, Salz und Phenol, das von der RNA-Isolation zurückbleibt, verändert werden (Freeman, Walker *et al.* 1999). Selbst bei gleicher Menge an Ausgangs-RNA kann somit eine unterschiedliche Effizienz der Reversen Transkription zu stark voneinander abweichenden Mengen an cDNA für die daran anschließende PCR führen und das Ergebnis der Quantifizierung maßgeblich beeinflussen.

1.3.3 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nimmt im Rahmen der quantitativen real-time-PCR eine zentrale Stellung ein. Die PCR an sich hat wie kaum eine andere Methode zur Erforschung des menschlichen Genoms und zum Verständnis molekularbiologischer Zusammenhänge beigetragen. Das Prinzip wurde 1983 von Kary Mullis erdacht (Mullis 1990), als Methode etabliert (Saiki, Scharf *et al.* 1985; Saiki, Bugawan *et al.* 1986) und 1993 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Bei der quantitativen real-time-PCR wird sie üblicherweise mit zwei Primern durchgeführt.

Für die quantitative Auswertung ist das Wissen um die Reaktionskinetik der PCR sehr wichtig: Die gesamte PCR-Reaktion lässt sich dabei in vier unterschiedliche Reaktionsabschnitte aufteilen (Abbildung 2). Nach einer linearen Grund-Phase, in der es zunächst zu keiner wesentlichen Vermehrung des PCR-Produktes kommt, schließt sich eine frühe exponentielle Phase an, in der im idealen Fall die Menge des entstandenen Produktes bei jedem Zyklus verdoppelt wird. Nach der sich daran anschließenden Phase der logarithmisch-linearen Amplifikation geht die Reaktion schließlich durch den Verbrauch von Reaktionskomponenten in eine Plateauphase über.



aus (Wong und Medrano 2005)

Abbildung 2: Phasen der PCR Reaktion

Die exponentielle Phase der PCR-Reaktion lässt sich dabei mit folgender Formel beschreiben:

$$P = T(1 + E)^n$$

P: entstandenes Produkt nach n Zyklen
 T: Ausgangsmenge an Template
 n: Anzahl der Zyklen
 E: Effizienz der Reaktion ($0 < E < 1$)

Formel 2: Exponentielle Reaktionskinetik der PCR

Die Effizienz E liegt während der exponentiellen Phase im idealen Fall bei 1, d.h. es findet bei jedem Zyklus eine Verdoppelung des Produktes statt. Sie

kann jedoch innerhalb verschiedener Reaktionsansätze deutlich schwanken. Wie aus Formel 2 ersichtlich, wirken sich Unterschiede in der Effizienz in exponentiellem Maße auf das Ergebnis aus. Die Effizienz der Reaktion entspricht bei einer Darstellung wie in Abbildung 2 der Steigung der Kurve. Mathematisch lässt sich somit für die Effizienz der exponentiellen Phase formulieren:

$$E = \left[10^{-\frac{1}{\text{Steigung}}} \right] - 1 \quad \text{E: Effizienz der Reaktion (0<E<1)}$$

Formel 3: Effizienz der PCR-Reaktion

Die Plateauphase entsteht dadurch, dass die Reaktionsprodukte aufgebraucht sind, die Polymerase-Aktivität sinkt und kein weiteres Produkt mehr entsteht, d.h. es wird in dieser Phase der maximale Wert an entstandenem DNA-Produkt erreicht. Wie sich in real-time-PCR-Läufen zeigt, ist die maximal entstandene Menge an DNA jedoch unabhängig von der Menge an ursprünglich eingesetzter cDNA. Die Menge an eingesetzter cDNA wirkt sich stattdessen aus auf den Beginn der exponentiellen Phase. Je größer die ursprünglich vorhandene DNA-Menge, umso früher beginnt die exponentielle Phase der Reaktion. (Freeman, Walker *et al.* 1999)

1.3.4 Quantifizierung; End-Punkt versus real-time

Soll die PCR einer Quantifizierung der Ausgangsmenge an mRNA dienen, muss als letzter Schritt eine Detektion und Quantifizierung des entstandenen PCR-Produktes durchgeführt werden. Dabei stehen prinzipiell zwei Möglichkeiten zur Verfügung: Die „End-Punkt-Analyse“, die das entstandene Produkt nach Ablauf der Reaktion durch weitere Verfahren misst, und die „real-time“-Analyse, die das entstandene Produkt bereits während des Reaktionsprozesses erfasst. Die End-Punkt-Analyse entspricht verschiedenen bisher praktizierten Verfahren, bei denen das PCR-Produkt mittels interkalierender, fluoreszierender Farbstoffe, Radioaktivität, oder

Hybridisierungs-Assays detektiert und quantifiziert wird. Wie unter 1.3.3 erläutert wurde, ist eine „End-Punkt-Analyse“ aufgrund der Reaktionskinetik der PCR nur dann aussagekräftig, wenn die Messung im exponentiellen Verlauf der Reaktion durchgeführt wird, da nur der Beginn der exponentiellen Phase Rückschlüsse auf die Menge an ursprünglich vorhandenem Produkt zulässt, nicht aber die Gesamtmenge des Amplifikates am Ende der Reaktion. Bei einer konventionell durchgeführten PCR ist es fraglich, ob diese Phase in der Praxis korrekt zu ermitteln ist. Neben einem geringeren Zeitbedarf zeigen sich Real-time-PCR Methoden den klassischen Endpunkt-Methoden überlegen in der Präzision der Ergebnisse und der Größe des Erfassungsbereiches (Schmittgen, Zakrajsek *et al.* 2000).

1.3.5 real-time-PCR-Prinzip

Für die „real-time-Analyse“ sind PCR-Cycler erforderlich, die bereits während der PCR-Zyklen Messungen an den Proben vornehmen können. Das entstandene PCR-Produkt wird dabei in der Regel optisch, durch die Intensität des Fluoreszenz-Signals ermittelt. Die Kennzeichnung des PCR-Produktes durch fluoreszierende Substanzen kann dabei sequenzspezifisch oder sequenzunspezifisch durchgeführt werden. Es existiert eine Reihe von sequenzspezifischen Verfahren, die auf Hydrolyse (TaqMan[®]), Hybridisierung oder anderen Prinzipien (Scorpions, Sunrise Primers, LUX Primers) beruhen (Freeman, Walker *et al.* 1999; Bustin 2000; Wong und Medrano 2005).

Eine andere Methode, die deutlich kostengünstiger und weniger arbeitsaufwendig ist, verwendet DNA-spezifische aber Sequenz-unspezifische Farbstoffe wie SYBR Green I (Morrison, Weis *et al.* 1998). Diese Substanzen interkalieren in doppelsträngige DNA (dsDNA) und können in diesem Zustand fluoreszieren. Die Fluoreszenz-Intensität verhält sich daher proportional zur dsDNA-Konzentration (Wittwer, Herrmann *et al.* 1997). Da eben keine Sequenz-Spezifität vorliegt, besteht die Gefahr von falsch-positiven Ergebnissen, wenn unspezifische PCR-Produkte entstehen und sich dadurch die Gesamt-Menge an dsDNA erhöht. Um sicherzustellen, dass es sich um ein einheitliches Produkt handelt, kann im Anschluss an die PCR eine „melting-

curve-Analyse“ durchgeführt werden. Auf eine Gel-Analyse kann somit verzichtet werden (Ririe, Rasmussen *et al.* 1997).

Wie unter 1.3.3 erläutert, schließt sich an die Grundphase der PCR, in der es zunächst noch zu keiner Amplifikation und keinem Anstieg der Fluoreszenz kommt, eine Phase der exponentiellen Amplifikation und damit einem exponentiellem Anstieg des Fluoreszenz-Signals an. Die Zahl an PCR-Zyklen, die erforderlich ist, damit das Fluoreszenz-Signal der Probe größer wird als die Hintergrund-Fluoreszenz und damit einen Schwellenwert (threshold) übersteigt, wird als Ct-Wert bezeichnet. In der Literatur wird teilweise auch der Begriff CP-Wert (crossing point) verwendet. Der Ct-Wert verhält sich dabei antiproportional zur Menge an ursprünglich vorhandener DNA in der Probe und ist daher die zentrale Messgröße der real-time-PCR, auf die sich alle weiteren Auswertungen stützen (Heid, Stevens *et al.* 1996). Der Schwellenwert muss sich in der frühexponentiellen Phase befinden und wird in der Software der meisten real-time-PCR-Geräte manuell gesetzt.

1.3.6 Quantifizierung real-time; absolut versus relativ

Die gewonnenen Daten der real-time-PCR können für eine absolute Quantifizierung der mRNA, bei der die Anzahl an Kopien der Ziel-Sequenz bestimmt wird, oder aber für eine relative Quantifizierung, bei der das Verhalten der Ziel-Sequenz in Bezug auf ein Referenz-Gen angegeben wird, verwendet werden.

Die absolute Quantifizierung setzt voraus, dass Standards hergestellt werden, die in Verdünnungsreihen bekannter Konzentration ebenfalls der PCR unterzogen werden, um eine Standard-Kurve zu erhalten (Heid, Stevens *et al.* 1996; Bustin 2000). Als Standard können dabei auf verschiedenen Wegen synthetisierte DNA oder auch cRNA verwendet werden. Die Reliabilität der absoluten Quantifizierung ist abhängig von der Qualität der Standards und der Annahme, dass die einzelnen PCR-Reaktion jeweils identische Reaktionseffizienzen aufweisen. Die Herstellung von Standards ist aufwendig und wirft zusätzliche methodische Probleme auf, die bewältigt werden müssen. Für viele experimentelle Fragestellungen ist es zunächst nicht erforderlich und

sinnvoll eine absolute Quantifizierung durchzuführen. (Bustin 2000; Wong und Medrano 2005)

Bei der oft ausreichenden relativen Quantifizierung wird die Änderung der Genexpression des Ziel-Gens angegeben in Bezug auf ein Referenz-Gen oder einen externen Standard (Livak und Schmittgen 2001). Das Ergebnis wird somit dargestellt als ein Ziel-Gen/Referenz-Gen Verhältnis. Es sind in den letzten Jahren zahlreiche mathematische Modelle entwickelt worden, die die Verarbeitung der Rohdaten jeweils unterschiedlich lösen (Wong und Medrano 2005). Eine zentrale Rolle bei der Berechnung spielt dabei die Effizienz der PCR-Reaktion. Die Effizienz kann aus einer Verdünnungsreihe / Standard-Kurve ermittelt (Livak 1997; Pfaffl 2001; Muller, Janovjak *et al.* 2002), als optimal angenommen (Livak und Schmittgen 2001) oder aus den Rohdaten errechnet werden (Gentle, Anastasopoulos *et al.* 2001; Liu und Saint 2002; Peirson, Butler *et al.* 2003; Ramakers, Ruijter *et al.* 2003). Die Annahme einer optimalen Effizienz ohne Korrektur erfordert den geringsten Aufwand, birgt jedoch die Gefahr von falsch-hohen Ergebnissen. Die Berechnung der Effizienz aus den Rohdaten erweist sich wiederum als genauer als die Ermittlung der Effizienz aus einer Standard-Kurve (Liu und Saint 2002). Das Software-Tool LinRegPCR (Ramakers, Ruijter *et al.* 2003) errechnet die Effizienz über eine Regressionsanalyse der PCR Rohdaten in der frühexponentiellen Phase, gemäß des unter 1.3.3 beschriebenen mathematischen Zusammenhangs. Die Anwendung erfordert korrekt importierbare Rohdaten sowie eine manuelle Kontrolle.

Die Effizienz nimmt in der naturwissenschaftlich korrekten Verwendung einen Wert zwischen 0 und 1 ein, wobei 1 einer optimalen Effizienz entspricht. In der verwendeten Literatur zur real-time-PCR wird diese Verwendung meistens nicht eingehalten, sondern die Effizienz als $1+E$ verstanden, d.h. die Effizienz schwankt zwischen 1 und 2, wobei 2 einer optimalen Effizienz entspricht. In den folgenden Teilen der Arbeit wird diese Definition der Effizienz ebenfalls übernommen.

1.3.7 Normalisierung bei relativer Quantifizierung

Bei der relativen mRNA-Quantifizierung ist es üblich, die Expression des Zielgens mit Hilfe einer weiteren Referenz-Größe, wie Zellzahl, Gesamt-RNA-Menge, rRNA-Expression oder Expression eines Housekeeping-Gens zu normalisieren. Durch die Normalisierung kann die Varianz der Expressionsergebnisse reduziert werden, da Gewebeeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionskoeffizienten sowie Fehler in der RT der einzelnen Probe sowohl Ziel- als auch Referenz-Größe betreffen. (Wong und Medrano 2005)

Die Normalisierung über Zellzahl, Gesamt-RNA und rRNA kann in der Praxis methodische Probleme und Ungenauigkeiten aufweisen, bzw. bei bestimmten Versuchsanordnungen nicht möglich sein.

Ein verbreitetes Vorgehen ist es daher, die Expression des Zielgens mit der Expression eines weiteren, nicht regulierten Housekeeping-Gens zu normalisieren. Diese Housekeeping-Gene sollten sich idealerweise in ihrer Expression nicht von der experimentellen Behandlung oder vom Entwicklungs- / Differenzierungsgrad der Zellen beeinflussen lassen. Diese Bedingung scheint in der Praxis oft nur schwer erfüllbar zu sein, da die Expression klassischer Housekeeping-Gene wie GAPDH oder β -Aktin auch von experimenteller Behandlung abhängig sein kann (Thellin, Zorzi *et al.* 1999; Bustin 2000; Schmittgen und Zakrajsek 2000). Eine Validierung der verwendeten Housekeeping-Gene sollte daher nach Möglichkeit immer erfolgen.

Sollen, wie bei wissenschaftlichen Experimenten üblich, Aussagen über mehrere Versuchsreihen abgesichert werden, stößt man bei den bisher eingesetzten Formeln an Grenzen und ist mit der Frage konfrontiert, wie Versuchsreihen mit $n > 1$ zu berücksichtigen sind. Pfaffl, Horgan *et al.* haben das Software-Tool REST[®] (Relative Expression Software-Tool) entwickelt, das Proben- und Kontroll-Gruppe miteinander vergleicht und auf ein Referenz-Gen normalisiert, wobei jeweils 16 Datenpunkte pro Gruppe verarbeitet werden können. Die Rohdaten der einzelnen Gruppen werden dabei zum einen als Mittelwerte (MW) zusammengefasst, normalisiert und die Expressionsunterschiede berechnet. Zum anderen werden die Rohdaten einem Randomisierungstest (Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test[®])

unterzogen, so dass auch die Signifikanz angegeben werden kann (Pfaffl, Horgan *et al.* 2002). Die Daten werden dabei mit folgender Formel verrechnet:

$$EV_{\text{relativ}} = \frac{(E_{\text{Ziel-Gen}})^{\Delta Ct_{\text{Ziel-Gen}} (MW_{\text{Kontrollen}} - MW_{\text{Proben}})}}{(E_{\text{Referenz-Gen}})^{\Delta Ct_{\text{Referenz-Gen}} (MW_{\text{Kontrollen}} - MW_{\text{Proben}})}}$$

EV_{relativ} : relatives Expressionsverhältnis (ratio)

ΔCt : Differenz der Ct-Werte

MW : Mittelwert

E : Effizienz der PCR-Reaktion ! ($1 < E < 2$) !

Formel 4: Berechnung des Expressionsverhältnisses in REST[®]

Bei dem neuen Programm REST 2005 (Download unter: www.gene-quantification.info) kommen statistisch abgewandelte Verfahren zum Einsatz: Die Zahl der Randomisierungen wurde auf 50000 erhöht, die Angabe von Standard-Fehler und 95%-Vertrauensintervall ist möglich. Die grafische Ausgabe erfolgt als Whisker-Diagramm, wodurch der Charakter der Ergebnisverteilung optisch sehr viel besser erfasst werden kann.

1.3.8 Darstellung der Daten

Das Ergebnis ist zunächst ein Expressionsverhältnis (EV_{relativ} , Formel 4), d.h., es beschreibt das Verhältnis der Expression des entsprechenden Gens bezogen auf den unstimulierten Zustand und normalisiert auf ein Referenz-Gen. Ein Wert von 1,0 bezeichnet den unveränderten Zustand, 0,5 eine Halbierung und 2,0 eine Verdoppelung gegenüber der Kontrolle. Bei einer linearen Darstellung wären diese beiden Punkte unterschiedlich weit von der Ausgangsebene entfernt. Um eine solche Darstellung zu vermeiden, kann aus diesen Zahlen der \log_2 gebildet werden, wie bei der Darstellung der Auswertung mit REST[®] erfolgt: Der Ausgangswert liegt damit bei 0, +1 entspricht einer Verdoppelung, -1 einer Halbierung der Genexpression. Bei den Auswertungen, die mit REST 2005 durchgeführt wurden, ist das Expressionsverhältnis (EV_{relativ}) als lineare Größe angegeben (1 = unveränderter Zustand), allerdings ist die y-Achse logarithmisch skaliert.

1.4 Tet-On™ Konstrukt

1.4.1 Allgemeines

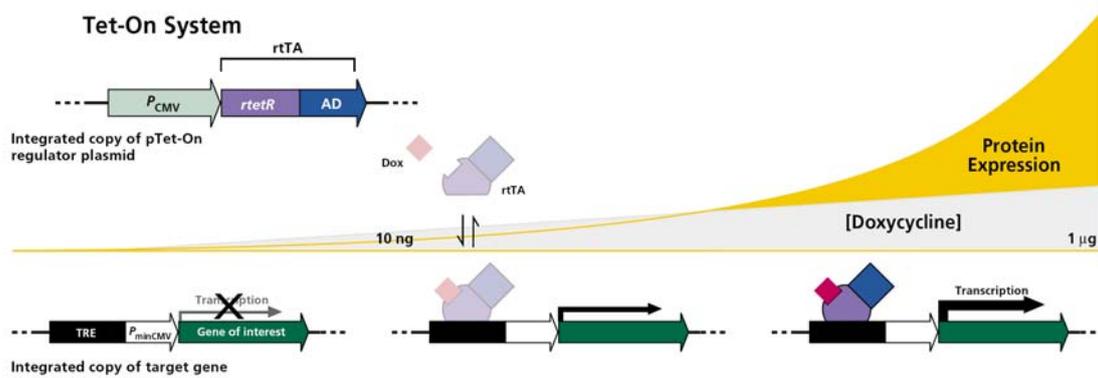
Eine Möglichkeit, um die Funktion von Genen zu erforschen, besteht darin, die Aktivität der entsprechenden Gene experimentell zu manipulieren und eventuell entstehende Veränderungen am Phänotyp zu beobachten. Solche Manipulationen können dauerhaft am Genotyp vorgenommen werden oder aber induzierbar, d.h. spezifisch und zeitlich begrenzt sein. Seit einigen Jahren stehen induzierbare Systeme auf Tetracyclin-regulierter Basis zur Verfügung (Gossen, Bonin *et al.* 1993; Gossen, Bonin *et al.* 1994).

Das **Tet-On™** Konstrukt ist ein solches Gen-Expressions-System für eukaryontische Zellen, mit dem sich die Expression eines beliebigen Gens für experimentelle Zwecke regulieren und kontrollieren lässt. Ist das System stabil in eine Zelllinie oder einen Organismus integriert, kann durch die Gabe von einem **Tetracyclin** (Doxycyclin) die Expression dieses bestimmten Gens induziert (turned **on**) werden. Die Induktion ist reversibel, erfolgt in enger Abhängigkeit von der Tetracyclin-Dosis und lässt sich präzise regulieren (Gossen, Freundlieb *et al.* 1995).

Als Basis für das Konstrukt dienten die prokaryotischen Elemente des Tetracyclin-Resistenz-Operons aus *E. coli*: Der Tet Repressor (TetR) und seine spezifische DNA-Bindungsstelle, der tet Operator (tetO), die für dieses Konstrukt abgewandelt und verändert wurden.

1.4.2 Grundprinzip

Das System besteht aus zwei entscheidenden Bestandteilen: dem **Regulator-Protein** und dem **Response-Plasmid** (Abbildung 3). Das Regulator-Protein, hier als ‚reverse tetracycline-controlled transactivator‘ (rtTA) bezeichnet, besitzt eine Bindungsstelle für Doxycyclin (Dox). Nur wenn Doxycyclin gebunden hat, kann das gesamte Regulator-Protein an das Response-Plasmid binden und dadurch die Transkription des ‚Gene of interest‘ dosisabhängig induzieren. Im nicht-induzierten Zustand wird das ‚Gene of interest‘ nicht transkribiert.



aus (Clontech 1999)

Abbildung 3: Grundprinzip des Tet-On™ Konstruktes

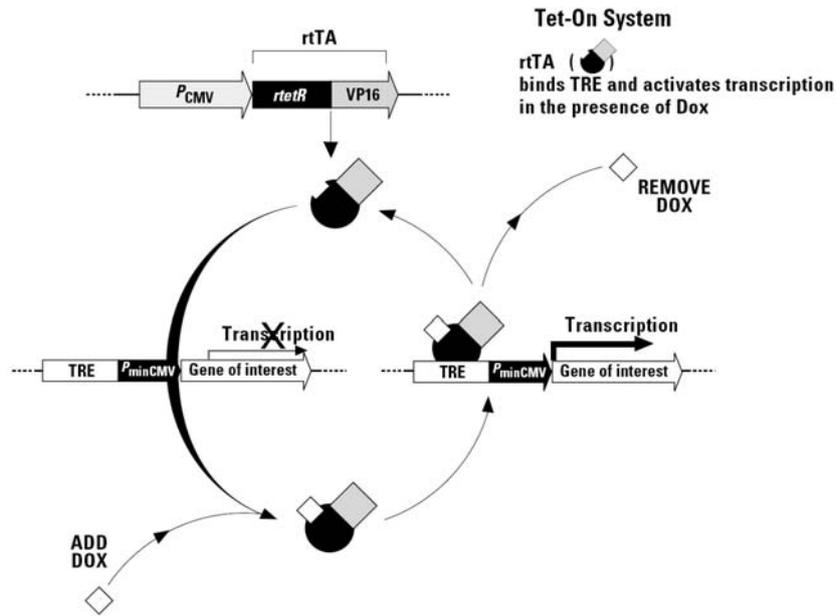
1.4.3 Bestandteile

Das **Regulator-Protein** setzt sich zusammen aus einem ‚reversen Tet-repressor‘ (*rtetR*) und einem Teil der Aktivierungsdomäne des Herpes Simplex Virus VP 16 (VP16) (Abbildung 4). Durch die Kombination von *rtetR* und VP16 ergibt sich der ‚reverse tetracycline-controlled transactivator‘ (*rtTA*), der in Anwesenheit von Doxycyclin einen Transkriptions-Aktivator darstellt.

Der Sequenz von *rtTA* ist der starke Promoter (P_{CMV}) des Zytomegalovirus (CMV) vorangestellt. Das gesamte Protein ist auf dem pTet-On Regulator-Plasmid codiert, das zur Selektion nach Transfektion auch Neomycin-Resistenz-Gene enthält.

Das **Response-Plasmid** (pTRE) besteht aus dem Tetracyclin-responsiven Element (TRE), das eine Bindungsstelle für *rtTA* besitzt, dem minimalen CMV-Promoter (P_{minCMV}) und dem eigentlichen ‚Gene of interest‘. TRE ist eine abgewandelte Form des *tetO* aus dem Regelkreis von *E. coli*. P_{minCMV} ist eine abgewandelte Form des frühen CMV-Promoters, dem verstärkende Elemente fehlen: In Abwesenheit von gebundenem *rtTA* findet, kontrolliert von TRE, keine Hintergrund-Transkription des ‚Gene of interest‘ statt. Kann *rtTA* durch Anwesenheit von Doxycyclin an TRE binden, wird P_{minCMV} zu einem starken Promoter, der hohe maximale Expressionsraten erreichen kann.

Ebenfalls auf dem Response-Plasmid (pTRE2hyg) codiert ist eine Hygromylin-Resistenz zur Selektion nach der zweiten stabilen Transfektion. Das ‚Gene of interest‘ muss zuvor in den Vektor ligiert werden, wodurch es zum pTRE2hyg-Gene X-Vektor wird.



aus (Clontech 2001)

Abbildung 4: Tet-On™ Konstrukt

1.4.4 Protokoll

Der oben beschriebene Regelkreis kann dann funktionieren, wenn sowohl das pTet-On Regulator-Plasmid als auch das pTRE2hyg Response-Plasmid stabil in das Genom einer Zelllinie übernommen wurden. Dazu sind zwei stabile Transfektionen erforderlich, die nacheinander durchgeführt werden.

In Vorversuchen ist zunächst das Transfektionsprotokoll für die jeweilige Zelllinie durch die transiente Transfektion mit einem Reporter-Vektor wie z.B. EGFP zu optimieren. Außerdem wird empfohlen, für jede Zelllinie die Dosis von G418 und Hygromylin zu ermitteln, bei der die Zellen absterben. Diese Information ist erforderlich, um nach der ersten stabilen Transfektion eine Selektion der Klone mit G418 und nach der zweiten stabilen Transfektion eine Selektion mit Hygromylin vornehmen zu können.

Nach der ersten stabilen Transfektion wird empfohlen, die Klone auf eine geringe Hintergrund-Expression und eine hohe Induzierbarkeit hin zu screenen: Dazu wird ein induzierbarer Reporter-Vektor transient transfiziert, dessen Expression leicht messbar ist. Das Plasmid pTRE2hyg-Luc besitzt als ‚Gene of interest‘ das Enzym Luciferase, dessen Aktivität in einem Luminometer zu bestimmen ist.

Nach der zweiten stabilen Transfektion wird empfohlen, die Zellen mit einem Gen-spezifischen Assay auf geringe Hintergrund-Expression und eine hohe Induzierbarkeit hin zu screenen.

1.4.5 Vorteile und Einsatzmöglichkeiten

Von den Tetracyclin-regulierten Expressionssystemen wurde zunächst das Tet-off-System entwickelt (Gossen und Bujard 1992). Es unterscheidet sich vom Tet-on-System dadurch, dass der Promoter in Abwesenheit von Doxycyclin aktiv ist und die Expression durch Doxycyclin unterdrückt wird. Auf molekularer Ebene enthält das Tet-off-System den tetracycline-controlled transactivator' (tTA) anstatt des ‚reverse tetracycline-controlled transactivator' (rtTA). Beide Systeme sind komplementär und weisen prinzipiell die gleichen Eigenschaften auf (Gossen und Bujard 2002).

Die maximalen Expressionsraten, die mit dem Tet-System erzielt werden können, sind sehr hoch. Sie erreichen Werte von starken konstitutiven Promotoren, wie z.B. CMV oder können auch noch weit darüber liegen (Yin, Zhu *et al.* 1996).

Die Expression des entsprechenden Gens durch den minimalen CMV-Promoter ($P_{\min\text{CMV}}$) ist im nicht-aktivierten Zustand sehr gering. In der Maus konnte mit diesem System das Gen für Diphtherie Toxin A Tetracyclin-abhängig reguliert werden, ohne dass sich im nicht-induzierten Zustand Auswirkungen bei den Tieren zeigten (Lee, Morley *et al.* 1998).

In eukaryontischen Zellen arbeitet dieser Regelkreis sehr spezifisch, da die eingesetzten regulatorischen DNA Sequenzen ursprünglich aus Prokaryonten

stammen und im eukaryontischen Genom nicht existieren (Harkin, Bean *et al.* 1999).

Neben einer hohen Induzierbarkeit weist das System auch relativ kurze Ansprechzeiten auf. Bereits nach 30 min Induktion können Veränderungen erfasst werden. Gegenüber anderen Expressionssystemen, die oft langsamer ansprechen, höhere Hintergrundexpression und geringere Maximalexpression aufweisen, muss der Induktor (Doxycyclin) nur in relativ geringen Konzentrationen eingesetzt werden, die weit von einer zytotoxischen Dosis entfernt sind (Gossen, Bonin *et al.* 1993). Darüber hinaus handelt es bei Doxycyclin um eine kostengünstige und gut charakterisierte Substanz.

Da das Regulator-Plasmid unabhängig vom ‚Gene of interest‘ ist, hat man nach der ersten stabilen Transfektion eine Zelllinie errichtet, die Ausgangsbasis sein kann für weitere Transfektionen mit verschiedenen Genen.

Die erforderlichen Plasmide des Tet-On™ Gene Expression Systems können über die Firma Clontech, BD Biosciences, Palo Alto, CA USA, bezogen werden.

Um die Funktion bestimmter Gene zu erforschen, bietet sich neben dem direkten Einsatz der Gene auch der Einsatz von dominant negativen Mutanten dieser Gene an. Durch die Kombination des Tet-Systems mit solchen Mutanten ergeben sich weitere interessante Einsatzmöglichkeiten (Gossen und Bujard 2002).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Phosphat stellt einen essenziellen Bestandteil der Knochenhartsubstanz dar. Ebenso ist Phosphat erforderlich, um mesenchymale Stammzellen osteogen zu differenzieren. Die Forschung der vergangenen zehn Jahre konnte einige Substanzen identifizieren, die wahrscheinlich spezifische Funktionen in der Regulation des Phosphathaushaltes besitzen. Es ist bisher weitgehend unklar, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Knochenstoffwechsel und dem Phosphathaushalt auf systemischer oder lokaler Ebene gibt.

In dieser Arbeit soll versucht werden, eventuell vorhandene Interaktionen zwischen knochenbildenden Zellen, Phosphat und den bisher bekannten Elementen des Phosphathaushaltes zu charakterisieren.

Dazu sollen immortalisierte Zelllinien mesenchymaler Stammzellen (hMSC-TERT) und fetaler Osteoblasten (hFOB) mittels konventioneller PCR zunächst auf die Expression relevanter Gene des Phosphatstoffwechsels hin untersucht werden. Anschließend soll der Einfluss von Phosphat im Nährmedium der Zellen auf die Expression von Genen des Phosphatstoffwechsels und Markern der osteogenen Differenzierung analysiert werden. Dazu soll die quantitative real-time-PCR zur relativen mRNA-Quantifizierung in der Arbeitsgruppe als Methode etabliert werden. Die Phosphat-Stimulation erfolgt in systematischer Weise, konzentrations- und zeitabhängig. Untersucht werden dabei Col1, OC, AP und OP als Differenzierungsmarker, Pit-1, sFRP4, MEPE und FGF23 als Schlüsselsubstanzen im Phosphatstoffwechsel sowie Aktin und EF1 α als Housekeeping-Gene.

Des Weiteren soll ein Genexpressionssystem (Tet-On™ Konstrukt) in mesenchymalen adulten Stammzellen (hMSC-TERT) etabliert werden, mit dem im Endzustand die Expression beliebiger Gene Tetracyclin-abhängig induziert werden kann. Diese Zellen stehen dann für weitere Zelluntersuchungen oder Proteom-Analysen zur Verfügung. Als erstes Gen soll sFRP4 überexprimiert werden. Für den Einsatz in diesem Genexpressionssystem muss sFRP4 isoliert, sequenziert und kloniert werden. Dafür stehen Zellen eines Tumors zur Verfügung, der Auslöser einer Onkogenen Osteomalazie war.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

- **hFOB**

Bei der Zelllinie hFOB (hFOB 1.19) handelt es sich um humane, fetale Osteoblasten, die mit dem Gen einer temperatursensitiven Mutante (tsA58) des Simian Virus 40 (SV-40) Large-Tumor-Antigens transfiziert wurden. Die Expression dieses Gens lässt eine konditionell immortalisierte Zelllinie entstehen und ist an Kultur bei 34,5°C gebunden. hFOB-Zellen stellen ein homogenes und schnell proliferierendes Modellsystem humaner Osteoblasten dar (Harris, Enger *et al.* 1995).

- **hMSC-TERT**

Bei der Zelllinie hMSC-TERT handelt es sich um humane Knochenmark-Stammzellen, die mit der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase (hTERT) transfiziert wurden. Die Telomeraseaktivität führt zu einer immortalisierten Zelllinie, die ein Modellsystem humaner mesenchymaler Stammzellen darstellt (Simonsen, Rosada *et al.* 2002). Die Zellen wurden freundlicherweise von Prof. M. Kassem, Odense, Dänemark, zur Verfügung gestellt.

- **Kompetente Zellen**

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurden E.coli **DH5 α** TM, E.coli **TOP10** und E.coli **TOP10F'** (alle Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

2.1.2 Nukleinsäuren

- **Oligonukleotide**

Oligonukleotide (Tabelle 2) wurden über die Firma Roth (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) bezogen, hFRP4-1, hFRP4-A, hFRP4-2 und hFRP4-B über die

Firma IBA (IBA GmbH, Göttingen), MEPE-1 und MEPE-A über die Firma amersham pharmacia biotech (jetzt: Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg).

Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide

Gen	Primer	Sequenz 5'-3'	Produktlänge
PCR			
Aktin	Aktin 1	TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCT	660 bp
	Aktin 2	CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGG	
Kollagen 1a2	COL1A1forward	GGACACAATGGATTGCAAGG	461 bp
	COL1A1reverse	TAACCACTGCTCCACTCTGG	
EF1α	EF1α sense	AGGTGATTATCCTGAACCATCC	234 bp
	EF1α antisense	AAAGGTGGATAGTCTGAGAAGC	
FGF23	FGF23 sense	GCGCACCCCATCAGACCATC	533 bp
	FGF23 antisense	GCCCGTTCCCCAGCGTGCGTGTT	
MEPE	MEPE-1	GGTTATACAGATCTTCAAGAGAGAG	468 bp
	MEPE-A	GTTGGTACTTTCAGCTGCATCACT	
NPT1	NPT1 sense	AACGAGGCCGACTTACTTCTATGA	237 bp
	NPT1 antisense	GCTGGACCAGGGAGGATGTGATGT	
NPT2a	NPT2 sense	GTCATCCAGAAGGTCATCAA	302 bp
	NPT2 antisense	CCCGAGATGTTGAAGAAGAA	
Pit-1	NPT3 sense	TACAACTCGACTCAAGGGCTACTG	215 bp
	NPT3 antisense	GGGGACACGAACCAAGACATCACA	
sFRP4	sFRP4 sense	ATGTTCCCTCTCCATCCTAGTG	1054 bp
	sFRP4 antisense	GAAACTAGTTAGCTCACACTCT	
hFRP4-1	hFRP4-1	CGAGGAGCTGGTGGACGTGAACTGC	514 bp
	hFRP4-A	TCGAGGGATGGGTGATGAGGACTTGAA	
hFRP4-2	hFRP4-2	GCCCCGCTTTGCTGCCGACTGGAGTTT	1311 bp
	hFRP4-B	GAGCACTGCAGTTGTTAGGGCAAGGGGC	
Osteokalzin	OC forward	ATGAGAGCCCTCACACTCCTC	297 bp
	OC reverse	GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC	
Sequenzierung			
sFRP4	FRPseq1	CTGGCCCGAAAGCCTGGCCT	
	FRPseq2	TCCCGCTCATTACAAATTCT	
	FRPseq3	AGCGCAGCACGGCGCTGCAG	

Die verwendeten Primer und PCR-Bedingungen wurden folgenden Publikationen entnommen:

- Kollagen 1: (Lomri, Fromigue *et al.* 1999)
- FGF23: (Seufert, Ebert *et al.* 2001)
- MEPE: (Rowe, de Zoysa *et al.* 2000)
- NPT1, NPT2a, Pit-1: (Fernandes, Beliveau *et al.* 1999)
- Osteokalzin: (Lomri, Fromigue *et al.* 1999)

- **Plasmide/ Tet-On™ Konstrukt**

Zur Vermehrung von PCR-Produkten wurde der Vektor pCRII und der Vektor pCR 2.1-TOPO (beide Invitrogen, Karlsruhe) verwendet

Plasmide für das Tet-On™Konstrukt wurden von der Firma Clontech, BD Biosciences, Palo Alto, CA USA bezogen (Tet-Off™ and Tet-On™ Gene Expression Systems).

