

Abteilung für Unfallchirurgie
des Klinikums rechts der Isar
der Technischen Universität München

**Veränderungen im TGF- β -Signalweg und
Vitamin D-Stoffwechsel bei Patienten mit
hepatischer Osteodystrophie**

Christian Richard Litzka

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. E. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. A. K. Nüssler (Eberhard Karls Universität Tübingen)
2. Univ.- Prof. Dr. P. Biberthaler

Die Dissertation wurde am 30.04.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.06.2015 angenommen.

Gewidmet meinen Eltern *Peter* und *Roswitha Litzka*

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die menschliche Leber	1
1.1.1 Makro- und mikroskopische Morphologie der Leber	1
1.1.2 Funktion der Leber	3
1.1.3 Die Leberzirrhose	3
1.2 Der menschliche Knochen	6
1.2.1 Makro- und mikroskopische Morphologie des Knochens	6
1.2.2 Funktion des Knochens	9
1.2.3 Auf- und Umbau des Knochens: Das Modeling	9
1.2.4 Frakturheilung und Regeneration	10
1.2.5 Die Osteoporose	11
1.2.6 Die hepatische Osteodystrophie	12
1.3 Die Transforming growth factor- β Familie	13
1.3.1 Intrazelluläre Signaltransduktion	13
1.3.2 Bedeutung im Organismus	15
1.4 Der Vitamin D Stoffwechsel	16
1.4.1 Die endogene Vitamin D Synthese	16
1.4.2 Bedeutung für den humanen Organismus	18
2. Zielsetzung	20
3. Materialien	21
3.1 Herkunft des verwendeten Gewebes und Einverständniserklärung	21

3.2	Patientenkollektiv	21
3.3	Gerätschaften und Hilfsmittel	22
3.4	Chemikalien	23
3.4.1	<i>Zellkultur und Enzymaktivitätsmessung</i>	23
3.4.2	<i>Histologische Färbung</i>	23
3.4.3	<i>RNA-Isolation und cDNA-Synthese</i>	24
3.4.4	<i>ELISA</i>	24
3.4.5	<i>PCR Primer</i>	25
4.	Methoden.....	26
4.1	Kultivierung von TGF- β Reporterzellen	26
4.2	Humanes Blut	26
4.2.1	<i>Serumdiagnostik</i>	26
4.2.2	<i>Gewinnung von Serum aus Blutproben</i>	29
4.2.3	<i>Bestimmung der TGF-β Konzentration im Serum</i>	29
4.3	Histologische Untersuchung humanen Lebergewebes	31
4.3.1	<i>Prinzip einer histologischen Untersuchung</i>	31
4.3.2	<i>Erstellung von Gewebeschnitten</i>	31
4.3.3	<i>Färbungen</i>	32
4.3.4	<i>Beurteilung</i>	35
4.4	Isolation von RNA	37
4.4.1	<i>Prinzip und Durchführung der RNA-Isolation</i>	37
4.4.2	<i>Konzentrationsbestimmung und Integritäts-Check</i>	38
4.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39

4.5.1	<i>Prinzip der PCR</i>	39
4.5.2	<i>Durchführung der cDNA-Synthese</i>	41
4.5.3	<i>Durchführung der Genamplifikation</i>	42
4.5.4	<i>Gelelektrophorese und densitometrische Analyse</i>	42
4.6	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	43
4.6.1	<i>Prinzip eines ELISAs</i>	43
4.6.2	<i>Bestimmung der Serumkonzentration von 25-Hydroxy-Vitamin D</i>	43
4.6.3	<i>Bestimmung der Serumkonzentration von Sclerostin</i>	44
4.7	Knochendichtemessung	44
4.7.1	<i>Prinzip der Knochendichtebestimmung</i>	44
4.7.2	<i>Klassifikation – der BMD-Wert und T-Score</i>	45
5.	Statistische Auswertung.....	46
6.	Ergebnisse	47
6.1	Patienten mit Leberzirrhose haben eine schlechte Knochendichte	47
6.2	Die TGF- β -Serumkonzentration ist bei Zirrhose-Patienten erhöht	49
6.3	Ergebnisse der PCRs	50
6.3.1	<i>Die Leberzirrhose hat keinen Einfluss auf die hepatische Genexpression der Regulatorproteine smurf 1, smurf 2, SARA, Ski und SnoN</i>	50
6.3.2	<i>Osteopontin, Osteocalcin, Osteonectin, RANKL und TNFα können in Lebergewebe nachgewiesen werden, sind bei Zirrhose aber nicht reguliert</i>	51
6.3.3	<i>Die Genexpression von Osteoprotegerin ist in Lebergewebe nachweisbar und dort bei Zirrhose herabreguliert</i>	53
6.3.4	<i>Die Genexpression des Vitamin D-bindenden Proteins ist in zirrhotischer Leber herabreguliert</i>	54

6.3.5	<i>Die hepatische Genexpression von CYP2R1 zeigt bei Leberzirrhose keine Änderung</i>	55
6.3.6	<i>Die Genexpression von DHCR7 erfährt in zirrhotischem Lebergewebe eine Regulation nach oben</i>	56
6.3.7	<i>Die Genexpression von CYP27A1 ist in zirrhotischem Lebergewebe herabreguliert</i>	57
6.4	ELISA	58
6.4.1	<i>Die Konzentration von 25-Hydroxy-Vitamin D ist im Serum zirrhotischer Patienten erniedrigt</i>	58
6.4.2	<i>Die Sclerostin-Serumkonzentration ist bei Leberzirrhose erhöht</i>	59
7.	Diskussion	60
8.	Ausblick.....	74
9.	Zusammenfassung.....	76
10.	Literaturverzeichnis.....	78
11.	Abbildungsverzeichnis	86
12.	Tabellenverzeichnis.....	88
13.	Danksagung.....	90

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
4-NPP	4-Nitrophenylphosphat
ALAT	Alanin-Aminotransferase
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ASH	Alkoholische steatosis hepatis
ATP	Adenosintriphosphat
BAMBI	BMP and Activin membrane-bound inhibitor
Bidest.	Doppelt destilliert
BMD	Bone mineral density
BMI	Body-Mass-Index
BMP	Bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
BWK	Brustwirbelkörper
ca.	Circa
Ca ²⁺	Calcium
Ca ₅ [PO ₄] ₃ OH	Calciumhydroxylapatit
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
cm ₂	Kubikzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
CYP	Cytochrom P
CYP27A1	Cytochrom P 450 27A1
CYP2R1	Cytochrom P 450 2R1
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DBP	Vitamin D bindendes Protein
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethyldicarbonat
Dest.	Destilliert
DEXA	Dual-energy X-ray absorptiometry

dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DHCR7	7-Dehydrocholesterolreduktase
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GC	Kodierendes Gen für DBP
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h	Stunde
H.E.	Hämatoxylin Eosin
H ₂ O	Wasser
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
INR	International normalized ratio
kg	Kilogramm
Konz.	Konzentration
l	Liter
λ	Wellenlänge
LDL	Low density lipoprotein
LWK	Lendenwirbelkörper
M	Molar
MFB-F11	Mausfibroblasten F-11
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
Mio.	Million

ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
N	Probenzahl
NASH	Nicht-alkoholische steatosis hepatis
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OPG	Osteoprotegerin
P	Primer
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pg	Pikogramm
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PTH	Parathormon
PTHR1	Parathormonrezeptor 1
pUC19	Plasmid University of California 19
QCT	Quantitative Computertomographie
RANK	Receptor Activator of NF-κB
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
rh	Rekombinant human
rT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
S	Svedberg
SARA	Smad anchor for receptor activation
SD	Standartabweichung
SEAP	Secreted alkaline phosphatase
Ski	Sloan-Kettering Institute proto-oncogene
Smurf 1/2	Smad ubiquitination regulatory factor 1/2
SnoN	Ski-related novel gene N
Sost	Kodierendes Gen von Sclerostin
taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer

T β RI/II	TGF- β Rezeptor Typ I/II
Temp.	Temperatur
TGF- β	Transforming growth factor- β
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V.	Vena
VDR	Vitamin D Rezeptor
Vergr.	Vergrößerung
VLDL	Very low density lipoprotein
μ g	Mikrogramm
μ m	Mikrometer

1. Einleitung

1.1 Die menschliche Leber

1.1.1 Makro- und mikroskopische Morphologie der Leber

Die Leber eines gesunden Erwachsenen wiegt zwischen 1200 und 1500 g und ist im rechten Oberbauch lokalisiert. Hier liegt sie dem Zwerchfell von unten an. Strukturell gliedert sie sich in den Lobus dexter und sinister, sowie die beiden kleineren Lobi quadratus und caudatus. Durch Blutgefäße, die durch die Leber ziehen, teilen sich diese vier Lappen nochmals in insgesamt acht Segmente auf. Die Leber ist ein reich durchblutetes Organ und erhält ca. 25% des Herz-Minuten-Volumens. Dieses Blut stammt aus zwei Stromgebieten: 25% arterielles Blut, über die Arteria hepatica aus dem Truncus coeliacus und 75% venöses Blut, das hauptsächlich aus dem Gastrointestinaltrakt stammt und in die Leber über die Pfortader fließt. Der venöse Abfluss ist direkt in die Vena cava inferior gewährleistet. Zentrale Ein- und Austrittsstelle für Gefäße ist die Leberpforte. Durch sie ziehen die Arteria hepatica propria, die Vena portae, sowie der Ductus choledochus [Lippert, 2006, S.322ff; Renz-Polster et al., 2008, S.657ff].

Hepatozyten, Kupffer-Zellen und hepatischen Sternzellen (Ito-Zellen) stellen die leberspezifischen Zellen dar. Hepatozyten sind mehrkernige, polar angeordnete Epithelzellen mit einem Durchmesser von ca. 25 µm. Sie bilden die anatomische Baueinheit des Organs, die ca. 1-1,5 Millionen Leberläppchen, und damit das Leberparen-

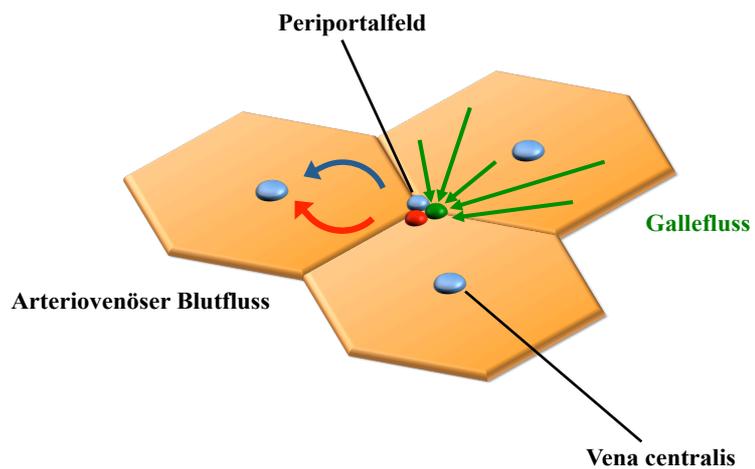


Abbildung 1 Mikroskopische Leberarchitektur – anatomisch, nach Welsch Lehrbuch Histologie, 2006, S.391

chym aus (Abbildung 1). Im Zentrum eines solchen oft hexagonförmigen Läppchens befindet sich ein Blutgefäß: die Vena centralis. Jeweils drei Leberläppchen umschließen an ihrem Berührungspunkt das sog. Periportalfeld, mit der Glisson-Trias aus Pfor-

taderast, kleiner Arterie und Gallengang. Durchzogen werden die Läppchen von den Sinusoiden, die lückenhaft von Endothelzellen ausgekleidete Blutgefäße darstellen. Durch sie strömt arterio-venöses Mischblut aus den Periportalfeldern in die Vena centralis. In entgegen gesetzter Richtung fließt von den Hepatozyten produzierte Galle in Gallekanälchen und mündet im Periportalfeld in die größeren Gallengänge. Zwischen den Gallekanälchen und den Sinusoiden liegen die Hepatozyten, wobei noch eine schmale Lücke zwischen ihnen und den Endothelzellen der Sinusoide besteht: der dem Stoffaustausch dienende Disse-Raum. Entsprechend der entgegen gesetzten Blut- und Galleströme gliedert sich die Leber in funktioneller Hinsicht nicht in Läppchen, sondern in die so genannten Azini. Dabei entspricht ein Azinus der Raute zwischen zwei Periportalfeldern und zwei Zentralvenen (Abbildung 2). Diese Einteilung ist wichtig für das Verständnis des typischen Schädigungsmusters der Leber: In der Achse zwischen den Periportalfeldern herrscht hohes Sauerstoff- aber auch hohes Substratangebot. Daher birgt dieser Bereich eine Anfälligkeit gegenüber Toxinen. Die Region um

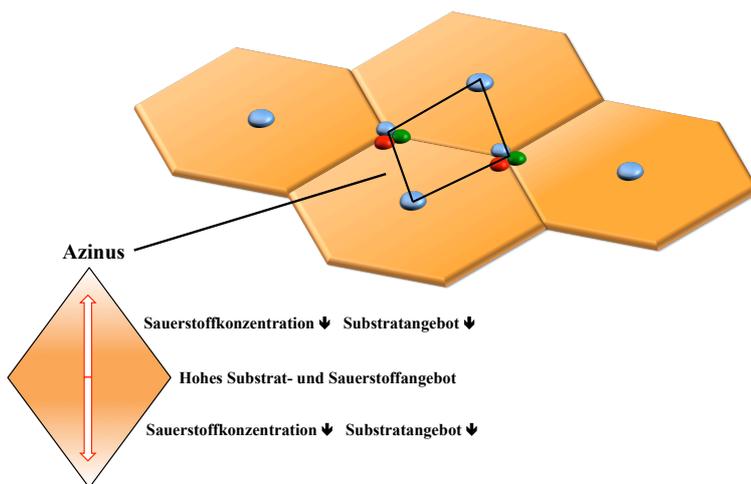


Abbildung 2 Mikroskopische Leberarchitektur – funktionell, nach Welsch
Lehrbuch Histologie, 2006, S. 391

die Zentralvenen in den Spitzen der Raute erhält nur noch wenig Sauerstoff und ist deswegen weniger durch Toxine, als durch Hypoxie gefährdet. Die Kupffer-Zellen sind als Teil des Monozyten-Makrophagen-Systems anzusehen und liegen in der Wand der Sinusoide. Ito-Zellen sind fibroblastenähnliche, sternförmige Zellen im Disse-Raum. Im Ruhezustand dienen sie als Vitamin A-Speicher. Werden sie im Rahmen pathologischer Vorgänge aktiviert, sind sie wesentlich für die Fibrogenese der Leber verantwortlich [Welsch, 2006, S.387ff; Rentz-Polster et al., 2008, S.657ff].

1.1.2 Funktion der Leber

Die Funktion der Leber ist vielschichtig und für den Organismus lebenswichtig. Im Nähr- und Energiestoffwechsel trägt sie eine zentrale Rolle. So ist sie mit der Glykolyse, Gluconeogenese und Glykogensynthese wesentlich an der Blutzuckerregulation beteiligt, beherbergt den Abbau- und Synthesort fast aller Proteine (Albumin, Gerinnungsfaktoren, akute Phase Proteine, Transportproteine, etc.) und steuert mit der Aufnahme und Abgabe von Lipoproteinen, sowie der Fettsäuresynthese und Lipolyse den Fettstoffwechsel. Mit der Galleproduktion ermöglicht sie überhaupt erst die Fettverdauung. Sie ist auch wesentliches Speicherorgan vieler Stoffe. Im Schnitt finden sich in einer humanen Leber 80 g eingespeichertes Glykogen, ferner Fette in Form von Triglyceriden und die Vitamine A, E, B₁₂ und D. Für Vitamin D stellt die Leber zudem eine wichtige Station in der endogenen Synthese dar. Ein weiteres Aufgabengebiet erstreckt sich über die Biotransformation ausscheidungspflichtiger Substanzen. Hier fungiert die Leber als Filterstation der Blutstrombahn. Durch chemische Reaktionen werden hydrophobe, toxische Stoffe in wasserlöslichen Zustand gebracht und der Ausscheidung über Galle oder Niere zugeführt. Neben der Entgiftung dienen diese Reaktionen aber auch der Aktivierung oder Inaktivierung endogener Hormone. Auch der Säure-Base-Haushalt benötigt das einwandfreie Funktionieren der Leber. Im Harnstoffzyklus wird basisches Bikarbonat verbraucht. Durch eine Drosselung der Harnstoffsynthese kann dieses im Rahmen einer Azidose als Puffer verwendet werden. Zuletzt ist noch die immunologische Funktion aufzuführen, die der Leber aufgrund residenter Makrophagen, der Synthese von Komplementfaktoren und akute Phase Proteinen zukommt. Angesichts der engen Einbindung der Leber in diese Vielzahl von Aufgaben ist es unschwer zu erahnen, dass eine Lebererkrankung einerseits durch viele Faktoren bedingt sein kann, andererseits aber auch massive Auswirkungen für den Gesamtorganismus mit sich bringt [Rentz-Polster et al., 2008, S.657ff].

1.1.3 Die Leberzirrhose

Die Entstehung einer Zirrhose ist gemeinsamer Endpunkt einer Reihe von Erkrankungen und nimmt in ihrer Häufigkeit zu. Jährlich versterben ca. 30 von 100.000 Einwohnern in Deutschland an den Folgen einer Leberzirrhose [Rentz-Polster et al., S.708]. Die häufigsten Erkrankungen, die zur Ausbildung einer Zirrhose führen, sind das metabolische Syndrom, Virushepatitiden und Alkoholabusus. Sie sind als chronische No-

zen für Hepatozyten anzusehen und bedingen oder fördern die Entstehung eines Ungleichgewichts im hepatischen Fettstoffwechsel. Einerseits werden vermehrt LDL-Partikel und Chylomikronen aufgenommen, sowie Fett eingespeichert, andererseits nimmt gleichzeitig die VLDL-Ausschleusung in die Peripherie ab, so dass es zu einer progressiven Verfettung der Hepatozyten kommt. Je nach deren Ausmaß spricht man entweder von einer einfachen Leberverfettung (mindestens 5% der Hepatozyten), oder von einer Fettleber bzw. Steatosis hepatis, wenn mindestens 50% der Hepatozyten verfettet sind. Eine solche Fettleber wird in Abhängigkeit ihrer Genese als NASH (nicht alkoholische Steatosis hepatis) oder ASH (alkoholische Steatosis hepatis) bezeichnet und ist in ihren morphologischen Veränderungen noch reversibel. Eine Fettleber ist jedoch sehr sensibel gegenüber jedem schädigenden Einfluss. So können z.B. genetisch bedingte Störungen im Cytochrom P450 oder Darmbakterientoxine zu Entzündungsvorgängen führen und damit die Entstehung einer Fettleberhepatitis bewirken. Diese wiederum birgt ein sechsfach erhöhtes Risiko für die Entstehung einer Zirrhose. Gekennzeichnet ist diese pathologische Veränderung des Leberparenchyms durch eine progrediente Bindegewebsvermehrung, induziert durch eine TGF- β vermittelte Steigerung der Fibroblastenaktivität (Abbildung 3).

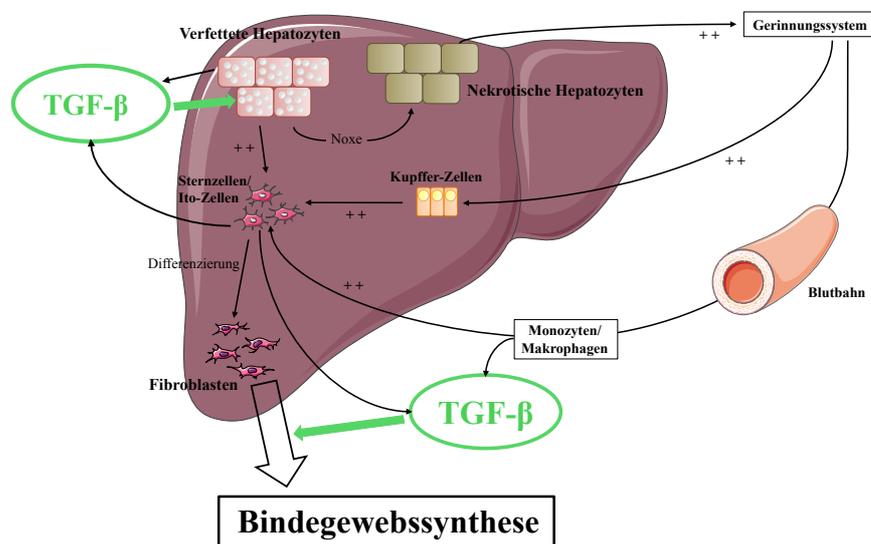


Abbildung 3 Entstehung der Zirrhose, nach Rentz-Polster et al., 2008, S.666; Bilder aus http://www.servier.com/Smart/ImageBank.aspx?id_=729 (abgerufen am 30.1.2013)

Durch die vermehrte Bindegewebssynthese kommt es im Rahmen der Zirrhose zur fortschreitenden Destruktion der ursprünglichen Architektur mit Parenchymverlust

und Gefäßzerstörung, sowie einer Verhärtung des Gesamtorgans, mit Zunahme des intravasalen Widerstandes. Sichtbar werden diese Vorgänge in der Serumdiagnostik: Initial steigen, bedingt durch Zellschädigungen, die Transaminasen ASAT (GOT) und ALAT (GPT) an. Mit fortschreitendem Zellverlust sinken diese Parameter bis auf Werte unterhalb des physiologischen Zustands ab. Morphologisches Korrelat der Zirrhose sind Regeneratknoten, porto-kavale oder porto-zentrale Septierungen sowie Pseudolobuli mit randständiger Vena centralis (siehe 4.3.4, Abbildung 12-16). Die vom Patienten spürbaren Symptome sind zunächst Resultat einer gestörten Leberfunktion: Als Folge einer massiv eingeschränkten Eiweißsynthese und der daraus resultierenden Abnahme des intravasalen onkotischen Drucks, wird freie Flüssigkeit ins Interstitium geschwemmt, es entsteht Aszites. Der Eiweißmangel führt auch zu Gerinnungsstörungen, da wichtige Bestandteile der Gerinnungskaskade (Protein C und S) fehlen und die Carboxylierung Vitamin K-abhängiger Gerinnungsfaktoren vermindert ist. Neben Störungen der Proteinbiosynthese treten auch hormonelle Störungen auf, die beim Mann eine Hodenatrophie oder Gynäkomastie, bei der Frau Menstruationsstörungen bis hin zur sekundären Amenorrhoe bedingen können. Andererseits leidet der Zirrhosepatient unter einer portalen Hypertension: Der fibrotische Umbau zerstört die ursprüngliche Blutstrombahn durch die Leber und verhärtet das gesamte Organ. So entsteht über eine Widerstandserhöhung ein Druckanstieg im prähepatischen Kreislauf. Als Folge bilden sich Umgehungskreisläufe, aus denen es, v.a. bei Ösophagusvarizen, lebensbedrohlich bluten kann. Je länger eine Zirrhose besteht, desto höher wird die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Spätkomplikationen: Ca. 80% der hepatozellulären Karzinome fußen auf einer Zirrhose [Bühling et al., 2008, S.272]. Die gestörte Elimination von Ammoniak führt zur Anreicherung von Ammoniumionen im Gehirn, Störung der Blut-Hirn-Schranke und konsekutiven neurologischen Veränderungen im Sinne einer hepatischen Enzephalopathie. Wird die Zirrhose nicht behandelt, führt sie früher oder später zum Tod des Patienten [Rentz-Polster et al., 2008, S. 662ff, S.708ff; Herold et al., 2010, S. 520f; Bühling et al., 2008, S. 271f].

Viele Arbeiten haben zudem gezeigt, dass eine chronische Lebererkrankung oft mit einer strukturellen Schädigung des knöchernen Skeletts verknüpft ist [Angulo et al., 2010; Collier, 2007; Diamond et al., 1990] und sich diese umso ausgeprägter darstellt, je länger die Schädigung der Leber schon besteht [Guañabens et al., 2010]. López-Larramona et al. fassten zusammen, dass zwischen 13 und 60% der Patienten mit

chronischer Cholestase an Osteoporose leiden. Bei Patienten mit chronischer Virushepatitis sind es 20% und bei viraler Zirrhose sogar 55% [López-Larramona et al., 2011]. Andere Autoren sprechen von einem Anteil Osteoporosekranker an sämtlichen Patienten mit chronischer Lebererkrankung von 50% [Luxon et al., 2011] oder sogar von 51,5%, wenn die Ursache der Leberschädigung eine PBC ist [Mounach et al., 2008].

1.2 Der menschliche Knochen

1.2.1 Makro- und mikroskopische Morphologie des Knochens

Je nach Alter besitzt der Mensch zwischen 300 (Kindesalter) und ca. 206 (Senium) Knochen. Jeder Knochen besteht aus einem harten Mantel, der Compacta, überzogen mit Periost und bildet in seinem Inneren den Spongiosaraum aus, ein feines Trabekelwerk aus Knochenbälkchen. Dieser ist, je nach Knochen und Alter des Menschen, entweder mit blutbildendem roten oder fetthaltigem gelben Knochenmark gefüllt. Ausgekleidet ist der Spongiosaraum von einer Schicht aus Knochendeckzellen, den so genannten bone lining cells. Die Trabekel verzweigen sich entlang der Richtung der größten mechanischen Beanspruchung. Dank dieser Architektur wird hohe mechanische Belastbarkeit mit maximaler Gewichtsreduktion im Sinne der Leichtbauweise vereint [Lippert, 2006, S.32ff; Welsch, 2006, S. 135].

Das Gewebe „Knochen“ besteht aus extrazellulärer Matrix, sowie knochenspezifischen Zellen (Abbildung 4). Die Zusammensetzung der Matrix lässt sich in zwei Komponenten gliedern: Zwei Drittel entfallen auf mineralische Hartschubstanz, hauptsächlich in Form von Calciumhydroxylapatit ($\text{Ca}_5[\text{PO}_4]_3\text{OH}$). Ein Drittel besteht aus organischen Bestandteilen, dem Osteoid, wobei davon Typ I Kollagen über 90% ausmacht. Die übrigen ca. 10% setzen sich aus Proteoglykanen und knochenspezifischen Proteinen wie Osteopontin, Osteonectin und Osteocalcin oder der alkalischen Knochenphosphatase zusammen. In geringer Menge sind überdies inaktive Formen von Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- β) in die Matrix eingemauert und spielen im Knochenstoffwechsel eine Rolle.

