

Aus dem Muskuloskelettalen Zentrum Würzburg  
Orthopädische Klinik König Ludwig Haus  
der Universität Würzburg  
Direktor: Prof. Dr. med. Franz Jakob

Auswirkungen von FGF23 und Klotho auf lokale Mineralisierungsprozesse von  
Knochenzellen in 3D-Zellkulturen

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Ulrich Goschenhofer  
aus Hofheim i.Ufr.

Würzburg, Februar 2020

Referent: Prof. Dr. med. Franz Jakob

Korreferentin: PD Dr. Christine Hofmann

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 19.02.2020**

**Der Promovend ist Arzt**

Meiner Familie gewidmet.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Allgemeine Anatomie und Biologie des Knochengewebes.....	1
1.2. Knochenstoffwechsel .....	2
1.2.1. Mineralisierung.....	2
1.2.2. Remodeling.....	3
1.3. Zelltypen.....	5
1.3.1. MSC / HSC.....	5
1.3.2. Osteoblasten – knochenaufbauende Zellen .....	6
1.3.3. Osteozyten – knochenüberwachende Zellen.....	7
1.3.4. Osteoklasten – knochenabbauende Zellen .....	10
1.4. Molekulare Regulationsmechanismen durch FGF23, Klotho, PHEX und die SIBLINGs .....	11
1.4.1. PHEX.....	12
1.4.2. Klotho .....	13
1.4.3. FGF23 .....	17
1.4.4. Physiologische Mechanismen und Pathologien zwischen FGF23, PTH und Vitamin D .....	20
1.4.5. Osteoporose als beispielhafte Knochenstoffwechselkrankheit .....	23
1.5. Ziel der Arbeit.....	24
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>26</b>
2.1. Material.....	26
2.1.1. Geräte.....	26
2.1.2. Verbrauchsmaterial.....	26
2.1.3. Chemikalien/ Reagenzien.....	27
2.1.4. Lösungen.....	28
2.1.5. Enzyme .....	29
2.1.6. Rekombinante Proteine .....	29
2.1.7. Kits.....	29
2.1.8. Zellkultur.....	30
2.1.8.3. Medien.....	31
2.1.8.4. Weitere Stimulationsmedien /-zusätze .....	33
2.1.8.5. 3D-Kollagengele .....	34

2.1.9.	PCR-Primerdesign .....	34
2.1.10.	Primäre Antikörper .....	35
2.2.	Methodik .....	36
2.2.1.	Zellkultur .....	36
2.2.2.	Isolation zellulärer RNA .....	38
2.2.3.	RNA-Konzentrationsbestimmung .....	38
2.2.4.	cDNA-Synthese .....	39
2.2.5.	Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	39
2.2.6.	Gelelektrophorese .....	40
2.2.7.	Immunhistologie .....	41
2.2.8.	Färbungen .....	42
2.2.9.	Stimulationsansätze der 3D-Kulturen mit MLO-A5 und MLO-Y4 .....	43
2.2.9.1.	<i>Osteogene Differenzierung</i> .....	44
2.2.9.2.	<i>Überprüfung der Signaltransduktion von FGF23 und Klotho</i> .....	44
2.2.9.3	<i>Stimulation mit FGF23</i> .....	45
3.	Ergebnisse .....	47
3.1.	Vorarbeiten .....	47
3.1.1.	hMSC in 2D- und 3D-Kulturen .....	47
3.1.2.	MLO-A5 und MLO-Y4 in 2D-Kultur .....	50
3.2.	MLO-A5 und MLO-Y4 im 3D-Kultursystem .....	53
3.2.1.	Optimierung der Zellzahl in den 3D-Gelen .....	53
3.2.2.	Zellverteilung in den 3D-Kollagengelen .....	55
3.2.3.	Vitalität und Dendritenbildung .....	56
3.2.4.	Kontraktion der Gele – keine Gelkontraktion bei MLO-Y4 .....	57
3.2.5.	mRNA-Expressionsanalyse von MLO-A5 und MLO-Y4 nach osteogener Differenzierung .....	58
3.2.6.	Analyse auf Proteinebene von MLO-A5 und MLO-Y4 mittels immunhistologischer Methoden nach osteogener Differenzierung .....	60
3.3.	Osteogene Differenzierung von MLO-A5 und MLO-Y4 unter Einfluss von FGF23 und Klotho .....	63
3.3.1.	Validierung der Signaltransduktion .....	63
3.3.2.	Stimulation mit FGF23 im 3D-Gel .....	64
4.	Diskussion .....	69
4.1.	Grundlegende Erfahrungen mit hMSC, MLO-A5 und MLO-Y4 .....	69