2.1.3 Chemikalien, Kits und Lösungen

- **Chemikalien**

Chemikalien waren von p.A.-Qualität, der Bezug erfolgte über die Firmen Sigma, Roth und Merck.

- **Kits**

- ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA USA
- Advantage®-HF-PCR-Kit, Clontech, BD Biosciences, Palo Alto, CA USA
- Bright-Glo™ Luciferase Assay System, Promega, Madison, WI USA
- NucleoSpin® Plasmid-Kit, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
- NucleoSpin®-RNA II-Kit, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
- NucleoTrap®-Kit, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
- QiaFilter® Maxi-Kit, Qiagen, Hilden
- QuantiTect™ SYBR® Green PCR-Kit, Qiagen, Hilden
- TA Cloning® Kit Dual Promoter, Invitrogen, Karlsruhe, mit: pCR®II Dual Promoter Vektor und TOP10F' One Shot® competent cells oder Subcloning Efficiency DH5α

- **Lösungen**

- IPTG: 100 mM isopropyl-β-D-thiogalactoside
- LB-Medium: 10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Yeast Extract, 10 g NaCl auf 1 l, pH 7,0
- LB_{amp}: LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml)

- Loading buffer, 5-fach konzentriert: 0,25% Bromphenolblau (w/v), 0,25% (Xylencyanol (w/v), 30% Glycerin (w/v), 1 mM EDTA).
- SOC: 2% Bacto-Trypton, 0,5% Bacto-Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂-6H₂O, 20 mM Glukose, pH 7,0
- TBE: Tris-Borat-EDTA (0,09 M Tris-Borat, 0,002 M EDTA)
- X-Gal: 40 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside

2.1.4 Geräte und Hilfsmittel

- ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA USA
- DNA Engine Opticon™ System, MJ Research, Alameda, CA USA, mit:
 - PTC-200 DNA Engine™ Cyclor
 - CFD-3200 Opticon™ Detector
 - Opticon Monitor™ Software Version 1.4
- Elektroporator: Gene Pulser II, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- Eppendorf BioPhotometer 6131, Eppendorf GmbH, Hamburg
- Fluoreszenz-Mikroskop: Axioskop, Carl Zeiss, Jena
- LumiCount™, Packard Instrument Company, jetzt: PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA USA
- Thermocycler Primus, MWG-Biotech AG, Ebersberg
- Vakuum-Zentrifuge UNIVAPO 150 αH, UNIEQUIP, Martinsried
- Software: SeqMan™II, DNASTAR Inc., Madison, WI USA

Kunststoffartikel wurden von den Firmen Falcon, Greiner, Sarstedt und Eppendorf bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

- **hMSC-TERT**

hMSC-TERT Zellen wurden in Earle's MEM-Medium (Minimal Essential Medium Eagle mit Earle's Salzen, mit L-Glutamin; PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria), unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FCS) (Gibco BRL, Life Technologies, jetzt Invitrogen GmbH, Karlsruhe) und 1% Penicillin/Streptomycin-100x (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria) kultiviert. Die Aussaat erfolgte in Gewebekulturflaschen (TPP AG, Trasadingen, Schweiz) von 25 cm² (5 ml Medium) oder 75 cm² (15 ml Medium). Die Zellen wuchsen bei 37°C unter feuchter Atmosphäre (95% Luft, 5% CO₂). Zur Stammerhaltung wurden die Zellen einmal pro Woche im Verhältnis 1:10 gesplittet, ein Mediumwechsel erfolgte alle 3-4 Tage.

- **hFOB**

hFOB Zellen wurden mit DMEM/Ham's F-12-Medium (Dulbeccos minimal essential media/Ham's F-12, 1:1, mit L-Glutamin; PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria) unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin-100x kultiviert. Die Aussaat erfolgte in Gewebekulturflaschen von 25 cm² (5 ml Medium) oder 75 cm² (15 ml Medium). Die Zellen wuchsen bei 34°C unter feuchter Atmosphäre (95% Luft, 5% CO₂). Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage.

- **Phosphat-Stimulation**

Zur Phosphat-Stimulation wurde dem Medium Phosphat in Form von Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄) zugegeben. Es wurde eine 1 M autoklavierte Stammlösung verwendet. Die im Medium bereits vorhandene Phosphatkonzentration wurde berechnet aus den Angaben des Herstellers und

der Konzentration im verwendeten fetalen Kälberserum, die im Zentrallabor der Universität Würzburg bestimmt worden war.

Für die Zellversuche wurden die Zellen jeweils in Gewebekulturflaschen von 25 cm² mit 5 ml Medium ausgesät. hMSC-TERT-Zellen befanden sich bei diesen Versuchen zwischen Passage 77 und 78, hFOB-Zellen zwischen 14 und 17.

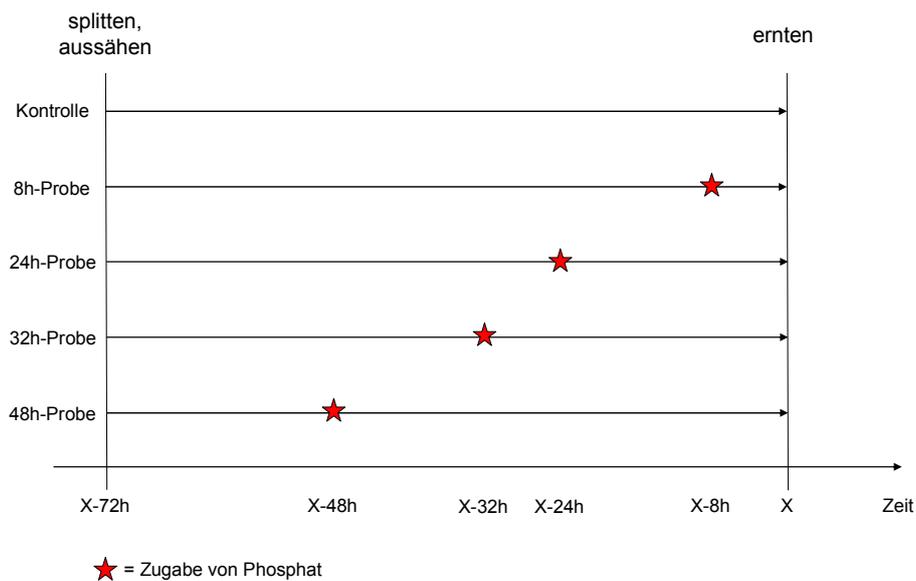


Abbildung 5: Prinzip der Phosphat-Stimulation bei Versuchsansatz 5 mM

2.2.2 Vorarbeiten zur RT-PCR

2.2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit einem NucleoSpin[®]-RNA II-Kit nach Angaben des Herstellers:

Auf die Zellen wurde dabei für einige Minuten zunächst eine Lösung mit Guanidin-Thiocyanat und β -Mercaptoethanol gegeben. In dieser Lösung konnten die Zellen dann geerntet werden, indem sie mit einem Zellschaber aus der Zellkulturflasche entfernt wurden. Im weiteren Protokoll erfolgte eine vorübergehende Bindung der RNA an eine Silica-Membran, mehrere Wasch-

Schritte und eine Behandlung mit DNase I. Die reine RNA wurde in RNase-freiem Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 Reverse Transkription von RNA

In einem Reaktionsvolumen von 12,5 µl wurden 2 µg der Gesamt-RNA mit Oligo-dT-Primer und HPLC-H₂O versetzt, für 5 min bei 70°C inkubiert und dann auf 4°C abgekühlt. Anschließend wurde dieser Ansatz um Puffer, dNTP-Mix, HPLC-H₂O und 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (Promega, Madison, WI USA) ergänzt, bis zu einem Gesamtvolumen von 20 µl. Das Reaktionsgemisch wurde für 60 min bei 42°C inkubiert und abschließend für 10 min auf 94°C erhitzt, um das Enzym zu denaturieren. Die gewonnene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Bei einigen Proben mit schwach konzentrierter RNA wurde diese zunächst in einer Vakuum-Zentrifuge eingedampft und anschließend erneut eine Konzentrationsbestimmung vorgenommen.

2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

DNA oder RNA wurden im Verhältnis von 1:100 bis 1:25 mit HPLC-H₂O verdünnt und in eine UV-durchlässige Küvette (UVette 220-1600 nm, Eppendorf GmbH, Hamburg) überführt. Es erfolgte eine fotometrische Messung der Proben im Vergleich zu reinem HPLC-H₂O in einem Eppendorf BioPhotometer 6131 in der jeweiligen Einstellung für RNA oder DNA.

2.2.3 Konventionelle RT-PCR

2.2.3.1 Durchführung

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion in einem Thermocycler Primus. Ein Ansatz enthielt jeweils 1 µl cDNA, 25 pmol sense-Primer, 25 pmol antisense-Primer, 2,5 mM MgCl₂, Puffer, HPLC-H₂O und 0,5 µl Taq DNA Polymerase (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg), das Gesamtvolumen betrug 50 µl.

Die PCR-Bedingungen sind Tabelle 3 zu entnehmen. Zu Beginn erfolgte eine Denaturierung bei 94°C für 2 bis 5 min, abschließend eine Elongation bei 72°C für 7 bis 10 min.

Tabelle 3: PCR-Bedingungen

Gen	Primer	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklen
Aktin	Aktin 1 Aktin 2	94°C 15 s	58°C 30 s	72°C 60 s	30
Kollagen 1a2	COL1A1forward COL1A1reverse	94°C 30 s	57°C 30 s	72°C 30 s	40
EF1 α	EF1 α sense EF1 α antisense	94°C 30 s	54°C 30 s	72°C 30 s	40
FGF23	FGF23 sense FGF23 antisense	94°C 30 s	60°C 30 s	72°C 45 s	28
MEPE	MEPE-1 MEPE-A	94°C 30 s	56°C 30 s	72°C 45 s	36
NPT1	NPT1 sense NPT1 antisense	94°C 30 s	55°C 30 s	72°C 30 s	40
NPT2a	NPT2 sense NPT2 antisense	94°C 30 s	55°C 30 s	72°C 30 s	40
Pit-1	NPT3 sense NPT3 antisense	94°C 30 s	55°C 30 s	72°C 30 s	40
sFRP4	sFRP4 sense sFRP4 antisense hFRP4-1 hFRP4-A	94°C 30 s 94°C 30 s	58°C 30 s 59°C 30 s	72°C 60 s 72°C 45 s	40 40
Osteokalzin	OC forward OC reverse	94°C 30 s	60°C 30 s	72°C 30 s	40

2.2.3.2 Agarose-Gel-Elektrophorese

Eine Auftrennung von PCR-Produkten erfolgte in einem 1% Agarose-Gel: Die Agarose (SeaKem[®] LE Agarose, BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME USA) wurde in TBE geschmolzen, mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 10 μ g/ml) und in einen Horizontal-Gelträger (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) gegossen. Den Proben wurde Loading-Buffer zugegeben. Das aufgetragene Probenvolumen betrug je nach erzeugten Probenkammern und eingesetzten Gelträgern zwischen 5 und 11 μ l. Zur Größenbestimmung kamen 100 bp und 1 kbp DNA-Marker zum Einsatz. Die

elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei angelegten Spannungen von 60 V bis 100 V in einem TBE-Bad. Die Gele wurden unter UV-Licht auf einem UV-Leuchttisch mit Dunkelkammer und Video-Dokumentationssystem (LTF Labortechnik GmbH, Wasserburg) fotografiert.

2.2.3.3 Elution von DNA aus Agarose-Gel

Unter UV-Licht sichtbare Banden von DNA wurden mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Die Elution der DNA aus dem Gel erfolgte mit einem NucleoTrap[®]-Kit nach Angaben des Herstellers.

2.2.4 Quantitative real-time-RT-PCR

2.2.4.1 Durchführung

Die real-time-PCR wurde nach der SYBR[®] Green-Methode durchgeführt, dabei kam das QuantiTect[™] SYBR[®] Green PCR-Kit zum Einsatz. In einem Ansatz wurden jeweils 1 µl cDNA, 10 µl QuantiTect[™] SYBR[®] Green PCR Master-Mix, 10 pmol Sense-Primer und 10 pmol Anti-Sense-Primer mit HPLC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht. Das Reaktionsgemisch wurde in real-time-PCR-caps (0,2 ml thin-wall-tubes, white; ultra-clear-caps, clear; MJ Research Inc., Waltham, MA USA) gegeben. Da es sich um eine Hot-Start-Polymerase handelt, wurde jeder PCR-Lauf mit einem Denaturierungsschritt von 15 min bei 95°C begonnen, die weiteren Bedingungen sind ebenfalls Tabelle 3 zu entnehmen. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte nach jedem Zyklus. Am Ende jeden Laufes wurde eine Melting Curve erstellt, Temperaturbereich von 55°C bis 95°C, Messung alle 0,2°C für 1 s. Die Melting Curve diente als Kontrolle für die Reinheit und Spezifität des entstandenen Produktes.

2.2.4.2 Auswertung

- **Bestimmung der Ct-Werte**

Für die weitere Auswertung sind die Ct-Werte entscheidend, die die Anzahl der Zyklen (C) angeben, nach denen die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert ($t = \text{threshold}$) übersteigt. Anhand der gemessenen Fluoreszenz-Intensität nach jedem Zyklus kann von der Opticon Monitor[™] Software

zunächst ein Graph erstellt werden, der die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zykluszahl darstellt (Abbildung 6). Die Daten waren dabei jeweils Leerwert- und Grundwert-korrigiert (Einstellungen: „subtract blanks“, „subtract baseline“).

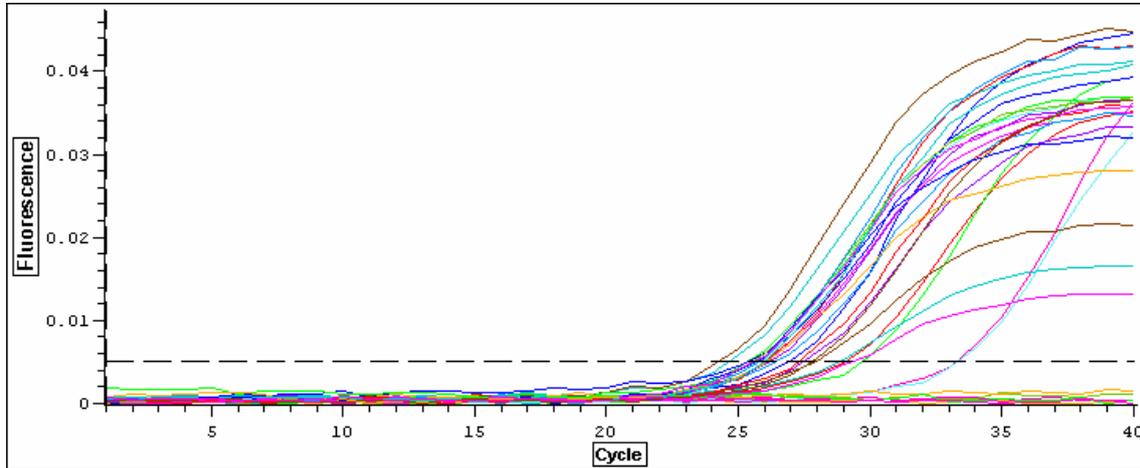


Abbildung 6: Beispiel für lineare Darstellung der Fluoreszenz-Rohdaten

In der halblogarithmischen Darstellung wurden alle Kurven eines PCR-Laufes angezeigt und der Schwellenwert (gestrichelte Linie) manuell gesetzt, so dass er über den Hintergrundwerten und gleichzeitig im exponentiellen Bereich der Kurven lag (Abbildung 7). Für ein untersuchtes Gen wurde der Schwellenwert bei allen Proben, die in der Regel auf drei PCR-Läufe aufgeteilt waren, auf einen identischen Wert gesetzt, für den die o.g. Bedingungen erfüllt waren.

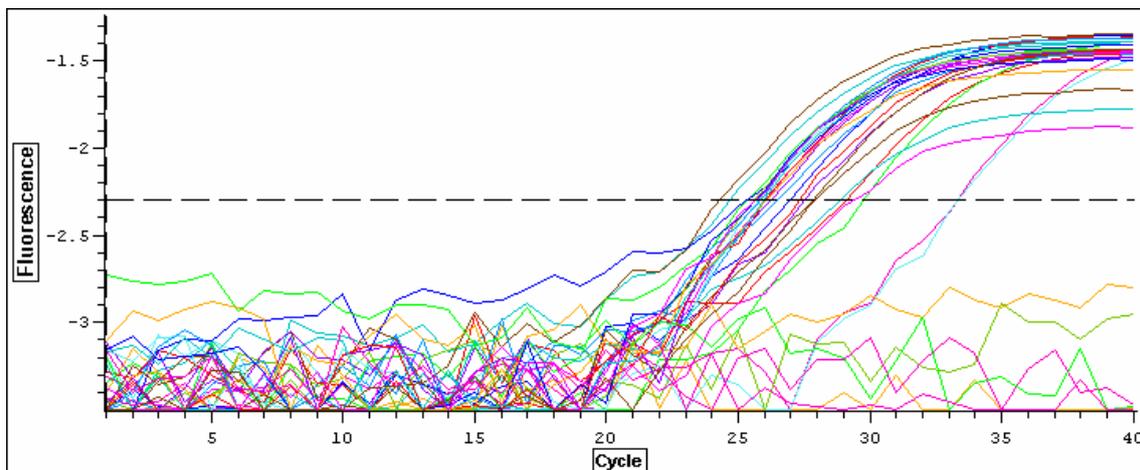


Abbildung 7: Beispiel für halblogarithmische Darstellung

- **Bestimmung der Effizienz**

Die Effizienzbestimmung erfolgte aus den Rohdaten für jede einzelne Probe mit Hilfe der Software LinRegPCR (Ramakers, Ruijter *et al.* 2003). Dabei wird eine lineare Regressions-Analyse der logarithmisch dargestellten Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zyklus-Zahl durchgeführt. Die Rohdaten aus der Opticon Monitor™ Software wurden Leerwert- und Grundwert-korrigiert (Einstellungen: „subtract blanks“, „subtract baseline“) in LinRegPCR importiert und in der Standardeinstellung analysiert. Es erfolgte jeweils eine manuelle Kontrolle der gelegten Regressionsgeraden. Die ermittelten Effizienzen wurden getrennt für jedes untersuchte Gen zusammengestellt, Mittelwert und Standardabweichung bestimmt.

- **Berechnungen**

Alle weiteren Berechnungen wurden in Excel® und mit REST® (relative expression software tool) (Pfaffl, Horgan *et al.* 2002) durchgeführt. Die Auswertungen für die Gruppen erfolgten mit dem Programm REST 2005, das weitere statistisch relevante Größen ermittelt und die Ergebnisse in Form von Whisker-Plots ausgibt.

Bei beiden Programmen wurde jeder Versuchsansatz einmal mit dem Mittelwert der PCR-Effizienz für das entsprechende Gen ausgewertet, die die Analyse mit LinRegPCR ergeben hatte. Zusätzlich wurde eine Auswertung durchgeführt mit der Effizienz $E=2$, d.h. unter der Annahme, die Effizienz sei optimal und für jedes untersuchte Gen identisch ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode) (Livak und Schmittgen 2001). Für jede Auswertung gemäß Formel 4 (siehe Seite 39) wurden wiederum einmal die Mittelwerte der Ct-Werte der drei Versuchsreihen als Grundlage genommen. Zum anderen wurde eine Auswertung nach dem *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*® (Pfaffl, Horgan *et al.* 2002), einer Funktion in REST®, durchgeführt.

Die ermittelten Daten wurden einerseits auf Aktin und andererseits auf EF1α normalisiert. Auf diese Weise ergaben sich für jedes Proben-Triplet durch die verschiedenen Auswertungswege acht Ergebnisse.

- **Darstellung**

Das Ergebnis ist zunächst ein Expressionsverhältnis (EV_{relativ} , Formel 4, S. 39), d.h., es beschreibt das Verhältnis der Expression des entsprechenden Gens bezogen auf den unstimulierten Zustand und normalisiert auf ein Referenz-Gen. Ein Wert von 1,0 bezeichnet den unveränderten Zustand, 0,5 eine Halbierung und 2,0 eine Verdoppelung gegenüber der Kontrolle. Bei einer linearen Darstellung wären diese beiden Punkte unterschiedlich weit von der Ausgangsebene entfernt. Um eine solche Darstellung zu vermeiden, kann aus diesen Zahlen der \log_2 gebildet werden, wie bei der Darstellung der Auswertung mit REST[®] erfolgt: Der Ausgangswert liegt damit bei 0, +1 entspricht einer Verdoppelung, -1 einer Halbierung der Genexpression. Bei den Auswertungen, die mit REST 2005 durchgeführt wurden, ist das Expressionsverhältnis (EV_{relativ}) als lineare Größe angegeben (1 = unveränderter Zustand), allerdings ist die y-Achse logarithmisch skaliert, um die oben beschriebene, verzerrte Darstellung zu vermeiden.

2.2.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten erfolgte nach der Cycle-Sequencing-Methode in einem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. Bei dieser Methode wird zunächst eine PCR durchgeführt, bei der neben herkömmlichen Desoxynukleotiden (dNTPs) auch farbstoffmarkierte Didesoxynukleotide eingesetzt werden. Diese Didesoxynukleotide wirken als Terminatoren und führen zum Kettenabbruch. Jede der vier Basen (A, C, G, T) ist mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt, der nach Anregung Licht einer charakteristischen Wellenlänge emittiert. Im Sequenzer erfolgt eine elektrophoretische Auftrennung bei gleichzeitiger Anregung und Detektion der emittierten Wellenlängen.

In die PCR wurde 1 µg DNA eingesetzt und mit 5 pmol des Primers, 8 µl BigDye[™] Terminator RR Mix und HPLC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht. BigDye[™] Terminator RR Mix enthält AmpliTaq DNA-Polymerase, dATP, dCTP, dITP, dUTP, A-Dye-Terminator mit dichloro[R6G], C-Dye-Terminator mit dichloro[ROX], G-Dye-Terminator mit dichloro[R110], T-Dye-

Terminator mit dichloro[TAMRA], MgCl₂ und Tris-HCl Puffer pH 9,0. Die PCR erfolgte in einem Thermocycler nach folgendem Ablauf: Initiale Denaturierung von 3 min bei 94°C, dann 30 Zyklen mit Denaturierung von 30 s bei 94°C, Annealing von 60 s bei 50°C, Elongation von 3 min bei 60°C, abschließender Elongationsschritt von 5 min bei 72°C.

Die Produkte wurden zur Aufreinigung über eine AutoSeq™G-50-Säule (Amersham Biosciences, Freiburg) zentrifugiert. Die Proben wurden jeweils mit 2 µl 3 M Natrium-Acetat, pH 4,6 und 50 µl Ethanol (100%) versetzt, 10 min auf Eis inkubiert und für 30 min bei 13000 rpm, 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 250 µl Ethanol (85%) gewaschen, in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet und konnte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt werden.

Vor dem Sequenzieren wurde das Pellet in 25 µl Template Supression Reagent (TSR) resuspendiert, die Lösung für zwei Minuten bei 95°C im Wasserbad denaturiert und auf Eis überführt.

Die auf diese Weise aufbereiteten Produkte wurden in einem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer analysiert. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit dem Programm SeqMan™II verglichen und zusammengestellt.

2.2.6 Klonierung von DNA-Fragmenten

Die Klonierungsarbeiten wurden nach dem Prinzip des T/A-Cloning, überwiegend mit einem TA Cloning® Kit Dual Promoter durchgeführt.

2.2.6.1 PCR-Produkt

Sofern nötig wurde ein PCR-Produkt nach den üblichen Protokollen erzeugt. Für die folgende Ligation ist ein Produkt mit jeweils einem Desoxyadenosin (A)-Überhang am 3'-Ende erforderlich, der von einer *Taq* oder vergleichbaren Polymerase erzeugt wird. Für die Klonierungsarbeiten an sFRP4 wurde das Advantage®-HF-PCR-Kit eingesetzt. Es handelt sich um eine High Fidelity-Polymerase mit Proofreading- und Hot-Start-Funktion auf Basis der Klen-Taq-Polymerase. Nach Angaben des Herstellers wird eine Fehlerrate von 2,4 auf 100000 bp erreicht. Die PCR mit den Primern hFRP4-2 und hFRP4-B wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Initiale Denaturierung von 1 min bei 94°C, dann 30 Zyklen mit Denaturierung von 30 s bei 94°C,

Annealing/Elongation von 4 min bei 68°C; abschließender Elongationsschritt von 3 min bei 68°C.

Die erzeugten PCR-Produkte wurden möglichst bald weiterverarbeitet.

2.2.6.2 Ligation

Die Ligation von PCR-Produkt in einen Vektor erfolgte nach Angaben des Herstellers: Es wurde 1 µl PCR-Produkt eingesetzt, mit 2 µl Vektor (25 ng/µl), 10X Ligationspuffer, 1 µl T4 DNA Ligase (4.0 Weiss units) und HPLC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl gebracht. Die Ligationslösung wurde über Nacht bei 14°C inkubiert.

2.2.6.3 Transformation kompetenter E.coli

Ein Volumen von 50 µl kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit 2 µl der Ligationslösung versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 30 s auf 42°C gebracht und dann für ca. 10 s auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium (auf Raumtemperatur) folgte eine Inkubation von 1 h bei 37°C. Von der Bakteriensuspension wurden 50 µl und der verbleibende Rest der Suspension auf jeweils eine LB_{amp}-Agarplatte aufgebracht. Bei Einsatz von Vektoren, die eine Blau-Weiß-Selektion erlauben, wurde ca. 1 h vor dem Ausplattieren 100 µl X-Gal und 10 µl IPTG gleichmäßig auf den Agarplatten verteilt. Die geimpften Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelne rekombinante Klone wurden mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt, jeweils in 2 ml LB_{amp}-Medium überführt und über Nacht bei 37°C in den Schüttelinkubator verbracht. Anschließend konnte eine Plasmid-Isolation durchgeführt werden.

2.2.6.4 Plasmid-Präparation

- **Mini-Präparation**

Kleine Mengen Plasmid-DNA, für Restriktionsanalysen benötigt, wurden aus 1,5 µl der Übernachtskultur mit einem NucleoSpin[®] Plasmid-Kit nach Angaben des Herstellers gewonnen.

- **Maxi-Präparation**

Für größere Mengen Plasmid-DNA wurden 400 ml der Übernachtskultur mit einem QiaFilter[®] Maxi-Kit nach Angaben des Herstellers gewonnen.

2.2.6.5 Restriktion von DNA

Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs (New England Biolabs Inc., Beverly, MA USA) bezogen. Ein Restriktionsverdau wurde jeweils mit einem Gesamtvolumen von 10 µl angesetzt, dabei kam der entsprechende Puffer nach Angabe des Herstellers zum Einsatz. Die Inkubation erfolgte für einige Stunden bei 37°C im Heizblock.

2.2.7 Tet-On™ Konstrukt

2.2.7.1 Vorarbeiten

Die Arbeiten erfolgten nach dem Protokoll für ‚Tet-Off™ and Tet-On™ Gene Expression Systems‘. Alle erforderlichen DNA-Fragmente oder Vektoren wurden, wie unter 2.2.6 beschrieben, angezüchtet.

Zum Optimieren der Transfektionsspannungen wurden eine Reihe von transienten Transfektionen mit einem pEGFP-N1 Vektor (Clontech, BD Biosciences, Palo Alto, CA USA) durchgeführt. Bei erfolgreicher Transfektion wird so ein unter UV-Licht grün fluoreszierendes Protein gebildet. Eine Kontrolle erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop.

Für eine spätere Selektion wurde bei den verwendeten Zelllinien die Letal-Dosis der Antibiotika Hygromyzin und G418 (G418 Sulfate, Clontech, BD Biosciences, Palo Alto, CA USA) bestimmt. Dafür wurden die Zellen in 6-well-Platten (TPP AG, Trasadingen, Schweiz) ausgesät, das Medium enthielt ansteigende Antibiotika-Konzentrationen von 0, 50, 100, 200, 400, 800 µg/ml. Die Zellen wurden täglich unter dem Lichtmikroskop kontrolliert, ein Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage.

2.2.7.2 Transfektionen

hMSC-TERT-Zellen wurden durch Elektroporation transfiziert. Die Transfektionsprotokolle für hMSC-TERT-Zellen waren im Labor durch Vorarbeiten bereits optimiert worden. Nach einer Spülung mit PBS wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria) von der Kulturflasche abgelöst und in Medium aufgenommen. Das Zell-Medium-Gemisch wurde zentrifugiert (5 min, 1200 U/min), das Pellet in serumfreiem Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine geringe Probenmenge entnommen, mit Trypanblau gefärbt und im Neubauer-Zählgitter ausgezählt. Pro Ansatz wurden 10^6 Zellen und 10 µg DNA eingesetzt und mit serumfreiem Medium auf 350 µl Volumen aufgefüllt. Um eine stabile Transfektion zu erzielen wurde die DNA vorher linearisiert, für transiente Transfektionen wurde Plasmid-DNA verwendet. Die Elektroporation erfolgte in einer 0,1 cm Elektroporationskuvette (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) mit Hilfe eines Gene-Pulser II - Elektroporators bei einer Spannung von 120 V und einer Kapazität von 950 µF. Ein Ansatz wurde anschließend in Earle's MEM-Medium mit FCS auf zwei Wells einer 6-well-Platte ausgesät.

2.2.7.3 Behandlung nach erster stabiler Transfektion

In den ersten 48 h nach Transfektion wuchsen die Zellen in Medium ohne G418, dann wurde die Konzentration im Medium auf 1,4 mg/ml erhöht, ein Mediumwechsel erfolgte wie üblich. Bei einer erfolgreichen Transfektion zeigten sich nach ca. 2-3 Wochen einige Zellansammlungen. Um eine monoklonale Zelllinie zu erhalten, wurden die Zellen vereinzelt: Soweit möglich, wurden einzelne Zellkolonien nur durch Spülung partiell abgelöst; wenn nötig, erfolgte ein Ablösen mit Trypsin/EDTA. Nach Zellzahlbestimmung (Neubauer-Zählgitter, s.o.) wurde die Suspension soweit verdünnt, dass sich eine Konzentration von 0,75 Zellen/100 µl ergab. Dann wurden jeweils 100 µl Zellsuspension in jeweils ein Well einer 96-well-Platte (TPP AG, Trasadingen, Schweiz) ausgesät, ein Mediumwechsel erfolgte wöchentlich, die Konzentration von G418 wurde auf 0,7 mg/ml gesenkt. Nach ca. 4 Wochen zeigten sich einzelne Zellkolonien. Wenn das Wachstum in einem Well von einem einzelnen Herd ausging, wurden

die Zellen als ‚monoklonal‘ eingestuft, bei Wachstum von zwei oder mehr Herden wurden sie als ‚polyklonal‘ eingestuft. Entsprechend ihrem Wachstum wurden die Zellen zunehmend in größeren Zellkulturplatten kultiviert.

2.2.7.4 Screening der Klone nach erster stabiler Transfektion

Nachdem ausreichend viele Zellen herangewachsen waren, wurde, wie unter 2.2.7.2 beschrieben, eine transiente Transfektion mit dem Referenzvektor pTRE2hyg-Luc durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein Response-Plasmid, bei dem sich die Expression des Luciferase-Gens induzieren lässt (siehe 1.4.4, Seite 42).

Das transfizierte Zellgemisch von 350 µl wurde in 1200 µl Medium mit FCS gegeben, vorsichtig gemischt und auf vier Caps zu je 350 µl verteilt. Ein Ansatz blieb unbehandelt, den anderen drei Ansätzen wurde Doxycyclin zugegeben, so dass sich Endkonzentrationen von 0,5 – 1 – 1,5 µg/ml ergaben. Die Ansätze wurden in Volumina von jeweils 100 µl auf 96-well-Platten (ViewPlate-96, black, Packard BioScience, jetzt: PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA USA) ausgesät.

Nach 48 h erfolgte eine Luciferase-Messung in einem Luminometer (LumiCount™, Packard Instrument Company, jetzt: PerkinElmer Life Science, Boston, MA USA) mit einem Bright-Glo™ Luciferase Assay System nach Angaben des Herstellers.

3 Ergebnisse

3.1 Konventionelle RT-PCR

3.1.1 Genexpression hMSC-TERT

Für diese Untersuchungen wurde jeweils die cDNA von Zellen verwendet, die unter den beschriebenen Zellkultur-Bedingungen gewachsen waren. Das Medium enthielt dabei eine Grundkonzentration von 1,25 mM Phosphat. Als Hinweis für die Reinheit der gewonnenen RNA wurde das im Fotometer bestimmte 260 nm/280 nm-Verhältnis herangezogen, als Kontrolle für die Qualität der cDNA wurde jeweils eine Aktin-PCR durchgeführt.

Dabei konnte gezeigt werden, dass **hMSC-TERT**-Zellen den Natrium-Phosphattransporter Typ III, Subtyp **Pit-1** (auch *Glv1*), exprimieren (Abbildung 8). Diese Ergebnisse wurden dreimal unabhängig voneinander bestätigt. Als Positiv-Kontrolle für Pit-1 (PCR-Produkt: 215 bp) wurden die cDNA von HEK-293-Zellen eingesetzt, für die die Expression dieses Transporters beschrieben ist (Fernandes, Beliveau *et al.* 1999). Das PCR-Produkt wurde zur Kontrolle sequenziert und war identisch mit den mRNA-Einträgen des NCBI (NM_005415). Die Expression der Typen I (NPT1) und II (NPT2a) konnte mehrmals nicht nachgewiesen werden.

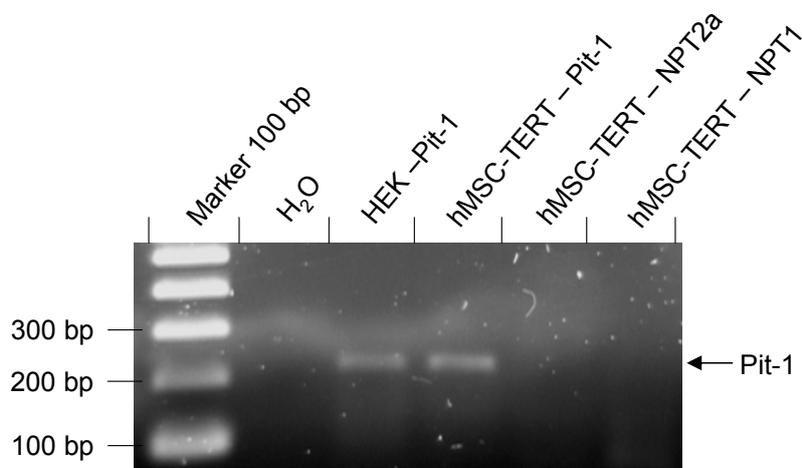


Abbildung 8: Phosphattransporter bei hMSC-TERT-Zellen

Ebenso konnte die Expression von sFRP4 mit den Primern sFRP4 sense und sFRP4 antisense bei hMSC-TERT und HEK-293 Zellen wiederholt nicht nachgewiesen werden. Für weitere Untersuchungen kamen die Primer hFRP4-1 und hFRP4-A zum Einsatz.