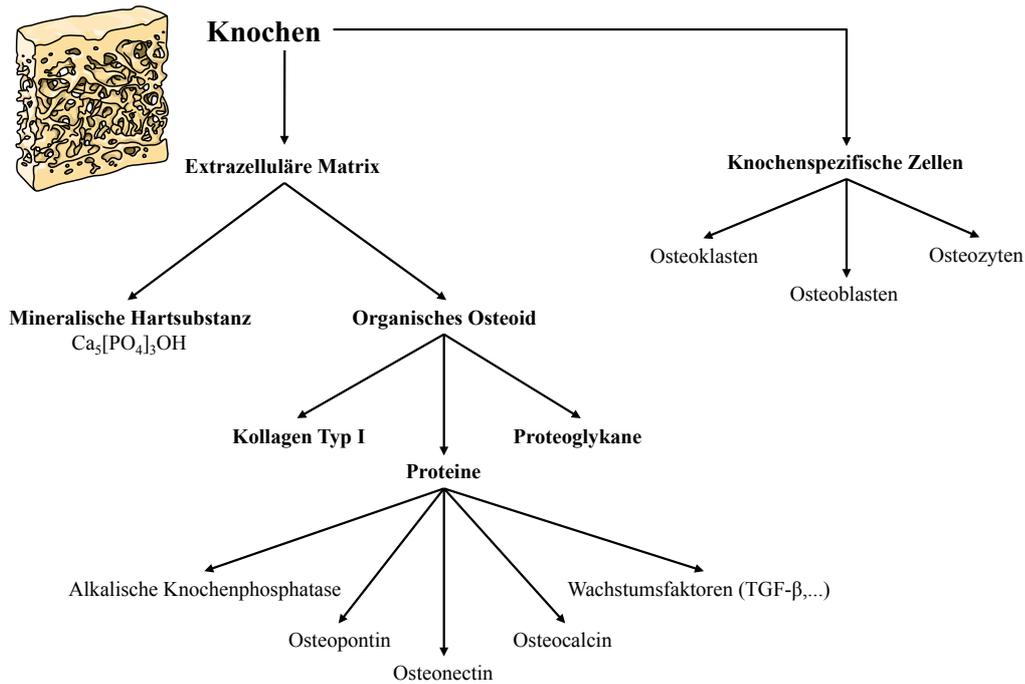


Abbildung 4 Aufbau des Knochens, nach Deetjen et al., 2005, S.188ff; Bilder aus <http://www.servier.de/medicalart/knochenstruktur/?catSelect=5> (abgerufen am 31.1.2013)

Die knochenspezifischen Zellen sind hauptsächlich Osteoblasten, Osteoklasten und die als ausgereifte Osteoblasten anzusehenden Osteozyten. Die Entwicklung der Osteoblasten geht auf mesenchymale Stammzellen zurück. Aus ihnen entwickeln sich Osteoprogenitorzellen. Diese können sich weiter zu Osteoblasten differenzieren und stellen dann kubisch bis prismatische, über Nexus miteinander verbundene Zellen dar. Osteoblasten verfügen über eine Vielzahl von Rezeptoren für Hormone, Vitamine und Zytokine, über die ihre Aktivität reguliert wird. So induziert Parathormon beispielsweise ihre Reifung. Die Funktion der Osteoblasten findet sich hauptsächlich im Knochenaufbau. Unter Sauerstoff- und Vitamin C-Verbrauch synthetisieren sie Kollagen I und bilden damit die Basis des organischen Osteoids. Auch die restlichen Komponenten des Osteoids wie Proteine, Proteoglykane und Wachstumsfaktoren wie TGF- β_{1-3} , einige BMP-Typen oder Insulin-like growth factor I/II werden größtenteils von Osteoblasten freigesetzt. Aber auch im Knochenabbau spielen Osteoblasten eine Rolle, indem sie, über den Abbau von Knochenmatrix bedeckendem Osteoid, den Osteoklasten den Weg bahnen. Schließlich mauern sich manche Osteoblasten in der extrazellulären Matrix ein und werden so zu Osteozyten. Andernfalls gehen sie durch Apoptose, beispielsweise unter Vermittlung von Sclerostin, zugrunde [Deetjen et al., 2005, S.188ff; Welsch, 2006, S.135f; Poole et al., 2005].

Osteoklasten differenzieren sich aus Vorläuferzellen, die in enger Verwandtschaft zur Monozyten-Makrophagen-Reihe stehen und ihren Ursprung im Knochenmark haben. Die Differenzierung unterliegt einer Regulation durch Vitamin D. Osteoklasten sind mehr- bis vielkernige Zellen und finden sich auf der Knochenoberfläche in den Howship Lakunen. Ihre Funktion ist der Abbau von Knochensubstanz. Dazu ist eine Anheftung an die Knochenmatrix nötig, die v.a. im Randbereich der Zelle über Integrine an Osteopontin erfolgt. So entsteht eine Art ringförmige Versiegelungszone um die Zelle herum, in deren Inneren der Osteoklast einen Faltensaum ausbildet. Dies ist der Ort der Knochenresorption. Osteoklasten besitzen eine Carboanhydrase, proteolytische Enzyme sowie eine ATP abhängige Protonenpumpe, die auf die Resorptionszone gerichtet ist. Aktive Zellen sezernieren auf diese Weise Protonen in die Howship Lakune und senken damit dort den pH-Wert auf ca. 4,5. In dem so entstehenden sauren Milieu löst sich zunächst die Mineralisierung der Matrix auf, anschließend bauen die proteolytischen Enzyme das Osteoid ab. Alle Osteoklasten unterliegen in ihrem Wechsel zwischen Ruhe- und Aktivitätsphase einem Regelkreis. So fördern beispielsweise Osteoprotegerin und PGE₂ aus Osteoblasten ihre Aktivität, Calcitonin aus den C-Zellen der Schilddrüse hemmt sie. Andererseits werden bei der Resorption von Knochenmatrix auch eingemauerte Wachstumsfaktoren freigesetzt und durch saure Hydrolyse aktiviert. Sie dienen als Chemotaxine für Osteoprogenitorzellen und wirken damit förderlich auf die Neubildung und Differenzierung von Osteoblasten [Deetjen et al., 2005, S.188ff; Welsch, 2006, S.136ff].

Bei den Osteozyten handelt es sich um in die Knochenmatrix eingemauerte Osteoblasten. Sie bilden eine Reihe von Fortsätzen aus, über die sie mit benachbarten Osteozyten und an der Knochenoberfläche lokalisierten Osteoblasten verbunden sind. So entsteht ein enges Netzwerk, das einen Stofftransport – vor allem für Elektrolyte – von perivaskulär gelegenen Osteoblasten hin zu den Osteozyten ermöglicht und deren Überleben gewährleistet. Über die Funktion der Osteozyten wird diskutiert. Eine Beteiligung im Matrixumbau oder eine Rolle als Signalgeber über die Reparaturbedürftigkeit des Knochens ist möglich [Welsch, 2006, S.136]. Außerdem begrenzen sie die Osteoblastenaktivität durch Freisetzung des inhibitorisch wirkenden Sclerostins [Poole et al., 2005; Li et al., 2005].

1.2.2 *Funktion des Knochens*

Knochen haben im wesentlichen Stütz- und Gerüstfunktion. Darüber hinaus schützen sie innere Organe und beherbergen mit dem Markraum den Ort der Hämatopoese. Außerdem hat der Knochen einen hohen Stellenwert im Elektrolythaushalt. Neben Magnesium, Phosphor und Natrium ist es vor allem Calcium, das je nach Stoffwechsellage im Knochen gespeichert oder bei Bedarf ins Blut abgegeben wird. Der Knochen fungiert dabei als größter Calciumspeicher des Organismus. Damit diese wichtige Rolle für den Gesamtorganismus wahrgenommen werden kann, ist eine gute Durchblutung nötig. So erhalten Röhrenknochen pro Minute ca. 4-12 ml Blut/ 100 g Gewebe. Für das gesamte menschliche Skelett (etwa 7 kg) ergibt sich somit ein Volumen von mehreren hundert Millilitern Blut pro Minute [Deetjen et al., 2005, S.191]. Damit wird deutlich, wie schnell Veränderungen am Knochen durch Freisetzung entsprechender Stoffe systemisch nachweisbar und bedeutsam werden können.

1.2.3 *Auf- und Umbau des Knochens: Das Modeling*

Das menschliche Skelett muss sich zeitlebens an sich ändernde biomechanische Belastungen adaptieren. Dies geschieht durch Umbauprozesse, die aufgrund des permanenten Auf- und Abbaus von Knochensubstanz auch als Modeling bezeichnet werden. Die für das Modeling nötige enge Interaktion zwischen Osteoklasten und Osteoblasten wird über Zytokine ermöglicht und durch fein aufeinander abgestimmte Regelkreise positiven wie negativen Feedbacks reguliert. Zentrale Rolle spielt hier die OPG/RANKL-Achse [Keck et al., 2003]. Der RANK-Ligand (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) gehört zur Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF) und ist in vielen Geweben (z.B. Lunge, Herz- und Skelettmuskel) in unterschiedlich hoher Konzentration nachweisbar. Im Knochen und Knochenmark ist seine Konzentration besonders hoch [Keck et al., 2003]. Hier wird er aus Osteoblasten freigesetzt, der Zielrezeptor RANK findet sich auf der Osteoklastenoberfläche (Abbildung 5). Als RANKL zählt z.B. auch der aus Entzündungszellen stammende Tumornekrosefaktor α (TNF α). Über die Bindung von RANKL an seinen Rezeptor werden Osteoklasten-fördernde Signale übertragen: Die Differenzierung aus Vorläuferzellen, Aktivierung reifer Osteoklasten und Hemmung einer frühzeitigen Apoptose. Im Rahmen der Osteoklastentätigkeit werden im Knochen eingemauerte Wachstumsfaktoren freigesetzt, die wiederum stimulierend auf Osteoblasten wirken. Stimulierte Osteoblasten setzen daraufhin ver-

schiedene Proteine frei, die ihrerseits für die Interaktion der Zellen im Knochenstoffwechsel wichtig sind. Dazu gehört Osteopontin, Osteonectin, Osteocalcin und Osteoprotegerin. Osteopontin und Osteonectin werden aber auch in anderen Geweben gebildet und spielen z.B. im Fibrosierungsprozess der Leber eine Rolle [Patouraux et al., 2012; Xiao et al., 2012; Blazejewski et al., 1997; Frizell et al., 1995]. Das freigesetzte Osteoprotegerin unterbricht den RANK-Signalweg zwischen Osteoblasten und Osteoklasten, indem es an RANKL bindet und so den Regelkreis über ein negatives Feedback schließt [Deetjen et al., 2005, S.194; Keck et al., 2003]. Eine Störung dieser Achse führt zu Veränderungen im Knochenstoffwechsel mit Überwiegen entweder des Knochenauf- oder Knochenabbaus. Zu solch einer Störung führt beispielsweise eine Veränderung der TGF- β -Konzentration. Hohe Konzentrationen von TGF- β_1 gehen mit erhöhter Konzentration von RANKL-mRNA und verringerter Konzentration von OPG-mRNA in Osteoblasten einher [Jurado et al., 2010].

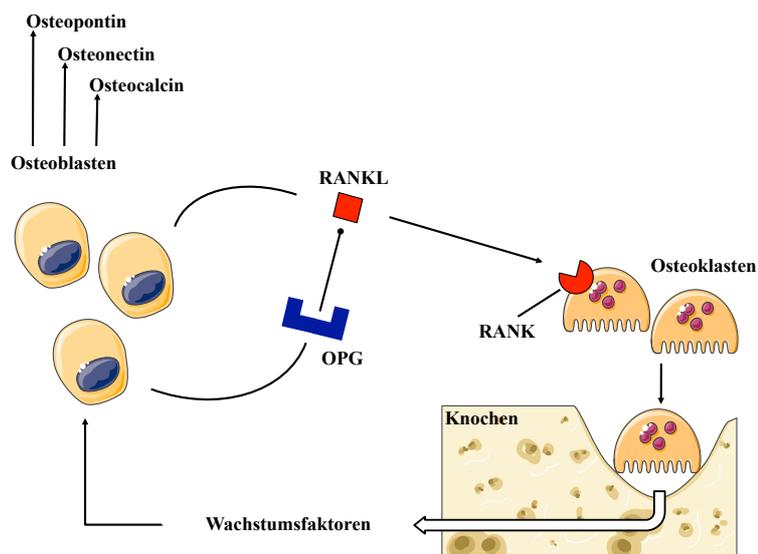


Abbildung 5 RANKL-Signalweg und Interaktion zwischen Osteoklasten und Osteoblasten, vereinfacht aus Keck et al., 2003; Bilder aus <http://www.servier.de/medicalart/knochenstruktur/?catSelect=5> (abgerufen am 15.1.2013)

1.2.4 Frakturheilung und Regeneration

Frakturen sind meist traumatisch bedingt, können aber auch Folge von Überlastung oder, als pathologische Fraktur, Ausdruck einer Grunderkrankung wie der Osteoporose sein. Beim gesunden Menschen heilt eine Fraktur meist folgenlos aus, wobei man primäre und sekundäre Frakturheilung unterscheiden muss. Voraussetzung für die primäre Frakturheilung ist der direkte Kontakt der Bruchenden zueinander. Besteht

dieser Kontakt, so sprießen Osteone von der einen Bruchfläche in die andere ein und der Frakturspalt schließt sich. Bei der sekundären Frakturheilung ist der Spalt größer, so dass kein direkter Kontakt zwischen den Frakturstücken besteht. In diesem Fall bildet sich eine zunächst bindegewebige, später knöcherne Manschette – der sog. Kallus – um die Bruchstelle. Im Rahmen von Umbauprozessen entwickelt sich aus diesem dann endgültiger Knochen. Die Heilungszeit hängt neben dem Ausmaß des ursprünglichen Traumas auch von der Art des Knochens ab. So heilt ein gebrochener Finger meist innerhalb von 3 Wochen, wohingegen eine Wirbelkörperfraktur, häufige Komplikation der Osteoporose, 12-14 Wochen zur vollständigen Heilung benötigt. Besteht eine Grunderkrankung des Knochenstoffwechsels so treten Frakturen einerseits gehäuft auf, andererseits ist auch ihre Heilung komplikationsträchtig und eingeschränkt [Bühling et al., 2008, S.470; Müller M. et al., 2010, S.341; Welsch, 2006, S.131 ff].

1.2.5 Die Osteoporose

Die Osteoporose stellt die „häufigste metabolische Knochenerkrankung“ in den Industrienationen dar [Rentz-Polster et al., 2008, S.805]. Sie ist gekennzeichnet durch einen überproportional schnell fortschreitenden Schwund trabekulärer und kortikaler Knochenmasse über die alterstypische Norm hinaus. Dabei handelt es sich um einen in Stadien ablaufenden Prozess, beginnend mit der Vorstufe Osteopenie. In Deutschland leben ca. 5 Mio. Osteoporosekranke, davon viermal mehr Frauen als Männer. Im Durchschnitt erkrankt jede dritte Frau im Laufe ihres Lebens an Osteoporose. Die Risikofaktoren sind mannigfaltig: Für beide Geschlechter gelten, neben höherem Alter und positiver Familienanamnese, Nikotin- und Alkoholabusus, Bewegungsmangel, Malnutrition – mit konsekutivem Vitamin D- und Calciummangel – oder Anorexie als prädisponierend für die Erkrankung. Speziell bei Frauen ist es aber eine über das Leben betrachtete zu kurze Exposition gegenüber endogenem Östrogen im Sinne einer späten Menarche bzw. frühen Menopause [Müller M. et al., 2010, S.400; Bühling et al., 2008, S.465f; Rentz-Polster et al., 2008, S. 805ff].

Entsprechend ihrer Ätiologie unterteilt man die Osteoporose in eine primäre und eine sekundäre Form. Die sekundäre Osteoporose ist Ausdruck von Grunderkrankungen wie Hyperthyreose und Knochenmetastasen oder durch medikamentöse Behandlung herbeigeführt, z.B. durch langjährige Cortisontherapie mit Überschreitung der Cushing-Schwelle. Die Ursache der primären Osteoporose findet sich hingegen von Be-

ginn an im Knochenstoffwechsel. Man unterscheidet nochmals die primäre Typ I- von der primären Typ II-Osteoporose. Betroffen vom Typ I sind hauptsächlich Frauen. Dies ist auf die kontinuierliche Abnahme der Sexualhormonproduktion mit Beginn der Menopause zurückzuführen. Sexualhormone haben physiologischer Weise, über die Inhibition von IL-6, einen hemmenden Einfluss auf die Osteoklastogenese, sodass mit dem Rückgang ihrer Synthese die Proliferation von Osteoklasten ansteigt. Das resultierende Ungleichgewicht gegenüber Osteoblasten fördert dann letzten Endes den Verlust von Knochensubstanz. Bei der primären Osteoporose vom Typ II handelt es sich um eine Form von der beide Geschlechter gleichermaßen betroffen sind und die hauptsächlich auf altersbedingte Mangelerscheinungen zurückzuführen ist. Gleich welcher Genese kommt es auch hier über ein Ungleichgewicht zwischen Osteoblasten und Osteoklasten im Verlauf der Krankheit zuerst zu einer Auflockerung der Spongiosabälkchen und schließlich zur Ausdünnung der Compacta. Dies prädestiniert für das Auftreten von Frakturen [Rentz-Polster et al., 2008, S.805ff].

Die Diagnose Osteoporose wird oft erst spät gestellt, da die Krankheit zunächst symptomarm verläuft. Probate diagnostische Untersuchungen sind bei Verdacht v.a. die Knochendichtemessung mittels DEXA (dual energy X-ray absorptiometry) oder QCT (quantitative Computertomographie). Über den Vergleich mit der Knochendichte eines gesunden jungen Erwachsenen ergeben sich Dichtewerte, die entweder im Normbereich liegen, auf einen Osteopenie hindeuten, oder eine Osteoporose widerspiegeln. Klinisch bemerkbar macht sich die Erkrankung mit dem Auftreten von Frakturen, v.a. am Hüftkopf (ca. 117.000 Frakturen pro Jahr) und an den Wirbelkörpern (hier v.a. im Bereich BWK7-LWK1). Andere häufige Lokalisationen sind Radius oder Rippen. Die frakturassoziierte Immobilität fördert letzten Endes ein Fortschreiten der Osteoporose, sodass sich der unbehandelte Patient oft in einem Circulus vitiosus wiederfindet [Müller M. et al., 2010, S.400; Rentz-Polster et al., 2008, S.805ff].

1.2.6 Die hepatische Osteodystrophie

Der Begriff der hepatischen Osteodystrophie wurde in den letzten Jahren geprägt, um das gehäufte Auftreten von Störungen der strukturellen Knochenintegrität im Rahmen einer chronischen Lebererkrankung beschreiben zu können. Über das Vorliegen dieser Assoziation herrscht genereller Konsens, auch wenn die Erkrankungshäufigkeit von den einzelnen Autoren unterschiedlich beurteilt wird (siehe 1.1.3) [Angulo et al.,

2010; Collier, 2007; Diamond et al., 1990; Guañabens et al., 2010; López-Larramona et al., 2011; Luxon et al., 2011; Mounach et al., 2008]. Als Störung der strukturellen Integrität des Knochens wird nicht nur die Osteoporose, sondern auch deren Vorstufe, die Osteopenie angesehen. Allerdings konnte bis zum heutigen Tag kein für sich stehender Pathomechanismus definiert werden, der als hinreichende Erklärung für eine Knochenschädigung im Gefolge einer Lebererkrankung genügen könnte. Vielmehr wird von einem multifaktoriellen Modell ausgegangen, in dem die Kombination aus z.B. Anomalien des Calcium- oder Vitamin D-Metabolismus, Vitamin K-Mangel, abnormer RANKL/OPG-Ratio und anderen Faktoren negativen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel hat [López-Larramona et al., 2011]. Immer größere Bedeutung scheint außerdem dem Transforming growth factor- β zuzukommen [Ehnert et al., 2010, Janssens et al., 2005].

1.3 Die Transforming growth factor- β Familie

1.3.1 Intrazelluläre Signaltransduktion

Der Transforming growth factor- β (TGF- β) wird von unterschiedlichsten Zellen produziert und wirkt im Organismus als Wachstumsfaktor. Ein Reservoir für TGF- β ist z.B. die Knochenmatrix. Aus ihr wird der Wachstumsfaktor im Rahmen des Knochenumbaus freigesetzt und vermutlich entweder durch den von Osteoklasten erzeugten niedrigen pH oder durch freigesetzte Proteasen aktiviert [Janssens et al., 2005]. TGF- β bindet an Rezeptoren mit Serin/Threonin-Kinase-Aktivität. Diese Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren setzen sich aus einem in Ruhe inaktiven Typ I- (T β R I) und einem konstitutiv aktiven Typ II-Rezeptor (T β R II) zusammen. TGF- β bindet an T β R II unter Ausbildung eines Heterooligomers mit T β R I. In diesem Heterooligomer phosphoryliert der Typ II-Rezeptor nun eine glycin-/serinreiche Region (GS-Box) am Typ I-Rezeptor und überführt diesen damit in den aktiven Zustand. Aktiviert phosphoryliert der Typ I-Rezeptor selbst weitere Komponenten der Signaltransduktion in Form der Smad-Proteine. Die Interaktion von Smad-Protein und Rezeptor wird dabei durch SARA (Smad anchor for receptor activation) vermittelt. Die Smad-Proteine bilden anschließend ein Trimer mit einem weiteren Smad-Protein (co-smad) aus und der entstehende Komplex wird in den Zellkern transloziert. Dort wird schließlich über DNA-

1.3.2 *Bedeutung im Organismus*

Wie bereits erwähnt, ist die TGF- β -Familie eine Klasse von Wachstumsfaktoren. Als solche greifen die einzelnen Vertreter regulierend in Proliferations-, Differenzierungs- und Apoptosevorgänge ein und spielen damit beispielsweise in der embryonalen Musterbildung eine entscheidende Rolle [Schartl et al., 2009, S.376]. Klinische Relevanz erhält TGF- β durch Förderung der Transkription von Genen der Kollagensynthese in Fibroblasten. Dies ist einerseits im Rahmen der Wundheilung essentiell [Border et al., 1994]. Andererseits wird dadurch die Fibrosierung innerer Organe wie Niere, Lunge und Leber vermittelt [Schartl et al., S.660; Rentz-Polster et al., S.666]. Bei einer Leberzirrhose ist TGF- β negativ mit der Restfunktion des Organs assoziiert [Wanninger et al., 2011]. Im Rattenmodell führt das vorübergehende Ausschalten von T β R II in Lebergewebe zu einer verringerten Expression profibrotischer Komponenten [Fu et al., 2011].

Auch für den Knochenstoffwechsel ist TGF- β ebenfalls von Bedeutung. Atfi et al. wiesen darauf hin, dass der TGF- β Signalweg eng assoziiert ist mit dem des Parathormons (PTH), über den die Osteoblastenreifung vermittelt wird. T β R II Knock-out-Mäuse zeigten eine erhöhte Expression von Parathormonrezeptor 1R (PTHR1), so dass der Mangel an T β R II zu einer Erhöhung der Knochendichte führte [Atfi et al., 2010]. Außerdem verringert TGF- β in Osteoblasten die Genexpression von OPG und erhöht gleichzeitig die von RANKL [Jurado et al., 2010]. Auf Osteoklasten nimmt TGF- β direkten und indirekten Einfluss. Indirekt über die oben genannte Expression des Osteoklastenaktivators RANKL, direkt durch die Förderung der Differenzierung aus Monozyten [Fox et al., 2005]. Studien der letzten Jahre zeigen, dass TGF- β auch Einfluss auf Osteozyten hat. In reifen Osteozyten fördert TGF- β die Transkription des Sost-Gens [Loots et al., 2012], dessen Produkt Sclerostin wiederum seit kurzem als wesentlicher Regulator der Osteoblastenaktivität bekannt ist. Über den Wnt-Signalweg vermittelt Sclerostin nämlich die Apoptose von Osteoblasten [Li et al., 2005; Sutherland et al., 2004]. Andererseits ist TGF- β essentiell für die Knochenneubildung im Zuge des Modelings, denn es wirkt als starkes Chemotaxin auf Osteoblasten [Janssens et al., 2005]. Andere Arbeiten haben zudem gezeigt, dass eine suffiziente Frakturheilung die Anwesenheit von TGF- β voraussetzt. Im Tiermodell führte eine kombinierte Applikation von TGF- β und IGF-I zu einer größeren Stabilität und Mineralisation

frakturierter Knochen gegenüber einer unbehandelten Kontrollgruppe [Schmidmaier et al., 2003]. TGF- β hat damit sowohl Knochenabbau-, als auch Knochenaufbau fördernde Wirkung. Derzeitiges Erklärungsmodell für diese gegenteiligen Effekte ist neben der Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Zielzelle v.a. die Konzentrationsabhängigkeit: in niedrigen Konzentrationen fördert TGF- β den Knochenaufbau, wohingegen hohe Konzentrationen den Abbau begünstigen [Janssens et al., 2005]. Diese Tatsache lässt dem Wachstumsfaktor eine maßgebliche Rolle für die Aufrechterhaltung der Balance im Knochenstoffwechsel zukommen.

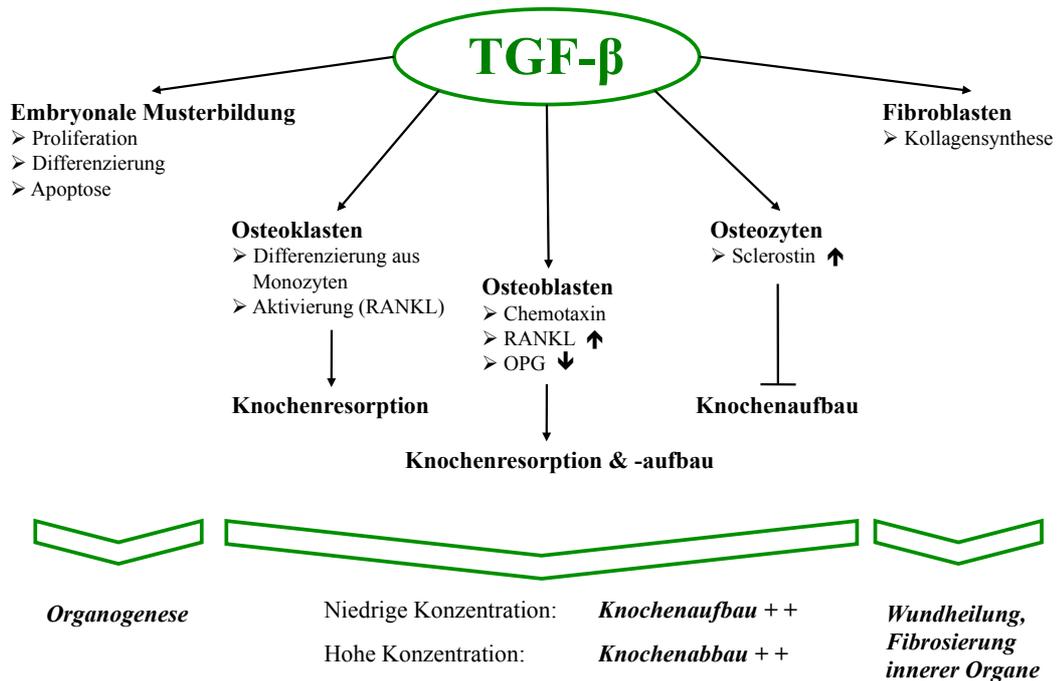


Abbildung 7 Überblick über die Rolle von TGF- β im Organismus, nach Jurado et al., 2010; Rentz-Polster et al., 2008; Scharl et al., 2009 S.376, S.660; Janssens et al., 2005; Loots et al., 2012

1.4 Der Vitamin D Stoffwechsel

1.4.1 Die endogene Vitamin D Synthese

Der Syntheseweg des Vitamin D-Hormons erstreckt sich über drei Organe (Abbildung 8). Erste Station ist die Haut. Hier entsteht unter der Einwirkung von UV-Licht aus endogenem 7-Dehydrocholesterol Cholecalciferol (Vitamin D₃). Cholecalciferol kann alternativ auch über die Nahrung aufgenommen werden. Über das Vitamin D bindende Protein (DBP) wird das hydrophobe Cholecalciferol zur Leber transportiert. In der Leber kodieren die Gene CYP2R1 und CYP27A1 für spezielle Enzyme, wobei v.a.

1. Einleitung

das Produkt von CYP2R1 – die 25-Hydroxylase – für den weiteren Syntheseschritt wichtig ist [Shinkyō et al., 2004; Cheng et al., 2004]. Das Enzym katalysiert die Hydroxylierung von Cholecalciferol zu 25-Hydroxyvitamin D₃ (Calcidiol). Dieses wird anschließend wieder mithilfe des DBP zur Niere transportiert und erfährt dort durch die mitochondriale 1 α -Hydroxylase eine weitere Hydroxylierung zum aktiven 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol oder 1,25(OH)₂-Vitamin D₃) [Plum et al., 2010].

Das Grundgerüst des 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ – das Cholesterin – ist im Organismus auch Baustein vieler anderer Verbindungen (z.B. Sexualhormone) und Strukturen (z.B. Membranen). Um für deren Synthese Cholesterin bereitstellen zu können, existiert im Syntheseweg des 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ das Enzym 7-Dehydrocholesterin Reduktase (DHCR7). Es katalysiert die Reduktion von 7-Dehydrocholesterin zu Cholesterin. Eine hohe Aktivität dieses Enzyms entzieht somit den Grundbaustein für 1,25(OH)₂-Vitamin D₃.