4.1.1.	Färbungen der Kulturen.....	70
4.1.2.	Test des FGF23-Signalings .....	71
4.2.	3D-Kollagengele.....	73
4.2.1.	Versuchsaufbau.....	73
4.2.2.	Visuelle Analyse des 3D-Zellmodells .....	75
4.2.3.	Gelkontraktion .....	78
4.2.4.	Osteogene Differenzierung und FGF23-Stimulation.....	79
4.2.1.	Probleme in der Auswertung.....	85
4.2.2.	Empfehlungen für zukünftige Reproduktionen .....	88
4.3.	Ausblick .....	88
5.	Zusammenfassung.....	90
5.1.	Zusammenfassung .....	90
6.	Anhang .....	91
6.1.	Literaturverzeichnis.....	91
6.2	Abkürzungsverzeichnis.....	105
6.3	Abbildungslizenzen .....	107
7.	Danksagung	
8.	Lebenslauf	

# 1. Einleitung

## 1.1. Allgemeine Anatomie und Biologie des Knochengewebes

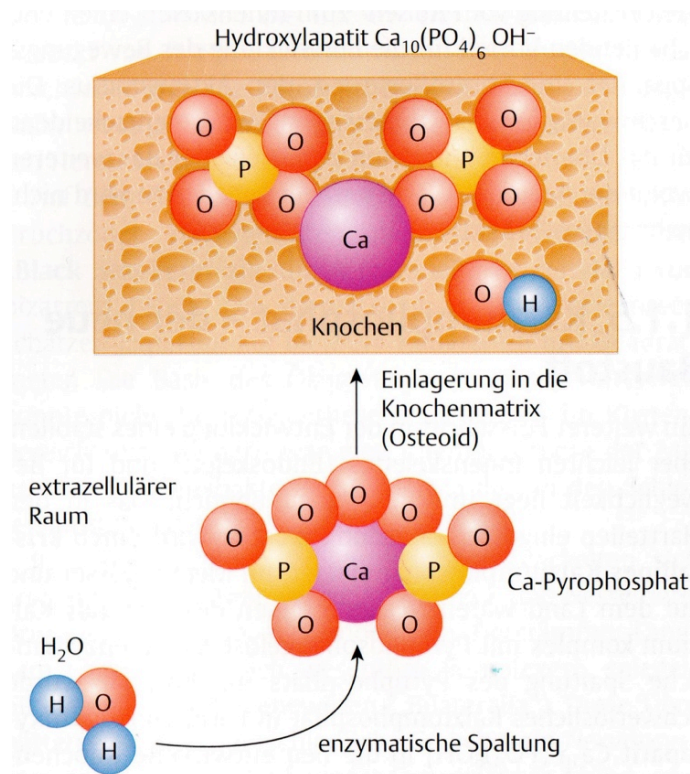
Knochen ist in vielerlei Hinsicht ein beeindruckendes Gewebe. Er besitzt eine einzigartige Leichtbauweise, die ihn als schützendes und stützendes Element des Körpers enorm druck-, zug- und biegungsfest macht. Sein Aufbau kann stetig wechselnden Bedingungen und Belastungen angepasst werden (Bommas-Ebert et al. 2006). Im evolutionären Kontext sind diese Anpassungsvorgänge meist die wesentlichen Voraussetzungen für die konsequenten Weiterentwicklungen vom Knochenfisch, den Reptilien und Dinosauriern, bis hin zu den Vögeln und Säugetieren (McLean et al. 2011, Zipfel et al. 2011, Bartl 2014). In seinem Markraum beherbergt der Knochen die blutbildenden hämatopoetischen Stammzellen (HSC), sowie Knochenzellen und Vorläuferzellen, welche auf Abruf rekrutiert werden können. Sie sichern den permanent stattfindenden, dynamischen Knochenumbau und die benötigten zellulären Elemente für die Frakturheilung (Bartl 2014). Als endokrines Organ kann der Knochen steuernd in den Calcium- und Phosphathaushalt eingreifen und damit seinen Verbrauch regulieren (Martin et al. 2012). Zugleich dienen die eingebauten Mineralien Calcium, Phosphat und Magnesium als Depots und können in Mangelsituationen fast unerschöpflich mobilisiert werden (Bartl 2014). Auf zellulärer Ebene besteht Knochen vor allem aus mesenchymalen Stammzellen (MSC), Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten. Osteozyten sind eingebettet in eine organische Knochenmatrix (Osteoid), bestehend zu 90 % aus Kollagen Typ 1 und zu 10 % aus anderen Proteinen, wie z.B. Osteokalzin, Osteonektin, Knochenproteoglykanen, Proteolipid, Sialoprotein oder den knochenmorphogenetischen Proteinen (Bone morphogenetic Protein, BMP). Die harte Grundsubstanz wird durch das anorganische Hydroxylapatit gebildet (Jerosch et al. 2002). Lange Röhrenknochen bestehen zum einen aus der außen liegenden dichten Kompakta, mit ihren Osteonen bzw. Havers-Systemen. Parallel zur Längsrichtung der Diaphyse angeordnet sind die 5 mm langen und aus 5 bis 20 Ringen bestehenden