3.1.2 Genexpression hMSC-TERT / hFOB unter 5 mM Phosphat

Für diese Untersuchungen wurden hMSC-TERT und hFOB-Zellen für 24 h und 48 h einem Medium mit einer Phosphatkonzentration von 5 mM ausgesetzt. Als Kontrolle dienten Zellen, die im Standard-Medium mit 1,25 mM Phosphat gewachsen waren. Als Kontrolle für die Qualität der RNA und cDNA wurde auch hier jeweils das 260 nm/280 nm-Verhältnis bestimmt und eine Aktin-PCR durchgeführt.

Bei den Phosphattransportern konnten Typ I und II wiederum nicht nachgewiesen werden, bei Typ III schien für hFOB-Zellen und für hMSC-TERT-Zellen eine Abhängigkeit von der Phosphat-Stimulation vorzuliegen (Abbildung 9), wobei nach 24 h jeweils die am stärksten ausgeprägten Banden zu beobachten waren.

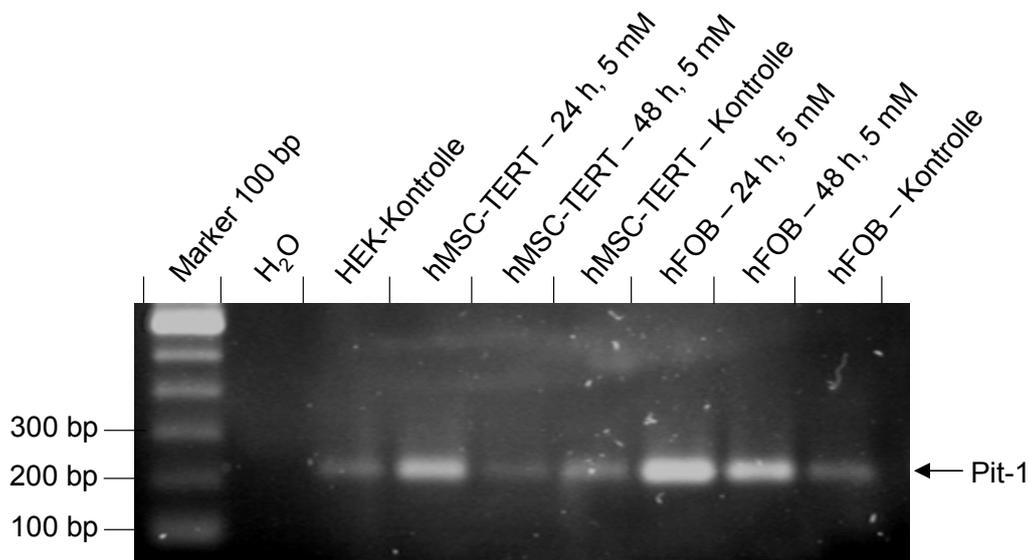


Abbildung 9: Pit-1-Expression nach Phosphat-Stimulation mit 5 mM

Die Expression von sFRP4 konnte mit den Primern hFRP4-1 und hFRP4-A bei einigen Proben nachgewiesen werden (PCR-Produkt: 514 bp). Auch hier zeigte sich eine Abhängigkeit von der Phosphat-Stimulation. Bei hFOB-Zellen, 48 h unter 5 mM Phosphat gewachsen, zeigte sich eine deutliche Bande (Abbildung 10).

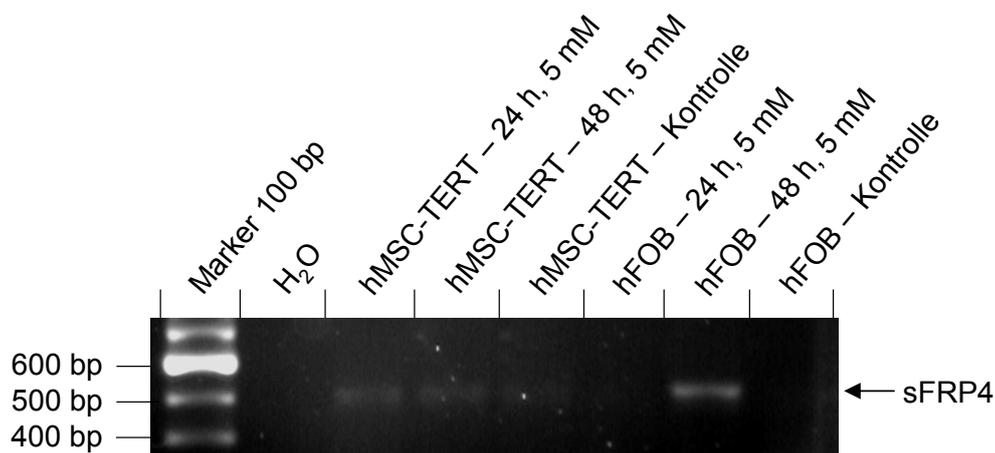


Abbildung 10: sFRP4-Expression nach Phosphat-Stimulation mit 5 mM

Die Expression von MEPE und FGF-23 konnte mit den beschriebenen Primern wiederholt nicht nachgewiesen werden.

Diese PCR-Ergebnisse wurden nicht weiter optimiert, sondern aus ihnen nur die Aussage gezogen, dass anscheinend eine phosphatabhängige Expression der untersuchten Gene vorliegt. Dies wurde zum Anlass genommen, weitere ausgiebige Zellversuche unter Phosphat-Stimulation durchzuführen, um die Genexpression mittels real-time-PCR relativ zu quantifizieren.

3.2 real-time-RT-PCR

3.2.1 Versuchsprotokoll

Bei diesen Versuchen wurde der Einfluss von Phosphat im Nährmedium auf die Änderung der Genexpression bestimmter Zielgene in systematischer Weise untersucht. Dazu wurden die zwei Zelllinien, hMSC-TERT und hFOB, verwendet. Die Phosphat-Stimulation erfolgte dabei sowohl in einer Zeit- als

auch in einer dosisabhängigen Weise, so dass mit jeder Zelllinie drei Versuchsansätze durchgeführt wurden:

1. Die Zellen wurden einer konstanten Phosphatkonzentration (5 mM) ausgesetzt und dabei jeweils nach 8, 24, 32 und 48 h geerntet. Als Kontrolle diente der Zustand zum Zeitpunkt 0.
2. Die Zellen wurden über 24 h stimuliert und waren dabei jeweils Phosphatkonzentrationen von 5, 10, 15 und 20 mM ausgesetzt. Als Kontrolle diente der Zustand bei der im Medium vorhandenen Phosphatkonzentration von 1,25 mM.
3. Die Zellen wurden über 48 h stimuliert und waren dabei jeweils Phosphatkonzentrationen von 5, 10, 15 und 20 mM ausgesetzt. Als Kontrolle diente der Zustand bei der im Medium vorhandenen Phosphatkonzentration von 1,25 mM.

Alle Zellversuche wurden unabhängig voneinander, zu verschiedenen Zeitpunkten jeweils dreimal, d.h. in drei Versuchsreihen, durchgeführt. hMSC-TERT-Zellen befanden sich bei diesen Versuchen zwischen Passage 77 und 78, hFOB-Zellen zwischen 14 und 17. Untersucht wurden die Gene β -Aktin (Aktin), EF1 α (EF1a), Pit-1 (Pit-1), sFRP4, Osteokalzin (OC), Kollagen 1 (Col1), Alkalische Phosphatase (AP), Osteopontin (OP) und MEPE.

3.2.2 RNA und PCR

Als Hinweis für die Reinheit der gewonnenen RNA wurde das im Fotometer bestimmte 260 nm/280 nm-Verhältnis herangezogen. Der Mittelwert lag bei 1,97, bei einem maximalen Bereich von 1,73 bis 2,19. (24h, 48h nur bis 10 mM einschließlich)

Unter hohen Phosphatkonzentrationen schienen die Zellen tendenziell schlechter zu wachsen, wie mikroskopische Kontrollen unter Zellkultur-Bedingungen zeigten. Bei hMSC-TERT 24h 20mM konnte trotz Poolen und Eindampfen von Versuchsreihe I-III, bei hMSC-TERT 24h 15mM trotz

Eindampfen von Versuchsreihe I und III, keine eindeutig ausreichende RNA-Menge erzielt werden. Daher wurden diese Werte aus der weiteren Wertung ausgeschlossen.

Die PCR-Läufe waren so aufgeteilt, dass jede Versuchsreihe einzeln auf jeweils ein Gen hin untersucht wurde. Für alle PCR-Untersuchungen wurde jeweils identische cDNA verwendet, die zuvor einmalig aus einer RT gewonnen worden war.

Da SYBR Green zur Detektion des PCR-Produkts zum Einsatz kam und somit nur eine DNA-Spezifität gegeben war, wurde die Spezifität der entstandenen Produkte mit Hilfe der Melting Curve überprüft. Dazu wurden die Kurven aller Proben eines Laufes in einem Graphen dargestellt. Waren die Kurven deckungsgleich, wurde von einem spezifischen und reinen Produkt ausgegangen (Abbildung 11). Die Produkte bei allen Läufen waren spezifisch. Einzige Ausnahme stellte MEPE dar: Zwischen TERT und hFOB-Zellen zeigten sich unterschiedliche Maxima in der Melting Curve, hMSC-TERT bei ca. 74°C, hFOB bei ca. 77,5°C. Das könnte für ein unterschiedlich langes Produkt, bzw. ganz allgemein zunächst für Unterschiede in den entstandenen Produkten sprechen.

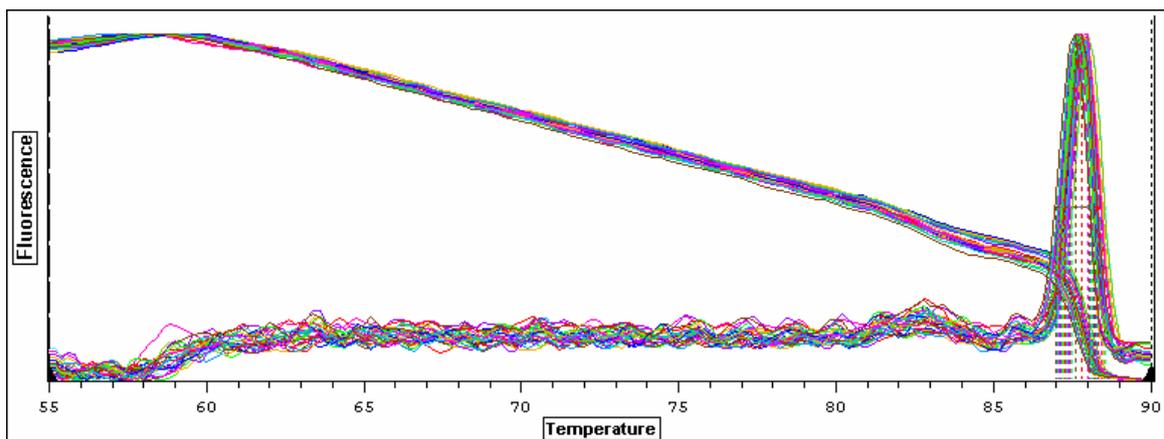


Abbildung 11: Beispiel für Melting Curve, sFRP4 bei hMSC-TERT und hFOB II

3.2.3 Analyse der Ct-Rohwerte

Aus den ermittelten Ct-Werten wurde jeweils der Mittelwert bestimmt, der für die weiteren Berechnungen herangezogen wurde, sowie Standardabweichung und Variationskoeffizient. Die Variationskoeffizienten, zusammengestellt in Tabelle 4, entsprechen somit der Inter-Assay-Variation.

Bei Versuchsansatz hMSC-TERT 5 mM wurde die Versuchsreihe I zeitlich getrennt von II und III durchgeführt, da es sich um den Pilot-Versuch handelte, der zunächst in der konventionellen PCR untersucht wurde, wie unter 3.1 beschrieben. Daher sind Unterschiede in Zellkulturbedingungen nicht absolut auszuschließen. Das zeigte sich in einem deutlichen Abweichen der Ct-Werte der Versuchsreihe I im Vergleich zu den Reihen II und III: Die Variationskoeffizienten erreichten Werte von bis zu 64,74 % bei den Ziel-Genen, bis zu 25,4 % bei Aktin und bis zu 2,61% bei EF1 α . Daher wurde die Versuchsreihe I im Versuchsansatz 5 mM sowohl für die hMSC-TERT als auch für die hFOB-Zellen aus der Wertung herausgenommen. Die Variationskoeffizienten der Reihen II und III waren deutlich geringer: Einmal bis zu 24 % bei Ziel-Genen, sonst im kleinen einstelligen Bereich, bis zu 1,98 % bei Aktin, bis zu 1,52 % bei EF1 α .

Bei Versuchsansatz hMSC-TERT 24 h lagen die Variationskoeffizienten für Aktin und EF1 α maximal bei 3,27%, bei den Zielgenen lagen sie meistens im kleinen einstelligen Bereich, lediglich bei Pit-1 erreichten sie höhere Werte bis zu 15,71 %. Wie oben erläutert, wurden die Werte für 15 mM und 20 mM ausgeschlossen, die Variationskoeffizienten erreichten Werte von bis zu 72,94 %, was den Ausschluss nochmals bestätigt.

Bei Versuchsansatz hMSC-TERT 48 h lagen die Variationskoeffizienten ebenfalls überwiegend im kleinen einstelligen Bereich, bei den hohen Phosphatkonzentrationen mit 15 und 20 mM stiegen die Werte vereinzelt an bis zu 29 % bei Aktin.

Bei hFOB 24 h lagen die Variationskoeffizienten ebenfalls überwiegend im kleinen einstelligen Bereich, vereinzelt waren erhöhte Werte von bis zu 13,92 % (24 h, 1,25 mM, AP) bei den Ziel-Genen und bis zu 19,03 % (24 h, 20 mM, EF1 α) bei den Referenz-Genen zu beobachten.

Tabelle 4: Variationskoeffizienten der Ct-Werte

hMSC-TERT		n	Aktin	EF1a	Pit-1	sFRP4	OC	Col1	AP	OP	MEPE	
5 mM Kontrolle	ohne	3	25,40	2,53	3,88	24,78	3,44	14,73				
	(II, III) ohne	2	0,52	0,55	0,03	0,00	5,81	1,38	15,48		8,40	
	Proben	8 h	2	0,06	1,52	0,01	4,16	1,74	1,26	1,68		0,19
		24 h	3	24,06	2,61	6,37	64,74	3,03	15,26			
		(II, III) 24 h	2	1,98	0,02	0,03	24,64	0,46	0,74	3,37		0,04
		32 h	2	0,02	0,00	0,05	3,58	1,49	4,54	0,00		0,03
		48 h	3	14,26	0,22	0,96	6,65	0,28	3,24			
		(II, III) 48 h	2	1,51	0,34	1,82	0,00	0,08	0,73	0,02		
24 h Kontrolle	1,25 mM	3	0,69	0,22	8,17	0,52	0,05	4,48	7,21	0,43	3,67	
	Proben	5 mM	3	0,44	0,57	9,73	1,19	0,10	1,91	8,44	1,53	9,07
		10 mM	3	3,27	0,63	15,71	1,84	2,50	3,11	9,64	2,55	2,62
48 h Kontrolle	1,25 mM	3	0,47	1,90	5,64	1,93	1,31	1,67	6,85	4,46		
	Proben	5 mM	3	0,41	5,32	4,28	5,45	1,34	3,62	7,72	5,95	
		10 mM	3	6,54	2,00	2,60	1,00	1,80	0,20	0,79	25,56	
		15 mM	3	29,54	0,54	4,60	0,27	0,07	18,50	9,36	8,01	
		20 mM	3	16,45	4,02	6,06	0,08	0,13	5,48	22,29	1,54	
alle Zahlenwerte in %												
hFOB		n	Aktin	EF1a	Pit-1	sFRP4	OC	Col1	AP	OP	MEPE	
5 mM Kontrolle	ohne	3	2,02	0,80	15,27	0,01	0,30	3,13				
	(II, III) ohne	2	0,04	0,50	7,24	0,03	0,52	1,18	0,60		0,04	
	Proben	8 h	2	0,24	0,23	3,98	0,28	0,05	1,36	0,00		5,28
		24 h	3	2,32	0,76	9,45	0,26	0,08	3,47			
		(II, III) 24 h	2	1,34	0,29	0,23	0,44	0,02	2,65	0,63		0,42
		32 h	2	0,69	1,50	2,29	0,35	0,03	0,13	1,65		0,39
		48 h	3	2,46	0,04	9,42	0,11	0,26	3,45			
		(II, III) 48 h	2	0,19	0,03	0,25	0,12	0,00	1,49	0,21		0,13
24 h Kontrolle	1,25 mM	3	0,33	8,17	4,22	2,83	0,53	10,54	13,92		3,09	
	Proben	5 mM	3	3,17	6,63	8,95	2,38	1,57	5,11	7,82		14,43
		10 mM	3	2,56	13,49	8,28	1,10	0,85	7,12	3,15		1,04
		15 mM	3	2,96	7,56	0,23	0,11	1,53	0,03	0,67		5,44
		20 mM	3	2,00	19,03	2,35	3,18	3,31	2,79	5,26		7,81
48 h Kontrolle	1,25 mM	3	13,23	2,11	0,09	6,34	0,93	8,18	3,57		0,54	
	Proben	5 mM	3	3,18	0,65	1,12	1,34	0,74	5,16	1,72		2,81
		10 mM	3	0,49	5,97	0,30	4,91	1,64	0,84	0,28		5,52
		15 mM	3	0,03	6,90	1,73	0,03	0,11	0,06	0,20		0,33
		20 mM	3	8,02	1,70	2,39	0,31	3,01	1,99	1,13		0,32
alle Zahlenwerte in %												

OP wurde bei hFOB-Zellen nur sehr schwach exprimiert, ein Kurvenanstieg erfolgte überwiegend erst nach dem 35. Zyklus, eine Auswertung war daher nicht möglich. Ebenso war eine Auswertung für OP beim Versuchsansatz 5 mM bei hMSC-TERT nicht möglich, da nur in einzelnen Proben ein PCR-Produkt entstand. Bei MEPE war aus dem gleichen Grund keine Auswertung beim gesamten Ansatz 48 h und 5 mM-48 h möglich.

3.2.4 PCR-Effizienz

Die mit LinRegPCR berechneten Effizienzen waren deutlich kleiner als 2, insgesamt aber sowohl innerhalb der Versuchsreihen, als auch zwischen den einzelnen Genen relativ einheitlich (Tabelle 5). Die Variationskoeffizienten erreichten maximal Werte von 6,5%.

Tabelle 5: PCR-Effizienzen

Gen	Effizienz			n
	Mittelwert	Standardabweichung	Variationskoeffizient	
Aktin	1,544	0,1007	6,524%	81
EF1a	1,574	0,0838	5,327%	82
Pit-1	1,467	0,0768	5,238%	84
sFRP4	1,582	0,0899	5,686%	83
OC	1,561	0,0852	5,459%	83
Col1	1,559	0,0698	4,478%	83
gesamt	1,547	0,0931	6,015%	496

Für OP, AP und MEPE konnten die Werte alle nicht in LinRegPCR importiert werden, da die PCR-Kurven wieder abfielen, das Programm diese Daten nicht verarbeiten konnte und Fehlermeldungen anzeigte. Daher konnte bei diesen Genen nur eine Auswertung mit der unkorrigierten Effizienz $E=2$ erfolgen.

3.2.5 Gene zur Normalisierung

Um eine Normalisierung durchführen zu können, wurden Aktin und EF1 α als Referenz-Gene verwendet. Als Anhaltspunkt für die Stabilität der Genexpression dieser beiden Gene wurde eine Analyse der Gesamtheit aller ermittelten Ct-Werte, für alle Versuchsansätze, sowohl für Proben als auch für Kontrollen durchgeführt (Tabelle 6, Werte für korrigierte Effizienz). Neben dem geometrischen und arithmetischen Mittelwert sowie Minima und Maxima, wurde auch die Standardabweichung auf der Ebene der Ct-Werte berechnet. Dabei zeigte sich für Aktin bei hMSC-TERT-Zellen eine hohe Standardabweichung von 1,18. Die Standardabweichungen von EF1 α bei hMSC-TERT sowie für

beide Gene bei hFOB-Zellen waren mit Werten zwischen 0,36 und 0,56 deutlich niedriger. Rechnet man diese Differenzen der Ct-Werte unter Berücksichtigung der korrigierten Effizienz um in Expressionsfaktoren, ergaben sich als Standardabweichung Hoch-/Runterregulationen zwischen 1,17 und 1,27 für EF1 α bei hMSC-TERT und Aktin und EF1 α bei hFOB. Für Aktin bei hMSC-TERT zeigte sich als Standardabweichung ein Expressionsfaktor von 1,67. Aufgrund der geringeren Streuung der Werte schien bei hMSC-TERT-Zellen EF1 α und bei hFOB-Zellen Aktin als Gen zur Normalisierung geeigneter zu sein, wie auch später eine Darstellung als Whisker-Plot noch verdeutlichen wird.

Tabelle 6: Analyse der Ct-Werte der Referenz-Gene

	hMSC-TERT		hFOB	
	Aktin	EF1a	Aktin	EF1a
n, Anzahl der gesamten Proben	34	32	39	37
geometrischer Mittelwert [Ct]	14,29	10,80	11,05	11,08
arithmetischer Mittelwert [Ct]	14,36	10,81	11,06	11,10
min [Ct]	11,53	10,20	9,79	9,30
max [Ct]	17,56	11,83	12,28	12,14
Standardabweichung [\pm Ct]	1,18	0,36	0,46	0,56
Variationskoeffizient [% Ct]	8,18	3,32	4,12	5,01
min [x-fach]	-3,31	-1,31	-1,73	-2,23
max [x-fach]	4,14	1,59	1,71	1,62
Standardabweichung [\pm x-fach]	1,67	1,17	1,22	1,27

Die Auswertung für alle Versuchsreihen erfolgte dabei einmal für eine als optimal angenommene Effizienz ($E=2$) und einmal für die korrigierte Effizienz, die mittels Regressionsgerade aus den Rohdaten errechnet worden war. Für die Normalisierung wurden getrennt voneinander Aktin und EF1 α eingesetzt. Insgesamt ergaben sich somit für jede Versuchsreihe Ergebnisse, die in vier verschiedenen Abbildungen dargestellt wurden. In den folgenden Abschnitten sollen die Diagramme jeweils nur exemplarisch dargestellt werden.

3.2.6 Darstellung der Ergebnisse

Das Ergebnis ist zunächst ein Expressionsverhältnis (EV_{relativ} , Formel 4), d.h. es beschreibt das Verhältnis der Expression des entsprechenden Gens bezogen auf den unstimulierten Zustand und normalisiert auf ein Referenz-Gen. Ein Wert von 1,0 bezeichnet den unveränderten Zustand, 0,5 eine Halbierung und 2,0 eine Verdoppelung gegenüber der Kontrolle. Bei einer linearen Darstellung wären diese beiden Punkte unterschiedlich weit von der Ausgangsebene entfernt. Um eine solche Darstellung zu vermeiden, kann aus diesen Zahlen der \log_2 gebildet werden, wie bei der Darstellung der Auswertung mit REST[®] erfolgt: Der Ausgangswert liegt damit bei 0, +1 entspricht einer Verdoppelung, -1 einer Halbierung der Genexpression. Bei den Auswertungen, die mit REST 2005 durchgeführt wurden, ist das Expressionsverhältnis (EV_{relativ}) als lineare Größe angegeben (1 = unveränderter Zustand), allerdings ist die y-Achse logarithmisch skaliert, um die oben beschriebene, verzerrte Darstellung zu vermeiden.

3.2.7 hMSC-TERT-Zellen

Als Abbildungen dargestellt sind jeweils die Auswertungen mit Normalisierung auf EF1 α , da dieses Gen bei hMSC-TERT-Zellen geringere Streubreiten aufweist, wie unter 3.2.5 erläutert. Werte, die mit dem jeweils angewandten Verfahren statistische Signifikanz aufweisen, sind mit einem (*) gekennzeichnet.

3.2.7.1 Phosphat-Stimulation mit 5 mM

Wie unter 3.2.3 erläutert, wurde die Versuchsreihe I aufgrund der hohen Streuung der Ct-Werte aus der Wertung herausgenommen. Diese Maßnahme erschien darüber hinaus sinnvoll, da die Werte für 8 h und 32 h in Versuchsreihe I nicht erhoben wurden und somit eine Verzerrung des Ergebnisses durch unterschiedliche Stichprobenzahl hätte stattfinden können.

Dargestellt in Abbildung 12 ist die Auswertung mit Effizienz $E=2$ bei Normalisierung auf EF1 α . Statistische Signifikanz der Expressionsraten war nur bei einzelnen Werten gegeben: Bei Normalisierung auf Aktin und korrigierter Effizienz für Pit-1-32 h, bei Normalisierung auf EF1 α für Pit-1-24 h und sFRP4-32 h, bei $E=2$ für MEPE-32 h bei Normalisierung auf Aktin und EF1 α .

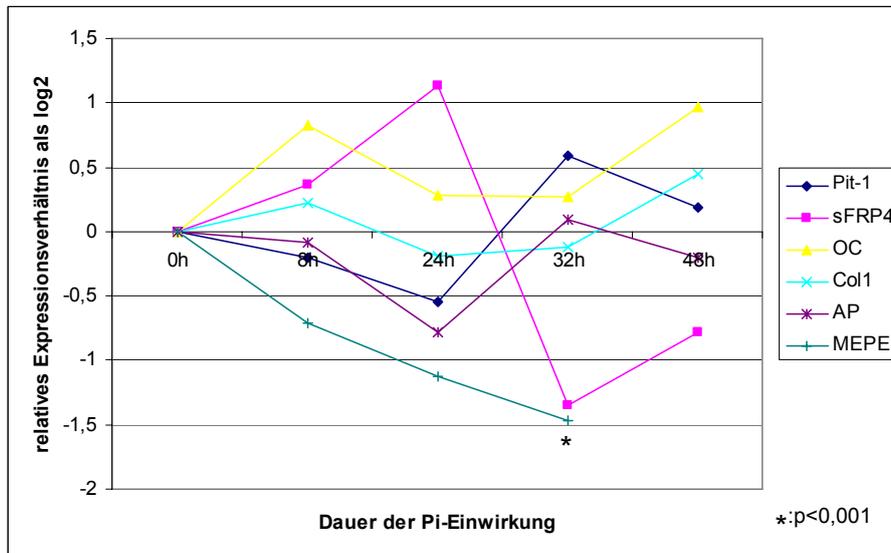


Abbildung 12: hMSC-TERT, 5 mM, E=2, Referenz: EF1α

sFRP4 stieg bis 24 h in der Expression an auf log₂-Werte von 1,139 (E=2), bzw. 0,757 (korrigierte Effizienz), was einer Steigerung um Faktor 2,2 bzw. Steigerung um 70 % entspricht. Bei 32 h und 48 h fiel die Expression wieder deutlich ab gegenüber dem nicht-stimulierten Zustand auf Werte von -1,35 (E=2) bzw. -0,891, was einer Reduktion um 60 % bzw. 46 % entspricht.

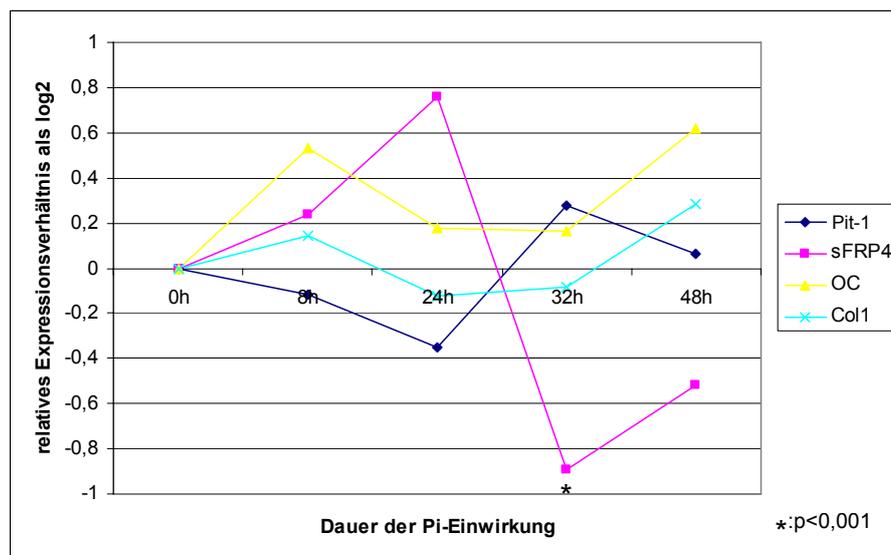


Abbildung 13: hMSC-TERT, 5 mM, korrigierte Effizienz, Referenz: EF1α

Bei Pit-1 ließ sich eine entgegengesetzte Reaktion beobachten: Bis 24 h kam es zu einem leichten Abfall der Expression auf Werte von -0,54 (E=2) bzw. -0,35 (korrigierte Effizienz), was einer Reduktion um ein Drittel bzw. um 22 % entspricht. Bei 32 h und 48 h erfolgte wieder ein Anstieg, bei 32 h auf Werte von bis zu 0,59 (E=2), bzw. 0,28 (korrigierte Effizienz), was einer Steigerung um die Hälfte bzw. um 21 % entspricht. Die MEPE-Expression fiel mit steigender Dauer der Phosphat-Stimulation deutlich ab und erreicht bei 32 h einen log₂-Wert von -1,47, was einer Reduktion auf fast ein Drittel der ursprünglichen Expression bedeutet.

3.2.7.2 Phosphat-Stimulation über 24 h

Da für die Werte 15 mM und 20 mM keine ausreichende RNA-Menge gewonnen werden konnte, sind diese Zustände nicht in die Auswertung eingeschlossen. Statistische Signifikanz zeigte sich im normalisierten Zustand nur bei einem Wert: sFRP4-10 mM bei Normalisierung auf Aktin und E=2.

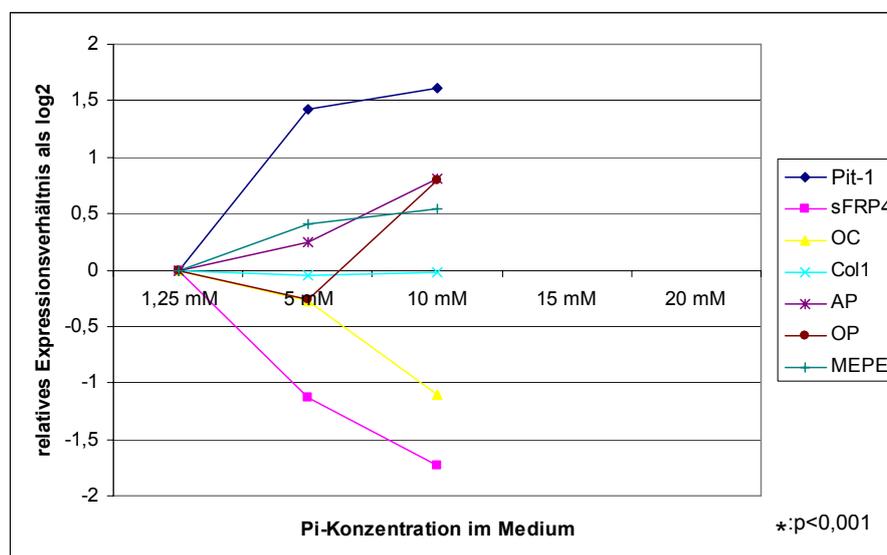


Abbildung 14: hMSC-TERT, 24 h, E=2, Referenz: EF1 α

Im Vergleich zum Versuchsansatz 5 mM ließ sich bei allen Genen aber ein deutlicherer Trend der Expressionsänderung durch die steigende Phosphatkonzentration beobachten. Die Expressionsraten nach Normalisierung

auf EF1 α sind in Abbildung 14 für E=2 und in Abbildung 15 für die Auswertung mit korrigierter Effizienz dargestellt.

Die Expression von Pit-1 stieg mit steigender Phosphatkonzentration an und erreichte als log₂ bei 10 mM Werte von 1,6 (E=2), bzw. fast 1 (korrigierte Effizienz), was einer Steigerung der Expression um Faktor 3 (E=2), bzw. einer Verdoppelung (korrigierte Effizienz) entspricht. Die Expression von sFRP4 dagegen sank mit steigender Phosphatkonzentration und erreichte als log₂ bei 10 mM Werte von -1,74 (E=2), bzw. -1,15 (korrigierte Effizienz), was noch einem Drittel der ursprünglichen Expression (E=2), bzw. etwas mehr als einer Halbierung der Expression (korrigierte Effizienz) entspricht. Als tendenziell ansteigend mit der Phosphatkonzentration erwies sich die Expression von OP, AP, MEPE mit einer Steigerung von 45-75% (E=2), wohingegen OC bei 10 mM um 55% (E=2) bzw. 40% (korrigierte Effizienz) herunterreguliert wurde. Die Expression von Col1 schien durch Phosphat nicht beeinflussbar zu sein.

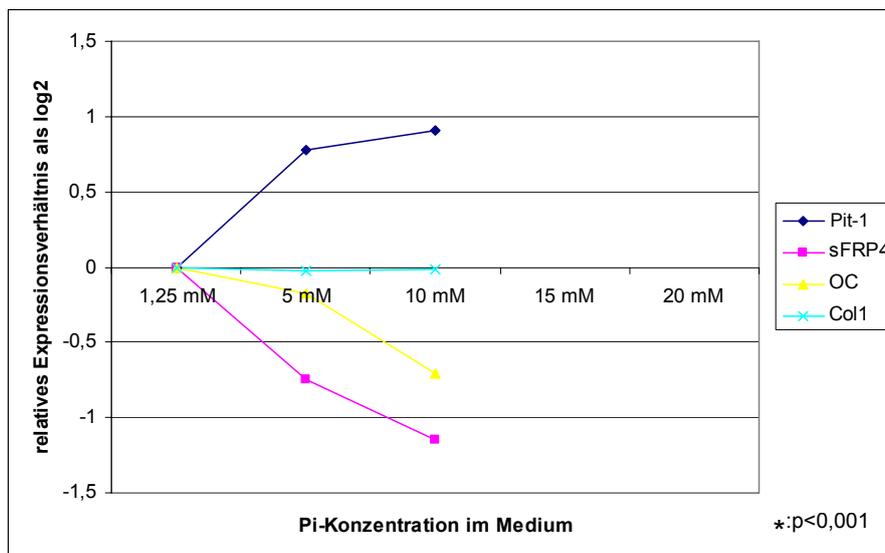


Abbildung 15: hMSC-TERT, 24 h, korrigierte Effizienz, Referenz: EF1 α

Bei Normalisierung auf Aktin zeigte sich insgesamt eine identische Situation. Betrachtet man die nicht-normalisierten Werte für die beiden Normalisierungsgene, zeigten sich nur geringe Schwankungen mit Faktoren im Bereich von 1,058 bis 0,81 (korrigierte Effizienz) bzw. 1,094 bis 0,719 (E=2).