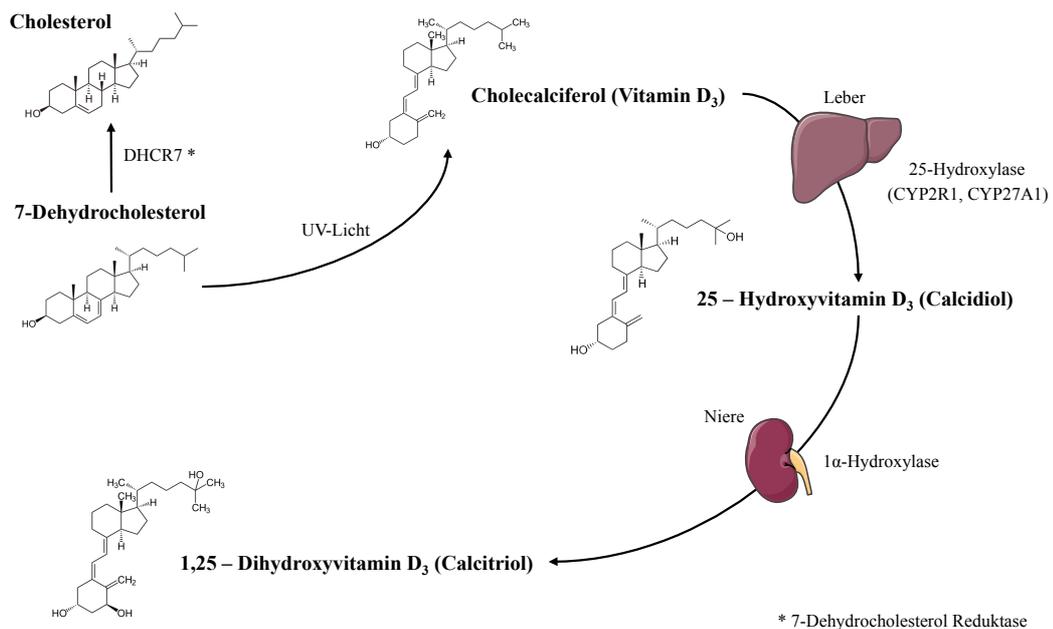


Abbildung 8 Vitamin D Synthese, modifiziert nach Plum et al. 2010; Bilder aus <http://www.servier.de/medicalart/hauptorgane/?catSelect=7> (abgerufen am 12.1.2013)

Das Ausmaß der endogenen Vitamin D Synthese wird von diversen Faktoren gesteuert. Parathormon und niedrige Calcium- oder Phosphatkonzentrationen steigern die 1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Synthese durch Förderung der 1 α -Hydroxylase, hohe Spiegel im Blut hingegen bremsen sie. Außerdem wird 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ zu einem gewissen Anteil zu 24,25-Dihydroxyvitamin D₃ umgewandelt, so dass eine Überpro-

duktion des Hormons vermieden wird. $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 ist ein lipophiles Hormon und muss im Blut, wie seine Vorläuferstoffe, an DBP gebunden transportiert werden. In dieser Form gelangt es zu seinen Zielzellen in Darm, Niere und Knochen, dissoziiert vom Transportmolekül und gelangt durch die Zellmembran an den nukleären Vitamin D-Rezeptor (VDR), wo es mit diesem und dem Retinoid X-Rezeptor ein Heterodimer ausbildet. Das Heterodimer bindet an regulatorische Genregionen und führt so zur Förderung oder Hemmung der Transkription verschiedener Gene [Schartl et al., 2009, S. 735f, S.881].

1.4.2 Bedeutung für den humanen Organismus

$1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 ist kein Vitamin im klassischen Sinn – also kein Stoff, auf dessen Zufuhr der Mensch angewiesen ist, denn es kann wie oben beschrieben vom Körper selbst synthetisiert werden. Dennoch ist es als Hormon von entscheidender Bedeutung für den humanen Organismus. Über die Hemmung der Zytokinausschüttung aus Megakaryozyten greift es in die Hämatopoese regulierend ein. Ebenfalls hemmend wirkt sich sein Einfluss auf die T- und B-Zellproliferation aus, so dass dem Hormon eine immunmodulierende Wirkung zukommt. Die wichtigste Funktion von $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 ist jedoch die Regulation des Calcium- und Phosphathaushalts. Diese findet an drei Organen statt. Zum einen fördert der Einfluss von $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 in der Niere die Rückresorption von Calcium und Phosphat und vermindert somit deren Ausscheidung über den Urin. Zum anderen mobilisiert es Calcium und Phosphat aus dem Knochen. Den größten Effekt auf die Calciumkonzentration im Plasma vermittelt $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 über die Induktion des Ca^{2+} -bindenden Calbindins im Darm, deren Konsequenz eine vermehrte enterale Calciumaufnahme ist. Neben der Aufrechterhaltung der Calcium- und Phosphathomöostase hat $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 noch eine essentielle Rolle im Knochenmetabolismus: Bei normaler Ca^{2+} -Konzentration fördert es die Osteocalcin- und Osteopontinsynthese und bewirkt auf diese Weise die Matrixbildung und Kalzifizierung des Knochens. Außerdem stimuliert $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 die Synthese und Sekretion von RANKL und nimmt damit indirekt Einfluss auf die Osteoklastentätigkeit [Plum et al., 2010]. Es fördert die Ausschüttung von TGF- β im Knochen [Finkelmann et al., 1991; Deetjen et al., 2005, S.813], was wiederum bereits erwähnte Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel hat. Wie auch TGF- β , erhöht $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 die Expression des Sost-Gens in Osteozyten, mit den bereits

geschilderten Auswirkungen auf die Osteoblastentätigkeit [Sutherland et al., 2004]. Die Wichtigkeit von $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 wird dann ersichtlich, wenn eklatanter Mangel an diesem Hormon herrscht. Häufigste Ursache hierfür ist das chronische Nierenversagen mit konsekutivem Mangel an 1α -Hydroxylase. Aber auch eine unzureichende UV-Exposition, angeborene Enzymdefekte oder die Leberzirrhose sind mögliche Faktoren, die pathologisch niedrige Vitamin D-Spiegel bedingen. Folgen sind Anämie, Osteomalazie beim Erwachsenen sowie Rachitis beim Kind. Eine zu hohe Vitamin D-Konzentration im Blut ist hingegen eher selten und lässt sich lediglich durch eine übermäßige alimentäre Zufuhr erreichen. Die Folge ist eine Kalzifizierung von Gefäßen und Weichteilen [Schartl et al., 2009, S.735f, S.881; Deetjen et al., 2005, S.813].

2. Zielsetzung

Aus den bisherigen Ausführungen wird deutlich, dass der Stoffwechsel des Knochens an entscheidenden Stellen mit dem der Leber verbunden ist. Beide Organe sind Bestandteile des Vitamin D-Stoffwechsels. An beiden Organen machen sich Änderungen der TGF- β Serumkonzentration bemerkbar. Eine chronische Erkrankung der Leber ist oft auch mit einer strukturellen Knochenerkrankung verbunden und diese Assoziation wird als hepatische Osteodystrophie bezeichnet. Für die Praxis ist dieser Zusammenhang von großer Bedeutung, kann er doch vorhersagen, dass ein Patient mit chronischer Lebererkrankung früher oder später auch Symptome der Osteoporose aufweisen wird. Weil die Frage nach der zugrunde liegenden Stoffwechselstörung bisher noch nicht befriedigend geklärt werden konnte, zielt diese Arbeit auf die Beantwortung folgender Fragen ab:

- Findet sich bei Patienten mit Leberzirrhose im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv eine Abnahme der Knochendichte?
- Ist die TGF- β Konzentration im Blut von Patienten mit Leberzirrhose gegenüber Gesunden verändert?
- Liegen Veränderungen im Vitamin D-Stoffwechsel beim Patienten mit Zirrhose vor?
- Lässt sich eine Änderung der Genexpression im TGF- β -Signalweg und Vitamin D-Stoffwechsel ausmachen, die eventuelle Veränderungen der TGF- β - oder Vitamin D-Konzentration erklären können?
- Zeigen sich im zirrhotischen Lebergewebe Veränderungen in der Genexpression von Proteinen, die Einfluss auf den Knochenstoffwechsel haben können?

3. Materialien

3.1 Herkunft des verwendeten Gewebes und Einverständniserklärung

Das für diese Arbeit verwendete humane Blut und Lebergewebe stammt entweder aus dem Klinikum rechts der Isar, dem Rotkreuzkrankenhaus München oder dem Klinikum Neuperlach. Das Kontrollserum stammt von gesunden Freiwilligen. Für jedes Gewebe liegt eine Einverständniserklärung des Spenders vor. Sämtliche Versuche erfüllen die Vorgaben und Voraussetzungen der Ethikkommission des Klinikums rechts der Isar.

3.2 Patientenkollektiv

Das untersuchte Patientenkollektiv (Tabelle 1) umfasst 46 Patienten (30 männlich, 16 weiblich), deren mittleres Alter 59,9 Jahre beträgt. Die Child A-Gruppe setzt sich aus 23 Patienten zusammen (13 männlich, 10 weiblich). Das mittlere Alter beträgt 60,2 Jahre (männlich) und 59,3 Jahre (weiblich). Die Child B-Gruppe umfasst 13 Patienten (8 männlich, 5 weiblich) mit einem mittleren Alter von 58,0 Jahren (männlich) und 60,6 Jahren (weiblich). In die Child C-Gruppe wurden 10 Patienten eingeschlossen (9 männlich, 1 weiblich), deren mittleres Alter bei 62,4 Jahren (männlich) und 51,0 Jahren (weiblich) liegt. Die Daten hinsichtlich der Ätiologie der Zirrhose lagen nicht vor, es wurde jedoch kein Gewebe viraler Hepatitiden verwendet. Zur genauen Einteilung der Patienten in Child A-C siehe 4.2.1.

Child A	N		Mittleres Alter (Jahre)	
	23		59,8	
	Männlich	Weiblich	Männlich	Weiblich
	13	10	60,2	59,3
Child B	N		Mittleres Alter (Jahre)	
	13		59,0	
	Männlich	Weiblich	Männlich	Weiblich
	8	5	58,0	60,6
Child C	N		Mittleres Alter (Jahre)	
	10		62,4	
	Männlich	Weiblich	Männlich	Weiblich
	9	1	62,4	51,0

Tabelle 1 Übersicht über das eingeschlossene Patientenkollektiv

3.3 Gerätschaften und Hilfsmittel

Material	Hersteller
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Pipetten 2,5 , 10 , 20 , 100 , 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Karlsruhe
Kern EG 220-3NM Waage	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Biorad Power Pac HC	Biorad, München
Gelkammer	Biorad, München
Gelkammer-Kämme	Biorad, München
Microm HM 355 Mikrotom	Microm International, Walldorf
Paraffin-Streckbad TFB 35	Medite Medizintechnik, Burgdorf
Biorevo BZ-9000	Keyence, Frankfurt
All-in-one Fluoreszenzmikroskop	
FLUOStar Omega Plate Reader	BMG Labtech, Ortenberg
Image J	Wayne Rosband, National Institute of health, Bethesda/USA
GraphPad Prism	GraphPad Software, La Jolla/USA
Philips Portal BMD option	Philips, Veldhoven/Niederlande
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg
Spektralphotometer NanoDrop	Thermo Fisher, Erlangen

Tabelle 2 Verwendete Gerätschaften und Hilfsmittel

3.4 Chemikalien

3.4.1 Zellkultur und Enzymaktivitätsmessung

Material	Hersteller
PBS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
DMEM (mit und ohne Phenol-Rot)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
FCS Gold	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Trypsin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Hygromycin B	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
4-Nitrophenylphosphat-disodiumsalzhexahydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MgCl ₂	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rekombinantes humanes TGF-β	Peptotech, Hamburg

Tabelle 3 Chemikalien für Zellkultur und Enzymaktivitätsmessung

3.4.2 Histologische Färbung

Material	Hersteller
Roticlear	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Roti Histokitt II	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hämatoxylin nach Mayer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Weigerts Hämatoxylinlösung A	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Weigerts Hämatoxylinlösung B	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Lichtgrün 1%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ponceau Xylidin	Fluka Chemikalien, Neu-Ulm
Säurefuchsin	Fluka Chemikalien, Neu-Ulm
Wolframatophosphorsäure-Hydrat	Merck, Darmstadt
Orange G	Merck, Darmstadt

3. Materialien

Material	Hersteller
Aqua dest.	Apotheke Klinikum r. d. Isar, München
Ethanol 100%	Apotheke Klinikum r. d. Isar, München
Aqua Delta Select	Apotheke Klinikum r. d. Isar, München

Tabelle 4 Chemikalien für histologische Färbungen

3.4.3 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Material	Hersteller
Isopropanol	Apotheke Klinikum r. d. Isar, München
Ethanol 100%	Apotheke Klinikum r. d. Isar, München
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TRIS(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Borsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid 10 mg/ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
pUC19-Marker	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TriFast	peq lab, Erlangen
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher, Erlangen

Tabelle 5 Materialien für RNA Isolation und cDNA Synthese

3.4.4 ELISA

Material	Hersteller
25(OH)-Vitamin D direct ELISA Kit	Teco medical, Bünde
Sclerostin EIA Kit	Teco medical, Bünde

Tabelle 6 Verwendete ELISA Kits

3.4.5 PCR Primer

Alle Primer wurden über die Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg bezogen.

Gen	GenBank ID (NM_)	Annealing-Temp.	5'-3'-Sequenz		Amplicon-Größe
			Sense	Antisense	
GAPDH	002046.3	54 °C	CCA TGA GAA GTA TGA CAA CAG CC	CCT TCC ACG ATA CCA AAG TTG	111 bp
OPG	002546.3	60 °C	CCG GAA ACA GTG AAT CAA CTC	AGG TTA GCA TGT CCA ATG TG	313 bp
Osteonectin	003118	60 °C	AGC ACC CCA TTG ACG GGT A	GGT CAC AGG TCT CGA AAA AGC	105 bp
Osteopontin	000582	60 °C	CTC CAT TGA CTC GAA CGA CTC	CGT CTG TAG CAT CAG GGT ACT G	257 bp
Osteocalcin	000711	62 °C	CAC TCC TCG CCC TAT TGG C	GCC TGG GTC TCT TCA CTA CCT	138 bp
TNF α	000594	58 °C	ATG AGC ACT GAA AGC ATG ATC C	GAG GGC TGA TTA GAG AGA GGT C	217 bp
RANKL	033012.3	56 °C	TCC CAA GTT CTC ATA CCC TGA	CAT CCA GGA AAT ACA TAA CAC TCC	245 bp
Smurf 1	020429.1	58 °C	CAG CAT CAA GAT CCG TCT GA	GCA TAG ATC CAA ACG CTG GT	325 bp
Smurf 2	022739.3	58 °C	AGA CTG GTG TGA GCA CAT GG	CAC TTG CTG TTG CTG TTG GT	239 bp
Ski	003036.3	60 °C	TCC GCG TGT ACC ACG AGT GC	AGC AGG ATG TAG GCC CGC CA	208 bp
SnoN	005414.3	58 °C	GCC ACG AAC TTT TCC TCA AA	GCT GGG GTG TAA AAA TGA ATG	493 bp
SARA	007324.2	58 °C	TGG TTT GCT GAT GGG ATC TT	TTC CAA CAG GAC TTC CAA CC	196 bp
DHCR7	007856.2	58 °C	ATG GGC GCT GCC TCA TCT GG	GAT TCC AGG CAG CAG GCG GT	329 bp
CYP2R1	177382.3	58 °C	GGG AGG CTT ACT CAA TTC CA	GCA ATG ATG AGT TCA CCC ACT	567 bp
CYP27A1	024264.4	58 °C	GTG GA CAC GAC ATC CAA CAC	ATG ATC CGG GAG TTT GTG G	212 bp
GC	008096.1	62 °C	AGA GGA GGT GCT GCA AGA CT	GCA GCA TAT TGT GAG CAG ACT C	707 bp

Tabelle 7 Verwendete PCR-Primer

4. Methoden

4.1 Kultivierung von TGF- β Reporterzellen

Bei den TGF- β Reporterzellen (MFB-F11) handelt es sich um embryonale Fibroblasten aus TGF- $\beta^{-/-}$ Mäusen [Tesseur et al., 2006]. Das für die Kultivierung nötige Medium wurde wie folgt hergestellt:

Volumen	Stoff	Konzentration (final)
500 ml	DMEM	
50 ml	FCS Gold	10 %
5 ml	L-Glutamin	2 mM
5 ml	Penicillin	100 U/ml
5 ml	Streptomycin	100 μ g/ml
560 μ l	Hygromycin B	15 μ g/ml

Tabelle 8 Herstellung des Mediums für die Zellkultur

Das Anzüchten von MFB-F11 Zellen erfolgte im Kulturmedium bei 37 °C in 175 cm² Zellkulturflaschen. Das Medium wurde alle drei bis fünf Tage gewechselt, die Passagierung der Zellen wurde bei hoher Zelldichte nach Beurteilung des Zellrasens unter dem Mikroskop (geschätzt ca. 80% des Flaschenbodens durch Zellen bedeckt) durchgeführt. Dabei wurden die Zellen von einer auf zehn Zellkulturflaschen verteilt. Die Versuche wurden in der 3.-5. Passage durchgeführt.

4.2 Humanes Blut

4.2.1 Serumdiagnostik

Das vom Patienten abgenommene Blut wurde in der Klinischen Chemie des Klinikums rechts der Isar hinsichtlich Serum-Bilirubin, Serum-Albumin und INR analysiert. Aus vorliegenden Arztbriefen wurde entnommen, ob bei dem betreffenden Patient bereits Aszites oder eine hepatische Enzephalopathie vorgelegen hatte. Über diese fünf Parameter wurden die Patienten nach dem Child-Pugh Score in die Kategorien A, B oder C eingeteilt (siehe Tabellen 9- 11). Dieser Score spiegelt den Schweregrad der Zirrhose wider und erlaubt nebenbei auch eine Abschätzung der Überlebenschance innerhalb eines Jahres [Herold et al., 2010, S.530].

4. Methoden

Parameter	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte
Serum-Bilirubin (mg/dl)	< 2,0	2,0 - 3,0	> 3,0
Serum-Albumin (g/l)	> 35	35 - 28	< 28
INR	< 1,7	1,7 - 2,2	> 2,2
Aszites	keiner	gering	ausgeprägt
Hepatische Enzephalopathie	keine	leicht	Präkoma/Koma

Tabelle 9 Punktevergabe im Child-Pugh Score, nach Rentz-Polster et al., 2008, S.710

Punkte	Child-Pugh Score
5-6	A
7-9	B
10-15	C

Tabelle 10 Einteilung des Child-Pugh Scores, nach Rentz-Polster et al., 2008, S.710

Child	INR	Albumin (g/l)	Bilirubin (mg/dl)	Aszites	Hepatische Enzephalo- pathie
A	1,0	45	0,2	keiner	keine
A	1,0	38	1,0	keiner	keine
A	1,2	45	1,2	keiner	keine
A	1,1	38	1,2	keiner	keine
A	1,2	40	1,6	keiner	leicht
A	0,9	44	0,6	keiner	keine
A	1,1	45	0,8	keiner	keine
A	1,1	38	0,5	keiner	leicht
A	1,2	38	0,8	keiner	keine
A	0,9	46	0,8	keiner	keine
A	1,0	43	0,9	keiner	keine
A	1,3	39	1,2	keiner	keine
A	1,1	35	2,1	keiner	keine
A	1,3	31	1,6	keiner	keine
A	1,1	36	0,6	keiner	keine
A	1,1	39	0,9	keiner	keine
A	0,9	43	0,9	keiner	keine

Child	INR	Albumin (g/l)	Bilirubin (mg/dl)	Aszites	Hepatische Enzephalo- pathie
A	1,3	39	1,7	keiner	keine
A	1,4	32	1,9	keiner	keine
A	1,0	47	0,7	keiner	keine
A	1,2	39	1,5	keiner	keine
A	1,2	42	1,2	keiner	keine
A	1,2	38	1,9	keiner	keine
B	1,2	38	3,2	keiner	keine
B	1,1	30	2,7	keiner	keine
B	1,4	33	3,3	keiner	leicht
B	1,5	29	2,6	keiner	keine
B	1,4	36	2,2	keiner	keine
B	1,4	37	3,5	keiner	keine
B	1,6	30	1,8	gering	keine
B	1,1	35	1,0	gering	keine
B	1,5	29	2,3	gering	keine
B	1,5	33	4,3	keiner	keine
B	1,3	31	3,0	gering	keine
B	1,6	30	5,3	gering	keine
B	0,9	36	10,1	keiner	keine
C	1,6	29	4,9	gering	leicht
C	1,5	25	12,5	gering	keine
C	1,8	31	5,4	gering	leicht
C	1,8	35	4,7	gering	keine
C	1,2	32	10,4	gering	leicht
C	1,7	30	7,5	keiner	leicht
C	1,4	35	3,1	gering	leicht
C	1,8	38	6,4	gering	leicht
C	3,0	27	8,8	ausgeprägt	leicht
C	1,8	34	0,7	ausgeprägt	leicht

Tabelle 11 Einteilung des Patientenkollektivs in den Child-Pugh Score

4.2.2 Gewinnung von Serum aus Blutproben

Zur Auftrennung von Blut in Serum und zelluläre Bestandteile wurde jedes Abnahmeröhrchen über 10 Minuten bei 1000 g/min zentrifugiert. Der goldgelbe Serumüberstand wurde anschließend abpipettiert und gesammelt. Zur Vermeidung des Abbaus enthaltener Enzyme durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren wurden Aliquote des Serums erstellt und bei -80 °C eingelagert.

4.2.3 Bestimmung der TGF- β Konzentration im Serum

Die Methode beruht auf der TGF- β -abhängigen Freisetzung einer alkalischen Phosphatase aus TGF- β -Reporterzellen [Tesseur et al., 2006]. Die verwendeten MFB-F11 Zellen aus TGF- $\beta^{-/-}$ Mäusen sind nicht in der Lage selbst TGF- β zu produzieren. Sie enthalten ein Plasmid, dessen Gen für eine alkalische Phosphatase (SEAP = secreted alkaline phosphatase) kodiert. In Anwesenheit von TGF- β wird die SEAP von den Zellen sezerniert und spaltet von einem der Probe zugefügten Substrat (4-Nitrophenylphosphat) eine Phosphatgruppe ab. Daraus resultiert ein im Photometer messbarer Farbumschlag, dessen Änderung eine Funktion der TGF- β Konzentration der Probe darstellt. Die Methode ist sehr spezifisch und sensitiv für TGF- β_{1-3} , andere Wachstumsfaktoren führen nicht zur Freisetzung der Phosphatase. Durch Zusatz von Salzsäure kann außerdem die inaktive Form von TGF- β aktiviert und somit messbar gemacht werden. Die untere Nachweisgrenze der TGF- β -Konzentration liegt mit dieser Methode bei 1 pg/ml.

Bei der nötigen 4-Nitrophenylphosphat-Suspension handelt es sich um AP-Pufferlösung, in der der Farbstoff 4-Nitrophenylphosphat gelöst ist. Die Herstellung ist in Tabelle 12 wiedergegeben.

Menge/Volumen	Stoff	Konz. (final)
500 ml	dH ₂ O	
2 mg/ml Lösung	4-Nitrophenylphosphatdisodiumsalzhexahydrat	
1,88 g	Glyzin	50 mM
101,5 mg	MgCl ₂	1 mM
6,06 g	TRIS	100 mM
	Anschließend pH auf 10,5 einstellen	

Tabelle 12 Herstellung der 4-Nitrophenylphosphat-haltigen AP-Pufferlösung

Die für den Versuch benötigten MFB-F11 Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS auf einer 96 well-Platte zu 50.000 Zellen/well über 48 h mit 70 µl Serum-freien Medium (Herstellung wie in 4.1, aber mit DMEM ohne Phenol-Rot) und 30 µl Patienten- bzw. Kontrollserum oder Standard inkubiert (37 °C, 5% CO₂). Anschließend wurden zu 40 µl der Zellsuspension auf einer neuen 96 well-Platte 60 µl 4-Nitrophenylphosphat-Suspension hinzugefügt und der einsetzende Farbumschlag als Extinktionsänderung bei 405 nm am Photometer gemessen (nach 10, 20, 30, 40 und 50 Minuten).

Zur Berechnung der TGF-β-Konzentration muss eine Kalibrierungskurve erstellt werden. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe mit bekannten Mengen an (rh)TGF-β₁ pipettiert (Tabelle 12). Analog zum oben beschriebenen Vorgehen wurde die Extinktion im Photometer gemessen. Aus den Messwerten wurde mit Microsoft Excel eine Ausgleichsgerade gebildet, mit deren Hilfe sich die unbekanntes TGF-β-Konzentrationen der Serumproben über die allgemeine Geradengleichung $y=m*x+b$ errechnen lassen.

Als Negativkontrolle diente eine reine 4-Nitrophenylphosphat-Lösung ohne Zellen.

Standard #	1	2	3	4	5	6	7	8
Konz. (rh)TGF-β (ng/ml)	50	25	12,5	6,25	3,125	1,562	0,781	0

Tabelle 13 Standard-Verdünnungsreihe für die Bestimmung der TGF-β-Konzentration

4.3 Histologische Untersuchung humanen Lebergewebes

4.3.1 *Prinzip einer histologischen Untersuchung*

Ziel einer histologischen Untersuchung ist die Beantwortung der Frage, ob und wenn ja in welchem Ausmaß in einem Organ eine bestimmte Erkrankung vorliegt. Dazu wird ein Schnitt des betroffenen Gewebes unter dem Mikroskop systematisch nach spezifischen morphologischen Merkmalen der Erkrankung abgesucht. Zur Kontrastierung und Darstellung zellulärer wie extrazellulärer Komponenten sind Färbungen des Gewebeschnitts notwendig. Die spezifische Anfärbung beruht dabei auf der Ausbildung elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen Farbstoffkomponente und Gewebeanteilen. Da viele Farbstoffe jedoch in wässriger Lösung vorliegen, müssen die Gewebeschnitte zunächst mit Lösungsmitteln und absteigenden Konzentrationen von Ethanol entparaffiniert bzw. entwässert werden, damit eine Anfärbbarkeit erreicht werden kann. Über den Vergleich mit gesundem Referenzgewebe lassen sich Aberrationen im kranken Organ erkennen. Diese Methode erlaubt jedoch nur eine grobe Orientierung und ist sehr von der Erfahrung des Untersuchers abhängig [Welsch, 2006, S.4ff].

4.3.2 *Erstellung von Gewebeschnitten*

Das Lebergewebe wurde in ca. 0,5 cm dicke Scheiben geschnitten und in Einbettkassetten in aufsteigender Alkoholkonzentration entwässert. Im Anschluss daran erfolgte die Einbettung in Paraffin. Nach Erkaltung und Härtung des Paraffins wurden mit dem Mikrotom von jedem Block 0,7 µm dünne Scheiben abgehobelt und, mittels Paraffin-Streckbad, auf Mikroskop-Objektträger übertragen.

4.3.3 Färbungen

Die für die Masson-Trichrom Färbung nötigen Farbstoffe wurden frisch angesetzt. Herstellung und Zusammensetzung zeigt Tabelle 14.

Farbstoff	Menge/Volumen	Stoff
Hämalaun nach Weigert	50 ml	Weigerts Hämatoxylinlösung A
	50 ml	Weigerts Hämatoxylinlösung B
Säure-Fuchsin-Ponceau	0,2 g	Ponceau
	0,1 g	Säurefuchsin
	300 ml	Aqua bidest.
	0,6 ml	Essigsäure 1%
Phosphorwolframsäure- Orange G	9-15 g	Phosphorwolframsäure
	6 g	Orange G
	300 ml	Aqua bidest.
Lichtgrün	0,3-0,6 g	Lichtgrün
	0,6 ml	Essigsäure
	300 ml	Aqua bidest.

Tabelle 14 Herstellung der Farbstoffe für die Masson-Trichrom Färbung

Für die Färbung der Gewebeschnitte wurden über mehrere Versuchsreihen die optimalen Verweilzeiten der Objektträger in den jeweiligen Flüssigkeiten ermittelt:

Hämatoxylin-Eosin Färbung		Masson Goldner Trichrom Färbung	
Substanz	Zeit (min)	Substanz	Zeit (min)
Roticlear	11	Roticlear	11
Ethanol 100%	8	Ethanol 100%	8
Ethanol 90%	2	Ethanol 90%	2
Ethanol 80%	2	Ethanol 80%	2
Aqua dest.	2	Aqua dest.	2
Hämatoxylin nach Mayer	5	Hämalaun nach Weigert	3
Spülung unter Wasserhahn	15	Spülung unter Wasserhahn	10
Eosin	3	Säure-Fuchsin-Ponceau	2
Aqua dest.	kurz	Essigsäure 1% (frisch angesetzt)	kurz
Ethanol 80%	0,5	Phosphorwolframsäure-Orange G	5,5
Ethanol 90%	8	Essigsäure 1% (frisch angesetzt)	kurz
Ethanol 100%	8	Lichtgrün 1%	17
Roticlear	20	Essigsäure 1% (frisch angesetzt)	kurz
		Ethanol 80%	kurz
		Ethanol 90%	8
		Ethanol 100%	8
		Roticlear	20

Tabelle 15 Färbezeiten für die H.E.- und Masson Trichrom-Färbung

4. Methoden

Die spezifische Anfärbung zellulärer und extrazellulärer Komponenten unter optimalen Bedingungen zeigen Tabelle 16 und 17.