Knochenzylinder. Im axialen Skelett, also in Schädel, Wirbelsäule, Thorax und Becken, dominiert die Spongiosa. Wie ein von einer festen Hülle umgebener Schwamm ist sie perfekt an die mechanischen Belastungen angepasst und erzeugt eine extrem große Oberfläche (Bartl et al. 2011). Die dazwischenliegenden Markräume, die die hämatopoetischen und mesenchymalen Zellen beherbergen, machen die Spongiosa zum metabolisch aktiven und für mechanische Stimuli sensiblen Teil des Knochens. In den meisten Knochen gibt es sowohl Kompakta als auch Spongiosa (Jacobs 2000).

## 1.2. Knochenstoffwechsel

### 1.2.1. Mineralisierung

Der Vorgang der knöchernen Mineralisierung ist eine wesentliche Voraussetzung für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Knochensubstanz. Schwerlösliches



**Abb. 1:** Calcium-Pyrophosphat wird im extrazellulären Raum enzymatisch gespalten und als kristallines Calciumphosphat in Form von Hydroxylapatit in die Knochenmatrix eingebaut. Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Thieme Verlags, entnommen aus (Bartl 2014).



Calciumphosphat in Form von Hydroxylapatit wird in die organische, extrazelluläre Matrix des Knochens eingebaut.