3.2.7.3 Phosphat-Stimulation über 48 h

Statistische Signifikanz zeigte sich bei diesem Versuchsansatz für die Werte von sFRP4 (5, 10, 15 mM) unabhängig von der verwendeten Effizienz sowie für Col1 (E=2) bei 10 und 20 mM und OC (E=2) bei 15 mM. Die Tendenz der Expressionsänderung, die bereits bei dem Versuchsansatz 24 h zu beobachten war, setzte sich auch hier fort.

sFRP4 wurde mit steigender Phosphatkonzentration herunterreguliert, der Effekt ist dabei noch etwas stärker ausgeprägt als bei 24 h: Die Expressionsraten nach Normalisierung auf EF1 α sind in Abbildung 16 für E=2 und in Abbildung 17 für die Auswertung mit korrigierter Effizienz dargestellt. sFRP4 zeigte bei 10 mM als log₂ ein Expressionsverhältnis von -1,7 (E=2), bzw. -1,12 (korrigierte Effizienz), was noch 30 % bzw. 45 % der ursprünglichen Expression entspricht. Die Pit-1-Expression stieg an, so wie auch bei dem Versuchsansatz 24 h, allerdings war die Änderung hier nicht so ausgeprägt: Bei 10 mM wurden Werte als log₂ von 0,44 (E=2) bzw. 0,155 (korrigierte Effizienz) erreicht, was einer Expressionssteigerung um 35 % bzw. 11 % entspricht. Bei den Werten von 20 mM und 25 mM zeigte sich bei diesem Versuchsansatz ein noch deutlich ausgeprägterer Anstieg von Pit-1 und Abfall von sFRP4.

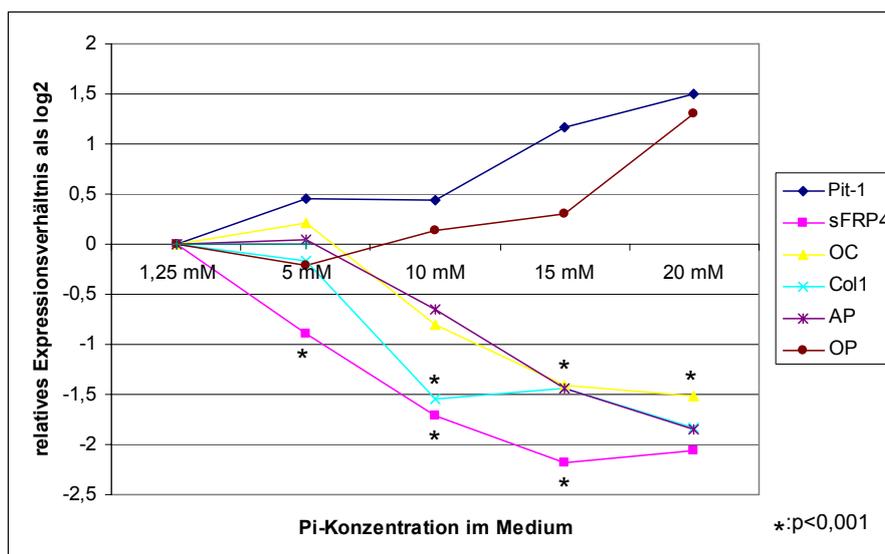


Abbildung 16: hMSC-TERT, 48 h, E=2, Referenz: EF1 α

Die Expression von OC wurde ebenso wie beim Ansatz 24 h nach unten reguliert und erreichte bei 10 mM Werte als \log_2 von -0,8 (E=2) bzw. -0,53 (korrigierte Effizienz), was einer Reduktion von mehr als 40 % bzw. mehr als 30 % der ursprünglichen Reduktion entspricht. Anders als beim Ansatz 24 h fiel auch die Expression von Col1 ab, und zwar bei 10 mM auf einen \log_2 -Wert von -1,55 (E=2) bzw. -1 (korrigierte Effizienz), was einem Drittel bzw. der Hälfte der Expression im unstimulierten Zustand entspricht.

OP stieg so auch beim Ansatz 24 h leicht an.

Bei der 24 h und 48 h-Stimulation fiel auf, dass mit steigender Pi-Konzentration sFRP4 runterreguliert und Pit-1 hochreguliert wird. Die Untersuchungen mit 5 mM standen dazu im Widerspruch.

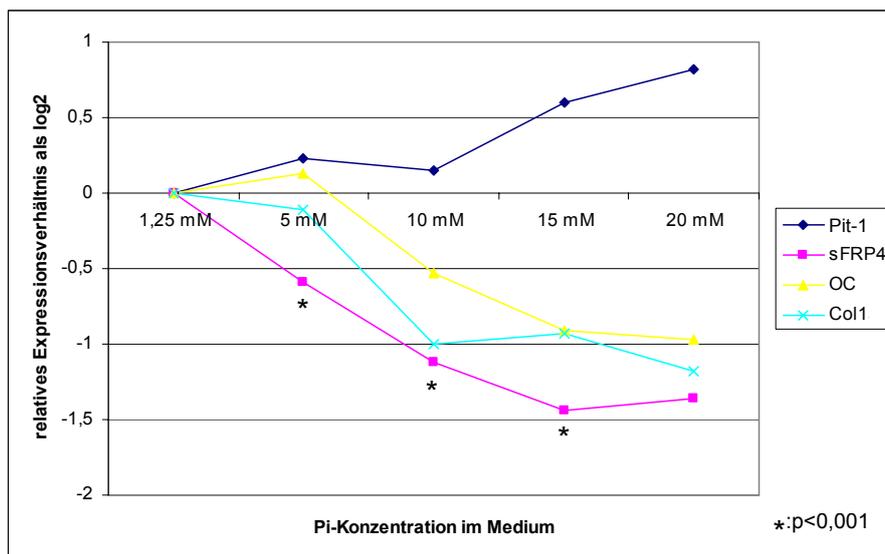


Abbildung 17: hMSC-TERT, 48 h, korrigierte Effizienz, Referenz: EF1 α

3.2.7.4 Zustand 24 h unter 5 mM und 48 h unter 5 mM

Zwei Zustände innerhalb der verschiedenen Versuchsansätze tauchten jeweils doppelt auf: 24 h unter 5 mM Phosphat sind die Zellen sowohl im Versuchsansatz 5 mM gewachsen, bei dem die Stimulationsdauer verändert wurde, als auch in dem Ansatz 24 h, bei dem die Konzentration verändert wurde. Für den Zustand 48 h unter 5 mM Phosphat trifft das entsprechend ebenso zu.

Daher konnte nochmals eine Auswertung erfolgen, bei der der Zustand 24 h unter 5 mM mit nun 5 Stichproben mit dem Zustand 24 h unter 1,25 mM mit 3 Stichproben als Kontrolle durchgeführt wurde. Für 48 h unter 5 mM ließ sich dies analog durchführen.

Die Auswertungen wurden mit der Software REST 2005 durchgeführt, bei der die Randomisierungsroutine mit 50000 Vorgängen erfolgt. Die grafische Ausgabe der Ergebnisse ist in Form von Whisker-Plots gegeben. Diese stellen den Charakter der Daten optisch bereits schnell erfassbar dar: Angegeben sind als gestrichelte Linie der Median. Innerhalb der Box liegen die mittleren 50 % der zu erwartenden Ergebnisse und die Whisker markieren den maximalen und minimal erfassten Wert.

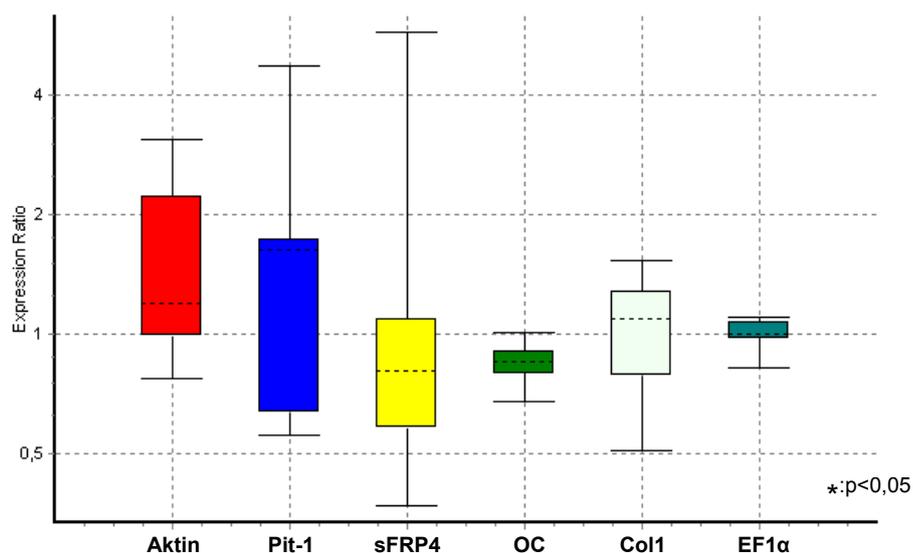


Abbildung 18: hMSC-TERT, 24 h unter 5 mM, Referenz EF1α, korrigierte Effizienz

Dabei zeigte sich bei den hMSC-TERT-Zellen beim Zustand 24 h unter 5 mM die Expressionsänderung keines Gens als statistisch signifikant gegenüber der Kontrolle, bei der die Zellen 24 h unter 1,25 mM Phosphat gewachsen waren. Ebenso zeigte sich für den Zustand 48 h unter 5 mM keine statistische Signifikanz der Expressionsänderung der Gene, verglichen mit der Kontrolle, bei der die Zellen 48 h unter 1,25 mM Phosphat gewachsen waren. Diese Ergebnisse waren jeweils unabhängig davon, ob auf Aktin oder EF1α oder auf

beide Referenzgene gemeinsam normalisiert wurde. Diese Aussagen trafen ebenso für die nicht-normalisierte Auswertung zu.

Bei 24 h (Abbildung 18) zeigte sich bei Normalisierung auf EF1 α , korrigierter Effizienz, und angegeben als Änderungsfaktor bezogen auf den Ausgangszustand (1) eine Expressionssteigerung von Pit-1 (1,28), ein nahezu unveränderter Zustand für sFRP4 und leichte Expressionsrückgänge für OC (0,84) und Col1 (0,98). Ebenso lässt sich aus den Abbildungen der Whisker-Plots aber auch erkennen, dass EF1 α nur in sehr geringem Maße streute.

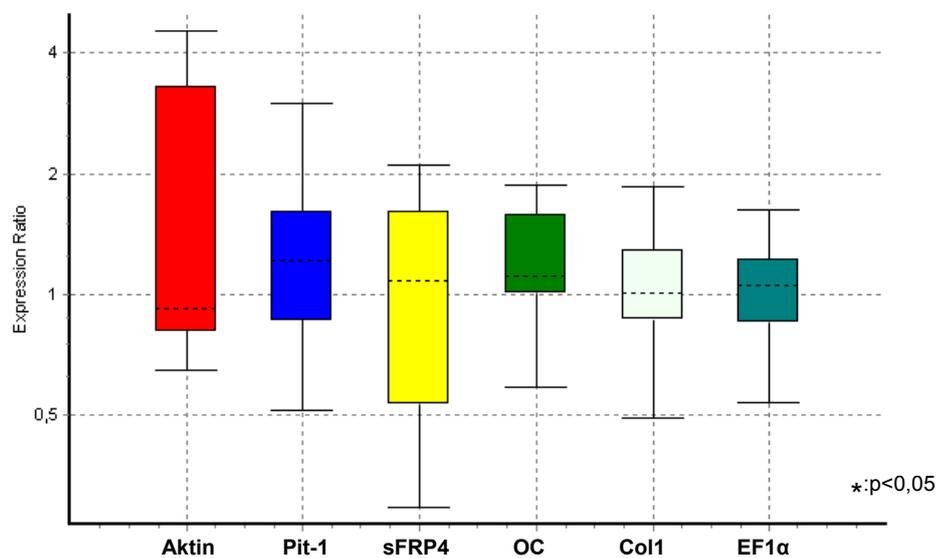


Abbildung 19: hMSC-TERT, 48 h unter 5 mM, Referenz EF1 α , korrigierte Effizienz

Bei 48 h (Abbildung 19) zeigte sich bei Normalisierung auf EF1 α , korrigierter Effizienz, und angegeben als Änderungsfaktor bezogen auf den Ausgangszustand (1) eine Expressionssteigerung von Pit-1 (1,2) und in etwas geringerem Maße von OC (1,16) sowie einen nahezu unveränderten Zustand für Col1 und einen leichten Expressionsrückgang für sFRP4 (0,89).

Diese Auswertung wurde nur für die korrigierte Effizienz durchgeführt, daher konnten die Gene AP, OP, MEPE nicht in die gleiche Auswertungsreihe eingefügt werden.

3.2.7.5 Gruppenvergleich der stimulierten Zustände

Bei den hMSC-TERT-Zellen zeigte sich sowohl bei der 24 h- und der 48 h-Reihe die Tendenz, dass Pit-1 konzentrationsabhängig hochreguliert wird und sFRP4 runterreguliert wird. Allerdings zeigten sich nur vereinzelt Werte als statistisch signifikant. Vereinfacht man nun die Fragestellung dahingehend, ob sich Phosphat überhaupt auswirkt, ließen sich Gruppen anders zusammenfassen und alle Werte der 24 h und 48 h-Reihe für 5 mM und 10 mM zusammenfassen und gegen die Werte 24 h und 48 h bei 1,25 mM vergleichen.

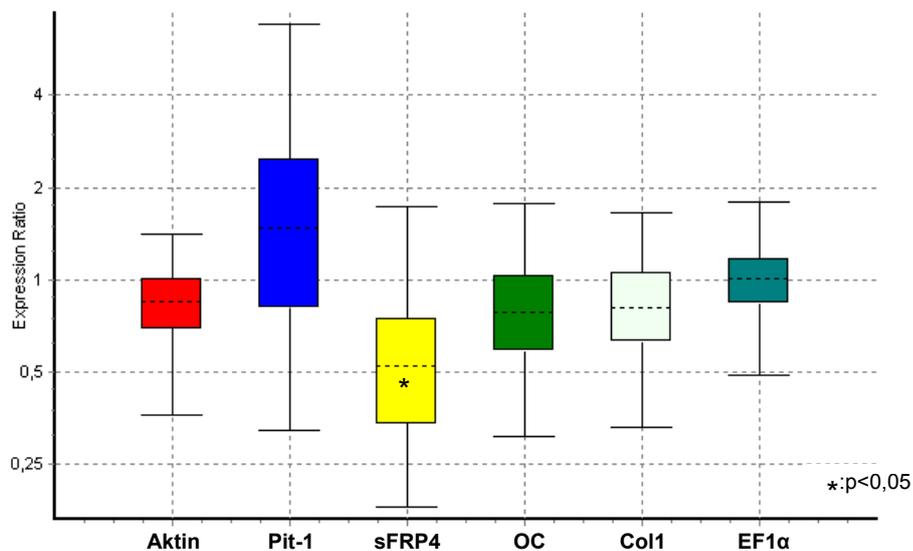


Abbildung 20: hMSC-TERT, 24 h und 48 h-Proben, korrigierte Effizienz, Referenz EF1α

Dabei zeigte sich, dass sFRP4 signifikant ($p < 0,05$) herunterreguliert wird und sich die Expression bei Normalisierung auf EF1α nahezu halbiert (0,52). Für Pit-1 zeigte sich kein signifikantes Ergebnis, aber ein deutliches Ansteigen der Expression um fast 40% (1,39). Die Signifikanz für sFRP4 blieb erhalten, sowohl bei Normalisierung auf Aktin als auch ohne Normalisierung. Nimmt man die Werte der 5 mM-Reihe dazu, zeigte sich diese Signifikanz der Ergebnisse nicht mehr, unabhängig davon, ob in die Kontrollgruppe die 5 mM-Kontrollwerte eingeschlossen wurden oder nicht.

Bei allen Konstellationen zeigte sich aber ein Ansteigen der Expression für Pit-1 und ein Abfallen der Expression für sFRP4 sowie ein leichtes Abfallen für OC und Col1.

3.2.8 hFOB-Zellen

Als Abbildungen dargestellt sind jeweils die Auswertungen mit Normalisierung auf Aktin, da dieses Gen bei hFOB-Zellen geringere Streubreiten aufweist, wie unter 3.2.5 erläutert. Werte, die mit dem jeweils angewandten Verfahren statistische Signifikanz aufweisen, sind mit einem (*) gekennzeichnet.

3.2.8.1 Phosphat-Stimulation mit 5 mM

Wie bereits unter 3.2.3 erläutert, wurde auch bei den hFOB-Zellen die Versuchsreihe I aufgrund der hohen Streuung der Ct-Werte aus der Wertung herausgenommen. Diese Maßnahme erschien darüber hinaus sinnvoll, da die Werte für 8 h und 32 h in Versuchsreihe I nicht erhoben wurden und somit eine Verzerrung des Ergebnisses durch unterschiedliche Stichprobenzahl hätte stattfinden können.

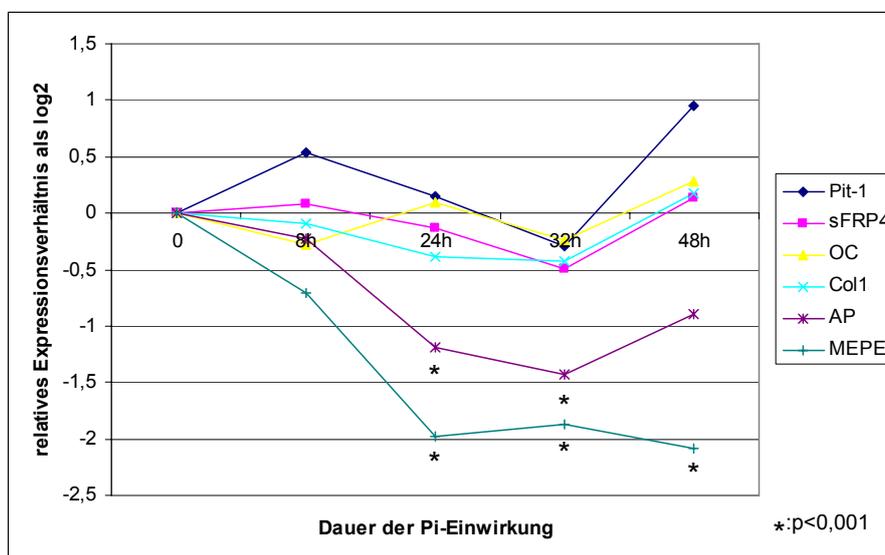


Abbildung 21: hFOB, 5 mM, E=2, Referenz: Aktin

Dargestellt in Abbildung 21 ist die Auswertung mit Effizienz E=2 bei Normalisierung auf Aktin.

Beim Wert für 32 h kam es zu einem deutlichen Unterschied der Expressionsverhältnisse zwischen Aktin und EF1 α : Die Aktin-Expression stieg bei einer geringen Streuung der Ct-Werte (CV=0,04 %) im nicht-normalisierten Zustand um ein Drittel an auf einen Wert von 1,336, zudem war diese Änderung statistisch signifikant. EF1 α dagegen fiel mit der Expression im nicht-normalisierten Zustand in nicht signifikanter Weise ab auf einen Wert von 0,82. Daher unterscheiden sich die Diagramme in diesen Werten deutlich: Bei Normalisierung auf Aktin (Abbildung 21) fielen alle Werte im Vergleich zum Zustand bei 24 h, bei Normalisierung auf EF1 α (Abbildung nicht dargestellt) stiegen alle Werte an.

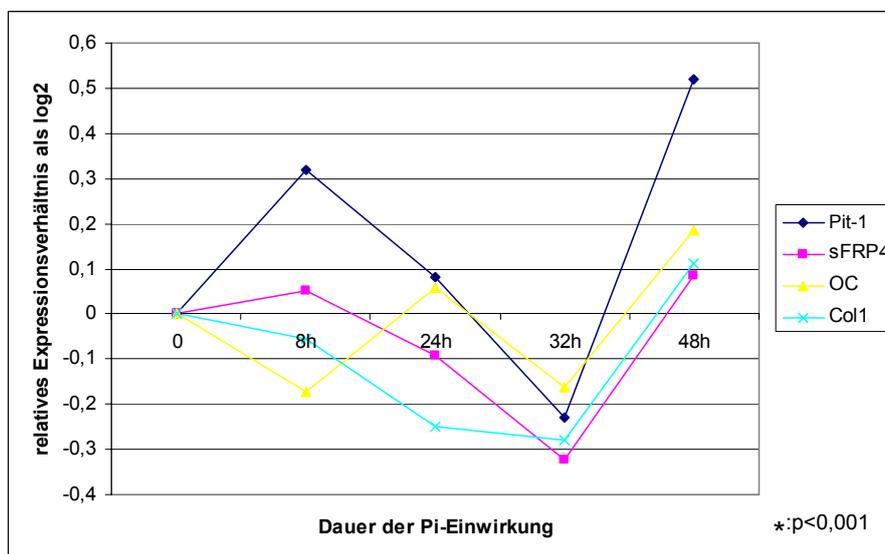


Abbildung 22: hFOB, 5 mM, korrigierte Effizienz, Referenz: Aktin

Ein deutlicher Trend der Genexpressionsänderung ließ sich daher nicht beobachten. Lediglich AP und MEPE fielen in ihrer Expression deutlich ab: MEPE fiel bei 24, 32 und 48 h ab auf Werte um -2, was einem Viertel der ursprünglichen Expression entspricht, alle drei Werte sind signifikant. AP fiel bis auf -1,43, was einem Rückgang von mehr als 60 % entspricht, die Werte für 24 und 32 h waren signifikant.

3.2.8.2 Phosphat-Stimulation über 24 h

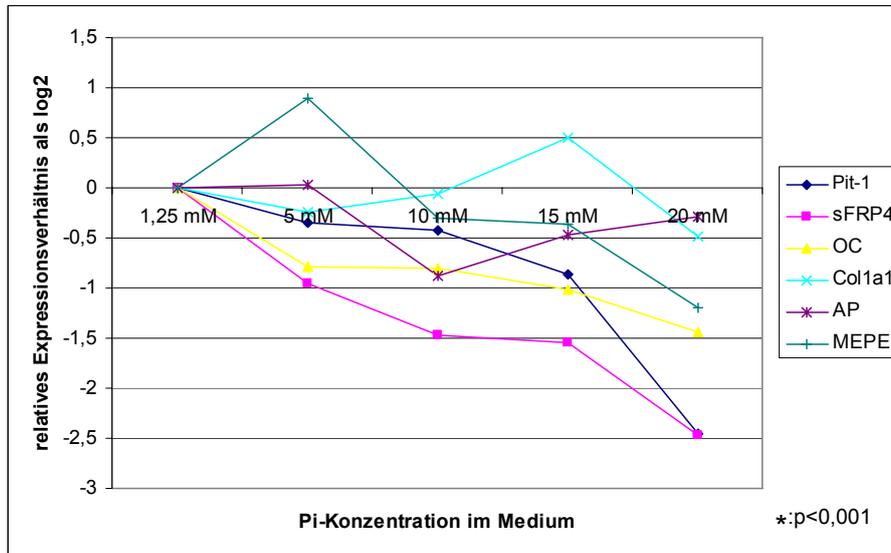


Abbildung 23: hFOB, 24 h, E=2, Referenz: Aktin

Unter der Einwirkung von Phosphat über 24 h schien sich die Expression der meisten Gene zu reduzieren.

Statistisch signifikant waren die Werte für sFRP4 unter 10 mM (korrigierte Effizienz) sowie die Werte für OC unter 5 und 10 mM (korrigierte Effizienz).

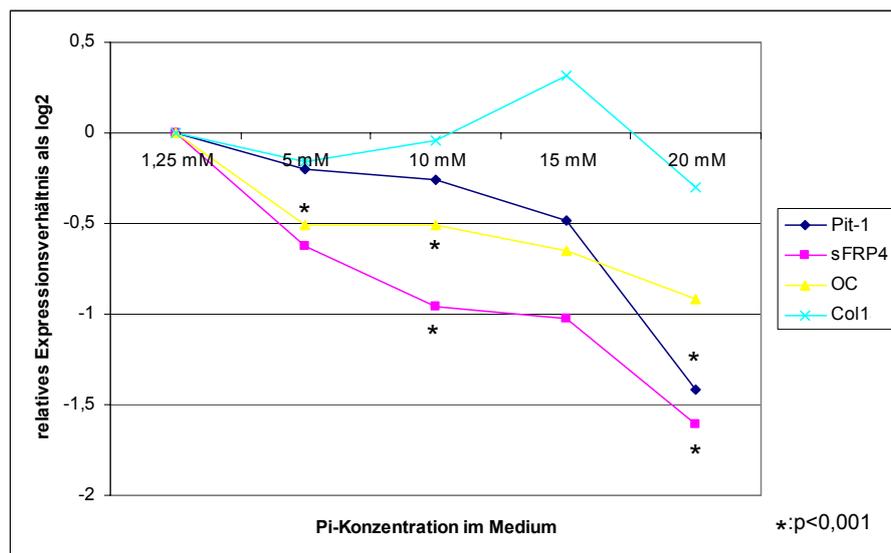


Abbildung 24: hFOB, 24 h, korrigierte Effizienz, Referenz: Aktin

Die Expression für sFRP4 fiel so wie auch bei den hMSC-TERT-Zellen mit steigender Phosphatkonzentration ab, erreichte bei 15 mM als log₂ einen Wert von -1,47 (E=2), bzw. -0,96 (korrigierte Effizienz), was ungefähr noch einem Drittel, bzw. der Hälfte der ursprünglichen Expression entspricht. Pit-1 fiel leicht ab, ebenso wie OC. MEPE verhielt sich uneinheitlich, stieg unter 5 mM erst an und fiel ab dann wieder ab.

3.2.8.3 Phosphat-Stimulation über 48 h

Der Trend, der bereits bei Stimulation über 24 h zu beobachten war, setzte sich auch hier ansatzweise fort. Statistisch signifikant waren die Werte von Pit-1, OC und sFRP4 unter 15 mM (E=2) und sFRP4 unter 15 mM (korrigierte Effizienz). Bei den Werten unter 10 mM ergab sich bezüglich der Normalisierung eine Diskrepanz, wie sie bereits unter 3.2.8.1 erläutert wurde. Bei Normalisierung auf Aktin (Abbildung 25) kam es wieder zu einem leichten Ansteigen der meisten Werte im Vergleich zum Zustand unter 5 mM, bei Normalisierung auf EF1 α (Abbildung nicht dargestellt) erfolgte ein weiteres Absinken der Expressionsraten.

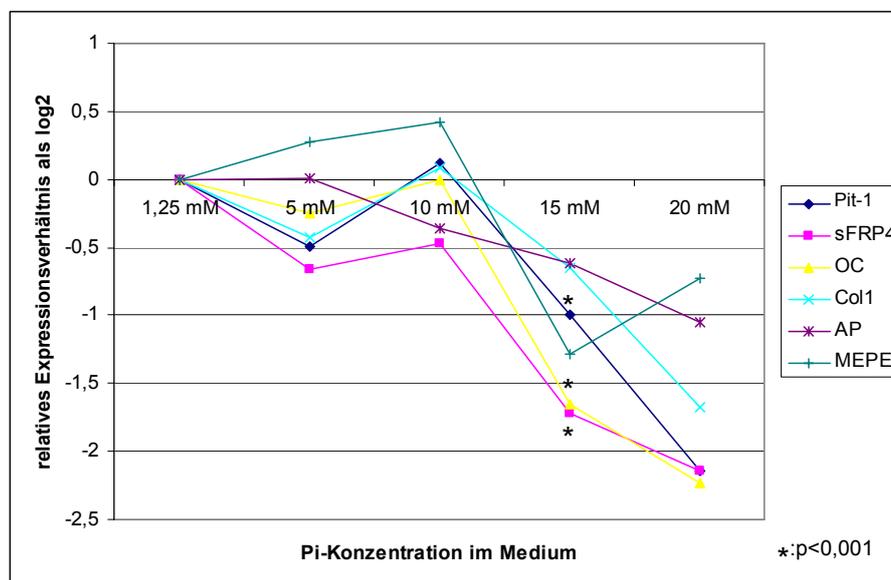


Abbildung 25: hFOB, 48 h, E=2, Referenz: Aktin

sFRP4 zeigte sich aber auch bei den hFOB-Zellen als das Gen, das am deutlichsten durch den Einfluss von Phosphat abzusinken scheint.

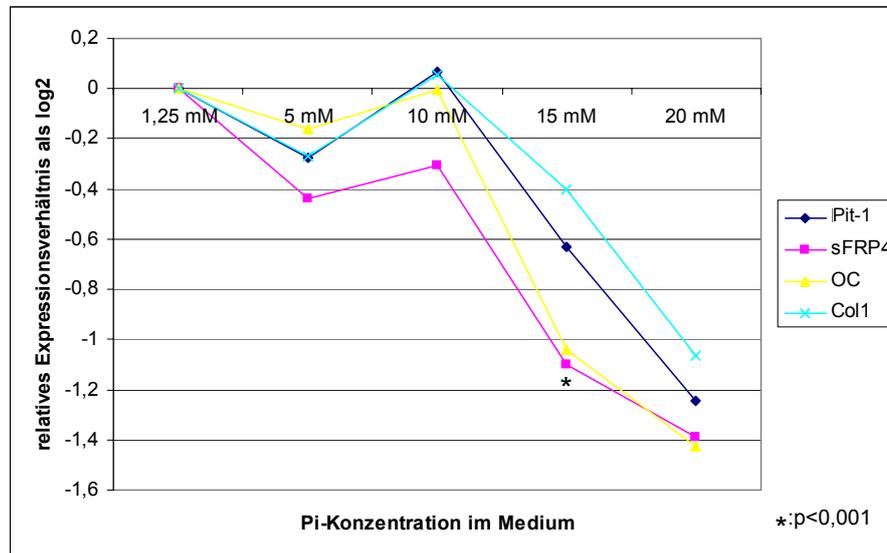


Abbildung 26: hFOB, 48 h, korrigierte Effizienz, Referenz: Aktin

Pit-1 scheint diesem Trend zu folgen und fiel ebenfalls ab, so wie OC auch.

3.2.8.4 Zustand 24 h unter 5 mM und 48 h unter 5 mM

Dabei zeigte sich bei den hFOB-Zellen beim Zustand 24 h unter 5 mM die Expressionsänderung keines Gens als statistisch signifikant gegenüber der Kontrolle, bei der die Zellen 24 h unter 1,25 mM Phosphat gewachsen waren. Ebenso zeigte sich für den Zustand 48 h unter 5 mM keine statistische Signifikanz der Expressionsänderung der Gene, verglichen mit der Kontrolle, bei der die Zellen 48 h unter 1,25 mM Phosphat gewachsen waren. Diese Ergebnisse waren jeweils unabhängig davon, ob auf Aktin oder EF1 α oder auf beide Referenzgene gemeinsam normalisiert wurde. Diese Aussagen trafen ebenso für die nicht-normalisierte Auswertung zu.

Bei 24 h zeigte sich bei Normalisierung auf Aktin und korrigierter Effizienz, angegeben als Änderungsfaktor bezogen auf den Ausgangszustand (1), eine Expressionssteigerung von Pit-1 (1,28), ein nahezu unveränderter Zustand für sFRP4 und leichte Expressionsrückgänge für OC (0,84) und Col1 (0,98).

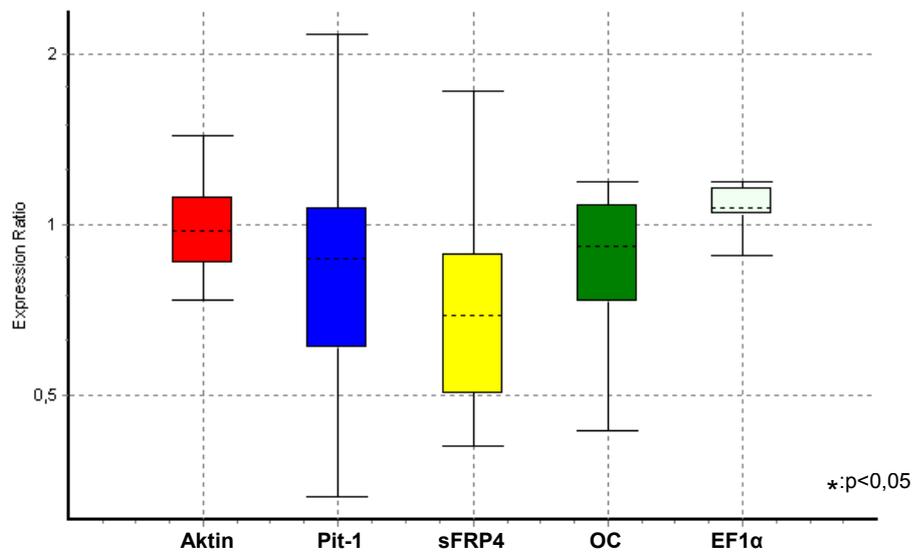


Abbildung 27: hFOB, 24 h unter 5 mM, Referenz Aktin, korrigierte Effizienz

Bei 48 h zeigte sich bei Normalisierung auf Aktin und korrigierter Effizienz, angegeben als Änderungsfaktor bezogen auf den Ausgangszustand (1), ein geringer Abfall der Expression bei allen Genen, Pit-1 (0,885), sFRP4 (0,845), OC (0,916) und Col1 (0,879).

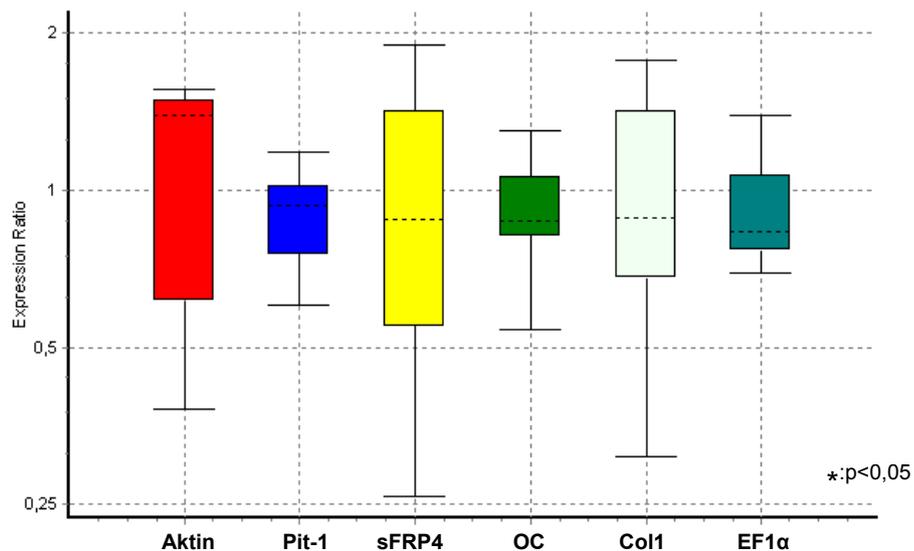


Abbildung 28: hFOB, 48 h unter 5 mM, Referenz Aktin, korrigierte Effizienz

3.2.8.5 Gruppenvergleich der stimulierten Zustände

Vereinfacht man nun, wie unter 3.2.7.5 bereits beschrieben, die Fragestellung dahingehend, ob sich Phosphat überhaupt auswirkt, ließen sich Gruppen anders zusammenfassen und alle Werte der 24 h und 48 h-Reihe für 5 mM und 10 mM zusammenfassen und gegen die Werte 24 h und 48 h bei 1,25 mM vergleichen. Dabei zeigte sich auch bei den hFOB-Zellen, dass sFRP4 bei Normalisierung auf Aktin signifikant ($p=0,013$) herunterreguliert wurde und sich die Expression um ein Drittel (0,67) reduzierte. Für die anderen Gene zeigte sich kein signifikantes Ergebnis, aber ein leichtes Abfallen der Expression in der Größenordnung von 10 % bei Pit-1, OC und Col1. Die Signifikanz der Ergebnisse für sFRP4 zeigte sich nicht mehr bei Normalisierung auf EF1 α und ebenso nicht mehr, wenn man die Werte der 5 mM-Reihe dazu nahm, unabhängig davon, ob in die Kontrollgruppe die 5 mM-Kontrollwerte eingeschlossen wurden oder nicht.