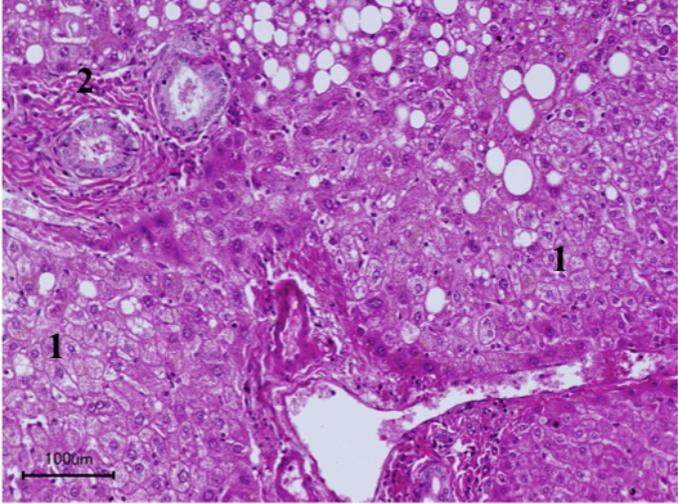
Hämatoxylin-Eosin-Färbung		
Struktur	Farbe	
Zellkerne (1)	Blau-violett	
Bindegewebe/ Kollagen (2)	Rot	
Nekrosen	Rot	

Abbildung 9 Beispiel einer Hämatoxylin-Eosin Färbung

Tabelle 16 Anfärbung mikroskopischer Strukturen in der Hämatoxylin-Eosin Färbung

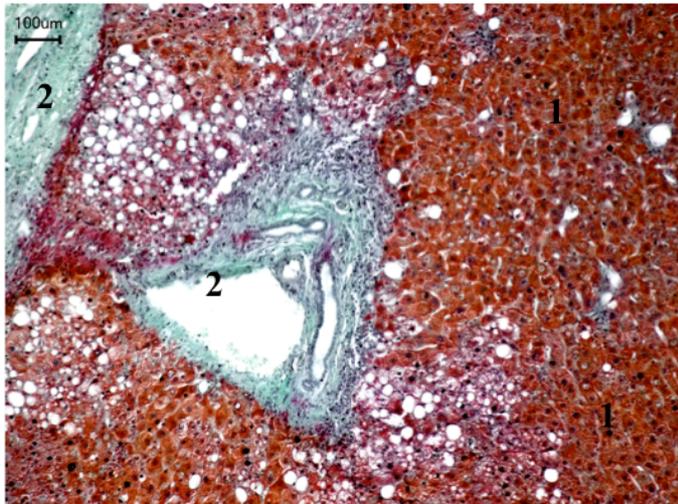
Masson Goldner Trichrom-Färbung		
Struktur	Farbe	
Zellkerne (1)	Blau-schwarz	
Bindegewebe/ Kollagen (2)	Grün	

Abbildung 10 Beispiel einer Masson Trichrom-Färbung

Tabelle 17 Anfärbung mikroskopischer Strukturen in der Masson-Trichrom Färbung

4.3.4 Beurteilung

Jeder Leberschnitt wurde mit gesundem Lebergewebe verglichen und auf Zirrhosekriterien untersucht (s.u.). Anschließend erfolgte ein Abgleich des Ergebnisses mit den vorliegenden Pathologiebefunden. Eine gesunde Leber zeigt den in Abbildung 11 sichtbaren Aufbau, wobei die lehrbuchhafte in 1.1.1 beschriebene Architektur selten angetroffen wird.

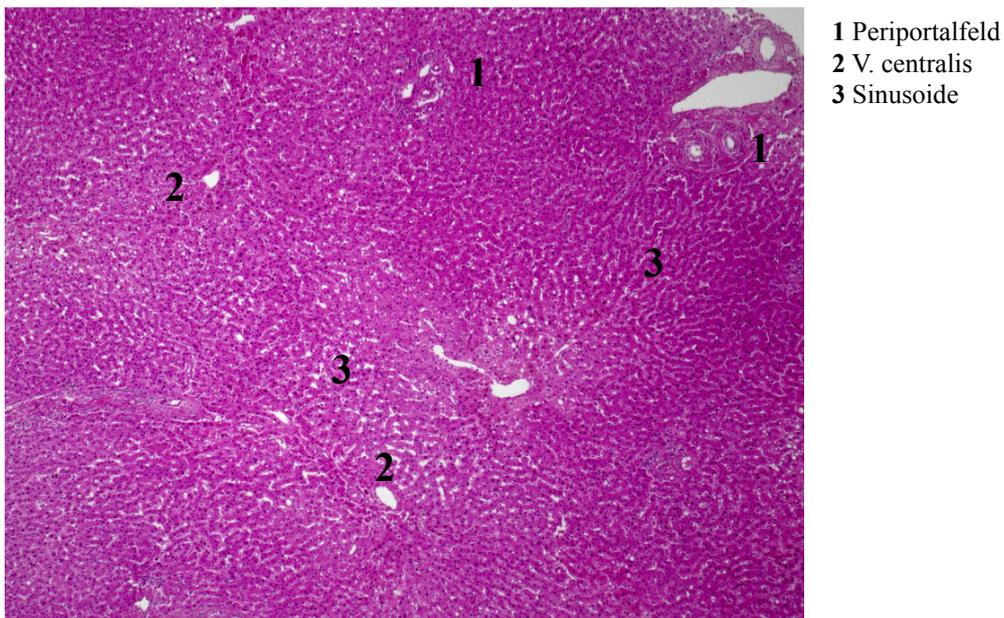


Abbildung 11 Physiologische Architektur einer humanen Leber, H.E.-Färbung, Vergr. 40fach

Kriterien für eine Zirrhose, die für die Beurteilung der Schnitte herangezogen wurden, sind die

- Entstehung bindegewebiger Septen (portoportal oder portozentral) (Abb. 12/13)
- Zerstörung der Parenchymarchitektur aus Läppchen und Gefäßen (Abb. 14)
- Bildung von Regeneratknoten (Abb. 15/16)
- Ausbildung von Nekrosen (Abb. 17)

[Herold et al., 2010, S.528; Bühling et al., 2008, S.271]

Bei Vorliegen dieser Kriterien wurde das Lebergewebe als „zirrhotisch“ eingestuft, das Fehlen führte zur Einstufung als „gesund“. Auf diese Weise konnten zwei Patientenkollektive gebildet werden und jeder Gruppe wurden die zugehörigen Blut- und cDNA-Proben zugeordnet.

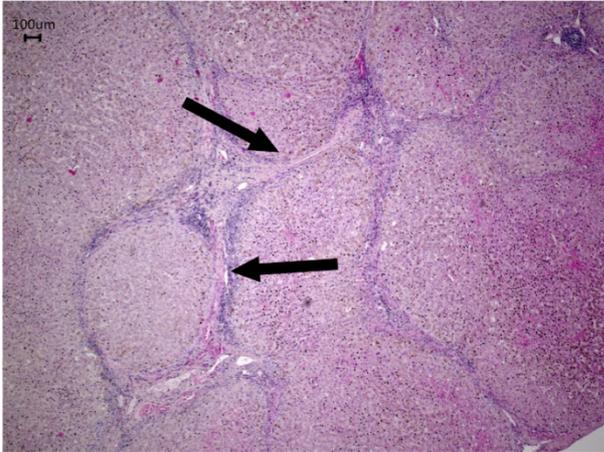


Abbildung 12 Portoportale Septierungen bei Zirrhose, H.E.-Färbung, Vergr. 40fach

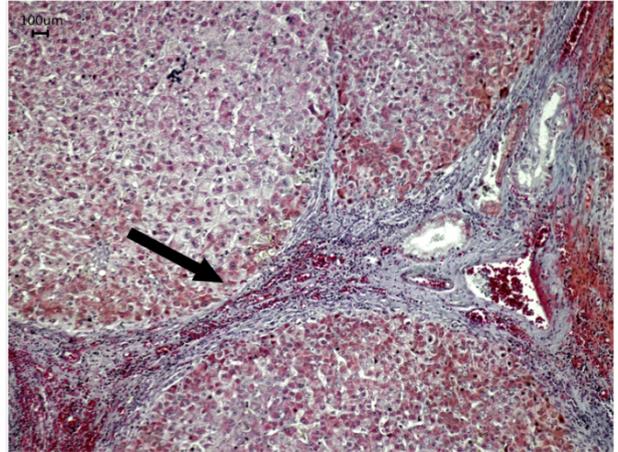


Abbildung 13 Portoportale Septierungen bei Zirrhose, Masson Trichrom-Färbung, Vergr. 100fach

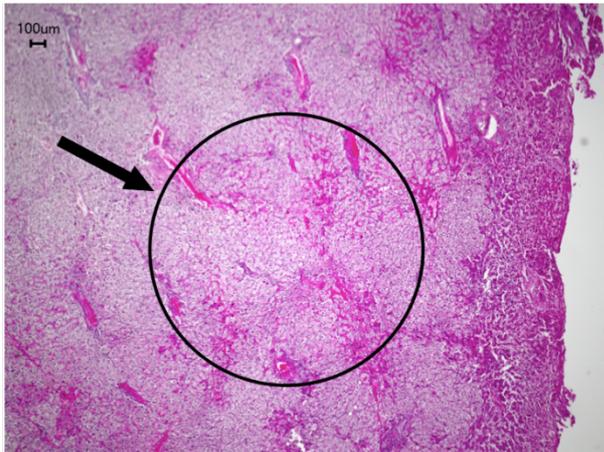


Abbildung 14 Zerstörte Architektur bei Zirrhose, H.E.-Färbung, Vergr. 40fach

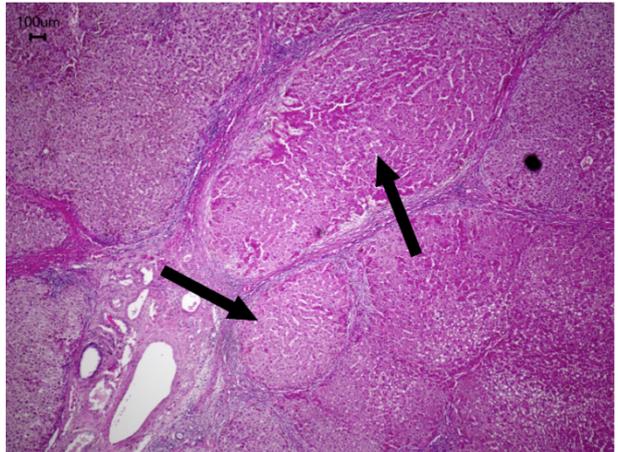


Abbildung 15 Regeneratknotten bei Zirrhose, H.E.-Färbung, Vergr. 40fach

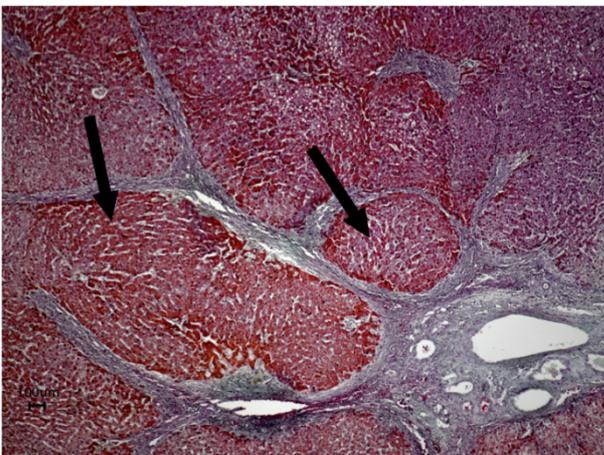


Abbildung 16 Regeneratknotten bei Zirrhose, Masson Trichrom-Färbung, Vergr. 40fach

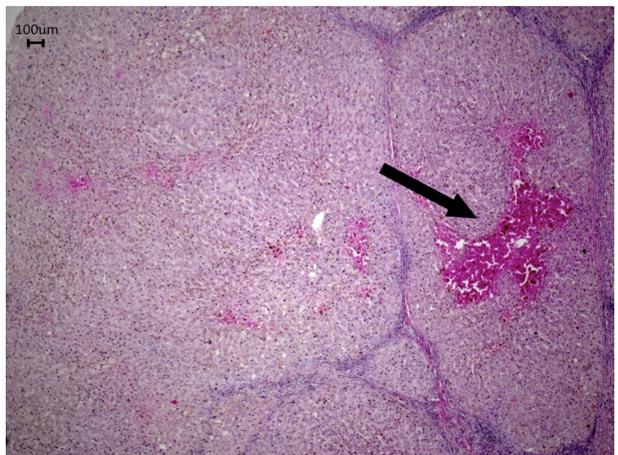


Abbildung 17 Nekrose bei Zirrhose, H.E.-Färbung, Vergr. 40fach

4.4 Isolation von RNA

4.4.1 Prinzip und Durchführung der RNA-Isolation

RNA wird im Zellkern je nach Stoffwechsellage in unterschiedlichem Ausmaß ausgehend von DNA umgeschrieben. Es ist also nicht zu jedem Zeitpunkt dieselbe mRNA bzw. deren Konzentration in der Zelle vorhanden. Die Extraktion von RNA aus dem Zellkern liefert somit eine Momentaufnahme der Zelltätigkeit und ermöglicht Rückschlüsse auf die Genexpression.

Die Isolation der RNA wurde nach der Methode nach Chomczynski und Sacchi durchgeführt. Es ist zu beachten, dass RNA sehr labil und anfällig gegenüber proteolytischen Enzymen (RNAsen) ist. Daher erfolgten alle Arbeitsschritte auf Eis und unter Verwendung von Einmalhandschuhen.

Für die RNA-Isolation wurden folgende Lösungen vorbereitet:

Lösung	Menge/Volumen	Stoff
DEPC-H ₂ O	1 ml 1000 ml 1h bei 37 °C inkubieren, anschließend autoklavieren	Diethylpyrocarbonat dH ₂ O
TBE Puffer (10x)	540 g 275 g 37,3 g Auf 5.000 ml mit dH ₂ O auffüllen und pH auf 8,3 einstellen	TRIS-aminomethan (0,89 M) Borsäure (0,89 M) Ethylendiamintetraacetat EDTA (20 mM)
PCR Ladepuffer (5x)	1 mg 25 ml 5 ml 20 ml	Bromphenol Blau TBE Puffer Glycerol 10% dH ₂ O

Tabelle 18 Herstellung der Lösungen für die RNA-Isolation

Jede Leberprobe wurde zunächst mechanisch zerkleinert, dann chemisch mit 750 µl Trifast lysiert. Trifast inaktiviert gleichzeitig RNAsen. Nach Zufügen von 150 µl Chloroform trennt sich das Stoffgemisch durch Zentrifugierung (14.000 g, 10 min) in

drei Phasen auf. Zuoberst liegt die wässrige RNA haltige Phase, über einem Saum DNA und dem rötlichen Gemisch aus Trifast und Proteinen. Der wässrige Überstand wurde abpipettiert und in einem neuen Reaktionsgefäß mit 375 µl Isopropanol versetzt. Durch erneute Zentrifugierung (14.000 g, 10 min) präzipitiert die RNA als gelähnliches weißes Pellet, welches nach Verwerfen des Überstandes mit 1 ml Ethanol 70% gewaschen wurde. Nach zweimaliger Wiederholung von Zentrifugierung und Waschen wurde das Pellet in RNase freiem DEPC-H₂O durch Schütteln mit dem Vortex gelöst, so dass man schließlich für jede Probe eine RNA haltige Suspension unterschiedlicher Konzentration erhält.

4.4.2 Konzentrationsbestimmung und Integritäts-Check

Die Bestimmung der RNA-Konzentration jeder einzelnen Probe erfolgte über die optische Dichte am Spektralphotometer (NanoDrop). Der Blindwert wurde mit DEPC-H₂O ermittelt und in den folgenden Messungen vom Gerät mit den jeweiligen Messwerten verrechnet. Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei $\lambda=260$ nm, Proteine bei $\lambda=280$ nm. Durch den Quotient der Messwerte ergibt sich das Verhältnis von RNA zu Proteinen. Dieses sollte sich um einen Wert von 2,0 bewegen, niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung der RNA hin (z.B. durch Phenole). Die Software errechnet aus den Messwerten bei $\lambda=260$ nm die Konzentration der RNA.

Um die Integrität der RNA mittels Gelelektrophorese feststellen zu können, wurde ein 1,5%iges Agarosegel hergestellt. Dafür wurden 1,5 g Agarose in 100 ml TBE Puffer so lange in der Mikrowelle aufgelöst, bis keine Ausflockung mehr sichtbar war. Danach wurden 3 µl Ethidiumbromid (1,5 µl pro 50 ml Gel) zupipettiert und das flüssige Gel zum Erkalten in eine mit Kämmen versehene Gießkammer gegossen. Anschließend wurde aus der vom NanoDrop ermittelten RNA-Konzentration errechnet, wie viel µl jeder Probe 0,5 µg RNA enthalten. Dieses Volumen muss mit einem entsprechenden Volumen x µl DEPC-H₂O und 7 µl Ladepuffer auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt werden:

$$0,5 \mu\text{g} / [\text{RNA}] + 7 \mu\text{l Ladepuffer} + x \mu\text{l DEPC H}_2\text{O} = 20 \mu\text{l}$$

In die erste Kammer des Gels wurden 2 µl pUC19-Marker (Größenmarker) aufgetragen, die restlichen Kammern wurden mit jeweils 10 µl Probe beladen. Nach Anlegen

einer Spannung von 90 Volt erkennt man nach 30-40 Minuten im Vergleich zu 2µl pUC19-Marker die für intakte RNA typischen 18 S- und 28 S-Banden (Abb. 18).

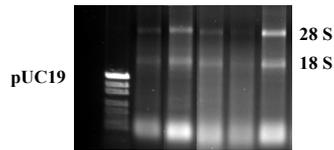


Abbildung 18 Nachweis intakter RNA nach Gelelektrophorese

4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

4.5.1 Prinzip der PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stellt eine Methode zum Nachweis und zur Vervielfältigung (Amplifikation) definierter Nukleinsäure-Sequenzen dar. Mit dieser Methode lässt sich entweder RNA in cDNA umschreiben, oder eine DNA-Sequenz amplifizieren. Für die Durchführung wird grundsätzlich benötigt:

- Template (DNA oder RNA)
- Polymerase (DNA- oder RNA-abhängige DNA-Polymerase)
- MgCl₂
- Primer
- Desoxyribonukleosidtriphosphate = dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
- Pufferlösung

Prinzip der PCR ist die Synthese eines DNA-Stranges, komplementär zu einem Ausgangsstrang. Dieser als Matrize bezeichnete Ausgangsstrang kann entweder selbst DNA-Sequenz oder RNA sein. In beiden Fällen laufen die einzelnen Arbeitsschritte in einem Thermocycler ab, der die optimale Temperatur für jeden Schritt einstellt. Die einzelnen Reaktionsabläufe von cDNA-Synthese und Genamplifikation unterscheiden sich jedoch voneinander:

Bei der cDNA-Synthese dient eine mRNA als Matrize. An den Poly-A Schwanz der mRNA bindet der Primer („Annealing“), an dessen 3'-OH-Ende die Reverse Transkriptase dNTPs anlagert. Die Abfolge der dNTPs ist komplementär zur Sequenz der RNA und es entsteht ein RNA-DNA-Hybridstrang. Nach Abspaltung des RNA-Strangs und erneuter Anlagerung von dNTPs an den freigewordenen DNA-

Einzelstrang entsteht die doppelsträngige cDNA (Abbildung 19) [Rassow et al., 2006, S.492ff].

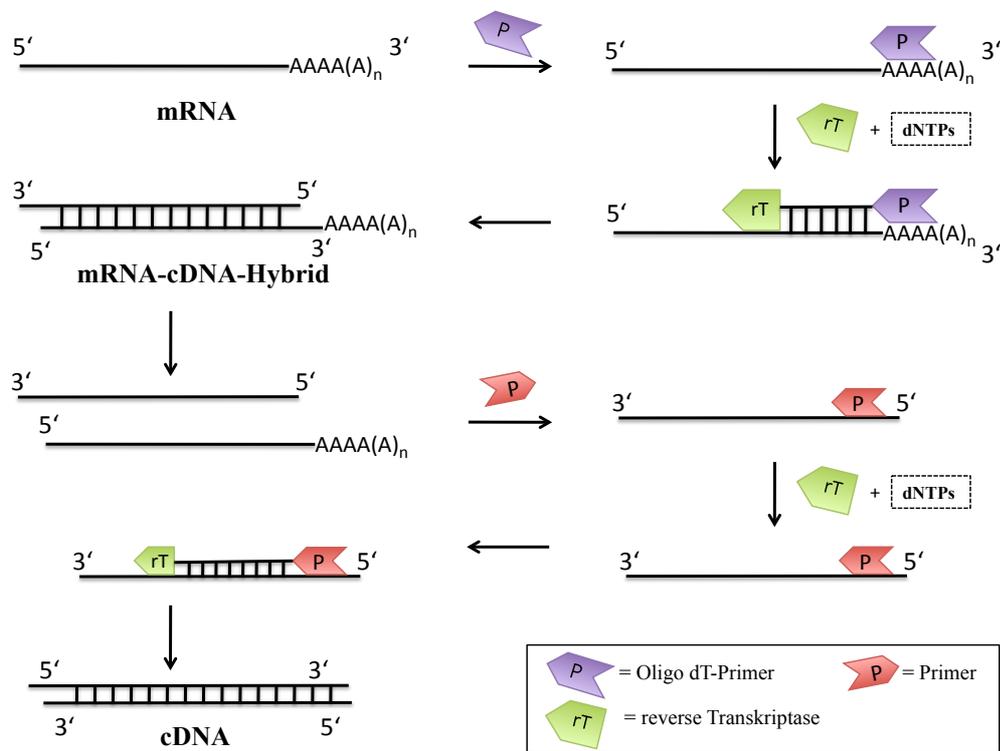


Abbildung 19 Synthese von cDNA aus mRNA, nach Rassow et al., 2006, S.492ff

Die Genamplifikation verläuft in drei sich wiederholenden Schritten. Im Gegensatz zur cDNA-Synthese aus einsträngiger RNA muss hier die doppelsträngige DNA durch Hitze erst denaturiert werden. Dabei lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen auf und es entstehen DNA-Einzelstränge. An diese hybridisieren anschließend die Primer bei einer für sie spezifischen Temperatur (Annealing-Temperatur). Diese ist umso höher, je größer der Gehalt an Wasserstoffbrückenbindung-reichen GC-Sequenzen ist. Im dritten Schritt – der Elongation oder Amplifikation – dient jeder Einzelstrang als Matrize für die Synthese eines Komplementärstranges durch die hitzestabile taq-Polymerase, die vom 3'-OH-Ende der Primer ausgeht. Die taq-Polymerase lagert bei 70-72 °C dNTPs an den neu entstehenden Strang an und schafft damit eine identische Kopie der Ausgangs-DNA. Bei jeder weiteren Wiederholung dieser Schritte (insgesamt 20-40 Zyklen) wird jeder neue Strang selbst als Matrize verwendet, so dass sich die Anzahl an Kopien der DNA-Sequenz exponentiell erhöht (Abbildung 20) [Rassow et al., 2006, S.492ff].

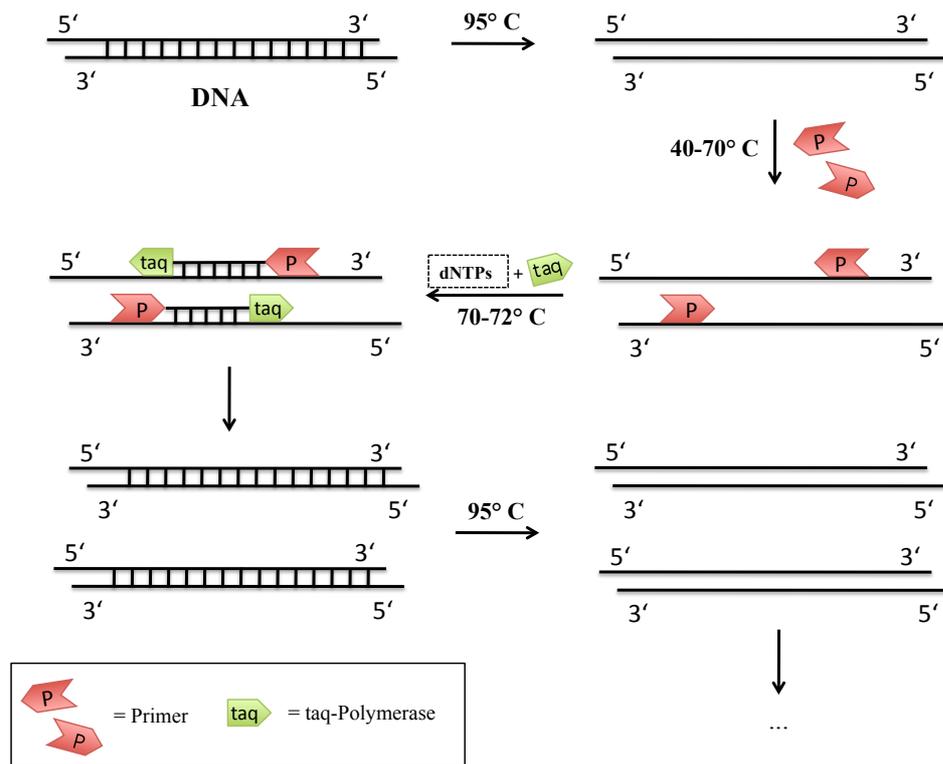


Abbildung 20 Amplifikation einer DNA-Sequenz, nach Rassow et al., 2006, S.492ff

4.5.2 Durchführung der cDNA-Synthese

Als erstes muss errechnet werden, welches Volumen der verwendeten RNA-Suspension 4 µg RNA enthält. Zu diesem Volumen wurden 1 µl Oligo(dT)₁₈ Primer und 1 µl Random Hexamer Primer pipettiert und die Probe auf 11 µl mit x µl DEPC-H₂O aufgefüllt.

$$4,0 \mu\text{g} / [\text{RNA}] + 1 \mu\text{l Oligo(dT)}_{18} + 1 \mu\text{l Random Hexamer} + x \mu\text{l DEPC-H}_2\text{O} = 11 \mu\text{l}$$

Dieser Reaktionsansatz wurde über 5 Minuten im Thermocycler bei 65 °C denaturiert. Anschließend wurden zu jeder Probe 9 µl eines Mastermix pipettiert. Dieser wurde wie folgt hergestellt:

Volumen	Stoff
4 µl	Reaktionspuffer (5x)
1 µl	RNAse Inhibitor
2 µl	dNTPs (10 mM)
2 µl	Reverse Transkriptase

Tabelle 19 Herstellung des Mastermix für die cDNA-Synthese

Mit den resultierenden 20 µl Gesamtvolumen pro Probe wurde die PCR vollständig durchgeführt und die fertige cDNA im Verhältnis 1:10 mit DEPC-H₂O verdünnt.

4.5.3 Durchführung der Genamplifikation

Für die Amplifikation definierter DNA-Sequenzen wurden 4-6 µl der im vorherigen Schritt hergestellten cDNA eingesetzt. Zu diesem Volumen wurde der Mastermix pipettiert, der sich folgendermaßen zusammensetzt:

Volumen	Stoff
2 µl	Reaktionspuffer BD
2 µl	MgCl ₂
1 µl	Forward Primer
1 µl	Reverse Primer
1,5 µl	dNTPs (10 mM)
0,1 µl	Taq Polymerase

Tabelle 20 Herstellung des Mastermix für die Genamplifikation

Das Gemisch wurde mit DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Mit diesem Volumen wurde die PCR gestartet.