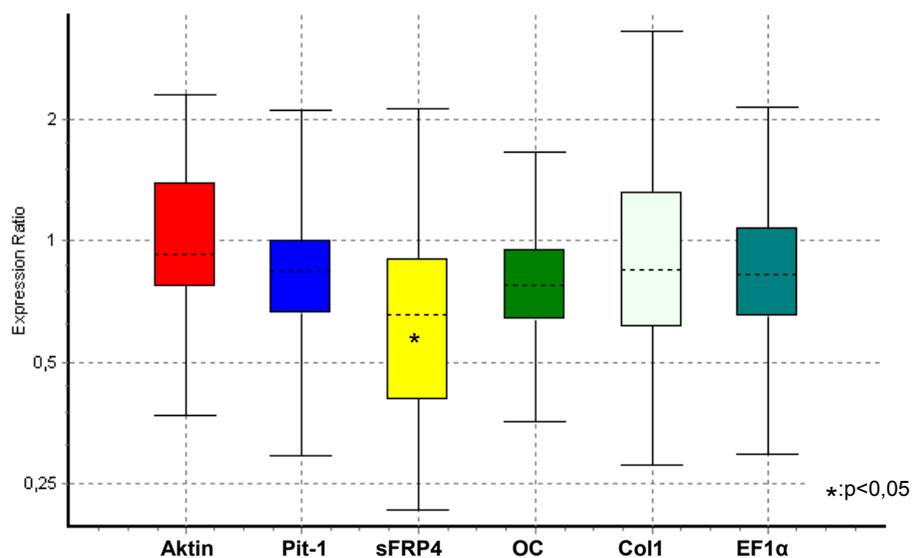


Abbildung 29: hFOB, 24 h und 48 h-Proben, korrigierte Effizienz, Referenz Aktin

Bei allen anderen Konstellationen zeigte sich aber immer ein Abfallen der Expression für sFRP4 sowie geringe Änderungen der Expression von Pit-1, OC und Col1 in der Größenordnung von maximal 10 %.

3.3 Arbeiten mit dem Tet-On™ Konstrukt

3.3.1 Vorversuche

Bei der Erstellung einer stabilen Zelllinie erfolgte gemäß Protokoll nach der ersten stabilen Transfektion eine Selektion der Zellen durch Zugabe von G418 oder Hygromyzin. Um die optimale Konzentration der Antibiotika für die Selektion zu ermitteln, wurden Vorversuche mit unbehandelten Zellen durchgeführt: Dabei soll durch Titration die minimal nötige Konzentration bestimmt werden, bei der die unbehandelten Zellen absterben (**Letal-Dosis**). Diese Versuche sind nötig, da Zellen unterschiedlich empfindlich sind und die Substanzen in ihrer Wirksamkeit variieren können. Es wurden hMSC-TERT-Zellen eingesetzt und jede Konzentrationsreihe doppelt durchgeführt.

Nach 14 Tagen zeigten sich unter Hygromyzin-Gabe bei 200 µg/ml nur noch einzelne Zellen im jeweiligen Well, ab 400 µg/ml konnten keine lebenden Zellen mehr beobachtet werden. Das gleiche Ergebnis zeigte sich nach 17 Tagen unter Hygromyzin-Gabe.

Unter G418-Gabe zeigten sich nach 14 Tagen bei 800 µg/ml nur noch einige wenige Zellen im jeweiligen Well. Das gleiche Bild konnte nach 17 Tagen beobachtet werden. Damit benötigten die hMSC-TERT-Zellen zur Selektion eine relativ hohe G418-Konzentration im Vergleich zu den Erfahrungswerten des Herstellers.

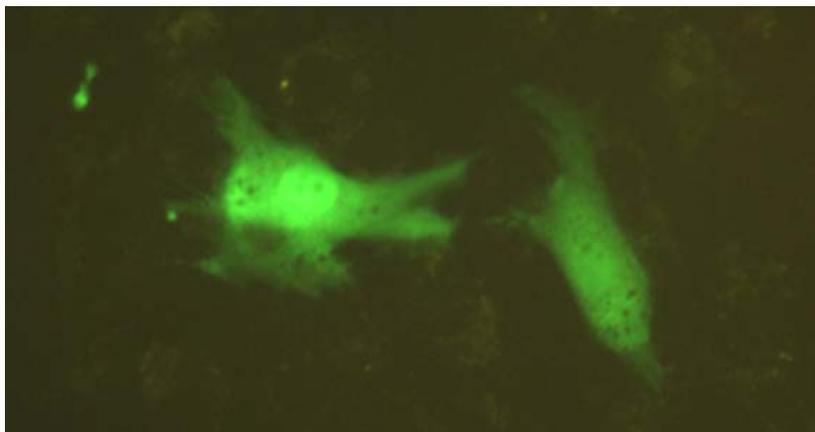


Abbildung 30: hMSC-TERT-Zellen mit EGFP-N1-Vektor im Fluoreszenzmikroskop

Zur Bestimmung der **optimalen Transfektionsspannung** wurden die hMSC-TERT-Zellen transient transfiziert mit dem Vektor pEGFP-N1, der für ein grün fluoreszierendes Protein codiert. Es wurden Spannungen von 100 bis 150 V verwendet und die Transfektionseffizienz unter einem Fluoreszenz-Mikroskop abgeschätzt (Abbildung 30). Die besten Ergebnisse zeigten sich bei einer Spannung von 120 V.

3.3.2 Erste stabile Transfektion

War eine Transfektion erfolgreich, zeigten sich nach ca. 2-3 Wochen einige Zellansammlungen. Wie unter 2.2.7.3 im Detail beschrieben, wurden die Zellen vereinzelt und mit G418 im Medium kultiviert. Nach Vereinzlung zeigten sich in der Regel nach vier Wochen einzelne Zellkolonien.

Verschiedene Klone wurden nach transienter Transfektion mit dem Referenzvektor auf ihr Ansprechverhalten gegenüber Doxycyclin hin getestet. Klon 18 zeigte dabei eine dosisabhängige Induzierbarkeit, die unter 1,5 µg/ml einen maximalen Wert von ca. 27 zeigt (Abbildung 31).

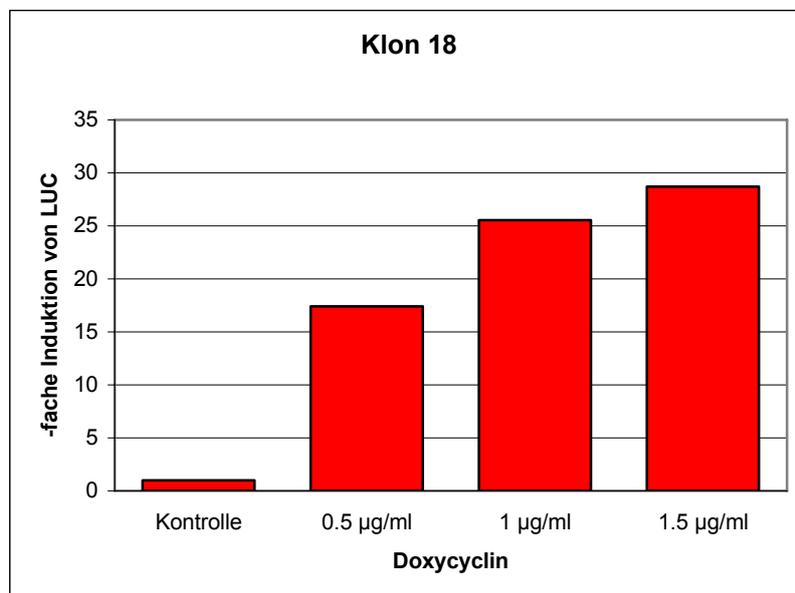


Abbildung 31: Klon 18 – Induzierbarkeit durch Doxycyclin

Bei (Poly-) Klon 21 war die maximale Induzierbarkeit noch deutlich ausgeprägter festzustellen, unter 1,5 µg/ml Doxycyclin wurden dort Steigerungen um Faktor 1100 beobachtet (Abbildung 32).

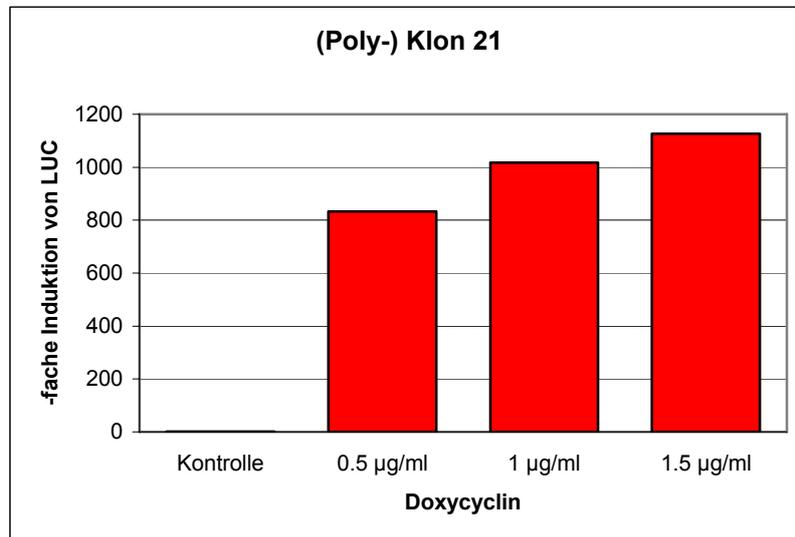


Abbildung 32: (Poly-) Klon 21 - Induzierbarkeit durch Doxycyclin

3.4 Klonierung von sFRP4

Als Basis für weitere Untersuchungen sollte sFRP4 rekombinant hergestellt werden. Das sFRP4-Gen ist auf Chromosom 7p14.1 lokalisiert, besteht aus sechs codierenden Exons und umspannt ungefähr 10.8 kbp genomischer Sequenz. Von sFRP4 existieren am NCBI zwei mRNA-Sequenz-Einträge mit den Akzessionsnummern NM_003014 und AF026692. Die Sequenzen sind identisch, AF026692 ist um 20 b länger. Die folgenden Positionsangaben beziehen sich auf NM_003014.

Wie auch veröffentlicht (Seufert, Ebert *et al.* 2001), wurde in der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg im Bereich Stoffwechsel, Endokrinologie und Molekulare Medizin ein Patient mit einer Tumor-induzierten Osteomalazie behandelt. Die chirurgische Entfernung des Tumors ließ auch bei diesem Patienten alle pathologischen Veränderungen verschwinden. Es handelte sich um ein Hämangioperizyтом mit mRNA-Expression von MEPE, FGF-23 und sFRP4.

Aus dieser Tumor-cDNA wurde mittels PCR die sFRP4-Sequenz mit den Primern hFRP4-2 und hFRP4-B amplifiziert. Dabei wurde eine High-Fidelity-Polymerase mit Proofreading-Funktion (Advantage[®] -HF-PCR-Kit) eingesetzt. Die Primer hFRP4-2 (Basen 86 bis 112) und hFRP4-B (Basen 1365 bis 1396) umspannten eine Sequenz von 1311 bp und waren in ihrer Schmelztemperatur auf die Polymerase abgestimmt. Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR[®]2.1-Topo[®] ligiert, der Vektor in TOP10F' One Shot[®]-Zellen transformiert. Nach Blau-Weiß-Selektion konnten 12 Klone in Übernachtskultur vermehrt werden, die isolierten Plasmide wurden einem Restriktionsverdau mit EcoR1 unterzogen, um die eingefügte Sequenz wieder aus dem Vektor zu entfernen. Nach Auftrennung der Produkte auf einem Agarose-Gel zeigten sich unterschiedliche Größen der ausgeschnittenen DNA-Fragmente (Abbildung 33).

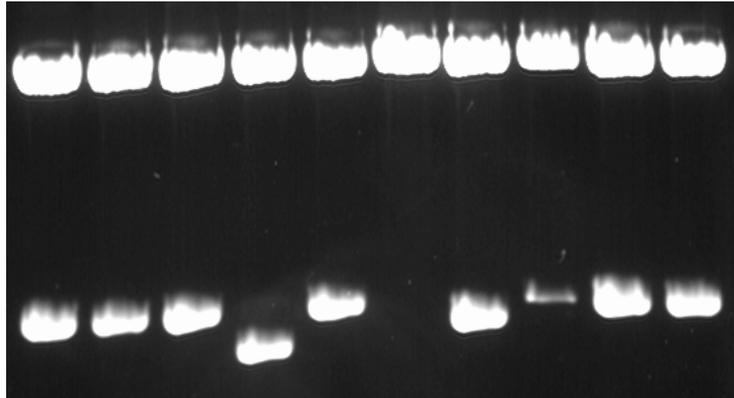


Abbildung 33: Isolierung der DNA-Fragmente von sFRP4

Für die Sequenzierung wurden neun Primer verwendet: M13 reverse, M13 forward, sFRP4 sense, sFRP4 antisense, hFRP-1, hFRP-A, FRPseq1, FRPseq2, FRPseq3. Somit war jede Position mindestens durch die Sequenz von Strang und Gegenstrang identifiziert, meistens lag die Sequenz für jede Position aber drei- bis vierfach vor.

Bei Klon 8 zeigten sich einige Unregelmäßigkeiten und Mutationen. Um genauere Aussagen über diese Veränderungen zu erhalten wurden auch noch die Klone 1, 4 und 7 sequenziert.

Klon 8-Tumor zeigte eine Deletion von 72 bp und Mutationen, **Klon 4-Tumor** zeigte eine Deletion von 150 bp und ebenfalls Mutationen. Bei **Klon 7-Tumor** war nur eine Sequenz von 201 bp in den Vektor übernommen worden. **Klon 1-Tumor** wies einige Mutationen auf. Alle Klone wiesen identische Veränderungen an den Positionen 141, 193-196, 466 und 648 auf. Die einzelnen Veränderungen und Konsequenzen sind in Tabelle 7 zusammengestellt, Klon 7-Tumor wurde nicht aufgenommen.

Bei beiden aufgetretenen Deletionen wiesen der Beginn des fehlenden Fragmentes und der Beginn der Sequenz nach der Deletion, bzw. das Ende des fehlenden Fragmentes und das Ende der Sequenz vor der Deletion eine identische Basenabfolge auf. Bei Klon 8-Tumor handelt es sich um das Motiv CATCC, bei Klon 4-Tumor um das Motiv CCATCCT.

Tabelle 7: Mutationen der sFRP4-Klone aus Tumor und hMSC-TERT-Zellen

	Position bezogen auf (NM_003014.2)	Veränderung zu mRNA-Eintrag (NM_003014.2)	Veränderung zu Genom-Eintrag (NT_007819.13)	Konsequenz
Klon 1-Tumor	141	G > A		?
	193-196	G zusätzlich		?
	289	A > G	A > G	Ser > Gly
	358	T > C	T > C	Trp > Phe
	466	C > T		Leu > Phe
	648	C > T		keine
	1023		T > C	keine
Klon 4-Tumor	141	G > A		?
	193-196	G zusätzlich		?
	248-398 / 255-404	Deletion von 150 b	Deletion von 150 b	?
	466	C > T		Leu > Phe
	648	C > T		keine
	1023		T > C	keine
Klon 8-Tumor	141	G > A		?
	193-196	G zusätzlich		?
	254-325 / 249-320	Deletion von 72 b	Deletion von 72 b	?
	466	C > T		Leu > Phe
	556	A > G	A > G	Asn > Asp
	648	C > T		keine
	1023		T > C	keine
Klon 6-TERT4	141	G > A		?
	193-196	G zusätzlich		?
	466	C > T		Leu > Phe
	648	C > T		keine
	804	A > G *	A > G	keine
	1023	C > T *		keine
	1195	A > C *	A > C	Thr > Pro
Klon 7-TERT4	141	G > A		?
	193-196	G zusätzlich		?
	466	C > T		Leu > Phe
	648	C > T		keine
	804	A > G *	A > G	keine
	1023	C > T *		keine
	1195	A > C *	A > C	Thr > Pro

* als Variation beschrieben

Als Vergleich dazu wurde versucht, die sFRP4-Sequenz aus der cDNA von hMSC-TERT und hFOB-Zellen zu amplifizieren und zu klonieren. Es wurde

ebenfalls das Advantage[®]-HF-PCR-Kit mit den Primern hFRP4-2 und hFRP4-B unter gleichen Bedingungen eingesetzt. Die cDNA stammte von Zellen, die unter Standard-Bedingungen gewachsen und nicht mit Phosphat behandelt worden waren. Ein PCR-Produkt ließ sich nur bei hMSC-TERT-Zellen erzeugen. Das Produkt wurde nach gleichem Ablauf, wie oben bereits beschrieben, weiterverarbeitet, die Ligation erfolgte hierbei in den Vektor pCR II.

Zwei Klone wurden selektiert und sequenziert: **Klon 6-hMSC-TERT**, **Klon 7-hMSC-TERT**. Beide Klone waren identisch und wiesen ebenfalls die Mutationen an den Positionen 141, 193-196, 466 und 648 auf (Tabelle 7).

Die Mutationen an den Positionen 804, 1023 und 1195 sind im Eintrag NM_003014 als Variationen beschrieben.

Zusätzlich wurden die Sequenzen mittels BLAST[®] mit Einträgen in der Genom-Datenbank verglichen. Das sFRP4-Gen ist auf Chromosom 7 lokalisiert, ein direkter Vergleich erfolgte mit der gesamten Sequenz von Chromosom 7 (NC_000007) und dem entsprechenden Teilbereich (NT_007819). Die chromosomale Sequenz war an den Positionen 141, 193-196, 466 und 648 identisch mit der Sequenz der analysierten Klone. Es schien sich daher an diesen Stellen um Fehler in den mRNA-Sequenz-Einträgen zu handeln.

An Position 1023 stimmten die Klone aus hMSC-TERT mit dem DNA-Eintrag überein, die Klone aus dem Tumor-Gewebe mit dem mRNA-Eintrag.

4 Diskussion

4.1 Methode der quantitativen real-time-PCR

Die Methodik der quantitativen real-time-PCR hat in den letzten Jahren enorm an Bedeutung gewonnen und wird zunehmend zur Methode der Wahl für die mRNA-Quantifizierung. Die Zahl der Veröffentlichungen nimmt kontinuierlich zu. Auch wenn die Methode zur Quantifizierung inzwischen zunehmend akzeptiert zu werden scheint, befindet sie sich trotzdem noch in einem eher anfänglichen Stadium ihrer Entwicklung. Wurden vor einigen Jahren noch zahlreiche Aspekte sehr kritisch gesehen (Bustin 2000) und die absolute Quantifizierung als valideste Variante angestrebt, werden heute einige problematische Punkte anders eingeschätzt und der relativen Quantifizierung immer mehr Bedeutung beigemessen (Bustin, Benes *et al.* 2005; Huggett, Dheda *et al.* 2005; Wong und Medrano 2005). Zu dieser Entwicklung beigetragen haben mehrere Berechnungsmodelle für die relative Quantifizierung, Möglichkeiten zur Bestimmung der PCR-Effizienz sowie verschiedene Software-Tools, die bei der Prozessierung der Daten behilflich sind. Auch die Validierung der Ergebnisse hat ihren Platz in der Diskussion über diese Methodik gefunden, so dass inzwischen in mathematisch-statistischer Hinsicht mehr Wege zur Verfügung stehen, um die Validität greifbarer zu machen. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Methode der relativen Quantifizierung mittels real-time-PCR für Genexpressionsstudien in der Arbeitsgruppe zu etablieren. Daher erfolgte von Beginn an eine sehr kritische und genaue Auseinandersetzung mit der Methodik an sich, die daher auch in der Schwerpunktsetzung der Arbeit ihren Raum findet. Ausgangspunkt für die real-time-PCR-Versuchsreihen waren konventionell durchgeführte PCR-Auswertungen, die phosphatabhängige Genexpressionsveränderungen in mesenchymalen Stammzellen vermuten ließen. Im Folgenden sollen zunächst die einzelnen durchgeführten Arbeitsschritte der quantitativen real-time-PCR kritisch diskutiert werden. Anschließend soll auf die unterschiedlichen Aussagen der mittels real-time-PCR und mittels konventioneller PCR gewonnenen Ergebnisse eingegangen werden.

Arbeitsschritte

Die quantitative real-time-PCR zeichnet sich durch eine extrem hohe Sensitivität aus. Dieser Vorteil birgt allerdings auch die Gefahr, dass sich geringe Unterschiede in den **Zellkulturbedingungen** und in der Materialgewinnung auf das Ergebnis auswirken können. Wie Huggett, Dheda *et al.* (Huggett, Dheda *et al.* 2005) erläutern, sollten bereits bei der RNA-Extraktion annähernd ähnliche Gewebemengen zur Verfügung stehen. Bei den hier durchgeführten Versuchen war es nicht realisierbar, die Zellen vor der Ernte zu zählen. Stattdessen wurden die Zellen aufgrund von Erfahrungswerten zu Versuchsbeginn jeweils so gesplittet und konzentriert, dass sie am Ende des Versuchsansatzes die Flasche möglichst ausfüllten. Es gab keine Unterschiede in den Zellkultur-Protokollen für die einzelnen Versuchansätze und -reihen, mikroskopisch sichtbare Infektionen wurden keine festgestellt. Dennoch war ansatzweise unterschiedlich ausgeprägtes Wachstum der Zellen erkennbar, wobei eine wirklich objektivierbare Kontrolle über das gleichmäßige Wachstum in den Flaschen nur schwer möglich war. Tendenziell schienen die Zellen unter hohen Phosphatkonzentrationen schlechter zu wachsen, allerdings ließ sich das nicht systematisch bei allen Zellen und Versuchreihen beobachten. Die Wachstumsunterschiede machten sich in den gewonnenen RNA-Mengen bemerkbar. Für diese Beobachtung lassen sich einerseits sicherlich biologische Erklärungen aufgrund der Phosphatwirkung finden, wie unter 4.2 noch erläutert wird. Andererseits sind die Wachstumsunregelmäßigkeiten eventuell auch auf vorhandene aber zunächst nicht nachvollzieh- und erfassbare Differenzen in den Zellkulturbedingungen zurückzuführen. Daher scheint es sinnvoll, bei weiteren Versuchen noch genauer darauf zu achten, dass die Zellen gleichmäßig wachsen, dass sie ausreichend Zeit haben, sich in der Flasche zu adaptieren, so dass sich am Ende des Versuchs wirklich ähnliche Gewebemengen in den Flaschen befinden. Klarere und objektivere Kriterien zur zum Ein- oder Ausschluss von Zellen aufgrund der Wachstumsbedingungen vor dem eigentlichen Versuch wären wünschenswert, sind aber wahrscheinlich nicht zu finden.

Das bereits beschriebene schlechtere Wachstum unter hohen Phosphatkonzentrationen führte dazu, dass bei hMSC-TERT 24 h 20 mM trotz Poolen und Eindampfen von Versuchsreihe I-III, bei hMSC-TERT 24 h 15 mM trotz Eindampfen von Versuchsreihe I und III, keine eindeutig ausreichende RNA-Menge erzielt werden konnte. Daher mussten diese Werte aus der weiteren Wertung ausgeschlossen werden.

Die Versuchsreihen wurden nach einem bestimmten Schema durchgeführt, wie unter 2.2.1 erläutert, um identische Zellkulturbedingungen zu erzielen. Lediglich Ansatz 5 mM Versuchsreihe I (hMSC-TERT und hFOB) wurde zeitlich früher durchgeführt, da es der erste Versuchsansatz war, der erst zur Durchführung der weiteren Reihen in systematischer Weise führte. Bei dieser Reihe wurden keine Werte für 8 h und 32 h erhoben. Da es eventuell die Auswertung beeinflussen könnte, wenn bei einigen Werten zwei, bei anderen drei Datenpunkte zur Verfügung stehen, wurde Versuchsreihe I 5 mM aus der Wertung herausgenommen. Ebenso zeigte sich, dass die Ct-Werte dieser Versuchsreihe im Vergleich zu den anderen Reihen stärker streuten. Das lässt sich wahrscheinlich aufgrund von geringen Unterschieden in den Zellkulturbedingungen erklären und stellte ein weiteres Argument für den Ausschluss aus der Gesamtwertung dar. Daher wurde die Auswertung für Versuchsansatz 5 mM nur für die Versuchsreihen III und III durchgeführt. Die konkreten Zahlenwerte des Expressionsverhältnisses waren zwar teilweise geringfügig anders als bei Einschluss aller drei Versuchsreihen, aber die Tendenz der Ergebnisse blieb eindeutig erhalten. Die Variationskoeffizienten der Ct-Werte wurden durch den Ausschluss aber erwartungsgemäß kleiner.

Die Integrität der **RNA** wurde mittels Optischer Dichte (OD) OD_{260}/OD_{280} nm verifiziert. Mit einem Mittelwert von 1,97 und einem Bereich von 1,73 bis 2,19 lag sie in akzeptablen Größenordnungen, wie auch in anderen Arbeiten veröffentlicht (Pfaffl 2001).

Die **Reverse Transkription** ist für ihre stark schwankenden Reaktionseffizienzen bekannt und kann somit deutliche Auswirkungen auf eine

Quantifizierung haben. Daher wurde für alle PCR-Untersuchungen jeweils nur identische cDNA verwendet, die zuvor einmalig aus einer einzigen RT gewonnen worden war. Da die ganze Versuchsanordnung als two-step-PCR durchgeführt wurde, hatten Schwankungen der Effizienz der RT somit keine Auswirkung mehr. In alle RT-Reaktionen wurde die gleiche Menge (2 µg) an RNA eingesetzt.

In dieser Arbeit wurde für jede Versuchsreihe ein eigener PCR-Lauf, d.h. jeweils I, II und III getrennt von einander, aber in jedem Lauf jeweils alle Ansätze (5 mM, 24 h, 48 h) und beide Zelllinien (hFOB und hMSC-TERT) gemeinsam, durchgeführt. Bei AP, OP, MEPE, FGF23 wurden die Versuchsreihen I-III in einem Lauf d.h. jeweils hFOB I-III und hMSC-TERT I-III zusammen, dafür aber die Ansätze (5 mM, 24 h, 48 h) in getrennten PCR-Läufen durchgeführt. Es ist fraglich, welche Variante der Zusammenstellung von PCR-Läufen möglichst gute experimentelle Bedingungen liefert und ob solche Unterschiede Auswirkungen auf das Ergebnis haben können. Bekannt ist, dass auch geringe Temperaturschwankungen im PCR-Gerät sich auf die Fluoreszenz auswirken können. Daher wurde darauf geachtet, dass der PCR-Cycler nicht zu voll geladen wurde und die Caps immer in der erwartungsgemäß temperaturgenauen Mitte standen.

Die PCRs wurden mit dem QuantiTect™ SYBR® Green PCR-**Master-Mix** (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Dieser Master-Mix schien eine schwankende Qualität zu haben, bzw. sehr empfindlich gegenüber Verunreinigungen zu sein. Bei einigen PCR-Läufen ließ sich plötzlich kein Amplifikat mehr erzeugen. Nach zunächst ergebnisloser Ursachenforschung konnte das Problem durch einen neuen Master-Mix gelöst werden. Bustin (Bustin 2002) berichtete von Unterschieden um Faktor 2,5, hervorgerufen durch die unterschiedliche Qualität von PCR-Master-Mix des gleichen Herstellers. Trotzdem wird die Verwendung eines vorgefertigten Master-Mix wahrscheinlich die bessere Variante darstellen und verlässlicher sein, als mit selbst hergestellten Lösungen zu arbeiten.

Die Analyse der **Melting Curves** (Ririe, Rasmussen *et al.* 1997) zeigte sich als elegante Methode, um die Spezifität des entstandenen Produktes zu überprüfen.

Die **Ct-Werte** stellen für die Auswertung der real-time-PCR die ersten gemessenen Daten dar. Wie unter 1.3 erläutert, handelt es sich um Rohdaten, die in die weitere Berechnung als Exponenten eingehen (Formel 4, S. 39). Aber bereits auf dieser Ebene lassen sich die Daten auf ihre Streubreite hin untersuchen und damit eventuell auch Aussagen über die Qualität gewinnen. Die Inter-Assay-Variation bezeichnet einen Fehler, der entsteht wenn die Versuchsreihen an mehreren unterschiedlichen Tagen durchgeführt werden, wohingegen die Intra-Assay-Variation den Fehler beschreibt, der entsteht, wenn bei einem Versuch eine einzelne Probe mehrmals dem gleichen PCR-Ansatz mit den gleichen Reagenzien unterzogen wird. In der vorliegenden Arbeit wurde jede Zellkultur-Versuchsreihe dreimal unabhängig voneinander an unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Um eine noch breitere Absicherung der Ergebnisse zu erhalten, wäre es möglich gewesen, jede Probe zusätzlich dreimal einer PCR zu unterziehen. Dies wurde in dieser Arbeit jedoch nicht gemacht, da bei der Fülle der untersuchten Gene die verfügbaren RNA- bzw. cDNA-Mengen nicht ausgereicht hätten. Um höhere RNA-Mengen zu erzielen, hätte die Zellkultur in anderen Dimensionen erfolgen müssen. Um höhere cDNA-Mengen zu erzielen, hätte die RT in größeren Volumina durchgeführt werden müssen, da die für die PCR verwendete cDNA nur aus einer einzigen RT stammen sollte. Daher kann zur Validierung der Ergebnisse auf Ebene der Ct-Werte auch nur eine Aussage über die Inter-Assay-Variation gemacht werden. Wong und Medrano (Wong und Medrano 2005) empfehlen zwar, die Variationen nicht aus den Ct-Werten zu berechnen, da es sich um logarithmische Größen handelt, sondern stattdessen aus linearen Größe der Copy-Zahl, doch das ist bei der relativen Quantifizierung nicht möglich, da diese Werte gar nicht ermittelt werden.

Die in dieser Arbeit ermittelten Inter-Assay-Variationen der Ct-Werte lagen mit dem Variationskoeffizienten meistens im kleinen einstelligen Prozent-Bereich,

oft sogar unter 1%. Von einigen erhöhten Werten abgesehen, spricht das, unter den oben beschriebenen Vorbehalten, auf dieser Ebene zunächst für valide Rohdaten. Die Werte lagen in der Größenordnung anderer aktueller Publikationen dieser Methode (Hartel, Didier *et al.* 2003).

Wie unter 1.3.5 erläutert, muss zur Ermittlung der Ct-Werte ein Schwellenwert gesetzt werden, der im frühen exponentiellen Bereich der Fluoreszenzwerte liegt. Dieser Schwellenwert wird in der Software der meisten real-time-PCR-Geräte und auch bei dieser Arbeit manuell gesetzt. Es ist nicht klar, inwieweit diese manuelle Festlegung eine zusätzliche Fehlerquelle sein kann.

Wie in der Einleitung unter 1.3.6 erläutert, kann die **Effizienz** aus einer Standard/Verdünnungskurve oder aus den Rohdaten ermittelt werden. Die Berechnung aus Rohdaten erzielt dabei genauere Ergebnisse (Tichopad, Dilger *et al.* 2003). In dieser Arbeit kam das Tool LinRegPCR (Ramakers, Ruijter *et al.* 2003) zum Einsatz, das die Effizienz über eine Regressionsanalyse der PCR-Rohdaten errechnet. Tichopad, Dilger *et al.* (Tichopad, Dilger *et al.* 2003) haben ein noch komplexeres Berechnungsmodell mit entsprechendem Algorithmus entwickelt. Andere Autoren empfehlen aber trotzdem die Standardkurve zusätzlich zur Kontrolle der Quantifizierung (Wong und Medrano 2005). Skern, Frost *et al.* (Skern, Frost *et al.* 2005) berichten von deutlichen Unterschieden in der Effizienz zwischen der Berechnung aus der Standardkurve und aus der Rohdatenberechnung über DART (Peirson, Butler *et al.* 2003), einem automatisierten Auswertungs-Tool, das auch die Effizienz-Bestimmung durchführt. Für diese Arbeit erschien es nicht sinnvoll, noch nachträglich eine Standardkurven-Ermittlung mit gepoolter cDNA durchzuführen, da die Ermittlung aus den Rohdaten prinzipiell als valide gilt und das Endergebnis in seiner Aussage wahrscheinlich nicht verändert worden wäre.

Bei den aus den Rohdaten ermittelten Effizienzen lagen die Mittelwerte für die einzelnen Ziel-Gene zwischen 1,47 und 1,58. Diese Werte unterschieden sich zwar deutlich von der als optimal angenommenen Effizienz $E=2$, aber die Werte streuten nur in geringem Maße. Daher fielen erwartungsgemäß die ermittelten

Expressionsfaktoren bei der relativen Quantifizierung für eine Effizienz $E=2$ deutlicher aus als bei einer Auswertung mit der korrigierten Effizienz. Allerdings lagen die ermittelten Effizienz-Werte für Referenz-Gene und Ziel-Gene so dicht beieinander, dass die Relationen der unterschiedlichen Expressionsmuster sich zwischen der Auswertung mit optimaler und korrigierter Effizienz nicht unterscheiden. Betrachtet man aber den einzelnen Expressionsfaktor, wird der über die korrigierte Effizienz ermittelte den realen Bedingungen wohl näher kommen.

Bei der relativen Quantifizierung ist eine **Normalisierung** üblich. Methoden, die sich dabei auf Zellzahl, Gesamt-RNA oder rRNA-Expression beziehen, können sich in der Praxis jeweils als problematisch darstellen. Daher wurden in dieser Arbeit die Ergebnisse auf die Expression von internen Kontroll-Genen normalisiert. Auf diese Weise kann der Einfluss von Fehlern, die sich durch geringfügig unterschiedliche Kulturbedingungen der Zellen, des RNA-Extraktionsprozesses oder Schwankungen in der in die RT eingesetzten RNA-Menge ergeben, reduziert werden. Als Referenz werden dabei Gene verwendet, die in allen Zellen exprimiert werden, da sie für das Überleben der Zellen erforderlich sind und daher oft als Housekeeping-Gene bezeichnet werden. Die Qualität der Normalisierung ist dabei davon abhängig, ob diese Gene wirklich stabil exprimiert werden und sich Änderungen der Expression nur durch geringe Fehler im Versuchsablauf, nicht aber durch die zu untersuchende experimentelle Behandlung selbst ergeben. Oftmals werden einer Reihe von Genen wie β -Aktin, GAPDH, Ubiquitin, Albumin, EF1 α , die auch bei anderen Methoden gerne zur Normalisierung verwendet werden, solche Housekeeping-Eigenschaften unterstellt. Mittels real-time-PCR konnte aber für zahlreiche Gene gezeigt werden, dass sie unter bestimmten Umständen doch von der experimentellen Behandlung abhängig sein können (Thellin, Zorzi *et al.* 1999; Schmittgen und Zakrajsek 2000). Für nicht-quantitative Ansätze mögen die altbekannten Kontroll-Gene ungeprüft ausreichend gewesen sein, für quantitative Ansätze müssen die Anforderungen höher sein. Daher fordern einige Autoren, dass bei quantitativen Ansätzen belegt werden muss, dass die

gewählten Gene für diesen Versuchsaufbau geeignet sind (Huggett, Dheda *et al.* 2005). Wenn jedoch bei der relativen Quantifizierung die **Housekeeping-Gene** Bestandteil der Auswertung sind und Fehler im Versuchsablauf ausgleichen sollen, ist es methodisch nicht möglich zu differenzieren, ob sich Unterschiede wirklich durch diesen Fehler oder durch die experimentelle Behandlung ergeben. Um diese Problematik zu umgehen, haben Pfaffl, Tichopad *et al.* (Pfaffl, Tichopad *et al.* 2004) sowie Vandesompele, De Preter *et al.* (Vandesompele, De Preter *et al.* 2002) jeweils Ansätze entwickelt, die auf mehrere Gene zurückgreifen und versuchen, die Qualität verschiedener Housekeeping-Gene zu erfassen. Diese Excel-basierten Software-Tools können bis zu 10 Housekeeping-Gene untersuchen und in die Auswertung einbeziehen. Die unterschiedlichen statistischen Auswertungen, die jeweils Bestandteil sind, erfordern für eine sinnvolle Aussage aber mindestens drei zu untersuchende Gene. Da in dem Versuchskonzept für diese Arbeit aber nur zwei Housekeeping-Gene vorgesehen waren, konnte daran nichts mehr geändert und die volle Analyse-Fähigkeit dieser Tools nicht ausgeschöpft werden.

Um aber zumindest einen Anhaltspunkt über die Qualität der verwendeten Housekeeping-Gene zu erhalten, wurde eine Analyse der Ct-Rohdaten für die beiden Gene Aktin und EF1 α durchgeführt, in der alle ermittelten Werte, sowohl für Proben als auch für Kontrolle einfließen. Dabei lag die Standardabweichung für EF1 α bei hMSC-TERT sowie für beide Gene bei hFOB deutlich unter 1 (0,36-0,56), was gemäß Pfaffl, Tichopad *et al.* (Pfaffl, Tichopad *et al.* 2004) bereits als ein erstes Qualitätsmerkmal für die Rohdaten angesehen werden kann. Lediglich bei Aktin für hMSC-TERT lag die Standardabweichung bei 1,18. Das bedeutet, dass Aktin bei den hMSC-TERT-Zellen nur unzureichend als Referenz geeignet zu sein schien, wohingegen die anderen Gen/Zell-Kombinationen geeignet schienen. Für weitere Versuche ist es sicherlich sinnvoll, die statistischen Möglichkeiten dieses Tools auszuschöpfen und die Versuchsreihen mit drei Genen zur Normalisierung zu planen.

Der **statistische Hintergrund** der real-time-PCR-Daten ist nicht ganz einfach zu erfassen, so dass statistische Richtgrößen nicht mit den einfacheren

üblichen Verfahren angewendet werden können: Zunächst handelt es sich bei den gemessenen Ct-Werten um Rohdaten, die benötigt werden, um das eigentliche Ergebnis (relatives Expressionsverhältnis) zu berechnen und die dazu als Exponenten in Formel 4 (S. 39) eingehen. Daher kann eine Analyse der Daten auf Ebene der Ct-Werte allenfalls als Anhaltspunkt genommen werden. Die Streubreite der Ct-Werte darf aber keinesfalls gleichgesetzt werden mit der Streubreite der ermittelten Expressionsverhältnisse. Zudem ist das errechnete Ergebnis (relatives Expressionsverhältnis) kein absoluter Wert, sondern ergibt sich aus dem Vergleich von Probe zu Kontrolle. Da diese Daten für Probe und Kontrolle jeweils aus einzelnen Versuchen (bei dieser Arbeit jeweils 3) entstammen, ist es zunächst nur sinnvoll, Mittelwerte der Ct-Werte zu bilden und mit diesen zu rechnen. Denn nur einzeln ausgewählte Werte-Paare aus Probe und Kontrolle miteinander zu vergleichen macht keinen Sinn. Bei Berechnung mit den Mittelwerten erhält man allerdings keine statistischen Aussagen über Streuung und Signifikanz. Veröffentlichungen und Software-Tools, die gemeinsam mit Statistikern entwickelt wurden, tragen diesem Problem Rechnung: Die erste Version von REST[®] (Pfaffl, Horgan *et al.* 2002) wurde um weitere Versionen ergänzt, die die Einsatzmöglichkeiten jeweils erweitern und auch größere Probenzahlen oder auch den Vergleich von mehreren Zuständen zulassen (Download unter: www.gene-quantification.info). Mit der darin enthaltenen Funktion eines Randomisierungstests (Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test[®]) werden zufällig ausgewählte Wertepaare von Probe und Kontrolle miteinander verglichen (20000 Randomisierungen), so dass es mit diesen Tools möglich ist, Signifikanzen für die ermittelten Expressionsverhältnisse zu erhalten. Zusätzlich wurden weitere statistische Größen eingeführt, wie die Fehlerabschätzung über eine Taylorreihe. Vergleicht man die Expressionsverhältnisse, die sich durch die Berechnung über die Mittelwerte ergeben, mit denen, die der Randomisierungstest ermittelt, zeigt sich ein Unterschied erst in der vierten Nachkommastelle und ist somit praktisch irrelevant. Bei den verschiedenen Versionen von REST[®] handelt es sich jeweils um Tools, die auf der Excel-Oberfläche basieren. Das neue Programm REST 2005 basiert nicht mehr auf

Excel und besitzt eine eigenständige Oberfläche. Statistisch kommen abgewandelte Verfahren zum Einsatz: Die Zahl der Randomisierungen wurde auf 50000 erhöht, die Angabe von Standard-Fehler und 95%-Vertrauensintervall ist möglich. Die grafische Ausgabe erfolgt als Whisker-Diagramm, wodurch der Charakter der Ergebnisverteilung optisch sehr viel besser erfasst werden kann. Da dieses Programm erst Ende 2005 veröffentlicht wurde, konnten nur die letzten Auswertungen, bei denen Datenpunkte für ganze Gruppen zusammengefasst wurden, auf diese Weise ausgewertet werden, für alle anderen Auswertungen kam die ursprüngliche Version von REST[®] zum Einsatz.

Bei den hier durchgeführten Versuchen, die jeweils in drei voneinander unabhängigen Versuchsreihen durchgeführt wurden, zeigten sich immer nur einzelne Werte als statistisch signifikant. Die ermittelten Expressionsverhältnisse lagen dabei aber durchaus in biologisch relevanten Größenordnungen.

Wie in den vorangegangenen Abschnitten erläutert, konnten in den einzelnen Schritten des Versuchsablaufs keine gravierenden methodischen Schwächen entdeckt werden. Die fehlende statistische Signifikanz bei der Auswertung der einzelnen Versuchsansätze machte eine detektierte Genexpressionsänderung somit unwahrscheinlich. Für die Gene der osteogenen Differenzierung ließen sich zudem keine sich wiederholenden Muster der phosphatabhängigen Genexpressionsänderung erkennen. Aber sowohl bei hMSC-TERT als auch bei hFOB-Zellen fiel auf, dass sFRP4 in den Versuchsansätzen 24 h und 48 h unter Phosphateinwirkung immer herunterreguliert wurden und diese Werte häufig signifikant waren. Bei den hMSC-TERT-Zellen wurde Pit-1 in den Versuchsansätzen 24 h und 48 h immer hochreguliert, statistisch signifikant waren diese Werte nicht.

Zwei Zustände innerhalb der verschiedenen Versuchsansätze tauchten jeweils doppelt auf: 24 h unter 5 mM Phosphat waren die Zellen sowohl im Versuchsansatz 5 mM gewachsen, bei dem die Stimulationsdauer verändert wurde, als auch in dem Ansatz 24 h, bei dem die Konzentration verändert

wurde. Für den Zustand 48 h unter 5mM Phosphat traf das entsprechend ebenso zu.

Um die Zahl der Proben, die in die Berechnung einfließen, zu erhöhen, erfolgte nochmals eine Auswertung, bei der der Zustand 24 h unter 5 mM mit nun 5 Stichproben mit dem Zustand 24 h unter 1,25 mM mit 3 Stichproben als Kontrolle verglichen wurde. Für 48 h unter 5 mM ließ sich das analog durchführen. Dabei zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse, allerdings wurde sowohl bei hMSC-TERT als auch bei hFOB-Zellen, 24 h unter 5 mM, sFRP4 wieder herunterreguliert.

Um die Stichprobenzahl noch weiter zu erhöhen und die Fragestellung zu vereinfachen, wurden alle Proben der Versuchsansätze 24 h und 48 h, die mit Phosphat behandelt worden waren, mit allen Kontrollen verglichen, die unter physiologischen Phosphatkonzentrationen gewachsen waren. Dabei zeigte sich sowohl bei den hFOB-Zellen als auch bei den hMSC-TERT-Zellen, dass sFRP4 signifikant herunterreguliert wird. Pit-1 blieb bei den hFOB-Zellen weitgehend unverändert, während es bei den hMSC-TERT Zellen hochreguliert wurde.

Die Beobachtung bei der Auswertung der einzelnen Versuchsreihen mit einigen statistisch signifikanten Werten sowie die statistische Signifikanz bei gemeinsamer Auswertung aller behandelten Proben, stellen starke Hinweise dar, dass sFRP4 bei hMSC-TERT und hFOB-Zellen durch den Einfluss von Phosphat herunterreguliert wird. Bei hMSC-TERT-Zellen gibt es zudem Hinweise darauf, dass Pit-1 durch Phosphateinfluss herunterreguliert wird.

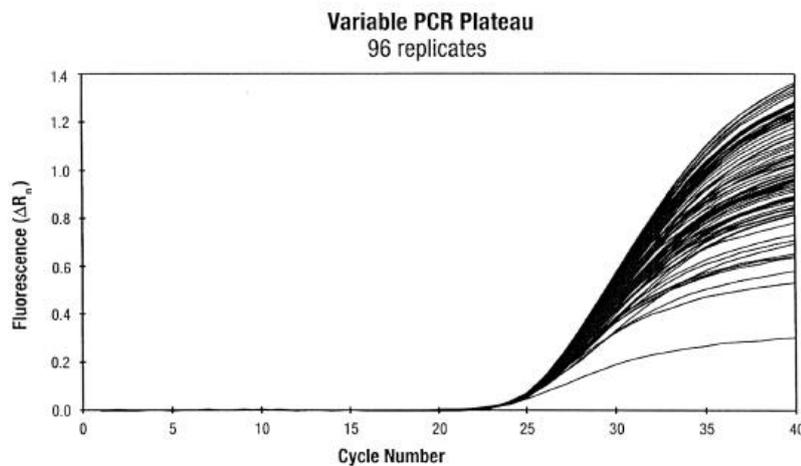
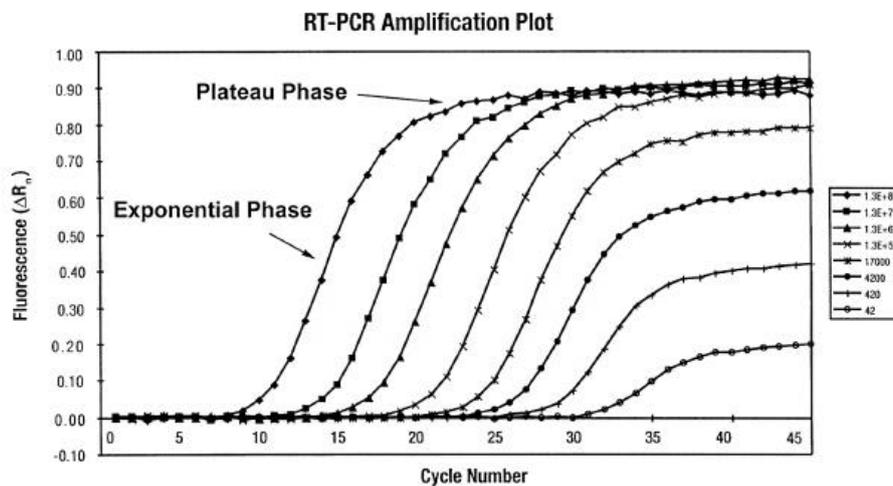
Kurz erwähnt werden soll auch die **grafische Darstellungsform** der Ergebnisse bzw. die statistischen Zusatzinformationen, die darüber vermittelt werden können. Die Auswertung über REST[®] ergibt nur die Mittelwerte der Ergebnisse, die auch nur als einzelne Datenpunkte in einem Diagramm dargestellt werden können. Zusätzliche Größen über die Verlässlichkeit der Daten sind, von der Signifikanz abgesehen, nicht verfügbar. Bei der Auswertung mittels REST 2005 wird neben dem Mittelwert und Median auch das 50%-Vertrauensintervall sowie der maximale und minimale Wert ausgegeben und kann damit auch im Diagramm dargestellt werden. So lässt

sich die Streubreite der Ergebnisse auch optisch erfassen. Für Abbildung 20 (S. 80) bedeutet das, dass es mindestens einen Messwert geben muss, bei dem sFRP4 hochreguliert wird (maximaler Wert). Allerdings liegt der Bereich, in dem sich 50 % der Ergebnisse befinden, unterhalb von 1 und die ermittelten Werte der Probe unterscheiden sich signifikant von denen der Kontrolle. Die alleinige Darstellung der Mittelwerte (Abbildung 12 bis Abbildung 17, Abbildung 21 bis Abbildung 26) kann dagegen schnell eine falsch-genaue Aussage suggerieren. Aus bereits genannten Gründen konnte die Auswertung aber nicht mit dem neuen Auswertungs-Tool wiederholt werden.

Real-time-PCR versus konventionelle PCR

Näher eingegangen werden soll auch noch auf die unterschiedlichen Aussagen zwischen konventioneller und real-time-PCR. Erst mit Hilfe der real-time-PCR, bei der die Menge an entstandenem PCR-Produkt während der gesamten Reaktion kontinuierlich erfasst wird, ist es möglich geworden, die Kinetik der Reaktion genau zu verstehen. Dabei zeigt die PCR-Reaktion unterschiedliche Phasen (Abbildung 2, S. 33). Mit Hilfe der real-time-PCR konnte anschaulich gezeigt werden, dass die Menge an ursprünglich vorhandenem Template nicht mit der Menge an entstandenem PCR-Produkt korreliert. Stattdessen führt eine größere Menge an Ausgangssubstanz zu einem früheren Anstieg der Menge des PCR-Produktes und damit zu einem früheren Anstieg der Fluoreszenz in der real-time-PCR. Identische Mengen an Ausgangssubstanz können zu völlig unterschiedlichen Mengen an PCR-Produkt und damit zu unterschiedlich starker Fluoreszenz führen (Abbildung 34). Durch die Gel-Auftrennung, Anfärbung und Densitometrie bei der konventionellen PCR wird aber genau diese Menge an PCR-Produkt, die am Ende der Reaktion entstanden ist, erfasst (End-Punkt-Messung). Soll die konventionelle PCR also quantitativ ausgewertet werden, ist die Menge an entstandenem Produkt am Ende der Reaktion nur dann aussagekräftig, wenn die PCR-Reaktion im Bereich des exponentiellen Anstiegs der PCR-Produkt-Menge abgebrochen wurde und dann ausgewertet wird. Dieser Bereich kann für jede PCR nur durch Ausprobieren gefunden werden. Das ist sicherlich in der Praxis auch durchgeführt worden,

allerdings bleibt es fraglich, ob es bei allen bisherigen PCR-Veröffentlichungen auch in diesem Maße berücksichtigt und konsequent in die Praxis umgesetzt wurde.



obere Abbildung: unterschiedliche Konzentrationen von Ausgangs-cDNA

untere Abbildung: identische Menge von Ausgangs-cDNA in verschiedenen PCR-Läufen

aus: (Freeman, Walker *et al.* 1999)

Abbildung 34: real-time-PCR – Exponential-Phase versus Plateau-Phase

Bei dieser Arbeit wurde zunächst einmalig eine konventionelle PCR durchgeführt zur Untersuchung von Genexpressionsänderungen durch Stimulation von hMSC-TERT und hFOB-Zellen mit 5 mM Phosphat über 24 h und 48 h. Dabei zeigten sich für Pit-1, sowohl bei hMSC-TERT als auch bei

hFOB, die stärksten Banden bei 24 h (Abbildung 9, S. 64). Bei 48 h zeigten sich schwächere Banden, die aber immer noch stärker waren als bei den entsprechenden Kontrollen. Für sFRP4 zeigte sich eine deutliche Bande nur bei hFOB-Zellen nach 48 h unter 5 mM Phosphat (Abbildung 10, S. 65). Diese PCR-Läufe werden sich erwartungsgemäß im Plateau-Bereich der Reaktion befunden haben. Sie wurden bewusst nicht weiter optimiert, sondern aus ihnen nur die Vermutung gezogen, dass Phosphat eine Genexpressionsänderung von sFRP4 und Pit-1 hervorruft.

Doch genau diese oben beschriebenen Beobachtungen ließen sich mit den dreimal durchgeführten Versuchreihen und real-time-Auswertung nicht bestätigen, sondern teilweise eher widerlegen: sFRP4 wurde bei beiden Zellreihen durch Phosphateinfluss eher herunterreguliert, Pit-1 wurde bei hMSC-TERT-Zellen eher hochreguliert, allerdings nicht in der vermuteten Weise, bei hFOB-Zellen wurde es nicht eindeutig reguliert. Das kann man als deutlichen Hinweis darauf sehen, dass die Ergebnisse einer konventionellen PCR, bei der nicht sichergestellt ist, dass die Reaktion im exponentiellen Bereich beendet wurde, nicht für quantitative Aussagen herangezogen werden dürfen. Auch die real-time-PCR besitzt methodische Schwächen, doch aus dem Wissen um die theoretischen Zusammenhänge heraus, ist sie zur Quantifizierung die deutlich geeignetere Methode. Bei systematischen Untersuchungen zeigte sie auch gegenüber den End-Punkt-Analysen eine deutlich geringere Intra-Assay-Variation (Schmittgen, Zakrajsek *et al.* 2000).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich die Methode der real-time-PCR zur relativen mRNA-Quantifizierung bewährt hat, ein beachtliches Potenzial besitzt, sich aber sicherlich noch in kontinuierlicher Weiterentwicklung befindet. Für die in dieser Arbeit vorhandene Fragestellung haben sich die gewählten methodischen Varianten mit SYBR Green, relativer Quantifizierung und Normalisierung auf ein internes Housekeeping-Gen als geeignet erwiesen. Die hohe Sensitivität der Methode und die Tatsache, dass die gemessenen Ct-Werte als Exponenten in die Berechnung eingehen, birgt die Gefahr, dass sich Ungenauigkeiten im Versuchsablauf auf die Ergebnisse auswirken. Daher ist

auf allen Ebenen auf eine exakte Versuchsdurchführung zu achten. Die entwickelten Software-Tools zur Effizienz-Bestimmung und zur Auswertung der Daten sind sehr wichtig. Durch die integrierten Funktionen sind auch statistische Aussagen möglich, die eine Aussage über die Qualität der Daten erlauben. Hinsichtlich der Verarbeitung der Daten und Ergebnisse ist sicherlich noch ein großes Verbesserungspotenzial gegeben. Wünschenswert wären aufwendigere und vielseitigere Programme mit einfach zu bedienender Oberfläche, die durch ihre Funktionen auch den diversen Variationen in Größe und untersuchten Situationen der real-time-PCR gerecht werden. Gut funktionierende Import- und Export-Funktionen würden die Prozessierung der Daten sehr viel weniger arbeitsaufwendig machen, wobei auch auf funktionierende Schnittstellen zur Software der diversen real-time-PCR-Cycler geachtet werden könnte. Um die Normalisierung auf interne Kontrollgene valider zu gestalten, erscheinen Ansätze, bei denen auf drei Housekeeping-Gene zurückgegriffen wird, als vielversprechend.

Die besondere Kinetik der PCR-Reaktion ist für die quantitative Auswertung von großer Bedeutung. Wie auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, kann die konventionell durchgeführte PCR zu falschen quantitativen Aussagen verleiten, sofern nicht sichergestellt wird, dass sich die Reaktion im exponentiellen Bereich befindet. Es bleibt mehr als fraglich, ob das in dieser Konsequenz und Sorgfalt bei bisherigen PCR-Untersuchungen ausreichend berücksichtigt wurde.

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen zeigten sich die Genexpressionsänderungen zahlreicher Gene als nicht signifikant und keinem konstanten Muster folgend. Die Änderungen von sFRP4 und Pit-1 zeigten sich in der Auswertung der einzelnen Versuchsansätze bei einigen Werten als signifikant und wiesen konstante Tendenzen auf. Signifikant herunterreguliert zeigte sich sFRP4 sowohl bei hMSC-TERT als auch bei hFOB-Zellen bei dem Vergleich aller phosphatstimulierten Proben mit den unbehandelten Kontrollen. Damit ergibt sich unter Berücksichtigung der methodischen Aussage der starke Verdacht, dass sFRP4 in diesen Zellen durch Phosphateinfluss herunterreguliert wird.

4.2 Phosphatstoffwechsel

Der Erkenntnisgewinn der molekularbiologischen Forschung in den letzten zehn Jahren hat dazu geführt, den Phosphatstoffwechsel in ein neues Blickfeld des Interesses zu rücken. Hat man die Regulation der Phosphatbilanz bisher in sehr enger Abhängigkeit vom Kalziumhaushalt gesehen und verstanden, gibt es inzwischen mehr und mehr Hinweise, dass Regulationsmechanismen und Botenstoffe existieren, die spezifisch den Phosphatstoffwechsel beeinflussen. Ausgangspunkt dieser Erkenntnisse war die Aufklärung molekularer Pathomechanismen von Erkrankungen, die mit einem renalen Phosphatverlust einhergehen. Dabei wurden einige sogenannte Phosphatonine identifiziert, die in der Niere phosphaturisch wirken und den Vitamin D-Haushalt beeinflussen. Die Niere stellt im menschlichen Organismus den bedeutendsten Ort der Regulation der Phosphatbilanz dar. Es gibt bereits Hinweise darauf, dass diese Phosphatonine auch an anderen Pathomechanismen beteiligt sind und auch physiologisch eine Rolle spielen könnten. Seit einiger Zeit schon sind Phosphattransporter bekannt, die mit ihren unterschiedlichen Subtypen verschiedene Funktionen übernehmen und von denen teilweise eine gewebsspezifische Expression bekannt ist.

Im Knochen stellt Phosphat einen essenziellen Bestandteil der Knochenhartsubstanz dar und ist erforderlich für die osteogene Differenzierung. Es ist bisher weitgehend unklar, ob es Zusammenhänge gibt zwischen den lokalen Vorgängen auf Ebene des Knochens und dem systemischen Phosphathaushalt. Es sollte Ziel dieser Arbeit sein, nach Hinweisen auf solche eventuell vorhandenen Zusammenhänge zu suchen.

4.2.1 Phosphatonine und Phosphattransporter

Phosphatonine

Zunächst konnte in den vorliegenden Untersuchungen gezeigt werden, dass sowohl die hMSC-TERT-Zellen als auch die hFOB-Zellen die Phosphatonine sFRP4 und MEPE exprimieren. Die Expression von FGF23 konnte hingegen mit den Primern FGF23 sense und FGF23 antisense nicht nachgewiesen werden.

Das Protein sFRP4 gehört zu den am konstantesten überexprimierten Substanzen in Tumoren, die eine Tumor-assoziierte Osteomalazie bewirken können (De Beur, Finnegan *et al.* 2002). Unter physiologischen Bedingungen konnte die Expression von sFRP4 in zahlreichen Geweben nachgewiesen werden, unter anderem in Niere, Gehirn, Ovar, Lunge und Endometrium (Jones und Jomary 2002). Die Bedeutung und Verbreitung im humanen Knorpel- und Knochengewebe ist noch nicht geklärt. Der hier erbrachte Nachweis von sFRP4 im Knochen lässt zum einen die Hypothese zu, dass sFRP4 auto- oder parakrine Effekte auf das Skelettsystem haben könnte. Zum anderen lässt er die Vermutung zu, dass eine Knochen-Nieren-Achse der Signaltransduktion bestehen und über sFRP4 an der systemischen Phosphatregulation beteiligt sein könnte.

Eine zunächst nicht nachweisbare sFRP4-mRNA-Expression in der PCR, die in einem konventionellen PCR-Cycler durchgeführt wurde, wird auf technische Probleme zurückzuführen sein, da die PCR unter identischen Bedingungen im real-time-PCR-Cycler positiv ausfiel. Ebenso wird die Tatsache, dass FGF23 mittels RT-PCR nicht nachgewiesen werden konnte, wahrscheinlich an einem technischen Problem liegen. Die RT-PCR war mit den beschriebenen Bedingungen auch bei anderen Zellen negativ, für die eine FGF23-Expression sicher zu erwarten war. Die PCR wurde mit anderen Primer-Kombinationen und PCR-Bedingungen zwischenzeitlich in der Arbeitsgruppe optimiert. Die Ergebnisse für hMSC-TERT-Zellen stehen noch aus. Denn nach heutigem Wissen stellt Knochen das Gewebe mit der höchsten FGF23-Expression dar (Riminucci, Collins *et al.* 2003; White, Larsson *et al.* 2006). Da extrazelluläres Phosphat und Mineralisation die FGF23-Expression in humanen Osteoblast-ähnlichen Zellen stimulieren (Mirams, Robinson *et al.* 2004), vermutet man auch, dass Knochen eine Quelle der regulierten Konzentration von FGF23 ist.

Bei der Analyse der Melting Curves für MEPE fiel auf, dass sich unterschiedliche Maxima zwischen hMSC-TERT (74°C) und hFOB-Zellen (77,5°C) zeigten. Das spricht für ein unterschiedlich langes, entstandenes Produkt, bzw. zunächst einmal ganz allgemein für eine andere Basenzusammensetzung der entstandenen Produkte. Die Ct-Werte der MEPE-

PCR waren bei hFOB-Zellen deutlich höher als bei hMSC-TERT-Zellen. Ohne dass zunächst eine weitere Quantifizierung möglich ist, deutet das auf eine schwächere MEPE-mRNA-Expression in hFOB-Zellen hin. Die Unterschiede in den entstandenen PCR-Produkten sollten durch weitere Untersuchungen noch genauer abgeklärt werden, bevor man Schlüsse aus den Genexpressionsstudien zieht.

Phosphattransporter

Ebenso konnte mit den vorliegenden Untersuchungen gezeigt werden, dass sowohl die mesenchymalen Stammzellen hMSC-TERT als auch die Osteoblasten hFOB einen Natrium-Phosphattransporter Typ III, den Subtyp Pit1 (Glv1) exprimieren. Natrium-Phosphattransporter vom Typ I (NPT1) und vom Typ II (NPT2a) ließen sich bei hMSC-TERT-Zellen hingegen mehrfach nicht nachweisen.

Die hier gemachten Beobachtungen decken sich insofern mit bisherigen Berichten, als die Phosphattransporter vom Typ I nur in der Niere, im Darm und in der Leber exprimiert werden (Prie, Beck *et al.* 2005). Bei Typ II Phosphattransportern scheint die Expression ebenfalls auf bestimmte Gewebe beschränkt zu sein, für NPT2a und NPT2c auf proximale Tubuluszellen der Niere und auf Osteoklasten (Gupta, Tenenhouse *et al.* 2001; Prie, Beck *et al.* 2005), für NPT2b auf Dünndarm, Lunge, Hoden und Brustdrüse (Xu, Bai *et al.* 1999; Prie, Beck *et al.* 2005). Natrium-Phosphattransporter vom Typ III mit den beiden Isoformen Pit-1 und Pit-2 hingegen können in den meisten Organen nachgewiesen werden, ihnen kann daher eine Housekeeping-Funktion unterstellt werden (Collins, Bai *et al.* 2004). Ihre Expression ist aber gewebsspezifisch unterschiedlich stark ausgeprägt: In der Ratte ist Pit-1 am stärksten im Knochenmark, Pit-2 am stärksten im Herz exprimiert (Kavanaugh, Miller *et al.* 1994), in dieser Studie wurden weder Knochen noch Osteoblasten gezielt untersucht. Da einige Organe vorzugsweise einen der beiden Transporter exprimieren, kann vermutet werden, dass funktionelle Unterschiede zwischen Pit-1 und Pit-2 bestehen (Prie, Beck *et al.* 2005). Ebenfalls nur vermutet werden kann bisher, dass die Natrium-Phosphattransporter Typ III an

der basolateralen Membran von polarisierten Epithelien exprimiert werden und damit eher eine Funktion für die zelluläre Phosphathomöostase besitzen und weniger für die Phosphat-(Re-)Absorption zuständig sind (Collins, Bai *et al.* 2004). Denn vor allem Pit-1 wird in Geweben (Lunge und Darm) exprimiert, die eine starke Polarisierung aufweisen (Zoidis, Ghirlanda-Keller *et al.* 2004). Neuere Untersuchungen an Ratten zeigten zudem eine Altersabhängigkeit des Expressionsmusters: Die Expression von Natrium-Phosphattransportern Typ III war bei Neugeborenen deutlich höher als bei Erwachsenen. Bei den neugeborenen Ratten wiesen Gehirn, Herz und Lunge hohe Expressionsraten von Pit-1 aus, bei erwachsenen Ratten waren es Darm, Lunge und Gehirn (Zoidis, Ghirlanda-Keller *et al.* 2004).

Für das Knochen- und Knorpelgewebe, insbesondere bei der extrazellulären Kalzifizierung, wird eine entscheidende Rolle des Phosphattransports bereits seit längerer Zeit vermutet. Über die Expressionsmuster der Natrium-Phosphattransporter Typ III in Zellen des Knochen- und Knorpelgewebes existieren unterschiedliche Aussagen: In der chondrogenen Zelllinie ATDC-5 der Maus konnte eine Pit-1-Expression festgestellt werden, der Nachweis war während der gesamten Differenzierung positiv und zeigte die höchsten Werte in der Proliferations-Phase (Guicheux, Palmer *et al.* 2000). Bei der Entwicklung von embryonalen Metatarsalknochen der Maus wurden Pit-1-Transkripte in hypertrophen Chondrozyten gefunden, in Osteoblasten konnte Pit-1 bei diesen Untersuchungen hingegen nicht nachgewiesen werden (Palmer, Zhao *et al.* 1999). Im Gegensatz dazu wiesen die Osteoblast-ähnlichen Zellen MC3T3-E1 der Maus eine Pit-1-Expression auf (Suzuki, Palmer *et al.* 2001), ebenso die Osteoblast-ähnliche Zelllinie PyMS der Ratte (Zoidis, Ghirlanda-Keller *et al.* 2004). Auch in Prä-Osteoblasten ROB-C26 der Ratte und Knochenmarkstammzellen der Ratte befand sich Pit-1 (Wada, Mizuno *et al.* 2004). In humanen Osteoblast-ähnlichen Zellen SaOS-2 wurde Pit-1 ebenfalls nachgewiesen (Palmer, Bonjour *et al.* 1997).

Konkrete Untersuchungen über die Pit-1-Expression an humanen Stammzellen scheinen bisher nicht veröffentlicht zu sein, der in dieser Arbeit erbrachte Nachweis einer Pit-1-Expression in einer humanen mesenchymalen

Stammzelllinie ist insofern neu. Er deckt sich aber mit den oben erwähnten Beobachtungen bei Stammzellen von Ratten und mit einer besonders hohen Pit-1-Expression im Knochenmark der Maus, das erwartungsgemäß eine hohe Dichte an Stammzellen aufweist. Die Feststellung, dass die Pit-1-Expression in den Geweben einer neugeborenen Ratte stärker ausgeprägt ist als bei erwachsenen Tieren, kann so interpretiert werden, dass der Phosphattransport in Zellen des wachsenden Organismus, der auch noch eine höhere Stammzell-dichte aufweist, eine bedeutende Rolle spielt. Daraus lässt sich einerseits ein hoher Phosphatbedarf für Zellwachstum und –vermehrung an sich vermuten, andererseits kann auch ein hoher Phosphatbedarf und damit eine besondere Bedeutung für Differenzierungsvorgänge postuliert werden.

Ob die mRNA-Expression von Pit-1 in den mesenchymalen Stammzellen stärker ausgeprägt ist als in den weiter differenzierten Osteoblasten wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, stellt aber sicherlich eine interessante Fragestellung dar.

4.2.2 Einfluss von Phosphat auf hMSC-TERT und hFOB

sFRP4

Um einen eventuellen Zusammenhang zwischen systemischem und lokalem Phosphatstoffwechsel zu charakterisieren, erfolgte eine Stimulation der Zellen mit erhöhten Phosphatkonzentrationen. Die vorliegenden Untersuchungen erbrachten den starken Hinweis darauf, dass die mRNA-Expression von sFRP4 in hMSC-TERT und hFOB-Zellen durch eine erhöhte Phosphatkonzentration im Medium herunterreguliert wird. Bei beiden Zelllinien wurden Größenordnungen von bis zu einem Viertel der ursprünglichen mRNA-Menge erreicht. Bei den Versuchsansätzen mit einer konstanten Stimulationsdauer von 24 h oder 48 h zeigte sich mit steigender Phosphatkonzentration im Medium eine sinkende mRNA-Expression. In der Auswertung der einzelnen Versuchsansätze zeigten sich zahlreiche Werte als statistisch signifikant. Das Expressionsmuster war für die Versuchsansätze 24 h und 48 h konstant und für beide Zelllinien zu beobachten. In der Auswertung, in der alle stimulierten Proben mit allen unstimulierten Kontrollen verglichen wurden, war die Herunterregulation von

sFRP4 statistisch signifikant ($p < 0,05$). Für hMSC-TERT erreichte das relative Expressionsverhältnis einen Wert von 0,52, was annähernd der Hälfte der ursprünglichen Expression entspricht, für hFOB erreichte es den Wert 0,67, was einer Reduktion der Expression um ungefähr ein Drittel entspricht. Trotz aller methodischen Vorbehalte und der Streuung der gemessenen Werte ergibt sich somit der starke Hinweis darauf, dass Phosphat in der Lage ist, die Genexpression von sFRP4 in hMSC-TERT und hFOB nach unten zu regulieren.

sFRP4 wirkt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* phosphaturisch (Berndt, Craig *et al.* 2003), wobei die Wirkung auf einer Reduktion von NPT2a-Molekülen an der apikalen Membran von proximalen Tubulus-Zellen beruht (Berndt, Bielez *et al.* 2006). Im Zellversuch zeigten sich diese Effekte auch ohne weitere systemische Faktoren und waren insgesamt etwas schwächer ausgeprägt als durch PTH (Berndt, Bielez *et al.* 2006). Die in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen sprechen eher gegen die Hypothese einer möglichen, direkten Knochen-Nieren Achse, die über sFRP4 vermittelt ist und die das Ziel hat, den Phosphatspiegel im Körper konstant zu halten. Sollte eine solche Achse in diesem Sinne existieren, wäre eher eine reduzierte Expression von sFRP4 bei erhöhten Phosphatspiegeln zu erwarten. Die gemachten Beobachtungen sprechen dabei nicht grundsätzlich gegen eine physiologische Beteiligung von sFRP4 an der Phosphathomöostase, da auch noch andere, mengenmäßig bedeutsamere Quellen von sFRP4 denkbar sind, die anders auf einen Phosphatanstieg im Körper reagieren. Ebenso ist es denkbar, dass die Phosphatonine, eventuell auch zusammen mit PTH und Vitamin D-Hormon, Bestandteile einer größeren Signalkaskade sind und jeweils einander über- oder untergeordnete Signale darstellen. Es ist bisher noch unklar, wie ausgeprägt Wechselwirkungen zwischen den Botenstoffen im Phosphathaushalt sind, sie scheinen aber zu existieren: Die Expression von PHEX in Osteoblasten wird durch PTH nach unten reguliert (Alos und Ecarot 2005). Vitamin D-Hormon ist in der Lage, die Genexpression von FGF23 im Knochen zu erhöhen und gibt damit einen Hinweis auf eine existierende Nieren-Darm-Skelett-Achse, die den Phosphathaushalt reguliert (Kolek, Hines *et al.*

2005). Für FGF23 existieren bereits mehrere Hinweise auf eine physiologische Rolle, für sFRP4 bleibt es noch aufzuklären, ob dieses Protein auch unter physiologischen Bedingungen an der Phosphathomöostase beteiligt ist.