4.5.4 Gelelektrophorese und densitometrische Analyse

Zur Auswertung wurde jeder Probe amplifizierter DNA 7 µl Ladepuffer zugefügt und von diesem Gemisch anschließend 10 µl auf ein 1,8%iges Agarosegel aufgetragen (Herstellung siehe 4.4.2 mit 1,8 statt 1,5 g Agarose). Nach 30 Minuten im elektrischen Feld bei 90 Volt wurden die DNA-Banden unter UV-Licht fotografiert und anschließend mit der Software Image J densitometrisch analysiert. Die Normalisierung der gemessenen Werte erfolgte dabei auf die korrespondierenden Ergebnisse für PCRs mit den House-keeping-Genen GAPDH oder β-actin.

4.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

4.6.1 *Prinzip eines ELISAs*

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) stellt eine Methode dar, mit deren Hilfe sich Proteine und niedermolekulare Verbindungen – also z.B. Antikörper oder Antigene – nachweisen lassen. Prinzip des ELISAs ist die Bindung von Antikörpern (meist von Kaninchen oder Maus stammend) an ein zu untersuchendes Antigen [Schartl et al., 2009, S.840]. Durch einen zweiten Antikörper, der gegen die Fc-Region der antigengebundenen Antikörper gerichtet ist und Enzymaktivität besitzt (z.B. alkalische Phosphatase oder Meerrettich-Peroxidase), kann nach Zugabe eines chromogenen Substrats ein Farbumschlag erzielt werden. Dieser stellt im Photometer ein Maß für die Konzentration des gesuchten Antigens dar. Wegen der Anordnung Antigen-Antikörper-Antikörper wird diese Methode auch als „Sandwich ELISA“ bezeichnet, wobei der erste Antikörper in der Regel bereits als „Deckschicht“ auf den verwendeten Platten aufgetragen ist und nicht mehr extra zugefügt werden muss. Eine ähnliche aber schneller durchführbare Methode ist die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers, der das gesuchte Antigen direkt erkennt und gleichzeitig selbst Enzymaktivität für eine Farbreaktion besitzt. Die Bestimmung der 25-Hydroxy-Vitamin D-Konzentration im Patientenserum wurde mit einem direkten ELISA durchgeführt, die von Sclerostin mittels traditionellem Sandwich-ELISA. Als Kontrolle diente Serum gesunder Probanden.

4.6.2 *Bestimmung der Serumkonzentration von 25-Hydroxy-Vitamin D*

Der ELISA wurde gemäß des Protokolls des Herstellers durchgeführt: Reagenzien und Proben wurden auf Raumtemperatur erwärmt. 30 µl jeder Serumprobe wurden mit 300 µl Freisetzungsreagenz vermischt und eine Stunde bei 37° C inkubiert. Nach dem Zufügen von 600 µl Verdünnungspuffer wurden 50 µl des Gemischs in die Mikrotiterstreifen pipettiert und mit 150 µl Antikörperlösung (Anti 25-Hydroxy-Vitamin D Antikörper) versetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation im Dunkeln bei 8-10° C. Zur Entfernung der nicht an die Oberfläche gebundenen Probenantigene wurde der Überstand abpipettiert und jeder Streifen fünfmal mit 250 µl Waschpuffer gewaschen. Danach wurden pro Vertiefung 200 µl Konjugat zupipettiert und die Streifen nochmals

für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach nochmaligem Verwerfen des Überstandes und anschließendem Waschen wurden 200 µl Substrat hinzupipettiert und das Gemisch für 10-15 Minuten unter Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Der Abbruch der ablaufenden Enzymreaktion wurde durch 50 µl Stopplösung herbeigeführt und die Extinktion bei 450 nm im Photometer gemessen. Zur Auswertung wurden die Messwerte mit der Extinktion bei einer Referenzwellenlänge von 650 nm verglichen und ins Verhältnis zu den Kontrollproben gesetzt.

4.6.3 Bestimmung der Serumkonzentration von Sclerostin

Auch der Sclerostin ELISA wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Vorbereitung wurde die Waschlösung 1:20 verdünnt, die Antikörperlösung mit 7 ml Puffer rekonstituiert und beide Lösungen für 30 Minuten bei 2-8 °C gekühlt. Anschließend wurden jeweils 400 µl der Waschlösung in die Vertiefungen einer 96 well-Platte pipettiert und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Abziehen der Flüssigkeit wurden jeweils 25 µl der Einzelproben, Kontrollseren und Standards in die Vertiefungen eingebracht und dort mit 50 µl Matrixlösung und 50 µl Antikörperlösung (polyklonaler Antikörper und monoklonaler Antikörper mit Meerrettich-Peroxidase) versetzt. Das Gemisch wurde anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur und dann bei 2-8 °C über Nacht inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit gekühltem Waschpuffer wurden jeder Probe 100 µl Substrat zugefügt und die Platten für 20-30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die ablaufende Enzymreaktion wurde mit 100 µl Stopplösung abgebrochen und die Extinktion bei 450 nm gemessen. Auch hier wurde zur Auswertung die Extinktionsänderung bei 450 nm gegenüber der Referenzwellenlänge von 650 nm verglichen und die resultierenden Messwerte ins Verhältnis zu den Kontrollproben gesetzt.

4.7 Knochendichtemessung

4.7.1 Prinzip der Knochendichtebestimmung

Die Knochendichte wurde über die Methode nach Philips mittels quantitativer Computertomografie (QCT) bestimmt. Dabei ermittelt eine Software auf CT-Aufnahmen der Wirbelsäule Absorptionskoeffizienten im Spongiosaraum der Wirbelkörper und setzt

diese ins Verhältnis zu Absorptionskoeffizienten in Fettgewebe [nach Reiser et al., 2006, S.322; Mueller et al., 2011]. Aus den Messwerten errechnet die Software den BMD-Wert (bone mineral density) und den T-Score. Für diese Arbeit wurden sagittale CT-Bilder der Wirbelsäule verwendet. Die Messfelder wurden in die Lendenwirbelkörper eins bis drei gelegt. Als gesunde Kontrolle dienten T-Scores aus DEXA-Messungen lebergesunder Patienten.

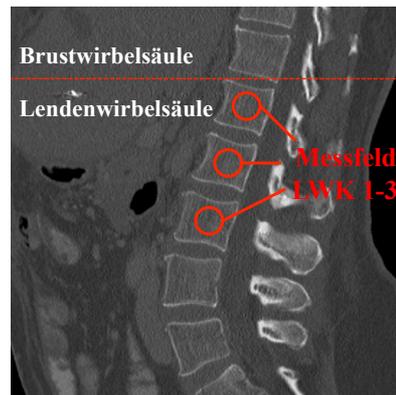


Abbildung 21 Messfelder im sagittalen CT-Bild zur Knochendichtebestimmung

4.7.2 Klassifikation – der BMD-Wert und T-Score

Der über die QCT gemessene BMD-Wert wird in mg Hydroxylapatit pro ml trabekulärer Knochen angegeben. Der T-Score hingegen stellt eine dimensionslose Zahl dar, die widerspiegelt, in wie weit sich die Knochendichte einer betreffenden Person vom Referenzwert eines gesunden jungen, gleichgeschlechtlichen Erwachsenen in Standardabweichungen (SD) unterscheidet. Durch die Verwendung des dimensionslosen T-Scores lassen sich Messungen, die mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt wurden (hier: DEXA und QCT), vergleichen [Kiechle et al., 2007, S. 163]. Tabelle 21 zeigt die dabei geltenden Grenzwerte:

BMD (mg Hydroxylapatit/ml trabekulärer Knochen)		T-Score (in SD)	
> 120	Normal	> -1	Normal
80 bis 120	Osteopenie	-1 bis -2,5	Osteopenie
< 80	Osteoporose	< -2,5	Osteoporose

Tabelle 21 Grenzwerte des BMD und T-Scores, nach Kiechle et al., 2007, S.163

5. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde zum Vergleich zweier Testmerkmale ein t-Test (Mann-Whitney) durchgeführt. Wurden mehr als zwei Testmerkmale miteinander verglichen, erfolgte eine Analyse mittels one-way analysis of variance (Anova) Test. Das Signifikanzniveau wurde für $p < 0,05$ als ausreichend festgelegt. Die Auswertung wurde mit Graphpad Prism durchgeführt.

6. Ergebnisse

6.1 Patienten mit Leberzirrhose haben eine schlechte Knochendichte

Die Bestimmung des T-Scores (Tabelle 22) ergibt für alle untersuchten Patienten mit Leberzirrhose (N=18) im Vergleich zum alters- und geschlechtsnormalisierten Kontrollkollektiv (N=23) signifikant niedrigere Werte (T-Score Kontrolle = -0,56 SD; T-Score Zirrhose = -1,91 SD; $p < 0,01$; one-way Anova). Aufgeteilt in die Child Stadien findet sich eine signifikante Abnahme der Knochendichte bei Patienten mit Child A-Zirrhose (N=9) gegenüber der gesunden Kontrolle ($p < 0,05$; one-way Anova). Ein T-Score < -1 SD korreliert mit der Osteoporosevorstufe Osteopenie. Im Durchschnitt zeigen alle Child Stadien T-Scores < -1 (Child A: -2,2 SD; Child B: -1,5 SD; Child C: -2,2 SD). Die gesunde Kontrolle liegt mit ihrem Durchschnittswert im physiologischen Bereich. Damit zeigt dieses Ergebnis, dass Zirrhosepatienten stärker von struktureller Knochenschädigung bedroht sind, als ein gesundes Vergleichskollektiv.

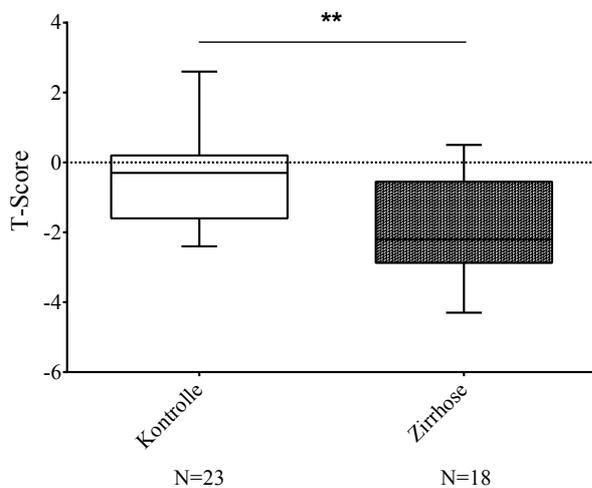


Abbildung 22 T-Score Kontrolle vs. Zirrhose-Gesamtkollektiv, signifikante Abnahme des T-Scores in der Zirrhosegruppe (** $p < 0,01$)

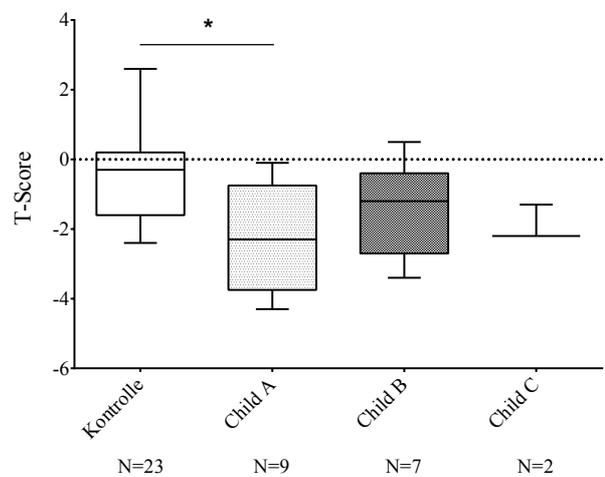


Abbildung 23 T-Score Kontrolle vs. Child A-C, signifikante Abnahme des T-Scores bei Child A, sichtbarer Trend bei Child B und C (* $p < 0,05$)

Kontrolle			Zirrhosepatienten			
Alter	T-Score	Geschlecht	Alter	Child	T-Score	Geschlecht
57	-2,3	w	71	A	-2,7	w
65	0,3	w	54	A	-0,2	w
60	-1,1	w	71	A	-4,3	w
54	-2	w	69	A	-4,0	m
42	0,1	w	65	A	-3,5	m
59	-2,1	w	33	A	-1,3	m
71	2,6	w	57	A	-0,1	m
60	1,8	w	62	A	-2,3	m
70	0,7	w	61	A	-1,3	m
57	-0,2	w	70	B	-2,7	w
55	-0,1	w	56	B	-3,4	w
55	-0,3	w	48	B	-2,4	w
70	-2,3	w	70	B	-1,2	m
49	-0,4	w	44	B	0,5	m
49	-1	w	64	B	-0,4	m
49	-0,3	m	50	B	-0,6	m
68	-1,5	m	56	C	-2,2	m
56	0,3	m	59	C	-2,2	m
68	0,2	m				
64	-2,4	m				
61	-0,2	m				
60	-1	m				
46	-1,6	m				

Tabelle 22 T-Scores der gesunden Kontrolle und der Zirrhosepatienten

6.2 Die TGF- β -Serumkonzentration ist bei Zirrhose-Patienten erhöht

Bei der Bestimmung der TGF- β -Konzentration im Serum wurden zirrhotische Lebern der Child-Stadien A-C (Child A (N=23), Child B (N=13), Child C (N=10)) mit einer gesunden Kontrolle (N=12) verglichen. Dabei zeigten sich in allen Child-Stadien signifikant höhere TGF- β -Spiegel als in der Kontrolle (Child A: [TGF- β] = 73,8 ng/ml; Child B: [TGF- β] = 69,9 ng/ml; Child C: [TGF- β] = 60,5 ng/ml; Kontrolle: [TGF- β] = 22,7 ng/ml; $p < 0,01$; one-way Anova).

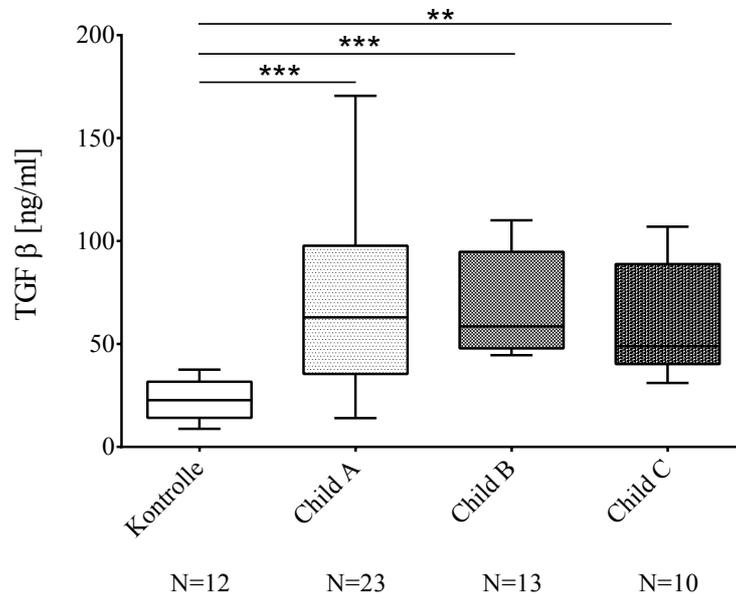


Abbildung 24 TGF- β Serumkonzentration Kontrolle vs. Child A-C, signifikant höhere Konzentrationen im Serum von Patienten mit Zirrhose (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

6.3 Ergebnisse der PCRs

6.3.1 Die Leberzirrhose hat keinen Einfluss auf die hepatische Genexpression der Regulatorproteine smurf 1, smurf 2, SARA, Ski und SnoN

Die densitometrische Analyse der jeweiligen PCRs lieferte keinen signifikanten Unterschied zwischen der Genexpression von smurf 1, smurf 2, SARA, Ski und SnoN in zirrhotischer (N=12) und derjenigen in nicht zirrhotischer (N=10) Leber. Die Genexpression der Regulatorproteine des TGF- β -Signalwegs ist nach diesen Daten unabhängig vom Gesundheitszustand der Leber. Abbildung 25 und 26 zeigen exemplarisch die Ergebnisse für smurf 1 und SARA in Relation zum House-keeping-Gen GAPDH.

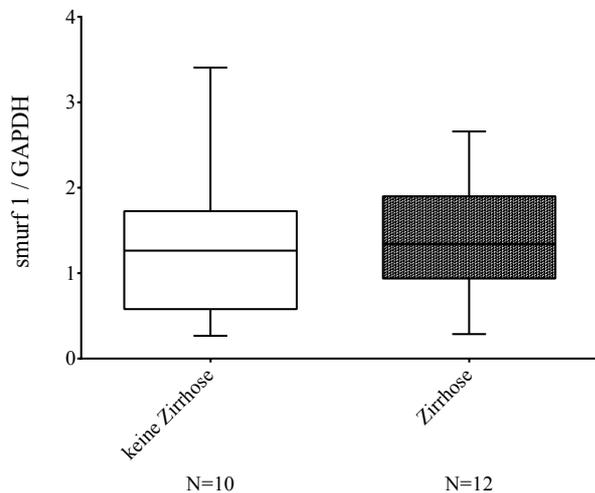


Abbildung 25 Fehlender Einfluss der Leberzirrhose auf Regulatorproteine des TGF- β -Signalwegs am Beispiel der Genexpression von smurf 1

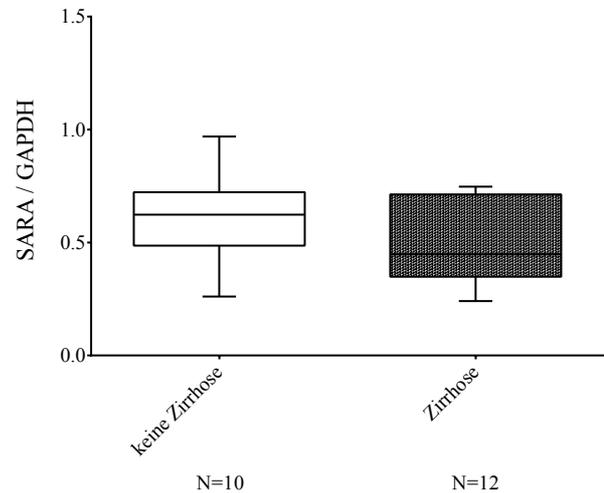


Abbildung 26 Fehlender Einfluss der Leberzirrhose auf Regulatorproteine des TGF- β -Signalwegs am Beispiel der Genexpression von SARA

6.3.2 *Osteopontin, Osteocalcin, Osteonectin, RANKL und TNF α können in Lebergewebe nachgewiesen werden, sind bei Zirrhose aber nicht reguliert*

Die Genexpression der Regulatorproteine des Knochenstoffwechsels Osteopontin (nicht zirrhötisch: N=10, zirrhötisch: N=12), Osteocalcin (nicht zirrhötisch: N=10, zirrhötisch: N=12), Osteonectin (nicht zirrhötisch: N=10, zirrhötisch: N=12), RANKL (nicht zirrhötisch: N=10, zirrhötisch: N=12) und TNF α (nicht zirrhötisch: N=10, zirrhötisch: N=12) konnten in Lebergewebe nachgewiesen werden. Die Genexpression von Osteopontin zeigt einen Aufwärtstrend im zirrhötischen Gewebe ($p = 0,1059$; t-test). Die übrigen Proteine zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen Zirrhose und Kontrolle. Somit hat die Leberzirrhose keinen regulierenden Einfluss auf deren Genexpression.

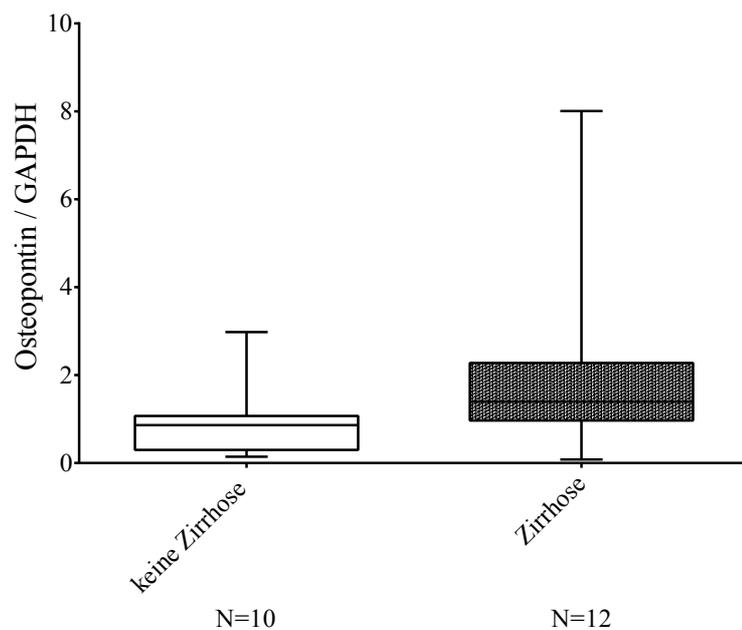


Abbildung 27 Genexpression von Osteopontin in Lebergewebe, Aufwärtstrend in der Zirrhosegruppe gegenüber der nicht zirrhötischen Kontrolle

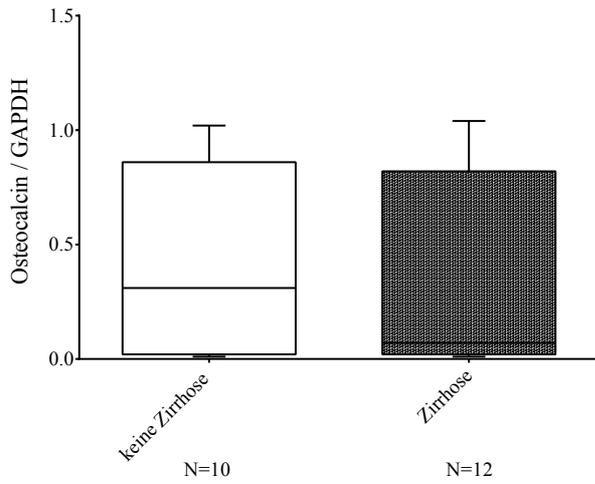


Abbildung 28 Genexpression von Osteocalcin in Lebergewebe, kein signifikanter Unterschied zwischen Zirrhose und Kontrolle

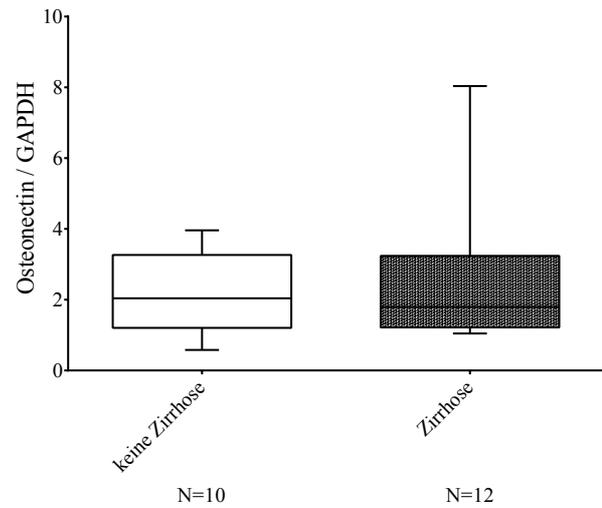


Abbildung 29 Genexpression von Osteonectin in Lebergewebe, kein signifikanter Unterschied zwischen Zirrhose und Kontrolle

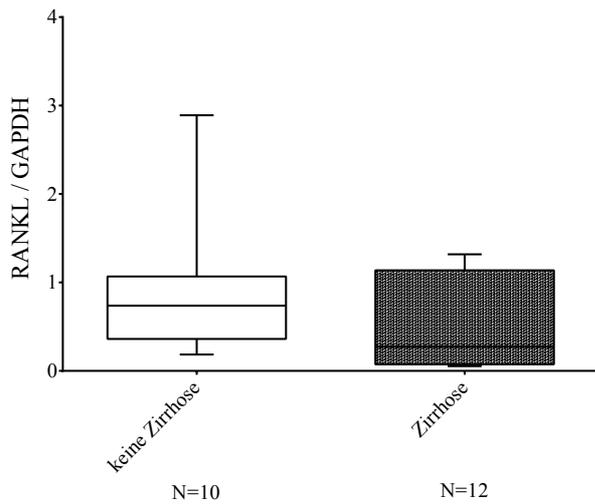


Abbildung 30 Genexpression von RANKL in Lebergewebe, kein signifikanter Unterschied zwischen Zirrhose und Kontrolle

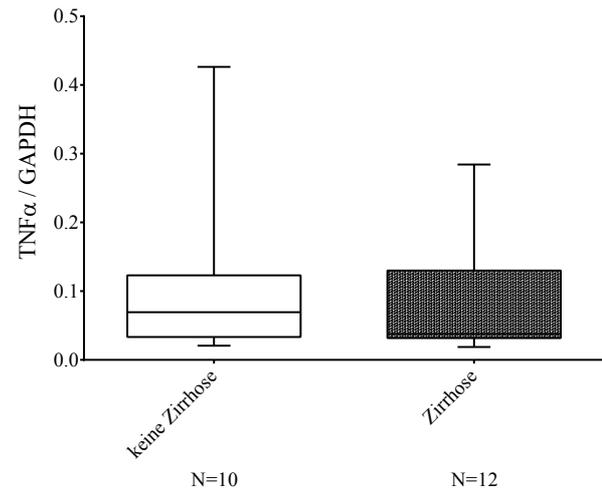


Abbildung 31 Genexpression von TNF α in Lebergewebe, kein signifikanter Unterschied zwischen Zirrhose und Kontrolle

6.3.3 Die Genexpression von Osteoprotegerin ist in Lebergewebe nachweisbar und dort bei Zirrhose herabreguliert

Mit der densitometrischen Analyse der PCR konnte nachgewiesen werden, dass das Gen für Osteoprotegerin in Lebergewebe exprimiert wird. Bei Zirrhose (N=16) erfährt diese Exprimierung im Vergleich zu nicht zirrhotischem Gewebe (N=14) eine signifikante Regulierung nach unten (nicht zirrhotisch: OPG/GAPDH = 1,10; zirrhotisch: OPG/GAPDH = 0,83; $p < 0,05$; t-test).

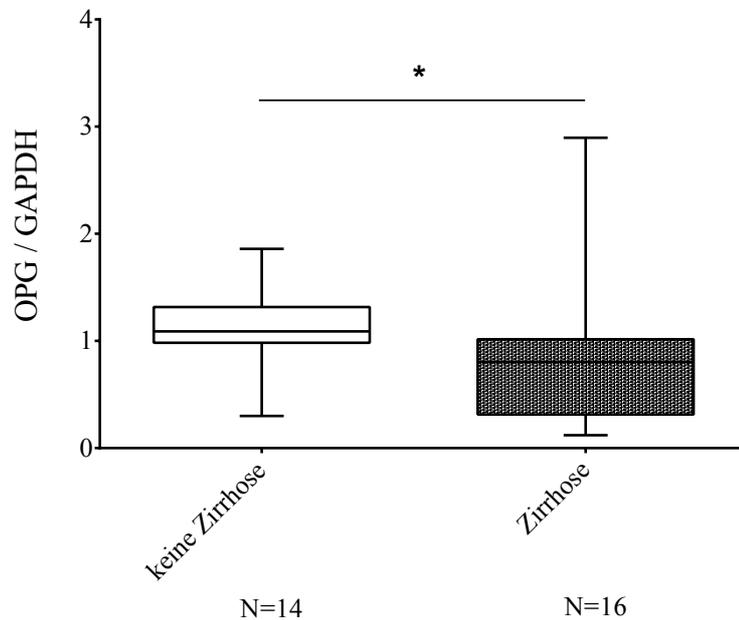


Abbildung 32 Genexpression von OPG in Lebergewebe, signifikante Verringerung bei Zirrhose (* $p < 0,05$)

6.3.4 Die Genexpression des Vitamin D-bindenden Proteins ist in zirrhotischer Leber herabreguliert

In der densitometrischen Analyse der PCR zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Genexpression des Vitamin D-bindenden Proteins (Gen-Name: GC) zwischen Kontrolle und Zirrhosegruppe. Zirrhosisches Lebergewebe (N=12) weist eine signifikante Herabregulierung gegenüber der nicht zirrhosischen Kontrolle (N=16) auf (Zirrhose: GC/GAPDH = 0,23; Keine Zirrhose: GC/GAPDH = 0,65; $p < 0,001$; t-test). In zirrhosischem Lebergewebe kann demnach das Protein für den Transport hydrophober Vorstufen des 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ fehlen.