Möglicherweise ist die in dieser Arbeit vermutete Regulation von sFRP4 durch Phosphat aber nicht im Kontext des Phosphatstoffwechsels sondern im Zusammenhang mit dem Wnt-Signalweg zu sehen, wie weiter unten noch erläutert wird.

Pit-1

Für die Phosphattransporter zeigte sich in der vorliegenden Arbeit bei den mesenchymalen Stammzellen hMSC-TERT der Hinweis auf eine gesteigerte mRNA-Expression von Pit-1 durch eine erhöhte Phosphatkonzentration im Medium. Die beobachteten Werte waren selten statistisch signifikant, die Beobachtung konnte aber bei allen Versuchsansätzen gemacht werden. In den humanen Osteoblasten hFOB konnte ein Effekt in dieser Form nicht nachgewiesen werden, die Expressionsänderungen zeigten kein einheitliches Muster.

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zeigten unterschiedliche Auswirkungen von Phosphat auf die Expression von Pit-1: In Rattenfibroblasten 208F stiegen die mRNA-Spiegel von Pit-1 und Pit-2 nach Entfernung von Phosphat aus dem Medium (Kavanaugh, Miller *et al.* 1994). Bei Untersuchungen an Osteoblast-ähnlichen Zellen PyMS der Ratte zeigte sich eine Expressionssteigerung von Pit-1, nicht aber von Pit-2 nach Wachstum der Zellen in phosphatfreiem Medium über 24 h (Zoidis, Ghirlanda-Keller *et al.* 2004). Auch in der Nebenschilddrüse der Ratte führte ein diätetischer Phosphatentzug zu einer Hochregulation der Expression von Pit-1 (Tatsumi, Segawa *et al.* 1998). Untersuchungen an der Prä-Osteoblasten Zelllinie MC3T3-E1 der Maus hingegen zeigten, dass erhöhtes anorganisches Phosphat im Medium (10 mM über 72 h) die Genexpression des Natrium-Phosphattransporter Pit-1 um den Faktor 2,45 nach oben reguliert (Beck, Moran *et al.* 2003). In Knochenmarkstammzellen der Ratte wurde nur die

Genexpression von Pit-2, nicht aber von Pit-1 gesteigert, nachdem das extrazelluläre Phosphat erhöht worden war (Wada, Mizuno *et al.* 2004). Wie kürzlich berichtet, wird in Arterien von Ratten die Expression von Pit1 bei Hyperphosphatämie und Urämie hochreguliert (Mizobuchi, Ogata *et al.* 2006).

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass es kein einheitliches Muster zu geben scheint, mit dem Zellen in Form von Genexpressionsänderungen der Natrium-Phosphattransporter Typ III auf wechselnde extrazelluläre Phosphatkonzentrationen reagieren. Es scheint sich dabei vielmehr um ein zellspezifisches Phänomen zu handeln, das möglicherweise von der aktuellen Stoffwechselfunktion oder dem Differenzierungsstadium abhängig ist. Wada, Mizuno *et al.* (Wada, Mizuno *et al.* 2004) stellten eine Regulation durch Phosphat nur bei Stammzellen der Ratte fest, allerdings nicht mehr bei den weiter differenzierten Präosteoblasten ROB-C26 und auch nicht bei Nierenzellen der Ratte. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte der Hinweis auf eine geänderte Genexpression von Pit-1 nur bei den Stammzellen, allerdings nicht bei den Osteoblasten beobachtet werden.

Differenzierung

Die vorliegenden Untersuchungen erbrachten somit den Hinweis darauf, dass Phosphat in der Lage ist, Änderungen der Genexpression *in vitro* hervorzurufen. Um mögliche Auswirkungen von Phosphat auf beginnende Differenzierungsvorgänge zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Genexpression der osteogenen Differenzierungsmarker Col1, OC, AP, OP untersucht. Dabei wurde für die Zellkultur bewusst kein Differenzierungsmedium verwendet, sondern normales Wachstumsmedium mit systematisch erhöhten Phosphatkonzentrationen. Die Stimulation der Zelllinien hMSC-TERT und hFOB zeigte dabei in den verschiedenen Versuchsansätzen kein einheitliches Expressionsmuster, das auf eine beginnende osteogene Differenzierung hinweisen würde.

Um eine eventuelle Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen oder der Osteoblasten zu beobachten, war die in dieser Arbeit gewählte Zeitspanne der Phosphat-Exposition mit maximal 48 h im Vergleich zu anderen *In-vitro*-Untersuchungen wahrscheinlich zu kurz. Eine komplette Differenzierung bzw. Mineralisierung ist nach einem Zeitraum in Größenordnungen von 2-4 Wochen zu beobachten (Noth, Osyczka *et al.* 2002; Beck, Moran *et al.* 2003).

Ein Problem bei allen Untersuchungen zur Rolle von Phosphat ist, dass das eingesetzte anorganische Phosphat, oft in Form von Natriumphosphat, den pH-Wert des Mediums verändert. Möglicherweise sind beobachtete Änderungen und auch Widersprüche zwischen den einzelnen Studien auf den pH-Wert zurückzuführen. Wie bei den meisten Studien wurde auch bei den hier durchgeführten Untersuchungen nicht auf den pH-Wert geachtet und es wurden keine pH-Messungen durchgeführt.

Obwohl anorganisches Phosphat ein essenzieller Bestandteil des Hydroxylapatits ist, wird in einigen Studien vermutet, dass es ebenso erforderlich ist für die Osteoblastenfunktion während des Differenzierungsprozesses. Es mehren sich also die Anzeichen dafür, dass Phosphat auch als Signalmolekül eine entscheidende Rolle spielt (Bellows, Aubin *et al.* 1991; Tenenbaum, Limeback *et al.* 1992; Beck 2003). Bei diesen Prozessen steht man jedoch erst am Beginn ihres Verständnisses, folgende Beobachtungen können diese Überlegungen stützen:

Es existieren inzwischen zahlreiche Zellmodelle, die sich osteogen differenzieren lassen, wenn sie in einem osteogenen Differenzierungsmedium wachsen. Als Beispiel seien die Prä-Osteoblasten-Zelllinie der Maus MC3T3-E1 (Quarles, Yohay *et al.* 1992) oder humane osteoblastische Zellen (Noth, Osyczka *et al.* 2002) erwähnt. Das Differenzierungsmedium muss dafür immer eine ausreichende Menge an Phosphat (Beta-Glycerophosphat) enthalten, da sich eine Differenzierung sonst nicht initiieren lässt (Fratzl-Zelman, Fratzl *et al.* 1998).

Ebenso lässt sich beobachten, dass bei fortschreitender Differenzierung *in vitro* die Aktivität der Alkalischen Phosphatase ansteigt und in Anwesenheit von organischem Phosphat zusätzliches, freies, anorganisches Phosphat produziert wird (Bellows, Heersche *et al.* 1992). Durch eine Inhibition der Alkalischen Phosphatase kann die Mineralisation verhindert werden (Bellows, Aubin *et al.* 1991). Es scheint also seitens der Zelle Bemühungen zu geben, die Phosphatkonzentration weiter ansteigen zu lassen.

Mikroarray-Untersuchungen an der Zelllinie MC3T3-E1 zeigten, dass freies, anorganisches Phosphat im Medium (10 mM über 72 h) eine Reihe von Genen sowohl hoch als auch herunterregulieren kann (Beck, Moran *et al.* 2003). Der Natrium-Phosphattransporter Pit-1 wurde unter Phosphateinfluss um den Faktor 2,45 nach oben reguliert. Zusätzlich zeigte sich ein inverser Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkdauer des extrazellulären Phosphats, d.h. dass eine geringe Phosphatdosis über längere Zeit die gleichen Effekte hervorruft wie eine höhere Konzentration über einen kürzeren Zeitraum. Die minimal erforderliche Dosis, um Änderungen zu bewirken, lag bei 2 mM. Das lässt vermuten, dass zunächst ein Transport über die Zellmembran hinweg stattfinden muss und die entscheidende Größe die intrazelluläre Phosphatkonzentration darstellt (Beck, Moran *et al.* 2003). Wurde der Natrium-Phosphattransport mittels Foscarnet (PFA) geblockt, blieben die Effekte auf die Genexpression ebenso wie eine Mineralisierung unter Differenzierungsmedium aus. Welche intrazellulären phosphatvermittelten Signalwege für die osteogene Differenzierung eine Rolle spielen könnten, ist weitgehend unklar. Diskutiert wird unter anderem der Transkriptionsfaktor Cbfa1. Bei Osteoblasten und Chondrozyten konnte durch Phosphateinfluss ein Transport von Cbfa1 aus dem Zellkern heraus beobachtet werden (Fujita, Izumo *et al.* 2001).

Apoptose

Es existieren neben Differenzierung / Mineralisierung auch noch andere Beobachtungen, die deutliche Auswirkungen von extrazellulärem Phosphat auf zelluläre Funktionen erkennen lassen: Bei humanen Osteoblasten-ähnliche Zellen konnte extrazelluläre Phosphatkonzentrationen, die über die

physiologischen Werte hinausgehen, eine Apoptose der Zellen verursachen (Meleti, Shapiro *et al.* 2000). Die Zellen stammten aus humanen Knochen-Explantaten und befanden sich bereits in der mineralischen Phase. Die Zahl an lebensfähigen Zellen reduzierte sich dabei konstant in einer zeit- und dosisabhängigen Weise, unter 5 mmol/l Phosphat um 25 % (48 h) bis zu 70 % (96 h), unter 7 mmol/l um 60 % (48 h) bis 100 % (96 h). Verschiedene Assays (TUNEL-Assay, Transmissions-Elektronen-Mikroskopie und Detektion mitochondrialer Funktion durch Rhodamin 123-Färbung) lieferten starke Hinweise auf einen apoptotischen Prozess. Der Zelltod konnte durch Blockade des Natrium-Phosphattransports mittels Foscarnet (PFA) komplett verhindert werden. Auch um eine Apoptose bei Osteoblasten einzuleiten, scheint Phosphat also zunächst in erhöhten Konzentrationen im Intrazellulärraum vorliegen zu müssen (Meleti, Shapiro *et al.* 2000). Ähnliche Beobachtungen in noch ausgeprägterer Weise, d.h. mit höherer Phosphatsensitivität, konnten bei Chondrozyten gemacht werden (Mansfield, Rajpurohit *et al.* 1999). Bei den Osteoblast-ähnlichen Zellen der Ratte PyMS wird ebenfalls von einem Zelltod berichtet, nach Erhöhung der extrazellulären Phosphatkonzentration von 5 auf 10 mmol/l und Stimulation über 24 h (Zoidis, Ghirlanda-Keller *et al.* 2004), wobei die gleichzeitige Gabe von PFA ebenfalls den Zelltod verhindern konnte. Auch bei den Untersuchungen von Wada, Mizuno *et al.* (Wada, Mizuno *et al.* 2004) zeigten sich verminderte Zellzahlen nach Stimulation mit 20 mM Phosphat im Medium über 72 h. Stammzellen waren dabei weniger stark betroffen als Osteoblasten und Nierenzellen der Ratte.

In der Konzeption der vorliegenden Versuchsreihen wurde die Untersuchung einer möglichen Apoptose nicht berücksichtigt. Die in dieser Arbeit verwendeten Phosphatkonzentrationen lagen dabei durchaus in dem Bereich, in dem andere Autoren ausgeprägte Apoptosen beobachten konnten. Es zeigte sich ein tendenziell schlechteres Wachstum der Zellen unter hohen Phosphatkonzentrationen, die RNA-Ausbeute war tendenziell geringer. Da die Zellen allerdings bei ihrer Aussaat nicht hinreichend quantifiziert wurden, darf man aus dem absoluten Wert der RNA-Ausbeute keine Aussage ziehen. Ein

einheitliches Muster des Zellrückgangs zeigte sich allerdings nicht, es waren teilweise einzelne Versuchsreihen, die besonders stark betroffen waren.

Die Möglichkeit, dass Phosphat apoptotische Prozesse einleiten kann, ist natürlich nicht unproblematisch in Bezug auf die gewonnenen Ergebnisse. Denn Änderungen der Genexpression könnten auch Zeichen einer reduzierten Überlebensfähigkeit der Zellen sein. Ein Zellverlust bzw. ein reduziertes Wachstum der Zellen sollte bei weiteren Versuchsanordnungen dieser Art dezidiert überprüft werden indem eine Quantifizierung erfolgt.

Kalzifizierung

Im Körper stellen sowohl Situationen des Überangebotes als auch der Unterversorgung mit Phosphat ein ernstes Problem dar. Ein Überangebot von Phosphat tritt, von der seltenen vererbten Krankheit der tumoralen Kalzinose abgesehen, bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz auf. Die verminderte Vitamin D-Hormon-Synthese und die erhöhte Phosphatretention führen zu einem sekundären Hyperparathyreoidismus. Klinisch zeigt sich eine Demineralisation des Knochens mit Fraktur neigung und subkutane Ablagerungen von Pyrophosphat. Vaskuläre Kalzifikationen als Zeichen einer Arteriosklerose treten ebenfalls häufig auf. Es ist bereits seit einiger Zeit bekannt, dass bei Dialysepatienten hohe Serum-Phosphatspiegel und ein hohes $P_i \times Ca$ Produkt wichtige und unabhängige Risikofaktoren für vaskuläre Kalzifikationen sind und die Mortalität dieser Patienten erhöhen (Block, Hulbert-Shearon *et al.* 1998; Goodman, Goldin *et al.* 2000; Ganesh, Stack *et al.* 2001). Da bei Patienten in einer solchen Situation nicht nur die Phosphatspiegel verändert sind, sondern weitreichendere hormonelle Abweichungen vorliegen, kann nicht direkt der Schluss gezogen werden, dass die auftretenden Effekte lediglich durch Phosphat begründet sind. Auch die Mechanismen, die zu einer renalen Osteodystrophie führen, sind zu komplex, als dass sie alleine auf Phosphat und Parathormon zurückgeführt werden könnten. Dennoch gibt es auch hier einige interessante Beobachtungen *in vitro* und *in vivo*, die die Bedeutung von Phosphat aufzeigen:

Humane, glatte Muskelzellen, die in normalem Medium gehalten werden, mineralisierten nicht. Erhöhte Phosphatspiegel ($>1,4$ mmol/l) hingegen ließen diese humanen, glatten Muskelzellen in einer dosisabhängigen Weise mineralisieren. Dabei konnte der Natrium-Phosphattransporter Pit-1 in diesen Zellen nachgewiesen werden, eine Blockade des Phosphattransports durch PFA konnte die Mineralisierung in einer dosisabhängigen Weise hemmen und gleichzeitig die Genexpression von Osteokalzin und Cbfa1 reduzieren (Jono, McKee *et al.* 2000). Die Gefäß-Muskelzellen verloren nach Stimulation mit Phosphat auch ihr typisches Genexpressionsmuster und wiesen osteochondrogene Marker auf wie Cbfa1, AP, OP, OC (Steitz, Speer *et al.* 2001). Pit-1 und Pit-2 ließen sich in solchen Zellen als einzige Phosphattransporter nachweisen (Giachelli, Speer *et al.* 2005). Das lässt vermuten, dass extrazelluläres Phosphat die Mineralisierung von humanen, vaskulären, glatten Muskelzellen initiieren kann. Um diese Wirkung zu entfalten, scheint Phosphat auch hier zunächst in das Zellinnere gelangen zu müssen, wobei der Natrium-Phosphattransporter Pit-1 eine Schlüsselrolle spielt (Li, Yang *et al.* 2006). Die Mechanismen, mit denen die Mineralisierung eingeleitet wird, sind weitgehend unklar, aber auch hier kann eine Bedeutung von Cbfa1 vermutet werden: In den kalzifizierten Arterien von Ratten mit Hyperphosphatämie und sekundärem Hyperparathyreoidismus konnte eine gesteigerte mRNA-Expression für Cbfa1 und Pit-1 festgestellt werden (Mizobuchi, Ogata *et al.* 2006).

Somit lässt sich festhalten, dass Phosphat anscheinend nicht nur als Bestandteil der Knochenhartschubstanz eine Rolle spielt, sondern auch als Signalmolekül im Differenzierungsprozess. Ebenso zeigt sich, dass erhöhte Phosphatkonzentrationen deutliche Auswirkungen auf die Zellfunktion haben können. In den vergangenen Jahren wurden neben PTH eine Reihe von Substanzen identifiziert, die allesamt den Phosphatspiegel im Blut senken. Es wurden allerdings keine neuen Substanzen gefunden, die den Phosphatspiegel anheben. Es stellt sich daher die Frage, ob Phosphat eine so gefährliche Substanz darstellt, deren Ansteigen im Körper auf jeden Fall verhindert werden

soll. Neuere Untersuchungen zeigten, dass auch bei Patienten mit einer chronischen aber nicht dialysepflichtigen Nierenerkrankung das Mortalitätsrisiko linear mit der Serum-Phosphatkonzentration ansteigt. Und das bereits ab einer Konzentration von 1,13 mM, also einem Wert, der noch als physiologisch angesehen wird (Kestenbaum, Sampson *et al.* 2005). Es ist bisher nicht bekannt, ob auch bei Menschen mit intakter Nierenfunktion eine Korrelation zwischen Phosphatspiegeln und der Mortalität besteht. Ob diese Auswirkungen ausschließlich die Wirkung des Phosphats sind bleibt unklar. Fest steht jedoch, dass erhöhte Phosphatspiegel bei Patienten mit Nierenerkrankungen bereits ab dem Normalwert aufwärts ein ernstes Problem darstellen und die Lebenserwartung deutlich einschränken.

Wnt-Signalweg

sFRP4 wurde entdeckt bei der Aufklärung der molekularen Mechanismen der Onkogenen Osteomalazie. Es ist bisher noch weitgehend unklar, warum sFRP4 in Tumoren, die eine TIO verursachen so deutlich überexprimiert wird. Bisher konnte gezeigt werden, dass die durch diese Tumore übermäßig produzierte Menge an sFRP4 im Körper eine direkte Wirkung an der Niere hat und dort über die Reduktion von NPT2a phosphaturisch wirkt (Berndt, Craig *et al.* 2003; Berndt, Bialesz *et al.* 2006). Damit ist zumindest eine Erklärung gefunden, warum diese Tumore mit dem Symptom einer Phosphaturie einhergehen. Vielleicht muss die Rolle von sFRP4 aber auch noch viel stärker als Antagonist im Kontext des Wnt-Signalweges gesehen werden. Der Wnt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle für Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Für mehrere Tumore konnte eine übermäßige Aktivierung dieses Signalweges als zugrunde liegender Pathomechanismus beschrieben werden, indem es zu einer pathologischen Methylierung der sFRP-Gene und damit funktionellen Inaktivierung ihrer Wirkung kommt (Suzuki, Watkins *et al.* 2004; Zou, Molina *et al.* 2005). Für die Stromaendometriose (endometrial stromal sarcoma) konnte sFRP4 als Gen identifiziert werden, dessen Expression besonders deutlich nach unten reguliert ist (Hrzenjak, Tippl *et al.* 2004), so dass über eine Tumor-Supressor-Funktion von sFRP4 spekuliert werden kann. Beim kolorektalen

Karzinom hingegen konnte eine übermäßige sFRP4-Expression festgestellt werden (Feng Han, Zhao *et al.* 2006). Für die mesenchymalen Tumore, die eine TIO auslösen, lässt sich nun spekulieren, dass die Überproduktion von sFRP4 in den Wnt-Signalweg eingreift, indem es dort als Antagonist wirkt und über eine Hemmung der Apoptose zur Entstehung oder Erhaltung des Tumors beiträgt. Andererseits ist es auch denkbar, dass es sich bei der sFRP4-Überexpression um einen kompensatorischen Mechanismus handelt, der einer übermäßigen Aktivierung des Wnt-Signalweges entgegenwirken will.

RT-PCR-Untersuchungen an mesenchymalen Stammzellen konnten eine ganze Reihe von Komponenten des Wnt-Signalweges nachweisen, unter anderem auch sFRP4 (Etheridge, Spencer *et al.* 2004). Eine Stimulation des Signalweges mit Lithium-Ionen oder durch Wnt3a führte zu einem Ansteigen von β -Catenin im Zellkern. Das lässt die Vermutung zu, dass der Wnt-Signalweg in MSC funktionell ist und für die Erhaltung oder Differenzierung eine Rolle spielt. Da sowohl Rezeptoren als auch Liganden exprimiert werden, ist auch eine zumindest teilweise autokrine Signalweitergabe denkbar. Für die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen, Stammzellen der Haut, für Myogenese, Chondrogenese und Adipogenese konnte eine Beteiligung des Wnt-Signalweges bereits gezeigt werden. Dabei konnten sowohl differenzierungs- und wachstumsfördernde als auch hemmende Auswirkungen festgestellt werden (Übersicht: Etheridge, Spencer *et al.* 2004). Für Osteoblasten konnte die Beobachtung gemacht werden, dass die komplette Hemmung des Wnt-Signalweges durch eine inaktivierende Mutation von LRP5 zu einer verminderten Knochenmasse und Osteoporose führt (Gong, Slee *et al.* 2001), wie bei der Osteogenesis imperfecta zu beobachten ist. Eine „Gain-of-function“-Mutation von LRP5 hingegen führt zu erhöhter Knochendichte und vermehrter Knochenmasse (Boyden, Mao *et al.* 2002). Es ist bisher noch unklar, welche Kombinationen von Liganden und Rezeptoren existieren und welche Wirkung diese Paare dann haben.

Es zeigt sich aber auch, dass sFRP4 noch andere Wirkungen an der Niere hat. Bei experimentell zugeführten Verletzungen der Niere war sFRP4 in der Lage, eine Fibrose zu verhindern (Surendran, Schiavi *et al.* 2005). Das lässt eine mögliche Bedeutung des Wnt-Signalweges auch bei Verletzung und Entzündung vermuten.

Betrachtet man diese Aussagen in der Zusammenschau, kann spekuliert werden, dass sFRP4 für mesenchymale Stammzellen oder Osteoblasten einen Differenzierungsinhibitor darstellt. Eine verminderte mRNA-Expression nach Einwirkung von Phosphat könnte so als sehr frühes Zeichen einer nachfolgenden Differenzierung gesehen werden. So könnte sFRP4 als ein direktes, vermittelndes Signalelement zwischen Phosphat und einer Differenzierung gesehen werden. Verfolgt man diese Hypothese weiter, könnte auch alleine der erhöhte sFRP4-Spiegel bei der Onkogenen Osteomalazie schädigend auf die Knochenstruktur einwirken. D.h. dass der Phosphatmangel an sich vielleicht nicht der einzige Pathomechanismus ist, der bei einer Onkogenen Osteomalazie zu der Symptomatik am Skelettsystem führt. Um diesem Gedankengang nachzugehen, könnte überprüft werden, ob rekombinant hergestelltes sFRP4 in der Lage ist, die Differenzierung von Osteoblasten zu beeinflussen. Mit dem Tet-On™ Konstrukt steht ein System zur Verfügung, mit dem die Konsequenzen einer Überexpression von sFRP4 in der Zelle untersucht werden können.

Neben den beiden bereits diskutierten Wirkungsbereichen von sFRP4 im Phosphatstoffwechsel und als Antagonist im Wnt-Signalweg sind natürlich auch weitere, bisher noch unbekannte Funktionsbereiche denkbar. Die Forschung wird zeigen, ob es weitere eventuell vorhandene regulatorische Wirkungen von sFRP4 gibt.

Ausblick

Abschließend lässt sich festhalten, dass sich durch die Entdeckung von löslichen Substanzen, die den Phosphathaushalt beeinflussen können, ganz neue Einblicke in mögliche Regulationsmechanismen der Phosphathomöostase im Körper ergeben haben. Entdeckt wurden die Phosphatonine im Zusammenhang mit pathologischen Prozessen, doch es mehren sich die Hinweise, dass sie auch im physiologischen Zusammenspiel bedeutsam sein könnten. Bei diesen Zusammenhängen steht man jedoch erst am Anfang ihres Verständnisses. Der in dieser Arbeit gefundene Hinweis auf eine Phosphatsensitivität von sFRP4 in mesenchymalen Stammzellen und Osteoblasten lässt die Vermutung einer physiologischen Beteiligung von sFRP4 an der Phosphatregulation zu. Die zukünftige Forschung wird zeigen, ob es physiologische Signalachsen mit Beteiligung von Phosphatoninen gibt. Denkbar ist, dass die Phosphatonine und auch PTH und Vitamin D-Hormon dabei in über- oder untergeordneten Signalverhältnissen zueinander stehen. Die Suche nach Wechselwirkungen untereinander wird solche Zusammenhänge möglicherweise erhellen können.

Die große Bedeutung des Wnt-Signalweges für physiologische und pathophysiologische Prozesse kann bisher nur erahnt werden. Es zeigt sich, dass sFRP4 auch in diesem Zusammenhang zunehmend gefunden wird. Eine zukünftige Charakterisierung der Bestandteile dieses Signalweges und ihrer biologischen Relevanz wird zeigen, ob sFRP4 eine größere Bedeutung besitzt als bisher angenommen und sich eventuell auch Zusammenhänge zum Phosphathaushalt aufzeigen.

Es verdichten sich die Hinweise darauf, dass eine pathologisch erhöhte Phosphatkonzentration im Körper massive Auswirkungen auf zelluläre Funktionen haben kann, dass Phosphat möglicherweise aber ebenso eine bisher unterschätzte Rolle in Wachstum und Differenzierung besitzt.

Die Aufklärung der Regulationsmechanismen und auch der Wirkungsmechanismen von Phosphat wird in Zukunft neue therapeutische Möglichkeiten zur Behandlung von krankhaften Abweichungen der Phosphathomöostase eröffnen.

5 Zusammenfassung

Phosphat stellt einen essenziellen Bestandteil der Knochenhartschubstanz dar und ist zudem erforderlich, um mesenchymale Stammzellen osteogen zu differenzieren. Bei der Aufklärung molekularer Pathomechanismen von Störungen der Phosphathomöostase wurden in den vergangenen zehn Jahre mehrere Botenstoffe identifiziert, die spezifische Wirkungen auf den systemischen Phosphathaushalt haben. Die als „Phosphatonine“ bezeichneten Substanzen FGF23 (Fibroblastenwachstumsfaktor 23), sFRP4 (secreted frizzled related protein 4), FGF7 (Fibroblastenwachstumsfaktor 7) und MEPE (matrix extracellular phosphoglycoprotein) induzieren eine negative Phosphatbilanz, indem sie an der Niere phosphaturisch wirken. Ziel dieser Arbeit war es, eventuell vorhandene Interaktionen zwischen knochenbildenden Zellen, Phosphat und den inzwischen bekannten Substanzen mit Wirkung auf den Phosphathaushalt zu charakterisieren.

Dazu wurden immortalisierte Zelllinien mesenchymaler Stammzellen (hMSC-TERT) und fetaler Osteoblasten (hFOB) konzentrations- und zeitabhängig mit Phosphat stimuliert (von 1,25 mM bis 20 mM, von 0 bis 48 h). Die quantitative real-time-PCR zur relativen mRNA-Quantifizierung wurde dabei in der Arbeitsgruppe als Methode etabliert, um den Einfluss dieser erhöhten Phosphatspiegel im Nährmedium auf die Expression von Genen des Phosphatstoffwechsels und Markern der osteogenen Differenzierung zu analysieren. Untersucht wurden Col1 (Kollagen 1), OC (Osteokalzin), AP (Alkalische Phosphatase) und OP (Osteopontin) als Differenzierungsmarker, Pit-1 (Natrium-Phosphattransporter), sFRP4, MEPE und FGF23 als Schlüsselsubstanzen im Phosphatstoffwechsel sowie Aktin und EF1 α als Housekeeping-Gene. Die real-time-PCR wurde mit der SYBR[®] Green-Methode durchgeführt, die Effizienzbestimmung erfolgte mit LinRegPCR, die Auswertung mit REST[®] und REST 2005, jeweils für die ermittelte Effizienz und die als optimal angenommene Effizienz (E=2).

Zunächst konnte die Expression des Natrium-Phosphattransporters Pit-1 in den Zellen hMSC-TERT und hFOB nachgewiesen werden. Bei beiden Zelllinien

zeigte sich, dass die Expression von sFRP4 mit steigender Phosphatkonzentration bzw. steigender Stimulationsdauer nach unten reguliert wird. Beim Vergleich aller stimulierten Proben mit den unstimulierten Kontrollen fiel das Expressionsverhältnis bei hMSC-TERT ungefähr auf die Hälfte des Ausgangswertes (0,52; $p < 0,05$), bei hFOB reduzierte es sich auf zwei Drittel (0,67; $p < 0,05$). Es ist somit anzunehmen, dass Phosphat in der Lage ist, die Genexpression von sFRP4 in hMSC-TERT und hFOB nach unten zu regulieren. Für Pit-1 ergab sich bei hMSC-TERT der Hinweis auf eine gesteigerte mRNA-Expression unter Phosphatwirkung, für hFOB-Zellen konnte diese Beobachtung nicht gemacht werden. Beide Zelllinien zeigten unter Phosphat-Stimulation und maximaler Einwirkzeit von 48 h kein einheitliches Expressionsmuster, das auf eine beginnende Differenzierung hinweisen würde. Der in dieser Arbeit gefundene Hinweis auf eine Phosphatsensitivität von sFRP4 in mesenchymalen Stammzellen und Osteoblasten lässt somit die Vermutung einer physiologischen Beteiligung von sFRP4 an der Phosphatregulation zu. Es bleibt zu klären, inwieweit andere Phosphatonine an solchen Signalachsen beteiligt sind. Spekuliert werden kann, dass sFRP4 auch als Antagonist des Wnt-Signalweges bei Differenzierungsvorgängen eine größere Rolle spielt als bisher angenommen.

Des Weiteren sollte in der vorliegenden Arbeit ein Genexpressionssystem (Tet-On™ Konstrukt) in mesenchymalen adulten Stammzellen (hMSC-TERT) etabliert werden, mit dem im Endzustand die Expression beliebiger Gene Tetracyclin-abhängig induziert werden kann. Diese Arbeiten konnten bis zur ersten Transfektion erfolgreich durchgeführt werden: Für einen Referenz-Vektor zeigte sich eine ausgeprägte Induzierbarkeit durch Doxycyclin. Als erstes Gen sollte sFRP4 überexprimiert werden, das dafür zunächst isoliert, sequenziert und kloniert wurde und nun für den Einsatz in diesem Genexpressionssystem zur Verfügung steht.

Die Aufklärung der Regulationsmechanismen und auch der Wirkungsweise von Phosphat wird ein wichtiges Ziel zukünftiger Forschung sein und eventuell neue therapeutische Möglichkeiten zur Behandlung von krankhaften Abweichungen der Phosphathomöostase eröffnen.

6 Literatur

- ADHR Consortium (2000). "Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23." Nat Genet **26**(3): 345-8.
- Alos N and Ecarot B (2005). "Downregulation of osteoblast PheX expression by PTH." Bone **37**(4): 589-98.
- Aubin JE (1998). "Advances in the osteoblast lineage." Biochem Cell Biol **76**(6): 899-910.
- Bai X, Miao D, Panda D, Grady S, McKee MD, Goltzman D and Karaplis AC (2002). "Partial rescue of the Hyp phenotype by osteoblast-targeted PHEX (phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome) expression." Mol Endocrinol **16**(12): 2913-25.
- Bai XY, Miao D, Goltzman D and Karaplis AC (2003). "The autosomal dominant hypophosphatemic rickets R176Q mutation in fibroblast growth factor 23 resists proteolytic cleavage and enhances in vivo biological potency." J Biol Chem **278**(11): 9843-9.
- Beck GR, Jr. (2003). "Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation." J Cell Biochem **90**(2): 234-43.
- Beck GR, Jr., Moran E and Knecht N (2003). "Inorganic phosphate regulates multiple genes during osteoblast differentiation, including Nrf2." Exp Cell Res **288**(2): 288-300.
- Beck L, Karaplis AC, Amizuka N, Hewson AS, Ozawa H and Tenenhouse HS (1998). "Targeted inactivation of Npt2 in mice leads to severe renal phosphate wasting, hypercalciuria, and skeletal abnormalities." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 5372-7.
- Bellows CG, Aubin JE and Heersche JN (1991). "Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate." Bone Miner **14**(1): 27-40.
- Bellows CG, Heersche JN and Aubin JE (1992). "Inorganic phosphate added exogenously or released from beta-glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules in vitro." Bone Miner **17**(1): 15-29.
- Benet-Pages A, Lorenz-Depiereux B, Zischka H, White KE, Econs MJ and Strom TM (2004). "FGF23 is processed by proprotein convertases but not by PHEX." Bone **35**(2): 455-62.
- Benet-Pages A, Orlik P, Strom TM and Lorenz-Depiereux B (2005). "An FGF23 missense mutation causes familial tumoral calcinosis with hyperphosphatemia." Hum Mol Genet **14**(3): 385-90.

- Berndt T, Craig TA, Bowe AE, Vassiliadis J, Reczek D, Finnegan R, Jan De Beur SM, Schiavi SC and Kumar R (2003). "Secreted frizzled-related protein 4 is a potent tumor-derived phosphaturic agent." J Clin Invest **112**(5): 785-94.
- Berndt TJ, Bielez B, Craig TA, Tebben PJ, Bacic D, Wagner CA, O'Brien S, Schiavi S, Biber J, Murer H and Kumar R (2006). "Secreted frizzled-related protein-4 reduces sodium-phosphate co-transporter abundance and activity in proximal tubule cells." Pflugers Arch **451**(4): 579-87.
- Berndt TJ, Schiavi S and Kumar R (2005). ""Phosphatonins" and the regulation of phosphorus homeostasis." Am J Physiol Renal Physiol **289**(6): F1170-82.
- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S and Robey PG (2001). "Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications." Stem Cells **19**(3): 180-92.
- Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW and Port FK (1998). "Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study." Am J Kidney Dis **31**(4): 607-17.
- Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K and Lifton RP (2002). "High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5." N Engl J Med **346**(20): 1513-21.
- Brent GA, LeBoff MS, Seely EW, Conlin PR and Brown EM (1988). "Relationship between the concentration and rate of change of calcium and serum intact parathyroid hormone levels in normal humans." J Clin Endocrinol Metab **67**(5): 944-50.
- Brown AJ, Dusso A and Slatopolsky E (1999). "Vitamin D." Am J Physiol **277**(2 Pt 2): F157-75.
- Bustin SA (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." J Mol Endocrinol **25**(2): 169-93.
- Bustin SA (2002). "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." J Mol Endocrinol **29**(1): 23-39.
- Bustin SA, Benes V, Nolan T and Pfaffl MW (2005). "Quantitative real-time RT-PCR--a perspective." J Mol Endocrinol **34**(3): 597-601.
- Cai Q, Hodgson SF, Kao PC, Lennon VA, Klee GG, Zinsmeister AR and Kumar R (1994). "Brief report: inhibition of renal phosphate transport by a tumor product in a patient with oncogenic osteomalacia." N Engl J Med **330**(23): 1645-9.