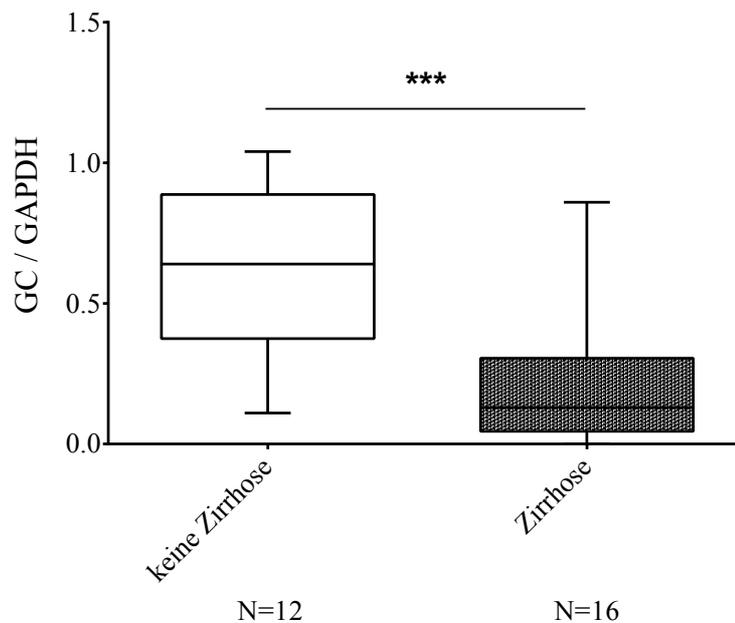


Abbildung 33 Genexpression von Vitamin D-bindendem Protein (GC) in Lebergewebe, signifikante Abnahme der Expression bei Leberzirrhose (***) $p < 0,001$)

6.3.5 Die hepatische Genexpression von CYP2R1 zeigt bei Leberzirrhose keine Änderung

Die densitometrische Analyse der PCR lieferte keinen signifikanten Unterschied zwischen zirrhotischen (N=16) und nicht zirrhotischen (N=12) Lebern hinsichtlich der Genexpression von CYP2R1. Nach diesen Daten hat die Leberzirrhose keine Auswirkung auf das von diesem Gen kodierte Enzym des Vitamin D-Stoffwechsels.

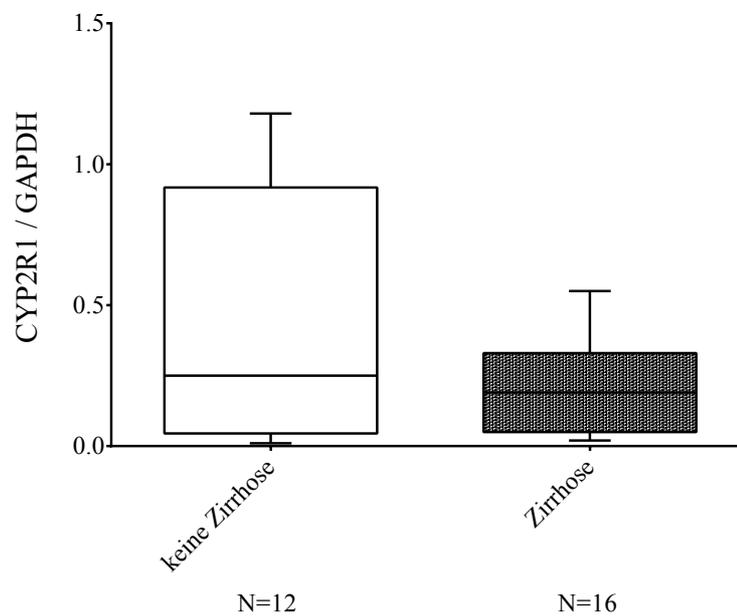


Abbildung 34 Genexpression von CYP2R1 in Lebergewebe, kein signifikanter Unterschied zwischen zirrhotischer und nicht zirrhotischer Leber

6.3.6 Die Genexpression von DHCR7 erfährt in zirrhotischem Lebergewebe eine Regulation nach oben

Mit der densitometrischen Analyse der PCR ließ sich nachweisen, dass die Expression des Gens der 7-Dehydrocholesterolreduktase in der Gruppe der Leberzirrhosepatienten (N=17) eine signifikante Regulation nach oben erfährt, verglichen mit der nicht zirrhotischen Kontrolle (N=13) (Zirrhose: DHCR7/ β -actin = 0,50; keine Zirrhose: DHCR7/ β -actin = 0,21; $p < 0,05$; t-test). Damit ist bei Zirrhose eine gesteigerte Aktivität des Enzyms, das die Reduktion von 7-Dehydrocholesterol zu Cholesterol katalysiert, denkbar.

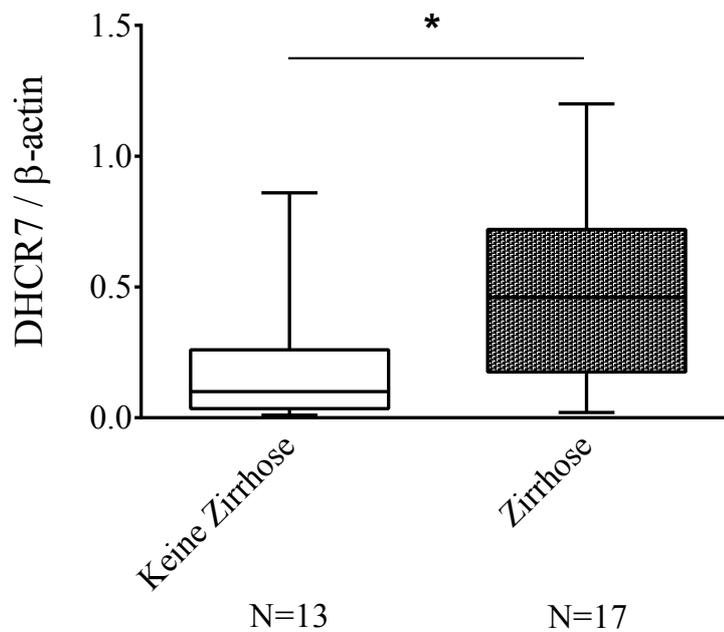


Abbildung 35 Genexpression von DHCR7 in Lebergewebe, signifikante Regulation nach oben in der Zirrhosegruppe, verglichen mit der nicht zirrhotischen Kontrolle (* $p < 0,05$)

6.3.7 Die Genexpression von CYP27A1 ist in zirrhotischem Lebergewebe herabreguliert

Für CYP27A1, das in der 1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Synthese für eine Hydroxylase kodiert, war in der densitometrischen Analyse der PCR in zirrhotischen (N=16) gegenüber nicht zirrhotischen (N=12) Lebern eine signifikante Herabregulierung der Genexpression erkennbar (keine Zirrhose: CYP27A1/GAPDH = 0,75; Zirrhose: CYP27A1/GAPDH = 0,33; $p < 0,05$; t-test). Dies kann eine Verringerung der Konzentration einer entscheidenden Hydroxylase der 1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Synthese bei Leberzirrhose bedingen.

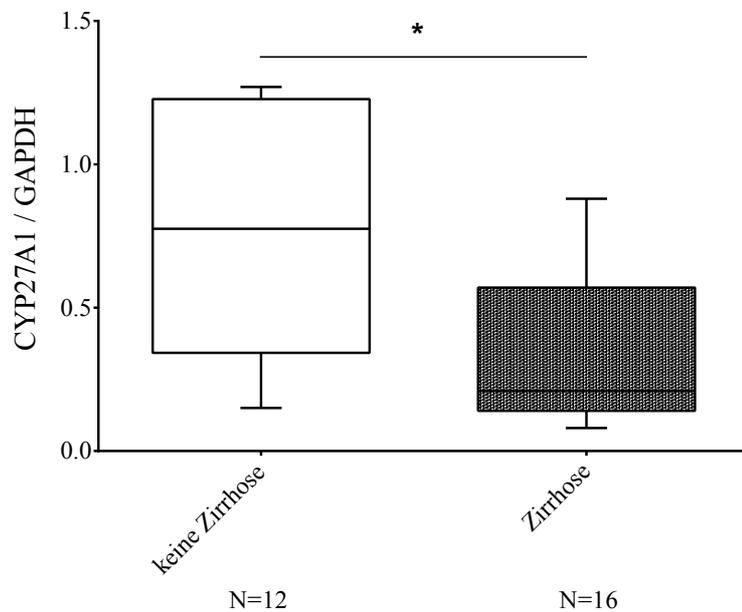


Abbildung 36 Genexpression von CYP2A1 in Lebergewebe, signifikante Abnahme in der Zirrhosegruppe gegenüber der nicht zirrhotischen Gruppe (* $p < 0,05$)

6.4 ELISA

6.4.1 Die Konzentration von 25-Hydroxy-Vitamin D ist im Serum zirrhotischer Patienten erniedrigt

Die Auswertung des ELISAs für 25-Hydroxy-Vitamin D zeigte im Vergleich zur Kontrolle (N=6; [25-Hydroxy Vitamin D] = 133,52 nmol/l) signifikant niedrigere Serumkonzentrationen von 25-Hydroxy-Vitamin D bei Child A-C Zirrhose (Child A: N=13; [25-Hydroxy-Vitamin D] = 45,03 nmol/l; Child B: N=15; [25-Hydroxy-Vitamin D] = 35,79 nmol/l; Child C: N=6; [25-Hydroxy-Vitamin D] = 27,42 nmol/l). 25-Hydroxy-Vitamin D ist das Produkt des hepatischen Abschnitts der 1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Synthese. Damit legt dieses Ergebnis nahe, dass der hepatische Anteil der 1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Synthese bei Leberzirrhose reduziert ist (p < 0,001; one-way Anova).

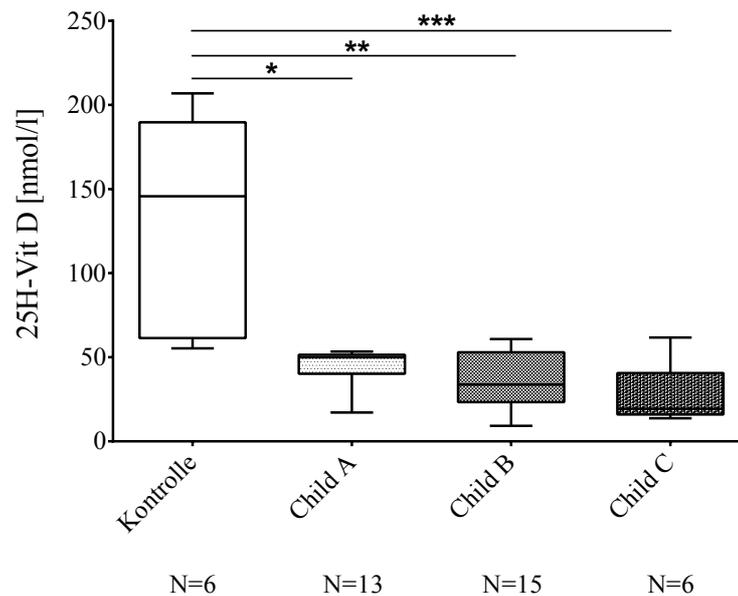


Abbildung 37 Serumkonzentration von 25-Hydroxy-Vitamin D, signifikante Abnahme bei Leberzirrhose Child A-C gegenüber der gesunden Kontrolle (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001)

6.4.2 Die Sclerostin-Serumkonzentration ist bei Leberzirrhose erhöht

Die Auswertung des ELISA für Sclerostin zeigte eine signifikante Erhöhung der Sclerostinkonzentration im Serum zirrhotischer Patienten (N=34) gegenüber der gesunden Kontrolle (N=6) (Zirrhotisch: [Sclerostin] = 0,32 ng/ml; nicht zirrhotisch: [Sclerostin] = 0,05 ng/ml; $p < 0,05$; t-test). Dieser Unterschied ist nach Auftrennung der Zirrhosegruppe in Child A-C noch als Trend erkennbar ($p = 0,1306$). Bei Leberzirrhose ist demnach die Serumkonzentration eines wesentlichen Inhibitors der Osteoblastenfunktion erhöht.

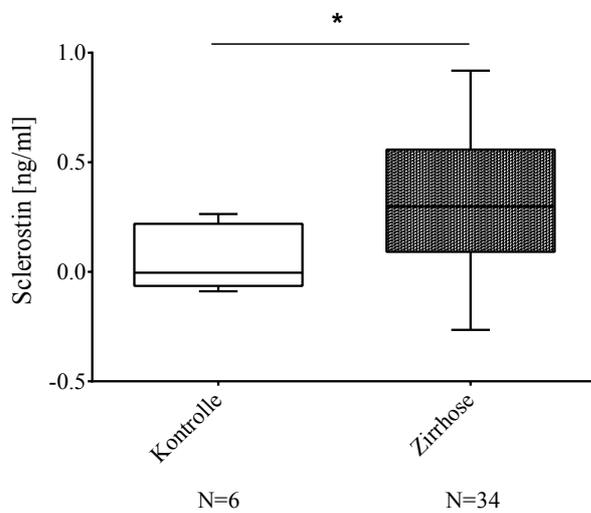


Abbildung 38 Serumkonzentration von Sclerostin (Kontrolle vs. Zirrhose-Gesamtkollektiv). Signifikante Zunahme bei Zirrhose gegenüber gesunder Kontrolle (* $p < 0,05$)

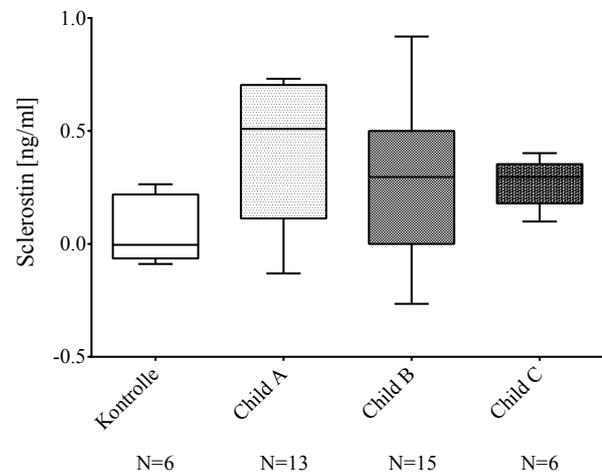


Abbildung 39 Serumkonzentration von Sclerostin (Kontrolle vs. Child A-C), sichtbare Tendenz zur Zunahme bei Leberzirrhose Child A-C gegenüber gesunder Kontrolle

7. Diskussion

Bei chronischen Lebererkrankungen ist das Auftreten struktureller Veränderungen im Knochen ein schon seit den 1960er Jahren bekanntes Phänomen [Paterson et al., 1967]. Seither wurde viel Forschungsarbeit auf diesem Gebiet geleistet. Heute ist diese Assoziation als hepatische Osteodystrophie bekannt, stellt jedoch – zum Leidwesen der Patienten – ein zu selten diagnostiziertes Krankheitsbild dar [Goel et al., 2010]. Als mögliche pathogenetische Faktoren kommen unter anderem Störungen im Calcium-, Vitamin K- und Vitamin D-Stoffwechsel, genetische Veranlagung oder Veränderungen im OPG-RANKL-System in Frage [Gasser, 2008], wobei die Rolle von OPG und RANKL von einigen Autoren als ungewiss eingestuft wird [Guañabens et al., 2009]. Auch ist bisher unklar, welche Bedeutung den unterschiedlichen Faktoren zukommt.

Vornehmliches Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von TGF- β in der Pathogenese der Leberzirrhose näher zu beleuchten. Dies sollte durch Betrachtung zweier Systeme geschehen, die über diesen Wachstumsfaktor miteinander verbunden sind: Das OPG-RANKL-System und der Vitamin D-Stoffwechsel. Im OPG-RANKL-System hat TGF- β auf die RANKL-RANK-Achse in Osteoblasten agonistische Wirkung. Es beeinflusst negativ die Bildung von OPG – Antagonist des RANKL – und erhöht gleichzeitig die mRNA-Konzentration von RANKL [Jurado et al., 2010]. Vitamin D fördert wiederum die Ausschüttung von TGF- β in Osteoblasten [Finkelmann et al., 1991; Deetjen et al., 2005] und nimmt Einfluss auf die Aktivität von Osteoklasten, indem es Synthese und Freisetzung von RANKL aus Osteoblasten stimuliert [Plum et al., 2010]. Vor der Untersuchung etwaiger Veränderungen dieser Regulationswege, musste in einem ersten Schritt untersucht werden, ob das untersuchte zirrhotische Patientenkollektiv eine schlechtere Knochendichte zeigt, als eine gesunde Kontrolle.

Zu diesem Zweck wurden CT-Aufnahmen der betroffenen Zirrhosepatienten (N=18) mit solchen eines alters- und geschlechtsstandardisierten gesunden Kontrollkollektivs (N=23) mittels der Methode nach Philips [Mueller et al., 2011] verglichen. Die erhobenen Daten zeigen, dass der durchschnittliche T-Score, verglichen mit der gesunden Kontrolle, bei Zirrhosepatienten signifikant niedriger ist (-1,91 SD vs. -0,56 SD; $p <$

0,01; t-test) und in allen Zirrhosegruppen im Durchschnitt in dem Bereich liegt, der von der WHO als „Osteopenie“ (T-Score -1 bis -2,5 SD) definiert ist (Child A: -2,19 SD; Child B: -1,5 SD; Child C: -2,20 SD). Die Patienten der Kontrollgruppe liegen mit einem gemittelten T-Score von -0,56 SD im von der WHO als physiologisch definierten Bereich (T-Score > -1 SD). Es wäre zu erwarten gewesen, dass die Abnahme der Knochendichte mit der Verschlechterung des Zirrhosestadiums korreliert [Monegal et al., 1997; Guañabens et al., 2010]. Der Vergleich der einzelnen Child Stadien untereinander ergab jedoch nur eine signifikante Verringerung des T-Scores bei Child A-Patienten (N=9) gegenüber der Kontrolle (-0,56 SD vs. -2,19 SD; $p < 0,05$; t-test). In anderen Studien konnte aber gezeigt werden, dass Patienten mit Child C-Zirrhose eine signifikant niedrigere Knochendichte im Vergleich zu Child A aufweisen [Monegal et al., 1997]. Die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit das Signifikanzniveau zwischen Kontrolle und Child B (N=7) bzw. Child C (N=2) nicht erreicht werden konnte, kann außer Acht gelassen werden, weil es auf das zu kleine Patientenkollektiv zurückzuführen sein sollte. Somit haben sich auch in der vorliegenden Arbeit die bisherigen Beobachtungen bestätigt, dass Patienten mit chronischer Lebererkrankung eine schlechte Knochendichte haben [Diamond et al., 1990; Collier, 2007; Angulo et al., 2010; Guañabens et al., 2010; López-Larramona et al., 2011; Luxon et al., 2011] und damit ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Osteoporose aufweisen bzw. frakturgefährdet sind.

Nach der Beobachtung der Knochendichteabnahme im zirrhotischen Patientenkollektiv sollte der TGF- β -Signalweg untersucht werden. Dieser Wachstumsfaktor steht im Verdacht das Bindeglied zwischen chronischer Inflammation (Leberzirrhose) und Verlust von Knochenmasse (Osteopenie oder Osteoporose) im Entstehungsprozess der hepatischen Osteodystrophie zu sein [Ehnert et al., 2010].

Zunächst wurden mittels Reporterzellen Veränderungen der TGF- β -Serumkonzentration bei Patienten mit Leberzirrhose gesucht. Es zeigte sich, dass jedes Child Stadium (Child A: N=23; Child B: N=13; Child C: N=10) signifikant höhere Konzentrationen an TGF- β aufweist als die gesunde Kontrolle (N=12) (Child A: [TGF- β] = 73,8 ng/ml; Child B: [TGF- β] = 69,9 ng/ml; Child C: [TGF- β] = 60,5 ng/ml; Kontrolle: [TGF- β] = 22,7 ng/ml; $p < 0,01$; one-way Anova). Dieses Ergebnis unterstützt den negativen Zusammenhang zwischen Leberrestfunktion bei Zirrhose

und TGF- β -Serumkonzentration [Wanninger et al., 2011]. Es liefert aber auch eine Erklärungsmöglichkeit für die Abnahme der Knochendichte im zirrhotischen Patientenkollektiv, denn alle drei wesentlichen Knochenzellen werden durch hohe TGF- β -Konzentrationen in Richtung des Knochenabbaus beeinflusst. In Osteozyten wird die Sclerostinausschüttung gefördert und damit Knochenaufbau durch Osteoblasten gehemmt [Sutherland et al., 2004; Kennetz et al., 2005; Loots et al., 2011]. Die Knochenmatrix abbauenden Osteoklasten differenzieren sich unter TGF- β -Einfluss verstärkt aus Monozyten [Fox et al., 2005]. In Osteoblasten wirkt TGF- β über die Erhöhung der RANKL-Genexpression bzw. Herabregulierung der OPG-Genexpression förderlich auf die Osteoklastentätigkeit und begünstigt so wiederum den Knochenabbau [Jurado et al., 2010].

Die Frage ist, worin die Ursache der erhöhten TGF- β -Konzentration im Serum zirrhotischer Patienten liegt. Den folgenden Überlegungen und Versuchen liegt die Erkenntnis zu Grunde, dass TGF- β in fibrotischem Lebergewebe seine Sezernierung selbst positiv beeinflusst [Dooley et al., 2008], steigende Konzentrationen des Wachstumsfaktors also eine gesteigerte hepatische Sezernierung von TGF- β bewirken. Im TGF- β -Signalweg existieren einige Komponenten, die im Sinne eines positiven oder negativen Feedbacks das eingehende Signal und damit auch dessen Effekt – z.B. die TGF- β -Sezernierung – manipulieren. Zu ihnen zählen der BMP and Activin membrane-bound inhibitor (BAMBI), das Sloan-Kettering Institute proto-oncogene (Ski), das Ski-related novel gene N (SnoN), der Smad anchor for receptor activation (SARA) sowie der Smad ubiquitylation factor 1 und 2 (smurf 1 und 2) [Massagué et al., 2000; Wanninger et al., 2011; Stroschein et al., 1999]. Unter der Hypothese, im Zuge einer zirrhotischen Lebererkrankung müsse wenigstens einer dieser Faktoren derart verändert sein, dass eine Selbstregulation des TGF- β -Signals nicht mehr möglich ist, wurden in der vorliegenden Arbeit wesentliche Vertreter (smurf 1, smurf 2, SARA, Ski und SnoN) hinsichtlich ihrer Genexpression in Lebergewebe mittels Reverser Transkriptase PCR untersucht.

Die Expression aller Proteine konnte in nicht zirrhotischer wie auch in zirrhotischer Leber nachgewiesen werden, was sich im Einklang mit bisherigen Studienergebnissen befindet [Cai et al., 2006; Tao et al., 2006; Macías-Silva et al., 2002]. Allerdings bestand für kein Protein ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Zu

einem ähnlichen Ergebnis kommt eine andere Arbeit, die nach einer TGF- β -vermittelten Veränderung der Expression dieser Gene – allerdings in Osteoblasten – gesucht hat [Ehnert et al., 2010]. Lediglich das Gen für SnoN wurde bei Ehnert et al. nach Stimulation humaner Osteoblasten mit TGF- β ausgeprägter exprimiert. Interessanterweise zeigt eine andere Forschungsgruppe, dass die SnoN-Expression in Hepatozyten bei chronischer Lebererkrankung – die ja ebenfalls mit hohen TGF- β -Spiegeln einhergeht – eine Abschwächung erfährt [Cai et al., 2006]. SnoN unterdrückt als Co-Repressor im Zellkern TGF- β -Signale, die die Transkription fördern [Massagué, 2000]. Sollte eine gesteigerte hepatische Sezernierung von TGF- β auf eine Veränderung der SnoN-Expression zurückzuführen sein, müsste sie wie bei Cai et al. verringert sein. In der vorliegenden Arbeit war diese Verringerung nicht messbar und für Osteoblasten scheint das Gegenteil zu gelten. Damit ist die Datenlage noch inkonsistent und die hier aufgestellte Hypothese der Einflussnahme von SnoN auf die hepatische Selbstregulation von TGF- β kann noch nicht endgültig bestätigt oder verworfen werden.

Eine chinesische Forschungsgruppe zeigte in ihrem Rattenmodell bezüglich der Genexpression von smurf 2 eine Veränderung im Rahmen des fibrotischen Umbaus. Wochen nach der Induktion eines Leberschadens konnte ein Anstieg von smurf 2 gemessen werden [Cai et al., 2006]. Smurf 1 und 2 haben in der TGF- β -Signalkaskade die Funktion, die intrazelluläre Signalübertragung negativ zu regulieren bzw. zu beenden, indem sie wesentliche Komponenten der Ubiquitinierung zuführen [Zhu et al., 1999; Massagué, 2000]. Weder die in der vorliegenden Arbeit gemessene fehlende Änderung im Expressionsmuster, noch eine Erhöhung der Expression von smurf 2, wie sie von Cai et al. beschrieben wird, sind jedoch Veränderungen, die die TGF- β -Sezernierung positiv beeinflussen würden. Ein Mangel an smurf 1 oder 2 würde mit verzögertem Abbau von Signalwegskomponenten mittels Ubiquitinierung einhergehen. Somit könnte lediglich eine Herabregulation der smurf 1- oder smurf 2-Genexpression eine Förderung des TGF- β -Signals und damit Steigerung der TGF- β -Freisetzung erklären. Eine derartige Verringerung ist bis zum jetzigen Zeitpunkt allerdings noch nicht beschrieben. Die Hypothese, smurf 1 oder 2 bewirke über eine bei Leberzirrhose veränderte Genexpression eine gesteigerte hepatische Sezernierung von TGF- β , kann mit den ermittelten Daten verworfen werden.

Ähnlich verhält es sich mit SARA. Tao et al. beschreiben im Rattenmodell mit zunehmender Fibrosierung der Leber eine mittels Western Blot gemessene Abnahme des Proteins und damit eine negative Korrelation mit der TGF- β -Konzentration [Tao et al., 2006]. Da SARA unter TGF- β -Stimulation die Interaktion zwischen Smad-Protein und Rezeptor vermittelt [Massagué, 2000] und somit wesentlich für die Initiation der intrazellulären Signalübertragung ist, könnte eine Veränderung der SARA-Expression durchaus zu einer Signalmodifikation beitragen. Damit das Signal in Hepatozyten jedoch dahingehend modifiziert wird, dass hohe TGF- β -Konzentrationen auch eine gesteigerte Freisetzung von TGF- β nach sich ziehen, müsste das SARA-Gen bei Zirrhose vermehrt exprimiert werden. Dies konnte bisher von keiner Arbeitsgruppe festgestellt werden. Sowohl die hier als unverändert ermittelten, wie auch die von Tao et al. gemessenen niedrigen SARA-Expressionslevel lassen vermuten, dass die hohe Konzentration von TGF- β bei Leberzirrhose nicht auf eine Veränderung der hepatischen Genexpression von SARA zurückzuführen ist.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit scheint der hepatische intrazelluläre Signalweg von TGF- β bei Zirrhose also unbeeinflusst zu bleiben. Auch davon abweichende Ergebnisse anderer Studien können die Hypothese, dass bei Leberzirrhose Komponenten der Signalkaskade hin zu einer positiven Beeinflussung der hepatischen TGF- β -Sekretion verändert sind, nicht bestätigen.