- Carpenter TO, Ellis BK, Insogna KL, Philbrick WM, Sterpka J and Shimkets R (2005). "Fibroblast growth factor 7: an inhibitor of phosphate transport derived from oncogenic osteomalacia-causing tumors." J Clin Endocrinol Metab **90**(2): 1012-20.
- Chomczynski P and Sacchi N (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.
- Clontech (1999). "Tet-Off and Tet-On Gene Expression Systems." Information Brochure.
- Clontech (2001). "Tet-Off and Tet-On Gene Expression Systems." User Manual PT3001-1 (PR11095).
- Collins JF, Bai L and Ghishan FK (2004). "The SLC20 family of proteins: dual functions as sodium-phosphate cotransporters and viral receptors." Pflugers Arch **447**(5): 647-52.
- De Beur SM, Finnegan RB, Vassiliadis J, Cook B, Barberio D, Estes S, Manavalan P, Petroziello J, Madden SL, Cho JY, Kumar R, Levine MA and Schiavi SC (2002). "Tumors associated with oncogenic osteomalacia express genes important in bone and mineral metabolism." J Bone Miner Res **17**(6): 1102-10.
- Ebert R, Jovanovic M, Ulmer M, Schneider D, Meissner-Weigl J, Adamski J and Jakob F (2004). "Down-regulation by nuclear factor kappaB of human 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase promoter." Mol Endocrinol **18**(10): 2440-50.
- Ebert R, Schutze N, Adamski J and Jakob F (2006). "Vitamin D signaling is modulated on multiple levels in health and disease." Mol Cell Endocrinol.
- Ebert R, Vogelsang A, Mandery K, Seufert J and Jakob F (2006). Erbliche und erworbene Erkrankungen des Phosphatstoffwechsels. Osteologie. **15**(1): 33-42.
- Econs MJ and Drezner MK (1994). "Tumor-induced osteomalacia--unveiling a new hormone." N Engl J Med **330**(23): 1679-81.
- Etheridge SL, Spencer GJ, Heath DJ and Genever PG (2004). "Expression profiling and functional analysis of wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells." Stem Cells **22**(5): 849-60.
- Feng Han Q, Zhao W, Bentel J, Shearwood AM, Zeps N, Joseph D, Iacopetta B and Dharmarajan A (2006). "Expression of sFRP-4 and beta-catenin in human colorectal carcinoma." Cancer Lett **231**(1): 129-37.

- Fernandes I, Beliveau R, Friedlander G and Silve C (1999). "NaPO₄ cotransport type III (PiT1) expression in human embryonic kidney cells and regulation by PTH." Am J Physiol **277**(4 Pt 2): F543-51.
- Ferré FM, A.; Pezoli, A.; Griffin, S.; Buxton, E. and Boyer, V. (1994). Quantitative PCR: an overview. The Polymerase Chain Reaction. FFA-RAG K.B. Mullis. Boston, Birkhäuser: 67-88.
- Foley RN, Parfrey PS and Sarnak MJ (1998). "Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease." Am J Kidney Dis **32**(5 Suppl 3): S112-9.
- Fratzl-Zelman N, Fratzl P, Horandner H, Grabner B, Varga F, Ellinger A and Klaushofer K (1998). "Matrix mineralization in MC3T3-E1 cell cultures initiated by beta-glycerophosphate pulse." Bone **23**(6): 511-20.
- Freeman WM, Walker SJ and Vrana KE (1999). "Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential." Biotechniques **26**(1): 112-22, 124-5.
- Friedman EA (2005). "Consequences and management of hyperphosphatemia in patients with renal insufficiency." Kidney Int Suppl(95): S1-7.
- Fujita T, Izumo N, Fukuyama R, Meguro T, Nakamuta H, Kohno T and Koida M (2001). "Phosphate provides an extracellular signal that drives nuclear export of Runx2/Cbfa1 in bone cells." Biochem Biophys Res Commun **280**(1): 348-52.
- Gaasbeek A and Meinders AE (2005). "Hypophosphatemia: an update on its etiology and treatment." Am J Med **118**(10): 1094-101.
- Ganesh SK, Stack AG, Levin NW, Hulbert-Shearon T and Port FK (2001). "Association of elevated serum PO₄, Ca x PO₄ product, and parathyroid hormone with cardiac mortality risk in chronic hemodialysis patients." J Am Soc Nephrol **12**(10): 2131-8.
- Gentle A, Anastasopoulos F and McBrien NA (2001). "High-resolution semi-quantitative real-time PCR without the use of a standard curve." Biotechniques **31**(3): 502, 504-6, 508.
- Giachelli CM, Speer MY, Li X, Rajachar RM and Yang H (2005). "Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin." Circ Res **96**(7): 717-22.
- Gilchrest BA, Marshall WL, Karassik RL, Weinstein R and Maciag T (1984). "Characterization and partial purification of keratinocyte growth factor from the hypothalamus." J Cell Physiol **120**(3): 377-83.

- Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Juppner H, Kim CA, Keppler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR and Warman ML (2001). "LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development." Cell **107**(4): 513-23.
- Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider D, Wang Y, Chung J, Emerick A, Greaser L, Elashoff RM and Salusky IB (2000). "Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis." N Engl J Med **342**(20): 1478-83.
- Gossen M, Bonin AL and Bujard H (1993). "Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokaryotic regulatory elements." Trends Biochem Sci **18**(12): 471-5.
- Gossen M, Bonin AL, Freundlieb S and Bujard H (1994). "Inducible gene expression systems for higher eukaryotic cells." Curr Opin Biotechnol **5**(5): 516-20.
- Gossen M and Bujard H (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(12): 5547-51.
- Gossen M and Bujard H (2002). "Studying gene function in eukaryotes by conditional gene inactivation." Annu Rev Genet **36**: 153-73.
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W and Bujard H (1995). "Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells." Science **268**(5218): 1766-9.
- Gowen LC, Petersen DN, Mansolf AL, Qi H, Stock JL, Tkalcevic GT, Simmons HA, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, Ke HZ, McNeish JD and Brown TA (2003). "Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (OF45) results in increased bone formation and bone mass." J Biol Chem **278**(3): 1998-2007.
- Guicheux J, Palmer G, Shukunami C, Hiraki Y, Bonjour JP and Caverzasio J (2000). "A novel in vitro culture system for analysis of functional role of phosphate transport in endochondral ossification." Bone **27**(1): 69-74.

- Gupta A, Tenenhouse HS, Hoag HM, Wang D, Khadeer MA, Namba N, Feng X and Hruska KA (2001). "Identification of the type II Na(+)-Pi cotransporter (Npt2) in the osteoclast and the skeletal phenotype of Npt2^{-/-} mice." Bone **29**(5): 467-76.
- Haas M (2004). "Renal osteodystrophy." Wien Med Wochenschr **154**(5-6): 107-18.
- Harkin DP, Bean JM, Miklos D, Song YH, Truong VB, Englert C, Christians FC, Ellisen LW, Maheswaran S, Oliner JD and Haber DA (1999). "Induction of GADD45 and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1." Cell **97**(5): 575-86.
- Harris SA, Enger RJ, Riggs BL and Spelsberg TC (1995). "Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line." J Bone Miner Res **10**(2): 178-86.
- Hartel A, Didier A, Pfaffl MW and Meyer HH (2003). "Characterisation of gene expression patterns in 22RV1 cells for determination of environmental androgenic/antiandrogenic compounds." J Steroid Biochem Mol Biol **84**(2-3): 231-8.
- Hattenhauer O, Traebert M, Murer H and Biber J (1999). "Regulation of small intestinal Na-P(i) type IIb cotransporter by dietary phosphate intake." Am J Physiol **277**(4 Pt 1): G756-62.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ and Williams PM (1996). "Real time quantitative PCR." Genome Res **6**(10): 986-94.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G and Watson R (1993). "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions." Biotechnology (N Y) **11**(9): 1026-30.
- Hrzenjak A, Tippl M, Kremser ML, Strohmeier B, Guelly C, Neumeister D, Lax S, Moinfar F, Tabrizi AD, Isadi-Moud N, Zatloukal K and Denk H (2004). "Inverse correlation of secreted frizzled-related protein 4 and beta-catenin expression in endometrial stromal sarcomas." J Pathol **204**(1): 19-27.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S and Zumla A (2005). "Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations." Genes Immun **6**(4): 279-84.
- HYP Consortium (1995). "A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. The HYP Consortium." Nat Genet **11**(2): 130-6.

- Ichikawa S, Lyles KW and Econs MJ (2005). "A novel GALNT3 mutation in a pseudoautosomal dominant form of tumoral calcinosis: evidence that the disorder is autosomal recessive." J Clin Endocrinol Metab **90**(4): 2420-3.
- Jain A, Fedarko NS, Collins MT, Gelman R, Ankrom MA, Tayback M and Fisher LW (2004). "Serum levels of matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) in normal humans correlate with serum phosphorus, parathyroid hormone and bone mineral density." J Clin Endocrinol Metab **89**(8): 4158-61.
- Jakob F (1999). "[1,25(OH)₂-vitamin D₃. The vitamin D hormone]." Internist (Berl) **40**(4): W414-30.
- Jones A, Tzenova J, Frappier D, Crumley M, Roslin N, Kos C, Tieder M, Langman C, Proesmans W, Carpenter T, Rice A, Anderson D, Morgan K, Fujiwara T and Tenenhouse H (2001). "Hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria is not caused by mutations in the Na/Pi cotransporter NPT2 gene." J Am Soc Nephrol **12**(3): 507-14.
- Jones SE and Jomary C (2002). "Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns." Bioessays **24**(9): 811-20.
- Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H and Giachelli CM (2000). "Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification." Circ Res **87**(7): E10-7.
- Jonsson KB, Zahradnik R, Larsson T, White KE, Sugimoto T, Imanishi Y, Yamamoto T, Hampson G, Koshiyama H, Ljunggren O, Oba K, Yang IM, Miyauchi A, Econs MJ, Lavigne J and Juppner H (2003). "Fibroblast growth factor 23 in oncogenic osteomalacia and X-linked hypophosphatemia." N Engl J Med **348**(17): 1656-63.
- Kassem M (2004). "Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications." Cloning Stem Cells **6**(4): 369-74.
- Kavanaugh MP, Miller DG, Zhang W, Law W, Kozak SL, Kabat D and Miller AD (1994). "Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(15): 7071-5.
- Kawano Y and Kypta R (2003). "Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway." J Cell Sci **116**(Pt 13): 2627-34.
- Kestenbaum B, Sampson JN, Rudser KD, Patterson DJ, Seliger SL, Young B, Sherrard DJ and Andress DL (2005). "Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease." J Am Soc Nephrol **16**(2): 520-8.
- Ketteler M, Gross ML and Ritz E (2005). "Calcification and cardiovascular problems in renal failure." Kidney Int Suppl(94): S120-7.

- Kolek OI, Hines ER, Jones MD, LeSueur LK, Lipko MA, Kiela PR, Collins JF, Haussler MR and Ghishan FK (2005). "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 **289**(6): G1036-42.
- Laing CM, Toye AM, Capasso G and Unwin RJ (2005). "Renal tubular acidosis: developments in our understanding of the molecular basis." Int J Biochem Cell Biol **37**(6): 1151-61.
- Larsson T, Marsell R, Schipani E, Ohlsson C, Ljunggren O, Tenenhouse HS, Juppner H and Jonsson KB (2004). "Transgenic mice expressing fibroblast growth factor 23 under the control of the alpha1(I) collagen promoter exhibit growth retardation, osteomalacia, and disturbed phosphate homeostasis." Endocrinology **145**(7): 3087-94.
- Larsson T, Yu X, Davis SI, Draman MS, Mooney SD, Cullen MJ and White KE (2005). "A novel recessive mutation in fibroblast growth factor-23 causes familial tumoral calcinosis." J Clin Endocrinol Metab **90**(4): 2424-7.
- Lee P, Morley G, Huang Q, Fischer A, Seiler S, Horner JW, Factor S, Vaidya D, Jalife J and Fishman GI (1998). "Conditional lineage ablation to model human diseases." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(19): 11371-6.
- Lekanne Deprez RH, Fijnvandraat AC, Ruijter JM and Moorman AF (2002). "Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions." Anal Biochem **307**(1): 63-9.
- Li X, Yang HY and Giachelli CM (2006). "Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification." Circ Res **98**(7): 905-12.
- Lim SC, Tan CE, Aw TC, Khoo D, Eng P, Ho SC, Tai ES and Fok A (2000). "A man with osteoblastic metastasis and hypocalcaemia." Singapore Med J **41**(2): 74-6.
- Liu S, Guo R, Simpson LG, Xiao ZS, Burnham CE and Quarles LD (2003). "Regulation of fibroblastic growth factor 23 expression but not degradation by PHEX." J Biol Chem **278**(39): 37419-26.
- Liu TH, Raval A, Chen SS, Matkovic JJ, Byrd JC and Plass C (2006). "CpG island methylation and expression of the secreted frizzled-related protein gene family in chronic lymphocytic leukemia." Cancer Res **66**(2): 653-8.
- Liu W and Saint DA (2002). "A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics." Anal Biochem **302**(1): 52-9.

- Livak KJ (1997). "ABI Prism 7700 Sequence Detection System, User Bulletin 2." PE Applied Biosystems, Foster City, CA.
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-8.
- Lomri A, Fromigue O, Hott M and Marie PJ (1999). "Genomic insertion of the SV-40 large T oncogene in normal adult human trabecular osteoblastic cells induces cell growth without loss of the differentiated phenotype." Calcif Tissue Int **64**(5): 394-401.
- Lumbroso S, Paris F and Sultan C (2004). "Activating Gsalpha mutations: analysis of 113 patients with signs of McCune-Albright syndrome--a European Collaborative Study." J Clin Endocrinol Metab **89**(5): 2107-13.
- Malluche H and Faugere MC (1990). "Renal bone disease 1990: an unmet challenge for the nephrologist." Kidney Int **38**(2): 193-211.
- Mansfield K, Rajpurohit R and Shapiro IM (1999). "Extracellular phosphate ions cause apoptosis of terminally differentiated epiphyseal chondrocytes." J Cell Physiol **179**(3): 276-86.
- Meleti Z, Shapiro IM and Adams CS (2000). "Inorganic phosphate induces apoptosis of osteoblast-like cells in culture." Bone **27**(3): 359-66.
- Miramis M, Robinson BG, Mason RS and Nelson AE (2004). "Bone as a source of FGF23: regulation by phosphate?" Bone **35**(5): 1192-9.
- Mizobuchi M, Ogata H, Hatamura I, Koiwa F, Saji F, Shiizaki K, Negi S, Kinugasa E, Ooshima A, Koshikawa S and Akizawa T (2006). "Up-regulation of Cbfa1 and Pit-1 in calcified artery of uraemic rats with severe hyperphosphataemia and secondary hyperparathyroidism." Nephrol Dial Transplant **21**(4): 911-6.
- Morrison TB, Weis JJ and Wittwer CT (1998). "Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification." Biotechniques **24**(6): 954-8, 960, 962.
- Muller PY, Janovjak H, Miserez AR and Dobbie Z (2002). "Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR." Biotechniques **32**(6): 1372-4, 1376, 1378-9.
- Mullis KB (1990). "The unusual origin of the polymerase chain reaction." Sci Am **262**(4): 56-61, 64-5.

- Nampe A, Hashimoto J, Hayashida K, Tsuboi H, Shi K, Tsuji I, Miyashita H, Yamada T, Matsukawa N, Matsumoto M, Morimoto S, Ogihara T, Ochi T and Yoshikawa H (2004). "Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is highly expressed in osteocytes in human bone." J Bone Miner Metab **22**(3): 176-84.
- Noth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG and Tuan RS (2002). "Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells." J Orthop Res **20**(5): 1060-9.
- Nusse R (2005). "Cell biology: relays at the membrane." Nature **438**(7069): 747-9.
- Palmer G, Bonjour JP and Caverzasio J (1997). "Expression of a newly identified phosphate transporter/retrovirus receptor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and its regulation by insulin-like growth factor I." Endocrinology **138**(12): 5202-9.
- Palmer G, Zhao J, Bonjour J, Hofstetter W and Caverzasio J (1999). "In vivo expression of transcripts encoding the Glvr-1 phosphate transporter/retrovirus receptor during bone development." Bone **24**(1): 1-7.
- Peirson SN, Butler JN and Foster RG (2003). "Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis." Nucleic Acids Res **31**(14): e73.
- Perwad F, Azam N, Zhang MY, Yamashita T, Tenenhouse HS and Portale AA (2005). "Dietary and serum phosphorus regulate fibroblast growth factor 23 expression and 1,25-dihydroxyvitamin D metabolism in mice." Endocrinology **146**(12): 5358-64.
- Pfaffl MW (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Pfaffl MW, Hageleit, M. (2001). "Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR." Biotechnol Lett **23**: 275-282.
- Pfaffl MW, Horgan GW and Dempfle L (2002). "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." Nucleic Acids Res **30**(9): e36.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C and Neuvians TP (2004). "Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations." Biotechnol Lett **26**(6): 509-15.

- Prie D, Beck L, Friedlander G and Silve C (2004). "Sodium-phosphate cotransporters, nephrolithiasis and bone demineralization." Curr Opin Nephrol Hypertens **13**(6): 675-81.
- Prie D, Beck L, Urena P and Friedlander G (2005). "Recent findings in phosphate homeostasis." Curr Opin Nephrol Hypertens **14**(4): 318-24.
- Prie D, Huart V, Bakouh N, Planelles G, Dellis O, Gerard B, Hulin P, Benque-Blanchet F, Silve C, Grandchamp B and Friedlander G (2002). "Nephrolithiasis and osteoporosis associated with hypophosphatemia caused by mutations in the type 2a sodium-phosphate cotransporter." N Engl J Med **347**(13): 983-91.
- Prindull G (2005). "Hypothesis: cell plasticity, linking embryonal stem cells to adult stem cell reservoirs and metastatic cancer cells?" Exp Hematol **33**(7): 738-46.
- Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R and Wenstrup RJ (1992). "Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development." J Bone Miner Res **7**(6): 683-92.
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH and Moorman AF (2003). "Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data." Neurosci Lett **339**(1): 62-6.
- Reese DM and Rosen PJ (1997). "Oncogenic osteomalacia associated with prostate cancer." J Urol **158**(3 Pt 1): 887.
- Riminucci M, Collins MT, Fedarko NS, Cherman N, Corsi A, White KE, Waguespack S, Gupta A, Hannon T, Econs MJ, Bianco P and Gehron Robey P (2003). "FGF-23 in fibrous dysplasia of bone and its relationship to renal phosphate wasting." J Clin Invest **112**(5): 683-92.
- Ririe KM, Rasmussen RP and Wittwer CT (1997). "Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction." Anal Biochem **245**(2): 154-60.
- Ritz E (2005). "The clinical management of hyperphosphatemia." J Nephrol **18**(3): 221-8.
- Ritz E, Haxsen V and Zeier M (2003). "Disorders of phosphate metabolism--pathomechanisms and management of hypophosphataemic disorders." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **17**(4): 547-58.
- Rowe PS, de Zoysa PA, Dong R, Wang HR, White KE, Econs MJ and Oudet CL (2000). "MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia." Genomics **67**(1): 54-68.

- Rowe PS, Kumagai Y, Gutierrez G, Garrett IR, Blacher R, Rosen D, Cundy J, Navvab S, Chen D, Drezner MK, Quarles LD and Mundy GR (2004). "MEPE has the properties of an osteoblastic phosphatonin and minihabin." Bone **34**(2): 303-19.
- Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA (1986). "Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes." Nature **324**(6093): 163-6.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA and Arnheim N (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science **230**(4732): 1350-4.
- Saito H, Kusano K, Kinosaki M, Ito H, Hirata M, Segawa H, Miyamoto K and Fukushima N (2003). "Human fibroblast growth factor-23 mutants suppress Na⁺-dependent phosphate co-transport activity and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ production." J Biol Chem **278**(4): 2206-11.
- Sax L (2001). "The institute of medicine's "dietary reference intake" for phosphorus: a critical perspective." J Am Coll Nutr **20**(4): 271-8.
- Schiavi SC and Kumar R (2004). "The phosphatonin pathway: new insights in phosphate homeostasis." Kidney Int **65**(1): 1-14.
- Schmittgen TD and Zakrajsek BA (2000). "Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR." J Biochem Biophys Methods **46**(1-2): 69-81.
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ and Reed MW (2000). "Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods." Anal Biochem **285**(2): 194-204.
- Segawa H, Kaneko I, Yamanaka S, Ito M, Kuwahata M, Inoue Y, Kato S and Miyamoto K (2004). "Intestinal Na-P(i) cotransporter adaptation to dietary P(i) content in vitamin D receptor null mice." Am J Physiol Renal Physiol **287**(1): F39-47.
- Seufert J, Ebert K, Muller J, Eulert J, Hendrich C, Werner E, Schutze N, Schulz G, Kenn W, Richtmann H, Palitzsch KD and Jakob F (2001). "Octreotide therapy for tumor-induced osteomalacia." N Engl J Med **345**(26): 1883-8.
- Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S and Yamashita T (2001). "Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 6500-5.

- Shimada T, Urakawa I, Yamazaki Y, Hasegawa H, Hino R, Yoneya T, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S and Yamashita T (2004). "FGF-23 transgenic mice demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type IIa." Biochem Biophys Res Commun **314**(2): 409-14.
- Silver J and Bushinsky D (2004). "Harnessing the parathyroids to create stronger bones." Curr Opin Nephrol Hypertens **13**(4): 471-6.
- Silver J, Moallem E, Epstein E, Kilav R and Naveh-Many T (1994). "New aspects in the control of parathyroid hormone secretion." Curr Opin Nephrol Hypertens **3**(4): 379-85.
- Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, Justesen J, Stenderup K, Rattan SI, Jensen TG and Kassem M (2002). "Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells." Nat Biotechnol **20**(6): 592-6.
- Skern R, Frost P and Nilsen F (2005). "Relative transcript quantification by quantitative PCR: roughly right or precisely wrong?" BMC Mol Biol **6**(1): 10.
- Slatopolsky E, Brown A and Dusso A (1999). "Pathogenesis of secondary hyperparathyroidism." Kidney Int Suppl **73**: S14-9.
- Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G and Giachelli CM (2001). "Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers." Circ Res **89**(12): 1147-54.
- Surendran K, Schiavi S and Hruska KA (2005). "Wnt-dependent beta-catenin signaling is activated after unilateral ureteral obstruction, and recombinant secreted frizzled-related protein 4 alters the progression of renal fibrosis." J Am Soc Nephrol **16**(8): 2373-84.
- Suzuki A, Palmer G, Bonjour JP and Caverzasio J (2001). "Stimulation of sodium-dependent inorganic phosphate transport by activation of Gi/o-protein-coupled receptors by epinephrine in MC3T3-E1 osteoblast-like cells." Bone **28**(6): 589-94.
- Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, Schuebel KE, Markowitz SD, Chen WD, Pretlow TP, Yang B, Akiyama Y, Van Engeland M, Toyota M, Tokino T, Hinoda Y, Imai K, Herman JG and Baylin SB (2004). "Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer." Nat Genet **36**(4): 417-22.

- Takeda E, Yamamoto H, Nashiki K, Sato T, Arai H and Taketani Y (2004). "Inorganic phosphate homeostasis and the role of dietary phosphorus." J Cell Mol Med **8**(2): 191-200.
- Tatsumi S, Segawa H, Morita K, Haga H, Kouda T, Yamamoto H, Inoue Y, Nii T, Katai K, Taketani Y, Miyamoto KI and Takeda E (1998). "Molecular cloning and hormonal regulation of PiT-1, a sodium-dependent phosphate cotransporter from rat parathyroid glands." Endocrinology **139**(4): 1692-9.
- Tenenbaum HC, Limeback H, McCulloch CA, Mamujee H, Sukhu B and Torontali M (1992). "Osteogenic phase-specific co-regulation of collagen synthesis and mineralization by beta-glycerophosphate in chick periosteal cultures." Bone **13**(2): 129-38.
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A and Heinen E (1999). "Housekeeping genes as internal standards: use and limits." J Biotechnol **75**(2-3): 291-5.
- Tichopad A, Dilger M, Schwarz G and Pfaffl MW (2003). "Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up." Nucleic Acids Res **31**(20): e122.
- Topaz O, Shurman DL, Bergman R, Indelman M, Ratajczak P, Mizrachi M, Khamaysi Z, Behar D, Petronius D, Friedman V, Zelikovic I, Raimer S, Metzker A, Richard G and Sprecher E (2004). "Mutations in GALNT3, encoding a protein involved in O-linked glycosylation, cause familial tumoral calcinosis." Nat Genet **36**(6): 579-81.
- Vaananen HK (2005). "Mesenchymal stem cells." Ann Med **37**(7): 469-79.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A and Speleman F (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." Genome Biol **3**(7): RESEARCH0034.
- Virkki LV, Forster IC, Hernando N, Biber J and Murer H (2003). "Functional characterization of two naturally occurring mutations in the human sodium-phosphate cotransporter type IIa." J Bone Miner Res **18**(12): 2135-41.
- Wada K, Mizuno M, Komori T and Tamura M (2004). "Extracellular inorganic phosphate regulates gibbon ape leukemia virus receptor-2/phosphate transporter mRNA expression in rat bone marrow stromal cells." J Cell Physiol **198**(1): 40-7.

- White KE, Jonsson KB, Carn G, Hampson G, Spector TD, Mannstadt M, Lorenz-Depiereux B, Miyauchi A, Yang IM, Ljunggren O, Meitinger T, Strom TM, Juppner H and Econs MJ (2001). "The autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) gene is a secreted polypeptide overexpressed by tumors that cause phosphate wasting." J Clin Endocrinol Metab **86**(2): 497-500.
- White KE, Larsson TM and Econs MJ (2006). "The Roles of Specific Genes Implicated as Circulating Factors Involved in Normal and Disordered Phosphate Homeostasis: Frp-4, MEPE, and FGF23." Endocr Rev.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA and Rasmussen RP (1997). "Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification." Biotechniques **22**(1): 130-1, 134-8.
- Wong ML and Medrano JF (2005). "Real-time PCR for mRNA quantitation." Biotechniques **39**(1): 75-85.
- Xu H, Bai L, Collins JF and Ghishan FK (1999). "Molecular cloning, functional characterization, tissue distribution, and chromosomal localization of a human, small intestinal sodium-phosphate (Na⁺-Pi) transporter (SLC34A2)." Genomics **62**(2): 281-4.
- Yamamoto T, Imanishi Y, Kinoshita E, Nakagomi Y, Shimizu N, Miyauchi A, Satomura K, Koshiyama H, Inaba M, Nishizawa Y, Juppner H and Ozono K (2005). "The role of fibroblast growth factor 23 for hypophosphatemia and abnormal regulation of vitamin D metabolism in patients with McCune-Albright syndrome." J Bone Miner Metab **23**(3): 231-7.
- Yamashita T, Yoshioka M and Itoh N (2000). "Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain." Biochem Biophys Res Commun **277**(2): 494-8.
- Yin DX, Zhu L and Schimke RT (1996). "Tetracycline-controlled gene expression system achieves high-level and quantitative control of gene expression." Anal Biochem **235**(2): 195-201.
- Yu X, Sabbagh Y, Davis SI, Demay MB and White KE (2005). "Genetic dissection of phosphate- and vitamin D-mediated regulation of circulating Fgf23 concentrations." Bone **36**(6): 971-7.
- Yu X and White KE (2005). "Fibroblast growth factor 23 and its receptors." Ther Apher Dial **9**(4): 308-12.
- Zhang J and Byrne CD (1999). "Differential priming of RNA templates during cDNA synthesis markedly affects both accuracy and reproducibility of quantitative competitive reverse-transcriptase PCR." Biochem J **337** (Pt 2): 231-41.

- Zoidis E, Ghirlanda-Keller C, Gosteli-Peter M, Zapf J and Schmid C (2004). "Regulation of phosphate (Pi) transport and NaPi-III transporter (Pit-1) mRNA in rat osteoblasts." J Endocrinol **181**(3): 531-40.
- Zou H, Molina JR, Harrington JJ, Osborn NK, Klatt KK, Romero Y, Burgart LJ and Ahlquist DA (2005). "Aberrant methylation of secreted frizzled-related protein genes in esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus." Int J Cancer **116**(4): 584-91.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: mRNA-Quantifizierung mittels quantitativer real-time-PCR	30
Abbildung 2: Phasen der PCR Reaktion.....	33
Abbildung 3: Grundprinzip des Tet-On™ Konstruktes.....	41
Abbildung 4: Tet-On™ Konstrukt.....	42
Abbildung 5: Prinzip der Phosphat-Stimulation bei Versuchsansatz 5 mM.....	51
Abbildung 6: Beispiel für lineare Darstellung der Fluoreszenz-Rohdaten	55
Abbildung 7: Beispiel für halblogarithmische Darstellung.....	55
Abbildung 8: Phosphattransporter bei hMSC-TERT-Zellen.....	63
Abbildung 9: Pit-1-Expression nach Phosphat-Stimulation mit 5 mM.....	64
Abbildung 10: sFRP4-Expression nach Phosphat-Stimulation mit 5 mM	65
Abbildung 11: Beispiel für Melting Curve, sFRP4 bei hMSC-TERT und hFOB II	67
Abbildung 12: hMSC-TERT, 5 mM, E=2, Referenz: EF1α	73
Abbildung 13: hMSC-TERT, 5 mM, korrigierte Effizienz, Referenz: EF1α	73
Abbildung 14: hMSC-TERT, 24 h, E=2, Referenz: EF1α	74
Abbildung 15: hMSC-TERT, 24 h, korrigierte Effizienz, Referenz: EF1α	75
Abbildung 16: hMSC-TERT, 48 h, E=2, Referenz: EF1α	76
Abbildung 17: hMSC-TERT, 48 h, korrigierte Effizienz, Referenz: EF1α	77
Abbildung 18: hMSC-TERT, 24 h unter 5 mM, Referenz EF1α, korrigierte Effizienz ...	78
Abbildung 19: hMSC-TERT, 48 h unter 5 mM, Referenz EF1α, korrigierte Effizienz ...	79
Abbildung 20: hMSC-TERT, 24 h und 48 h, korrigierte Effizienz, Referenz EF1α	80
Abbildung 21: hFOB, 5 mM, E=2, Referenz: Aktin	81
Abbildung 22: hFOB, 5 mM, korrigierte Effizienz, Referenz: Aktin	82
Abbildung 23: hFOB, 24 h, E=2, Referenz: Aktin	83
Abbildung 24: hFOB, 24 h, korrigierte Effizienz, Referenz: Aktin	83
Abbildung 25: hFOB, 48 h, E=2, Referenz: Aktin	84
Abbildung 26: hFOB, 48 h, korrigierte Effizienz, Referenz: Aktin	85
Abbildung 27: hFOB, 24 h unter 5 mM, Referenz Aktin, korrigierte Effizienz	86
Abbildung 28: hFOB, 48 h unter 5 mM, Referenz Aktin, korrigierte Effizienz	86
Abbildung 29: hFOB, 24 h und 48 h-Proben, korrigierte Effizienz, Referenz Aktin	87
Abbildung 30: hMSC-TERT-Zellen mit EGFP-N1-Vektor im Fluoreszenzmikroskop ...	88
Abbildung 31: Klon 18 – Induzierbarkeit durch Doxycyclin.....	89
Abbildung 32: (Poly-) Klon 21 - Induzierbarkeit durch Doxycyclin	90
Abbildung 33: Isolierung der DNA-Fragmente von sFRP4	92
Abbildung 34: real-time-PCR – Exponential-Phase versus Plateau-Phase.....	107

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beeinflussende Faktoren der renalen Phosphatrückresorption	7
Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide	47
Tabelle 3: PCR-Bedingungen	53
Tabelle 4: Variationskoeffizienten der Ct-Werte	69
Tabelle 5: PCR-Effizienzen.....	70
Tabelle 6: Analyse der Ct-Werte der Referenz-Gene.....	71
Tabelle 7: Mutationen der sFRP4-Klone aus Tumor und hMSC-TERT-Zellen.....	93

Formelverzeichnis

Formel 1: Reaktionskinetik der Reversen Transkription	32
Formel 2: Exponentielle Reaktionskinetik der PCR	33
Formel 3: Effizienz der PCR-Reaktion	34
Formel 4: Berechnung des Expressionsverhältnisses in REST®	39

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Franz Jakob danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung dieser Arbeit auf seine freundliche und menschliche Art. Herrn Prof. Walter Sebald möchte ich für die Bereitschaft danken, die Rolle des Koreferenten zu übernehmen.

Bei Dr. Regina Ebert bedanke ich mich herzlich dafür, dass sie mich und diese Arbeit engagiert und freundschaftlich betreut hat, jederzeit für meine Fragen ansprechbar war und nicht zuletzt durch ihre raschen Rückmeldungen zum erfolgreichen Abschluss beigetragen hat. Mein besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern im Labor des Zentrums für Muskuloskelettale Forschung, Frau Doris Schneider, Frau Sabine Zeck und Frau Jutta Meißner-Weigl. Sie haben mich wohlwollend aufgenommen und bereitwillig in die praktischen Seiten des Laboralltags eingearbeitet. Ebenso möchte ich Frau Monika Hofmann und Frau Martina Regensburger für ihre hilfsbereite Art danken.

Herrn Mathias Müller danke ich für seine konstruktiven und fundierten Anregungen zur Statistik sowie seine kompetente und bereitwillige Hilfe bei jeglichen EDV-Fragen und Problemen.

Dem Cusanuswerk danke ich insbesondere für die ideelle Förderung während meiner Studienzeit, die ich als große Bereicherung erlebt habe.

Für ihre Unterstützung und Begleitung bedanke ich mich herzlich bei Martina Boos und allen Freunden, die während dieser Zeit Wegbegleiter waren.

Meinen Eltern, die mir diesen Weg und dieses Leben ermöglicht haben, und ebenso meinem Bruder Benedikt gilt mein abschließender und auch wichtigster Dank für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung, auf die ich jederzeit bauen und vertrauen kann.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Sebastian Kuhnen

* 02. Dezember 1975

in Neuwied/Rhein

Promotion

2002-2006 Orthopädisches Zentrum für Muskuloskelettale Forschung,
Universität Würzburg, Prof. Dr. Franz Jakob

Hochschulausbildung

Studium

1997-2005 Studium der Humanmedizin,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

06/2005 Ärztliche Prüfung

06/2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

04/2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

03/2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

05/1999 Ärztliche Vorprüfung

Praktisches Jahr

ab 12/2004 Pädiatrie, Universitäts-Kinderklinik Würzburg

ab 08/2004 Innere, Hôpital Riviera, Vevey, Université de Genève, Schweiz

ab 04/2004 Chirurgie, Missionsärztliche Klinik, Würzburg

Stipendium

1999-2005 Stipendiat des Cusanuswerkes, Bischöfliche Studienförderung

Zivildienst

1995-1996 Ausbildung zum Rettungssanitäter, Tätigkeit im Rettungsdienst
Deutsches Rotes Kreuz, Kreisverband Koblenz-Stadt

Schulbildung

1995 Allgemeine Hochschulreife

Würzburg, September 2006

Sebastian Kuhnen