Einen wesentlichen Weg für die Aktivierung von Osteoklasten stellt die Interaktion zwischen RANKL und RANK dar. Osteoprotegerin (OPG) wirkt auf diese Interaktion antagonistisch [Keck et al., 2003]. Dieses Protein wird im Organismus nicht nur von Osteoblasten gebildet sondern kommt „nahezu ubiquitär“ [Wagner et al., 2010] vor. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit humanes Lebergewebe verwendet und untersucht, ob die hepatische Genexpression von OPG und RANKL bei den untersuchten Zirrhose-Patienten modifiziert ist. Wie von Wagner et al. postuliert, konnte die OPG-Expression mittels PCR in Lebergewebe nachgewiesen werden, ebenso eine Genexpression von RANKL. Darüber hinaus zeigte sich für OPG in der densitometrischen Analyse der PCR eine signifikant herabregulierte Genexpression in zirrhotischem (N=16) gegenüber nicht zirrhotischem Gewebe (N=14) (nicht zirrhotisch: OPG/GAPDH = 1,10; zirrhotisch: OPG/GAPDH = 0,83; $p < 0,05$; t-test). Der entsprechende Vergleich hinsichtlich der RANKL-Expression lieferte hingegen keinen

signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Soweit kann also festgehalten werden, dass die TGF- β -Konzentration bei Leberzirrhose im Serum erhöht ist und sich im Rahmen der Erkrankung eine signifikant niedrigere OPG-Expression, nicht nur – wie bisher beschrieben – in Osteoblasten, sondern auch in Lebergewebe nachweisen lässt. Die hepatische RANKL-Expression ist unverändert. Im Knochen ist eine „stabile RANKL/OPG-Ratio (...) für einen ausgewogenen Knochenumsatz (...) verantwortlich“ und „das Verhältnis von RANKL zu OPG determiniert den Grad der Knochendestruktion“ [Keck et al., 2003]. Mit unveränderter RANKL-, aber erniedrigter OPG-Expression ergibt sich in zirrhotischem Lebergewebe aus den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten also eine Änderung der RANKL/OPG-Ratio, die zu einem Überwiegen des Osteoklastenaktivators RANKL führt. Moschen et al. kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Konzentration von RANKL – in deren Studie gemessen im Serum – zwischen zirrhotischen Patienten und gesunder Kontrolle keine signifikante Änderung zeigt. Allerdings beobachtete diese Arbeitsgruppe höhere Serum-OPG-Konzentrationen bei den 87 eingeschlossenen Zirrhosepatienten gegenüber der Kontrollgruppe. Nach diesen Ergebnissen wäre die RANKL/OPG-Ratio zugunsten von OPG verschoben und OPG käme eine Rolle als Kompensationsprotein des Knochenmasseverlusts bei Zirrhose zu [Moschen et al., 2005]. Auch Guañabens et al. fanden im Serum von 68 Patientinnen mit Leberzirrhose (PBC) signifikant höhere OPG-Konzentrationen verglichen mit Gesunden. Allerdings war die gleichzeitig bestimmte hepatische Genexpression von OPG in der Patientengruppe auf ähnlichem Niveau wie in der Kontrolle, was zu der Schlussfolgerung führte, die hepatische OPG-Expression sei nicht mit der OPG-Serumkonzentration assoziiert [Guañabens et al., 2009]. Letzten Endes ergeben sich also für die hepatische RANKL- und OPG-Expression sowie deren Konzentration im Serum immer noch unklare und gegensätzliche Ergebnisse. Die genaue Rolle der RANKL-RANK-Achse für die hepatische Osteodystrophie bleibt damit, wie schon früher postuliert, unklar [Collier, 2007]. Selbst wenn sich im Verlauf einer chronischen Lebererkrankung die hepatische RANKL/OPG-Ratio ändern sollte, ist noch nicht gezeigt, dass diese Veränderung Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel hat. Zu diesem Zweck müsste erst untersucht werden, ob das in der Leber gebildete OPG und der RANK-Ligand in den Blutkreislauf freigesetzt werden. Auch wenn es durch die durchgeführten Versuche nicht bewiesen werden kann, ist es zumindest vorstellbar, dass die in der vorliegenden Studie gemessene Verringerung der hepatischen OPG-Expression auf die hohe Serumkonzentration von TGF- β zurückzu-

führen ist. Dieser Zusammenhang ist für Osteoblasten beschrieben [Jurado et al., 2010].

Bis hierhin wurde der TGF- β - und RANKL-Signalweg untersucht. Einflussfaktor, sowohl auf TGF- β , als auch auf RANKL, ist Vitamin D. Zum einen fördert es die Ausschüttung von TGF- β im Knochen [Finkelmann et al., 1991; Deetjen et al., 2005]. Zum anderen bewirkt es in reifen Osteoblasten sowie Vorläuferzellen von Osteoblasten und Osteoklasten eine gesteigerte Synthese und Freisetzung von RANKL [Plum, 2010]. In Osteoblasten erhöht es außerdem die Transkription des Sost-Gens, das für den Osteoblasteninhibitor Sclerostin kodiert. Um die bisherigen Betrachtungen der vorliegenden Arbeit zu erweitern, wurden Veränderungen im Vitamin D-Stoffwechsel bei zirrhotischen Patienten gegenüber Patienten ohne Zirrhose untersucht. Derzeit ist der beste Indikator für den Zustand des Vitamin D-Haushalts das 25-Hydroxy-Vitamin D [Bu et al., 2010]. Dessen Serumkonzentration wurde für eine gesunde Kontrolle (N=6) und Patienten mit Leberzirrhose (Child A: N=13; Child B: N=15; Child C: N=6) mittels ELISA bestimmt. Dabei zeigte sich eine signifikante Abnahme der 25-Hydroxy-Vitamin D-Konzentration in der Zirrhosegruppe. Das Ausmaß dieser Abnahme ging mit der Zunahme des Zirrhosegrads einher (Kontrolle: [25-Hydroxy Vitamin D] = 133,52 nmol/l, Child A: [25-Hydroxy-Vitamin D] = 45,03 nmol/l; Child B: [25-Hydroxy-Vitamin D] = 35,79 nmol/l; Child C: [25-Hydroxy-Vitamin D] = 27,42 nmol/l; $p < 0,001$; one-way Anova). Dieses Ergebnis bestätigt bisherige Beobachtungen, die von einem unterschiedlich stark ausgeprägten Vitamin D-Mangel bei bis zu 92% aller Patienten mit chronischer Lebererkrankung ausgehen [Arteh et al., 2010]. In zirrhotischem Lebergewebe scheint also der hepatische Anteil der 1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Synthese reduziert zu sein.

Die Frage ist nun, was die Ursache der niedrigen 25-Hydroxy-Vitamin D-Konzentration bei Leberzirrhose sein kann. Als Hypothese dazu wurden ein Mangel an Ausgangsstoffen der Biosynthese, ein vermehrter Verlust, ein Enzymmangel sowie das Fehlen entsprechender Transportermoleküle formuliert.

Die erste Erklärungsmöglichkeit für den niedrigen 25-Hydroxy-Vitamin D-Spiegel wäre ein Mangel an Ausgangsstoffen der Biosynthese. 25-Hydroxy-Vitamin D wird in der Leber ausgehend von Cholecalciferol gebildet, das wiederum entweder alimentär zugeführt wird, oder der endogenen UV-abhängigen Synthese in der Haut entstammt

[Plum et al., 2010]. Eine unzureichende Bereitstellung über die Nahrung oder eine zu geringe Exposition gegenüber UV-Licht könnten also ursächlich für niedrige 25-Hydroxy-Vitamin D-Spiegel sein. Da die enterale Resorption von Cholecalciferol gallesäureabhängig ist, steht außer Frage, dass sie bei Erkrankungen, die mit einer Verringerung der Lebersyntheseleistung verbunden sind, eingeschränkt ist. Allerdings ist schon lange bekannt, dass eine insuffiziente Aufnahme über den Darm erst bei einer zusätzlichen Störung der endogenen Synthese relevant wird [Compston, 1986]. Das Ausmaß der individuellen UV-Exposition wiederum ist schwer messbar. Es besteht jedoch über das Enzym 7-Dehydrocholesterol-Reduktase (DHCR7) eine Möglichkeit, Edukte für die 25-Hydroxy-Vitamin D-Synthese zu entziehen. Dieses Enzym katalysiert die Reduktion von 7-Dehydrocholesterol zu Cholesterol, entfernt also den Ausgangsstoff des Cholecalciferols aus dem Vitamin D-Syntheseweg. In der vorliegenden Studie wurde mittels PCR untersucht, ob sich die Genexpression von DHCR7 in zirrhotischem Lebergewebe (N=17) verglichen mit nicht zirrhotischer Leber (N=13) verändert. Die densitometrische Analyse zeigte bei Zirrhose eine signifikante Regulierung der Expression nach oben (nicht zirrhotisch: $\text{DHCR7}/\beta\text{-actin} = 0,21$; zirrhotisch: $\text{DHCR7}/\beta\text{-actin} = 0,5$; $p < 0,05$; t-test). Das Gen wird also bei Zirrhose stärker exprimiert. Damit ist es möglich, dass das Enzym 7-Dehydrocholesterol-Reduktase im Verlauf einer Leberzirrhose gesteigerte Tätigkeit aufweist. Über die Reduktion zu Cholesterol zieht es 7-Dehydrocholesterol aus dem Syntheseweg des Vitamin D ab. Diese Veränderung bei Leberzirrhose liefert einen ersten Erklärungsansatz für die mit der Krankheit verbundene niedrige Vitamin D-Serumkonzentration. Es unterstützt auch bisherige Erkenntnisse, dass sich Veränderungen von DHCR7 auf den Vitamin D-Haushalt auswirken [Grünhage et al., 2012; Yuling et al., 2012].

Eine weitere Ursache könnte die forcierte Ausscheidung von Vorstufen des 25-Hydroxy-Vitamin D sein. Schon 1977 wurde ein erhöhter renaler Verlust von Cholecalciferol bei Patienten mit PBC beschrieben [Krawitt et al., 1977], bereits wenige Jahre später aber als unerheblich erachtet [Compston, 1986].

Somit verbleiben zwei Erklärungsansätze: Erstens ein Mangel an 25-Hydroxylase, dem Enzym, das die Hydroxylierung von Cholecalciferol zu 25-Hydroxy-Vitamin D katalysiert. Zweitens eine Veränderung des in der Leber synthetisierten Vitamin D-bindenden Proteins, das für den Transport von Cholecalciferol aus der Haut bzw. dem

Darm zur Leber sowie von 25-Hydroxy-Vitamin D von der Leber zur Niere verantwortlich ist.

Über die Gene, die für 25-Hydroxylase kodieren, herrscht derzeit noch Unklarheit. Neuere Daten sprechen für CYP2R1 und CYP27A1 [Shinkyō et al., 2004; Bu et al., 2010]. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit mittels PCR untersucht, ob im Rahmen einer Leberzirrhose Veränderungen der hepatischen Genexpression von CYP2R1 und CYP27A1 auftreten. Für CYP2R1 zeigte die densitometrische Auswertung der PCR keine signifikante Änderung. Eine Abhängigkeit der 25-Hydroxy-Vitamin D-Konzentration von der CYP2R1-Expression wurde jedoch an anderer Stelle gezeigt [Bu et al. 2010]. Bei der densitometrischen Auswertung der PCR für CYP27A1 zeigte sich im Vergleich zu nicht zirrhotischem Lebergewebe (N=12) eine signifikante Herabregulierung der Genexpression in der zirrhotischen Gruppe (N=16) (nicht zirrhotisch: CYP27A1/GAPDH = 0,75; zirrhotisch: CYP27A1/GAPDH = 0,33; $p < 0,05$; t-test). Damit kann die Tätigkeit eines entscheidenden hepatischen Enzyms der 1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Synthese bei Zirrhose vermindert sein. Dieses Ergebnis liefert eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die niedrige 25-Hydroxy-Vitamin D-Konzentration bei Zirrhosepatienten und stimmt mit den Ergebnissen von Bu et al. überein, die eine Abhängigkeit der 25-Hydroxy-Vitamin D-Konzentration von der Expression des CYP27A1 beschrieben [Bu et al., 2010].

In einem weiteren Versuch sollte die Genexpression des Vitamin D-bindenden Proteins in zirrhotischen (N=12) und nicht zirrhotischen Lebern (N=16) mittels PCR beleuchtet werden. Die densitometrische Auswertung zeigte, dass die Expression dieses Gens (GC) bei den zirrhotischen Patienten im Vergleich zur Kontrolle signifikant herabreguliert ist (Zirrhose: GC/GAPDH = 0,23; Keine Zirrhose: GC/GAPDH = 0,65; $p < 0,001$; t-test). Das Resultat dieser herabregulierten Genexpression kann eine geringere Konzentration des Vitamin D-bindenden Proteins (DBP) sein. Da Cholecalciferol – Vorstufe des 25-Hydroxy-Vitamin D – im Blut nur an DBP gebunden transportiert werden kann [Herold et al., 2010, S.732], stehen bei einem Mangel an DBP weniger Edukte für die hepatische 25-Hydroxy-Vitamin D-Synthese zur Verfügung. Dieses Ergebnis stellt somit eine dritte Erklärungsmöglichkeit der niedrigen 25-Hydroxy-Vitamin D-Konzentrationen bei Zirrhose dar und stimmt mit bisherigen Daten überein [Bu et al., 2010].

Die Resultate der untersuchten Parameter des Vitamin D-Stoffwechsels lassen in Verbindung mit den anderen aufgeführten Arbeiten zusammenfassend also folgenden Schluss zu: Patienten, die an Leberzirrhose erkrankt sind, zeigen mit zunehmender Progredienz der Erkrankung kontinuierlich abnehmende 25-Hydroxy-Vitamin D-Konzentrationen. Die Ursache findet sich in einer verringerten Genexpression von CYP27A1, CYP2R1 und GC sowie einer gesteigerten Genexpression von DHCR7. Da Vitamin D essentiell für einen gesunden Knochenmetabolismus ist, kann mit diesen Ergebnissen eine weitere Ursache für die Entstehung der hepatischen Osteodystrophie vorgeschlagen werden. Andererseits wirft dieses Ergebnis erneut die Frage nach der Herkunft der hohen TGF- β -Konzentration im Serum Zirrhosekranker auf. Vitamin D steigert physiologischer Weise die Ausschüttung von TGF- β , ist in seiner Konzentration im zirrhotischen Patientenkollektiv jedoch verringert. Die Veränderung im Vitamin D-Stoffwechsel bei Zirrhose kann folglich nicht als Erklärungsmöglichkeit der hohen TGF- β -Konzentration herangezogen werden.

Neuere Untersuchungen weisen auf die wichtige Rolle von Sclerostin im Knochenstoffwechsel hin [Poole et al., 2005; Li et al., 2005]. Da sowohl 1,25(OH)₂-Vitamin D₃, als auch TGF- β die Expression des Sost-Gens fördern [Sutherland et al., 2004; Loots et al., 2012] und erhöhte TGF- β -Konzentrationen im vorliegenden Patientenkollektiv bereits nachgewiesen werden konnten, wurde die Sclerostin-Konzentration im Patientenserum mittels ELISA bestimmt. Die statistische Auswertung ergab für die gesamte Zirrhosegruppe (N=34) signifikant höhere Werte als für die Kontrolle (N=6) (Zirrhotisch: [Sclerostin] = 0,32 ng/ml; nicht zirrhotisch: [Sclerostin] = 0,05 ng/ml; $p < 0,05$; t-test). Dieser Unterschied konnte nach der Unterscheidung in Child A-C nur noch als Trend erkannt werden ($p = 0,1306$), was an der zu geringen Probenzahl des Kontrollkollektivs liegen kann. Die gemessene Zunahme der Sclerostinkonzentration unter TGF- β -Anstieg entspricht den Ergebnissen früherer Studien [Loots et al., 2012]. Damit wäre eine weitere Erklärung für die schlechte Knochenqualität zirrhosekranker Patienten gegeben: Die Freisetzung von TGF- β aus zirrhotischem Lebergewebe fördert in Osteozyten die Transkription des Sost-Gens, das entstehende Protein Sclerostin hemmt Osteoblasten bzw. induziert deren Apoptose, so dass schließlich eine Imbalance im Knochenumbau entsteht, mit dem Resultat einer herabgesetzten strukturellen Integrität.

Eingangs war in dieser Arbeit als weitere Frage formuliert worden, ob sich in zirrhotischem Lebergewebe Veränderungen von Proteinen zeigen, die Einfluss auf den Knochenstoffwechsel haben können. Derartige Regulatorproteine sind z.B. Osteocalcin, Osteopontin, Osteonectin und TNF α . Ihre Genexpression wurde mittels PCR in Lebergewebe bestimmt und ein Vergleich zwischen nicht zirrhotischen (N=10) und zirrhotischen Lebern (N=12) gezogen. Für alle Gene war eine Expression in Lebergewebe nachweisbar, was für Osteopontin, Osteonectin und TNF α mit bisherigen Daten übereinstimmt [Patouraux et al., 2012; Blazejewski et al., 1997; Frizell et al., 1995; Neumann et al., 2011; Tosello-Tramont et al., 2012]. Für die Expression des profibrotisch wirkenden Osteopontin wurde bereits in neueren Studien eine positive Korrelation mit dem Schweregrad einer hepatischen Fibrosierung und dem zirkulierenden TGF- β beschrieben [Patouraux et al., 2012; Xiao et al., 2012]. Damit wäre für die Genexpression in der vorliegenden Arbeit aufgrund der hohen TGF- β -Spiegel eine Regulierung nach oben zu erwarten gewesen. Diese konnte jedoch lediglich im Sinne eines Trends gezeigt werden ($p = 0,1059$). Osteopontin fördert einerseits in Abhängigkeit von TGF- β die Proliferation von hepatischen Sternzellen und damit letzten Endes deren Differenzierung zu Fibroblasten [Xiao et al., 2012], was das Fortschreiten der Organfibrosierung begünstigt. Die Rolle für den Knochenstoffwechsel ist andererseits noch nicht hinreichend geklärt [Hunter et al., 2013]. Als gesichert gilt allerdings, dass Osteopontin Osteoklasten an der mineralisierten Matrix verankert [Welsch, 2006, S.138]. In jüngster Zeit wurde das Protein als Indikator für schlechte Knochendichte und Risikofaktor für Wirbelkörperfrakturen gehandelt [Fodor et al., 2013]. Unter der Annahme, dass der in der vorliegenden Arbeit gemessene Trend wirklich eine höhere Genexpression bei den Zirrhosepatienten widerspiegelt, kommt Osteopontin also sowohl eine negative Rolle im Krankheitsverlauf der Leberzirrhose, als auch im Knochenstoffwechsel zu. Sollte sich die negative Auswirkung hoher Konzentrationen dieses Proteins auf die Knochenintegrität in weiteren Studien bewahrheiten, könnte die gesteigerte Osteopontinproduktion einer der Gründe für die Entstehung der hepatischen Osteodystrophie bei Leberzirrhose sein.

Auch Osteonectin steht in enger Verbindung mit TGF- β . In der Leber wird es vor allem von aktivierten Fibroblasten freigesetzt [Blazejewski et al., 1997] und soll für die profibrotische Aktivität von TGF- β mitverantwortlich sein [Atorrasagasti et al., 2011]. Insofern ist es verwunderlich, dass in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Un-

terschied zwischen der Osteonectin-Expression in zirrhotischer und nicht zirrhotischer Leber entdeckt werden konnte. Dies steht bisherigen Erkenntnissen entgegen, die eine gesteigerte hepatische Expression mit Fortschreiten der Leberzirrhose beschreiben [Frizell et al., 1995]. Betrachtet man den Knochenstoffwechsel, so hat allerdings weder eine unveränderte, noch eine potentiell gesteigerte Osteonectin-Expression negative Auswirkungen auf die Knochenintegrität. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass nur eine Verringerung der Osteonectinproduktion mit einer Abnahme der Knochenneubildung und Osteopenie einhergeht [Delany et al., 2000]. Damit erscheint es unwahrscheinlich, dass eine Veränderung der Genexpression dieses Proteins im Zuge der Leberzirrhose zur hepatischen Osteodystrophie beiträgt.

Die Untersuchung des Expressionsgrades von $\text{TNF}\alpha$ ließ ebenfalls keine signifikante Veränderung zwischen zirrhotischem und nicht zirrhotischem Lebergewebe erkennen. Als Chemotaxin wird $\text{TNF}\alpha$ im Rahmen inflammatorischer Prozesse wie der Fibrosierung der Leber freigesetzt – in letzterem Fall vor allem aus hepatischen Kupffer-Zellen [Tosello-Tramont et al., 2012]. Eine andere Studie hat gezeigt, dass diese Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ mit zunehmender Fibrosierung der Leber ansteigt [Neumann et al., 2011] und nicht, wie in der vorliegenden Studie, unverändert bleibt. Das in der vorliegenden Arbeit gemessene PCR-Signal von $\text{TNF}\alpha$ war so schwach, dass die densitometrische Analyse als Auswertungsverfahren unter Umständen nicht genügend Trennschärfe besitzt. Dies könnte die Diskrepanz zwischen den Versuchsergebnissen erklären. Sich bei Fibrosierung der Leber nicht verändernde Expressionsgrade würden einen Beitrag des Zytokins zum Krankheitsbild der hepatischen Osteodystrophie unwahrscheinlich machen. Eine gesteigerte hepatische Expression mit anschließender Abgabe von $\text{TNF}\alpha$ in den Blutkreislauf könnte allerdings eine wesentliche Ursache schlechter Knochenqualität sein. $\text{TNF}\alpha$ stimuliert schließlich die Expression von Genen, die wiederum die Osteoklastogenese fördern und inhibiert gleichzeitig die Osteoblastenfunktion [Gilbert et al., 2000; Nanes, 2003; Boyce et al., 2005]. Dieser Schluss lässt sich aus der vorliegenden Arbeit nicht ziehen.

Eine interessante Beobachtung ist die hepatische Expression von Osteocalcin – handelt es sich doch um ein Protein, das eigentlich von Osteoblasten gebildet wird [Deetjen et al., 2005, S.190]. Bisherige Studien haben sehr wohl den Zusammenhang von Osteocalcin und chronischer Lebererkrankung beleuchtet, ihre Untersuchungen jedoch

stets auf die Messung der Serumkonzentration beschränkt. Die Datenlage ist dabei recht inkonstant. Während die einen Autoren keine Korrelation zwischen der Osteocalcin-Serumkonzentration und einer (nicht-) alkoholischen Fettlebererkrankung sehen [Dou et al., 2013; Szalay et al., 1991], weisen andere auf eine Abhängigkeit vom Ausmaß der Leberzellverfettung hin und beschreiben signifikant niedrigere Osteocalcin-Werte im kranken Kollektiv [Yilmaz et al., 2011]. Wieder andere Autoren berichten von einer negativen Korrelation zwischen Osteocalcinkonzentration und Leberzirrhose [Aller et al., 2011; Pietschmann et al., 1990]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass neben Knochenzellen auch Leberzellen Osteocalcin freisetzen. Osteocalcin fungiert als Chemotaxin für Osteoklasten, vermittelt ihre Adhäsion am Knochen [Chenu et al., 1994] und trägt somit zu einer gesteigerten Knochenresorption bei, wie sie auch im Verlauf der hepatischen Osteodystrophie auftritt. Die fehlende Veränderung der hepatischen Expression im Rahmen einer zirrhotischen Erkrankung erlaubt aber den Rückschluss, dass aus der Leber stammendes Osteocalcin keinen oder zumindest keinen signifikanten Beitrag zur Änderung der Serumkonzentration liefert. Dies spricht wiederum gegen eine Beteiligung hepatischen Osteocalcins an der Entstehung der hepatischen Osteodystrophie.

Zusammenfassend konnte mit den durchgeführten Versuchen die eingangs formulierte Fragestellung größtenteils beantwortet werden: Patienten mit Leberzirrhose haben im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv eine reduzierte Knochendichte. Die TGF- β -Konzentration im Serum ist bei Zirrhosekranken erhöht und die Betroffenen zeigen im Serum einen verringerten Vitamin D-Spiegel. Mit dem Nachweis veränderter Expressionsgrade von Genen des Vitamin D-Synthesewegs konnten mögliche Ursachen für die niedrige 25-Hydroxy Vitamin-D-Konzentration bei Leberzirrhose vorgeschlagen werden. Die Ursache für die Erhöhung der TGF- β -Konzentration bleibt indes unbeantwortet. Es konnte keine erklärende Abweichung in der intrazellulären Signalkaskade in Lebergewebe eruiert werden und die niedrige Vitamin D-Konzentration widerspricht einem Beitrag des Vitamin D an der Freisetzung von TGF- β . Die Suche nach relevanten Veränderungen in der hepatischen Genexpression von Proteinen, die Einfluss auf den Knochenstoffwechsel haben könnten, verlief erfolglos. Lediglich im Fall von Osteopontin konnte ein Trend aufgezeigt werden, der Auswirkungen auf den Knochenmetabolismus haben könnte. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Ent-

stehung der hepatischen Osteodystrophie nicht auf eine hepatische Freisetzung der untersuchten Proteine zurückzuführen ist.

Abschließend sollen an dieser Stelle wesentliche Limitierungen der durchgeführten Studie aufgezeigt werden: Zum einen ist die Reverse-Transkriptions-PCR mit densitometrischer Analyse nicht die exakteste Methode zur Analyse von Expressionsgraden. In einem komplexeren Versuchsaufbau (z.B. real-time PCR) wären eindeutigere oder andere Entdeckungen durchaus vorstellbar. Die aufgetretenen Abweichungen vorliegender Ergebnisse von anderen Studien zeigen dies. Dennoch wurde diese Methodik gewählt, da sie sich eignet um einen ersten Überblick über das Expressionsverhalten zu erlangen. Eine weitere Limitierung liegt in der teilweise zu geringen Fallzahl. Vergrößerungen des Patientenkollektivs könnten gemessene Trends über das Signifikanzniveau anheben, oder bisher nicht gemessene Veränderungen zu Tage fördern. Als letztes darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die in dieser Arbeit verwendete cDNA nicht einer Hepatozytenkultur, sondern frisch gewonnenem Lebergewebe entstammt. Damit fließt zwangsläufig auch cDNA anderer hepatischer Zellen (Kupffer-Zellen, Ito-Zellen, Entzündungszellen, etc.) in die Auswertung mit ein und könnte die gewonnenen Daten verfälschen. Dieses Problem lässt sich allerdings nur schwer umgehen, da für entsprechende Versuche eine zirrhotische Hepatozytenkultur existieren müsste. Die vorliegende Studie sollte also als Grundbaustein zukünftiger Arbeiten angesehen werden, deren Ziel die weitere Verfolgung und Spezifizierung der aufgestellten Beobachtungen sein kann.

8. Ausblick

An mehreren Stellen dieser Arbeit wurde deutlich, dass der aktuelle Forschungsstand noch nicht ausreicht, um alle Interaktionen im komplexen Entstehungsmodell der hepatischen Osteodystrophie hinreichend zu erklären. Auch für die Zukunft bestehen weite Felder, auf denen medizinische Forschungsarbeit geleistet werden muss. Die vorliegende Arbeit kann dazu konkrete Vorschläge liefern:

- Auf der Suche nach der Ursache für die sehr hohe TGF- β -Serumkonzentration bei Zirrhose könnte ein weiterer Denkansatz den Knochen in den Mittelpunkt der Betrachtungen stellen. Bei der Entstehung der Leberzirrhose handelt es sich um einen entzündlichen Prozess, in dessen Rahmen auch TGF- β ausgeschüttet wird. Über die TGF- β -vermittelte Aktivierung von Osteoklasten im Knochen könnte ein Kreislauf in Gang gesetzt werden, in dessen Verlauf die Freisetzung von TGF- β aus Knochenmatrix immer wieder neue Osteoklasten anregt und so die TGF- β -Konzentration stetig erhöht. Die Betrachtung der intrazellulären Signaltransduktion in Osteoblasten hinsichtlich etwaiger Veränderungen – analog zu den hier durchgeführten Versuchen – wäre damit ein Ansatz zukünftiger Studien.
- Interessanterweise konnte eine Genexpression von Osteoprotegerin in Lebergewebe nachgewiesen werden. Um dies zu spezifizieren, könnte derselbe Versuch mit cDNA aus kultivierten Hepatozyten durchgeführt werden. In einem weiteren Schritt wäre dann zu untersuchen, ob sich eine Änderung der OPG-Expression nach Stimulation dieser Zellen mit TGF- β zeigt. Damit sich eine Veränderung der hepatischen OPG-Expression am Knochen bemerkbar machen kann, muss aber zusätzlich der Nachweis erbracht werden, dass dieses OPG in ausschlaggebendem Maß in den Blutkreislauf abgegeben wird.
- Für die hepatische Genexpression von Osteopontin wurde in der vorliegenden Arbeit bei Zirrhose ein Trend zur einer Regulation nach oben ermittelt. Hinsichtlich der Rolle von Osteopontin auf den Knochen herrscht in der Fachliteratur noch Uneinigkeit. Zunächst sollte der gemessene Trend in einem größeren Patientenkollektiv und mit einer exakteren Methode als der Reversen-Transkriptions PCR (z.B. real-time PCR) verifiziert werden. Bei nachweislich erhöhten Werten müsste sich ein ELISA zum Nachweis einer erhöhten Osteo-

pointkonzentration im Serum anschließen. Die Auswirkung hoher Osteopontin-Spiegel auf die Knochenstabilität ließe sich dann im Mausmodell eruieren.

Ungeachtet der Ergebnisse dieser Arbeit bleibt weiterhin ungeklärt, ob die Assoziation von chronischer Lebererkrankung und Osteopenie bzw. Osteoporose wirklich auf Stoffwechselveränderungen zurückzuführen ist. Wesentliche Risikofaktoren der Osteoporose wie niedriger BMI, schlechte Ernährung, Alkohol- und Nikotinabusus finden sich auch gehäuft bei Patienten mit Leberzirrhose und stellen schwer zu eliminierende Confounder aller bisherigen Studien dar. Der wissenschaftliche Ehrgeiz auf diesem Gebiet darf nicht abreißen, denn erst wenn das komplexe Krankheitsbild „Hepatische Osteodystrophie“ komplett verstanden ist, wird eine kausale Therapie für die vielen betroffenen Menschen möglich sein.

9. Zusammenfassung

Patienten mit Leberzirrhose sind aufgrund schlechter Knochendichte hochgradig gefährdet, eine Osteoporose mit nachfolgenden Frakturen zu entwickeln. Über die vergangenen Jahre wurde dafür der Begriff der Hepatischen Osteodystrophie geprägt, deren Ätiologie nach derzeitigem Wissensstand multifaktoriell ist. Ziel dieser Arbeit war es, Veränderungen des TGF- β -Systems und des Vitamin D-Stoffwechsels bei Leberzirrhosekranken zu untersuchen, zwei bisher als vielsprechend angesehenen Erklärungsansätzen dieses multifaktoriellen Modells. Mittels QCT der lumbalen Wirbelsäule konnte gezeigt werden, dass das untersuchte Kollektiv der Zirrhosepatienten mit signifikant niedrigeren T-Scores eine schlechtere Knochendichte als eine gesunde Kontrolle hat (-1,91 SD vs. -0,56 SD). Der Vergleich der TGF- β -Konzentration im Serum zwischen Zirrhosepatienten und einer gesunden Kontrolle zeigte mittels Reporterzellen eine signifikante Erhöhung in der Zirrhosegruppe (Child A: [TGF- β] = 73,8 ng/ml; Child B: [TGF- β] = 69,9 ng/ml; Child C: [TGF- β] = 60,5 ng/ml; Kontrolle: [TGF- β] = 22,7 ng/ml). Die Ursache dieser Erhöhung liegt nicht in einer Modifikation der intrazellulären hepatischen TGF- β -Signalkaskade, soweit es die Genexpression der untersuchten Regulatorproteine smurf 1, smurf 2, SARA, Ski und SnoN betrifft. TGF- β nimmt durch die Manipulation der mRNA-Expression von RANKL und OPG Einfluss auf die Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten. Beide Proteine konnten mittels PCR in Lebergewebe nachgewiesen werden. Die RANKL-Expression zeigte sich unverändert, OPG war in zirrhosischem Gewebe signifikant herunterreguliert (OPG/GAPDH = 1,10 vs. 0,83), so dass die Leber theoretisch zu einer den Knochenabbau fördernden RANKL/OPG-Ratio beitragen könnte, sollten die Proteine in den Blutkreislauf abgegeben werden. Der Vitamin D-Stoffwechsel zirrrosekranker Patienten weist erhebliche Veränderungen auf. Die Konzentration von 25-Hydroxy-Vitamin D, Vorstufe des aktiven 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ zeigte im ELISA signifikant niedrigere Serum-Werte im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolle: [1,25(OH)₂-Vitamin D₃] = 133,52 nmol/l; Child A: [1,25(OH)₂-Vitamin D₃] = 45,03 nmol/l; Child B: [1,25(OH)₂-Vitamin D₃] = 35,79 nmol/l; Child C: [1,25(OH)₂-Vitamin D₃] = 27,42 nmol/l). Als Ursache kommt eine herabregulierte Genexpression von CYP27A1 (CYP27A1/GAPDH = 0,33 vs. 0,75) und GC (GC/GAPDH = 0,23 vs. 0,65) in Frage, die zeigt, dass die 25-Hydroxylase und das Vitamin D bindende Protein bei Leberzirrhose negativ beeinflusst sind. Außerdem ist die Genexpression von DHCR7 bei Le-

berzirrrose gesteigert (DHCR7/ β -actin = 0,21 vs. 0,5), was eine gesteigerte Aktivität des Enzyms vermuten lässt, das Edukte aus der Vitamin D-Synthese entzieht. Sowohl TGF- β , als auch 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ beeinflussen die Sezernierung von Sclerostin, einem wichtigen Regulatorprotein der Osteoblastenaktivität. Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von Sclerostin im Serum des zirrhotischen Kollektivs im Vergleich zur gesunden Kontrolle signifikant erhöht ist (Kontrolle: [Sclerostin] = 0,05 ng/ml; Zirrhose: [Sclerostin] = 0,32 ng/ml). Mit einer niedrigen Vitamin D- sowie erhöhten Sclerostin-Konzentration zeigen Patienten mit Leberzirrhose Veränderungen im Stoffwechsel, die die Entstehung einer Osteoporose begünstigen können. Die hohe TGF- β -Serumkonzentration kommt als Ursache der gesteigerten Sclerostinausschüttung in Betracht. Warum bei zirrhotischen Patienten erhöhte TGF- β -Konzentrationen gemessen werden, bleibt Gegenstand weiterer Forschung.

10. Literaturverzeichnis

- Angulo, P., Grandison, G.A., Fong, D.G., Keach, J.C., Lindor, K.D., Bjornsson, E., Koch, A. *Bone disease in patients with primary sclerosing cholangitis*, Gastroenterology 140 (2011) 180–188
- Arteh, J., Narra, S., Nair, S. *Prevalence of vitamin D deficiency in chronic liver disease*, Dig Dis Sci 55 (2010) 2624-2628
- Atfi, A., Baron, R. *PTH battles TGF- β in bone*, Nat. Cell. Biol. 12 (2010) 205-207
- Atorrasagasti, C., Aquino, JB., Hofman, L., Alaniz, L., Malvicini, M., Garcia, M., Benedetti, L., Friedman, SL., Podhajcer, O., Mazzolini, G. *SPARC downregulation attenuates the profibrogenic response of hepatic stellate cells induced by TGF- β 1 and PDGF*, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 300 (2011) 739-748
- Blazejewski, S., Le Bail, B., Boussarie, L., Blanc, JF., Malaval, L., Okubo, K., Saric, J., Bioulac-Sage P., Rosenbaum, J., *Osteonectin (SPARC) Expression in Human Liver and in Cultured human Liver Myofibroblasts*, Am J Pathol 151 (1997) 651-657
- Border, WA., Noble, NA. *Transforming Growth Factor β in Tissue Fibrosis*, N Engl J Med 331 (1994) 1286-1292
- Boyce, BF., Li, P., Yao, Z., Zhang, Q., Badell, IR., Schwarz, EM., O’Keefe, RJ., Xing, L. *TNF α and pathologic bone resorption*, Keio J Med 54 (2005) 127-131
- Bu, F.X., Armas, L., Lappe, J., Zhou, Y., Gao, G., Wang, H.W., Recker, R., Zhao, L.J. *Comprehensive association analysis of nine candidate genes with serum 25-hydroxy vitamin D levels among healthy Caucasian subjects*, Hum. Genet. 128 (2010) 549–556
- Bühling, K.J., Lepenies, J., Witt, K. „*Intensivkurs allgemeine und spezielle Pathologie*“ Urban & Fischer Verlag, München/Jena, 2008
- Cai, Y., Shen, XZ., Zhou, CH., Wang, JY. *Abnormal expression of Smurf2 during the process of rat liver fibrosis*, Chin J Dig Dis 7 (2006) 237-245
- Cheng, J.B., Levine, M.A., Bell, N.H., Mangelsdorf, D.J., Russell, D.W. *Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase*, Proc. Natl. Acad. Sci. 101 (2004) 7711-7715

Chenu, C., Colucci, S., Grano, M., Zigrino, P., Barattolo, R., Zambonin, G., Baldini, N., Vergnaud, P., Delmas, PD., Zallone, AZ. *Osteocalcin Induces Chemotaxis, Secretion of Matrix Proteins and Calcium-mediated Intracellular Signaling in Human Osteoclast-like Cells*, J Cell Biol. 127 (1994) 1149-1158

Collier, J. *Bone Disorders in Chronic Liver Disease*, Hepatology 46 (2007) 1271-1278

Compston, J.E. *Hepatic osteodystrophy: vitamin D metabolism in patients with liver disease*, Gut 27 (1986) 1073-1090

Crosbie, O.M., Freaney, R., McKenna, M.J., Hegarty, J.E. *Bone density, vitamin D status and disordered bone remodeling in end-stage chronic liver disease*, Calcif Tissue Int. 64 (1999) 295-300

Deetjen, P., Speckmann, E.-J., Hescheler, J. „*Physiologie*“ Urban & Fischer Verlag, München/Jena, 2005

Delany, AM., Amling, M., Priemel, M., Howe, C., Baron, R., Canalis, E. *Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice*, J Clin Invest 105 (2000) 915-923

Diamond, T., Stiel, D., Lunzer, M., Wilkinson, M., Roche, J., Posen, S. *Osteoporosis and skeletal fractures in chronic liver disease*, Gut 31 (1990) 82-87

Dooley, S., Hamzavi, J., Ciuculan, L., Godoy, P., Ilkavets, I., Ehnert, S., Ueberham, E., Gebhardt, R., Kanzler, S., Geier, A., Breitkopf, K., Weng, H., Mertens, PR. *Hepatocyte-specific Smad7 expression attenuates TGF-beta-mediated fibrogenesis and protects against liver damage*, Gastroenterology 135 (2008) 642-659

Dou, J., Ma, X., Fang, Q., Hao, Y., Yang, R., Wang, F., Zhu, J., Bao, Y., Jia, W. *Relationship between Serum Osteocalcin Levels and Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Chinese Men*, Clin Exp Pharmacol Physiol. Epub (2013) 1440-1681

Ehnert, S., Baur, J., Schmitt, A., Neumaier, M., Lucke, M., Dooley, S., Vester, H., Wildemann, B., Stöckle, U., Nüssler, AK. *TGF- β 1 As Possible Link between Loss of Bone Mineral Density and Chronic Inflammation*, PLoS One 5 (2010) doi: 10.1371

Ehnert, S., Zhao, J., Pscherer, S., Freude, Th., Dooley, S., Kolk, A., Stöckle, U., Nüssler, AK., Hube, R. *Transforming growth factor β 1 inhibits bone morphogenic*

protein (BMP)-2 and BMP-7 signaling via upregulation of Ski-related novel protein N (SnoN): possible mechanism for the failure of BMP therapy?, BMC Medicine 10 (2010) 101-111

Finkelmann, R.D., Linkhart, T.A., Mohan, S., Lau, K.H., Baylink, D.J., Bell, N.H. *Vitamin D deficiency causes a selective reduction in deposition of transforming growth factor beta in rat bone: possible mechanism for impaired osteoinduction*, Proc. Natl. Acad. Sci. 88 (1991) 3657-3660

Fodor, D., Bondor, C., Albu, A., Simon, SP., Craciun, A., Muntean, L. *The value of osteopontin in the assessment of bone mineral density status in postmenopausal women*, J Investig Med. 61 (2013) 15-21

Fox, S.W., Lovibond, A.C. *Current insights into the role of transforming growth factor-beta in bone resorption*, Mol. Cell. Endocrinol. 243 (2005) 19-26

Frizell, E., Liu, SL., Abraham, A., Ozaki, I., Eghbali, M., Sage, EH., Zern, MA. *Expression of SPARC in normal and fibrotic livers*, Hepatology 21 (1995) 847-854

Fu, R., Wu, J., Ding, J., Sheng, J., Hong, L., Sun, Q., Fang, H., Xiang, D. *Targeting transforming growth factor β RII expression inhibits the activation of hepatic stellate cells and reduces collagen synthesis*, Exp. Biol. Med. 236 (2011) 291-297

Gasser, R.W., *Cholestase und metabolische Knochenerkrankung – eine Übersicht*, Wiener Medizinische Wochenschrift 158 (2008) 553-557

Gilbert, L., He, X., Farmer, P., Boden, S., Kozlowski, M., Rubin, J., Nanes, M. *Inhibition of Osteoblast Differentiation by Tumor Necrosis Factor- α* , Endocrinology 141 (2000) 3956-3964

Goel, V., Kar, P. *Hepatic osteodystrophy*, Trop. Gastroenterol. 31(2010) 82-86

Grünhage, F., Hochrath, K., Krawczyk, M., Höblinger, A., Obermayer-Pietsch, B., Geisel, J., Trauner, M., Sauerbruch, T., Lammert, F. *Common genetic variation in vitamin D metabolism is associated with liver stiffness*, Hepatology 56 (2012) 1883-1891

Guañabens, N., Enjuanes, A., Alvarez, L., Peris, P., Caballería, L., Jesús Martínez de Osaba, M., Cerdá, D., Monegal, A., Pons, F., Parés, A. *High osteoprotegerin serum*

levels in primary biliary cirrhosis are associated with disease severity but not with the mRNA gene expression in liver tissue, J. Bone Miner. Metab. 27 (2009) 347-354

Guañabens, N., Cerdá, D., Monega, I. A., Pons, F., Caballería, L., Peris, P., Parés, A. *Low bone mass and severity of cholestasis affect fracture risk in patients with primary biliary cirrhosis*, Gastroenterology 138 (2010) 2348-2356

Herold, G. „*Innere Medizin*“ Gerd Herold Verlag, Köln, 2010

Hunter, G.K. *Role of Osteopontin in Modulation of Hydroxyapatite Formation*, Calcif Tissue Epub (2013)

Janssens, K., Dijke, P., Janssens, S., van Hul, W., *Transforming Growth Factor- β 1 to the Bone*, Endocrine Reviews 26 (2005) 743–774

Jurado, S., Garcia-Giralt, N., Díez-Pérez, A., Esbrit, P., Yoskovitz, G., Agueda, L., Urreiziti, R., Pérez-Edo, L., Saló, G., Mellibovsky, L., Balcells, S., Grinberg, D., Nogués, X. *Effect of IL-1 β , PGE(2), and TGF- β 1 on the expression of OPG and RANKL in normal and osteoporotic primary human osteoblasts*, J. Cell. Biochem. 110 (2010) 304-310

Keck, A.V., Pecherstorfer, M. *Knochenstoffwechsel bei malignen Erkrankungen*, Journal für Mineralstoffwechsel 10 (2003) 6-11

Kiechle, M. „*Gynäkologie und Geburtshilfe*“ Urban & Fischer Verlag, München/Jena, 2007

Krawitt, E.L., Grundmann, M.J., Mawer, E.B. *Absorption, hydroxylation, and excretion of vitamin D3 in primary biliary cirrhosis*, Lancet 17 (1977) 1246-1249

Li, X., Zhang, Y., Kang, H., Liu, W., Liu, P., Zhang, J., Harris, S.E., Wu, D. *Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling*, J. Biol. Chem. 280 (2005) 19883–19887

Lippert, H. „*Lehrbuch Anatomie*“ Urban & Fischer Verlag, München/Jena, 2006

Loots, G.G., Keller, H., Leupin, O., Murugesu, D., Collette, N.M., Genetos, D.C. *TGF- β regulates sclerostin expression via the ECR5 enhancer*, Bone 50 (2012) 663-669

- López-Larramona, G., Lucendo, A.J., González-Castillo, S., Tenias, J.M. *Hepatic osteodystrophy: An important matter for consideration in chronic liver disease*, World J. Hepatol. 27 (2011) 300-307
- Luxon, BA. *Bone disorders in chronic liver diseases*, Curr Gastroenterol Rep. 13 (2011) 40-48
- Macías-Silva, M., Li, W., Leu, J., Crissey, MA., Taub, R. *Up-regulated Transcriptional Repressors SnoN and Ski Bind Smad Proteins to Antagonize Transforming Growth Factor- β Signals during Liver Regeneration*, J. Biol. Chem. 277 (2002) 28483-28490
- Mansueto, P., Carroccio, A., Seidita, A., Di Fede, G., Craxì, A. *Osteodystrophy in chronic liver diseases*, Intern. Emerg. Med. (2012) epub
- Massagué, J. *How cells read TGF- β signals*, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 3 (2000) 169-178
- Monegal, A., Navasa, M., Guañabens, N., Peris, P., Pons, F., Martinez de Osaba, M.J., Rimola, A., Rodés, J., Muñoz-Gómez, J. *Osteoporosis and bone mineral metabolism disorders in cirrhotic patients referred for orthotopic liver transplantation*, Calcif Tissue Int. 60 (1997) 148-154
- Moschen, A.R., Kaser, A., Stadlmann, S., Millonig, G., Kaser, S., Mühllechner, P., Habor, A., Graziadei, I., Vogel, W., Tilg, H. *The RANKL/OPG system and bone mineral density in patients with chronic liver disease*, J. Hepatol. 43 (2005) 973-983
- Mounach, A., Ouzzif, Z., Wariaghli, G., Achemlal, L., Benbaghdadi, I., Aouragh, A., Bezza, A., El Maghraoui, A. *Primary biliary cirrhosis and osteoporosis: a case-control study*, J Bone Miner Metab 26 (2008) 379-384
- Müller, M. „*Chirurgie für Studium und Praxis*“ Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach, 2010
- Mueller, D.K., Kutscherenko, A., Bartel, H., Vlassenbroek, A., Ourednicek, P., Erckenbrecht, J. *Phantom-less QCT BMD system as screening tool for osteoporosis without additional radiation*, Eur. J. Radiol. 79 (2011) 375-381

- Nanes, MS., *Tumor necrosis factor-alpha: molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology*, Gene 321 (2003) 1-15
- Neumann, MG., Schmilovitz-Weiss, H., Hilzenrat, N., Bourliere, M., Marcellin, P., Trepo, C., Mazulli, T., Moussa, G., Patel, A., Baig, AA., Cohen, L. *Markers of Inflammation and Fibrosis in Alcoholic Hepatitis and Viral Hepatitis C*, Int J Hepat 2012 (2012) 231210
- Paterson, C.R., Losowsky, M.S. *The bones in chronic liver disease*, Scand. J. Gastroenterol. 2 (1967) 293-300
- Patouraux, S., Bonnafous, S., Voican, CS., Anty, R., Saint-Paul, MC., Rosenthal-Allieri, MA., Agostini, H., Njike, M., Barri-Ova, N., Naveau, S., Le Marchand-Brustel, Y., Veillon, P., Calès, P., Perlemuter, G., Tran, A., Gual, P. *The Osteopontin Level in Liver, Adipose Tissue and Serum is Correlated with Fibrosis in Patients with Alcoholic Liver Disease*, PLoS ONE 7 (2012) e35612
- Pietschmann, P., Resch, H., Müller, C., Woloszczuk, W., Willvonseder, R. *Decreased serum osteocalcin levels in patients with liver cirrhosis*, Bone Miner 8 (1990) 103-108
- Plum, L.A., DeLuca, H.F. *Vitamin D, disease and therapeutic opportunities*, Nat. Rev. Drug Discov. 9 (2010) 941-955
- Poole, K.E., van Bezooijen, R.L., Loveridge, N., Hamersma, H., Papapoulos, S.E., Löwik, C.W., Reeve, J. *Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation*, FASEB J. 19 (2005) 1842-1844
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., Deutzmann, R. „*Biochemie*“ Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2006
- Reiser, M., Kuhn, F.P., Debus, J. „*Radiologie*“ Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2006
- Rentz-Polster, H., Krautzig, S. „*Basislehrbuch Innere Medizin*“ Urban & Fischer Verlag, München/Jena, 2008
- Schartl, M., Gessler, M., von Eckardstein, A. „*Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*“ Urban & Fischer Verlag, München/Jena, 2009

- Schmidmaier, G., Wildemann, B., Gäbelein, T., Heeger, J., Kandziora, F., Haas, N.P., Raschke, M. *Synergistic effect of IGF-I and TGF- β 1 on fracture healing in rats*, Acta Orthop. Scand. 74 (2003) 604–610
- Shinkyō, R., Sakaki, T., Kamakura, M., Ohta, M., Inouye, K. *Metabolism of vitamin D by human microsomal CYP2R1*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 324 (2004) 451-457
- Stroschein, S.L., Wang, W., Zhou, S., Zhou, Q., Luo, K. *Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein*, Science 286 (1999) 771-774
- Sutherland, M.K., Geoghegan, J.C., Yu, C., Turcott, E., Skonier, J.E., Winkler, D.G., Latham, J.A. *Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation*, Bone 35 (2004) 828-835
- Szalay, F., Lakatos, P., Németh, J., Abonyi, M., Büki, B., Tarján, G., Holló, I. *Decreased serum osteocalcin level in non-alcoholic and alcoholic chronic liver diseases*, Orv Hetil 16 (1991) 1301-1305
- Tao, YY., Cui, HY., Liu, CH. *Dynamic characteristics of SARA during liver fibrogenesis in rats*, Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi 14 (2006) 909-913
- Tesseur, I., Zou, K., Berber, E., Zhang, H., Wyss-Coray, T. *Highly sensitive and specific bioassay for measuring bioactive TGF- β* , BMC Cell. Biol. 2006 epub
- Tosello-Trampont, AC., Landes, SG., Nguyen, V., Novobrantseva, TI., Hahn, YS. *Kupffer cells trigger nonalcoholic steatohepatitis development in diet-induced mouse model through tumor necrosis factor- α production*, J Biol Chem. 287 (2012) 40161-40172
- Wagner D., Fahrleitner-Pammer, A. *Levels of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator for nuclear factor kappa B ligand (RANKL) in serum: Are they of any help?*, Wiener Medizinische Wochenschrift 160 (2010) 452-457
- Wanninger, J., Wiest, R., Bauer, S., Neumeier, M., Eisinger, K., Farkas, S., Scherer, M.N., Schäffler, A., Buechler, C. *Portal levels of latent transforming growth factor- β are related to liver function in patients with liver cirrhosis*, Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 23 (2011) 218-223

Welsch, U. „*Lehrbuch Histologie*“ Urban & Fischer Verlag, München/Jena, 2006

Xiao, X., Gang, Y., Gu, Y., Zhao, L., Chu, J., Zhou, J., Cai, X., Zhang, H., Xu., L., Nie, Y., Wu, K., Liu, Z., Fan, D. *Osteopontin contributes to TGF- β 1 mediated hepatic stellate cell activation*, Dig Diss Sci 57 (2012) 2883-2891

Yilmaz, Y., Kurt, R., Eren, F., Imeryuz, N. *Serum osteocalcin levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease: association with ballooning degeneration*, Scand J Clin Lab Invest 71 (2011) 631-636

Yuling, Z., Xi, W., Ye, L., Hui, Q., Shuqiang, Q., Wei, W., Lihong, R. *The GC, CYP2R1 and DHCR7 genes are associated with vitamin D levels in northeastern Han Chinese children*, Swiss Med Wkly. 2012; 142:w13636

Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J.L., Thomsen, G.H. *A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation*, Nature 400 (1999) 687-693

11. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Mikroskopische Leberarchitektur – anatomisch	1
Abbildung 2 Mikroskopische Leberarchitektur – funktionell.....	2
Abbildung 3 Entstehung der Zirrhose	4
Abbildung 4 Aufbau des Knochens	7
Abbildung 5 RANKL-Signalweg und Interaktion zwischen Osteoklasten und Osteoblasten .	10
Abbildung 6 Der TGF- β Signalweg.....	14
Abbildung 7 Überblick über die Rolle von TGF- β im Organismus	16
Abbildung 8 Vitamin D Synthese	17
Abbildung 9 Beispiel einer Hämatoxylin-Eosin Färbung	34
Abbildung 10 Beispiel einer Masson Trichrom-Färbung	34
Abbildung 11 Physiologische Architektur einer humanen Leber	35
Abbildung 12 Portoportale Septierungen bei Zirrhose	36
Abbildung 13 Portoportale Septierungen bei Zirrhose	36
Abbildung 14 Zerstörte Architektur bei Zirrhose	36
Abbildung 15 Regeneratknoten bei Zirrhose	36
Abbildung 16 Regeneratknoten bei Zirrhose	36
Abbildung 17 Nekrose bei Zirrhose	36
Abbildung 18 Nachweis intakter RNA nach Gelelektrophorese	39
Abbildung 19 Synthese von cDNA aus mRNA	40
Abbildung 20 Amplifikation einer DNA-Sequenz.....	41
Abbildung 21 Messfelder im sagittalen CT-Bild zur Knochendichtebestimmung	45
Abbildung 22 T-Score Kontrolle vs. Zirrhose-Gesamtkollektiv	47

11. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 23 T-Score Kontrolle vs. Child A-C	47
Abbildung 24 TGF- β Serumkonzentration Kontrolle vs. Child A-C.....	49
Abbildung 25 Fehlender Einfluss der Leberzirrhose auf Regulatorproteine des TGF- β - Signalwegs am Beispiel der Genexpression von smurf 1	50
Abbildung 26 Fehlender Einfluss der Leberzirrhose auf Regulatorproteine des TGF- β - Signalwegs am Beispiel der Genexpression von SARA.....	50
Abbildung 27 Genexpression von Osteopontin in Lebergewebe.....	51
Abbildung 28 Genexpression von Osteocalcin in Lebergewebe	52
Abbildung 29 Genexpression von Osteonectin in Lebergewebe	52
Abbildung 30 Genexpression von RANKL in Lebergewebe.....	52
Abbildung 31 Genexpression von TNF α in Lebergewebe	52
Abbildung 32 Genexpression von OPG in Lebergewebe	53
Abbildung 33 Genexpression von Vitamin D-bindendem Protein (GC) in Lebergewebe	54
Abbildung 34 Genexpression von CYP2R1 in Lebergewebe.....	55
Abbildung 35 Genexpression von DHCR7 in Lebergewebe	56
Abbildung 36 Genexpression von CYP2A1 in Lebergewebe.....	57
Abbildung 37 Serumkonzentration von 25-Hydroxy-Vitamin D	58
Abbildung 38 Serumkonzentration von Sclerostin (Kontrolle vs. Zirrhose-Gesamtkollektiv) 59	
Abbildung 39 Serumkonzentration von Sclerostin (Kontrolle vs. Child A-C).....	59

12. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht über das eingeschlossene Patientenkollektiv	21
Tabelle 2 Verwendete Gerätschaften und Hilfsmittel	22
Tabelle 3 Chemikalien für Zellkultur und Enzymaktivitätsmessung.....	23
Tabelle 4 Chemikalien für histologische Färbungen	24
Tabelle 5 Materialien für RNA Isolation und cDNA Synthese	24
Tabelle 6 Verwendete ELISA Kits	24
Tabelle 7 Verwendete PCR-Primer	25
Tabelle 8 Herstellung des Mediums für die Zellkultur	26
Tabelle 9 Punktevergabe im Child-Pugh Score	27
Tabelle 10 Einteilung des Child-Pugh Scores.....	27
Tabelle 11 Einteilung des Patientenkollektivs in den Child-Pugh Score.....	28
Tabelle 12 Herstellung der 4-Nitrophenylphosphat-haltigen AP-Pufferlösung.....	30
Tabelle 13 Standard-Verdünnungsreihe für die Bestimmung der TGF- β -Konzentration	30
Tabelle 14 Herstellung der Farbstoffe für die histologische Färbung.....	32
Tabelle 15 Färbezeiten für die H.E.- und Masson Trichrom-Färbung.....	33
Tabelle 16 Anfärbung mikroskopischer Strukturen in der Hämatoxylin-Eosin Färbung	34
Tabelle 17 Anfärbung mikroskopischer Strukturen in der Masson Trichrom-Färbung ...	34
Tabelle 18 Herstellung der Lösungen für die RNA-Isolation.....	37
Tabelle 19 Herstellung des Mastermix für die cDNA-Synthese.....	41
Tabelle 20 Herstellung des Mastermix für die Genamplifikation.....	42
Tabelle 21 Grenzwerte des BMD und T-Scores	45

Tabelle 22 T-Scores der gesunden Kontrolle und der Zirrhosepatienten..... 48

13. Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. A. Nüssler und Dr. S. Ehnert für die Ermöglichung und enge Betreuung dieses Projekts. Besonders bedanken möchte ich mich aber bei meinen Eltern, die mich gelehrt haben, immer mit einem Ziel vor Augen durch das Leben zu gehen und bei Rückschlägen nie locker zu lassen.