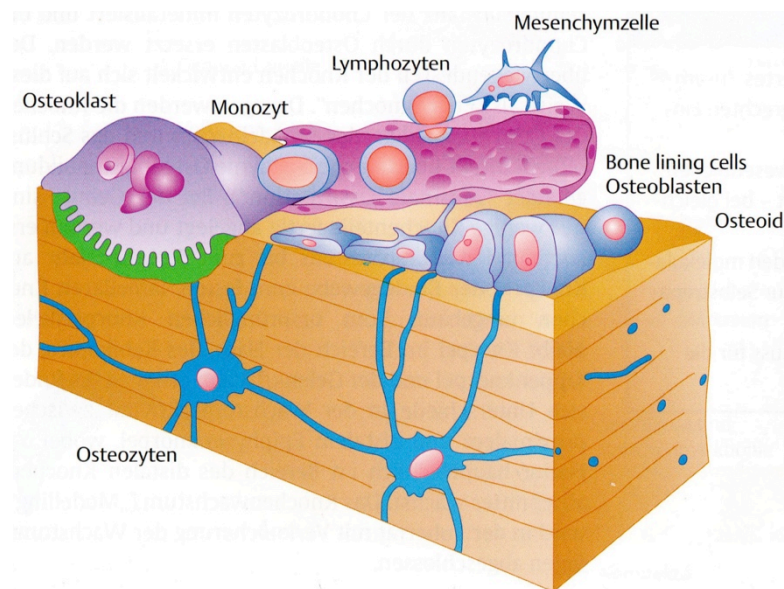
Hauptakteure, die diesen Prozess ermöglichen, sind Proteoglykane sowie das Enzym Alkalische Phosphatase und Kollagen vom Typ 1 (Jerosch et al. 2002, Bartl 2014). Hypertrophe Chondrozyten, Osteoblasten und Odontoblasten können Matrixvesikel mit Hydroxylapatitkristallen bilden und geben diese von ihrer Oberflächenmembran ab. In die Extrazellulärmatrix gestreut, wird das Hydroxylapatit zwischen Kollagenfibrillen abgelagert (Orimo 2010). Es entsteht eine sogenannte „2-Phasen-Komponente“, ähnlich der Spannbetonbauweise im Bauwesen. Zwischen eine elastische Matrix mit schichtweise lamellär angeordneten Kollagenmolekülen wird Calcium und Phosphat in kristalliner Form wie Beton eingelagert und verfestigt. Als Leim dienen Wasser und Riesenmoleküle (Mukopolysaccharide). Kollagen sorgt für Elastizität, kristalline Materialien für Festigkeit und Rigidität. Gesteuert wird dieser Vorgang durch ein hochkomplexes, lokales System mit zellulären Interaktionen, Zytokinen und elektromagnetischen Potenzialen. Beteiligt sind zudem Hormone, Vitamine,  $\beta$ 2-adrenerge Nervenfasern und einige weitere (Bartl et al. 2011).

### **1.2.2. Remodeling**

Ein ständiger Umbauprozess erhält den Knochen im Erwachsenenalter und erfüllt einige wichtige physiologische Aufgaben: In den Phasen des Längen- und Dickenwachstums werden Form und Proportionen des Knochens bewahrt. Die Calcium- und Phosphathomöostase des Organismus wird aufrechterhalten. Der Knochen wird an veränderte körperliche Belastungen angepasst, dabei können Sehnen- und Bandansätze am Knochen bedarfsorientiert verschoben werden. Bei Fehlstellung und nach einer Fraktur wird der Knochen neu ausgerichtet (Jerosch et al. 2002). Dabei handelt es sich nicht nur um die großen Frakturen, sondern auch um sogenannte Mikrofrakturen, die in ihrer Summe Knochendichte und Frakturrisiko bestimmen (Bartl et al. 2011).

Auf zellulärer Ebene erfordert dies ein enges Wechselspiel zwischen Osteoklasten und Osteoblasten. Man spricht dabei von der sogenannten „Basic Multicellular Unit“, auch als „Bautrupp“ des Knochengewebes bezeichnet (s. Abb. 2). Beteiligt an

dieser Einheit sind unter anderem Osteozyten, osteale Makrophagen und vaskuläre Endothelzellen, die mit Signalnetzwerken von Ligand-Rezeptorkomplexen kommunizieren. Zusätzlich regulieren T- und B-Lymphozyten die osteoimmunologische Homöostase (Kular et al. 2012). Kontinuierlich entfernt der „Bautrupp“ einzelne Einheiten alten Knochens und ersetzt diese durch neu synthetisierte proteinreiche Matrix. Die Auswahl der Stellen, die umgebaut werden, scheinen in einem meist zufälligen Muster aufzutreten. Man findet sie aber auch vermehrt an beanspruchten, reparaturbedürftigen Orten (Clarke 2008). Als Ergebnis dieses ganzen Prozesses wird am ausgewachsenen Menschen pro Jahr zirka 10% des gesamten Skelettes umgebaut. Innerhalb von 10 Jahren erneuert der Organismus sein komplettes Skelett (Schünke et al. 2007).



**Abb. 2: Darstellung eines „Bautrupps“ des Knochengewebes.**

Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Thieme Verlags, entnommen aus (Bartl 2014).

Die Steuerung dieses Prozesses geschieht vor Ort durch zelluläre Interaktionen, Zytokine (u.a. IGFs, Interleukine, BMPs, FGFs, Prostaglandine) und elektromagnetische Potenziale. Unterstützt werden sie durch den Einfluss von systemisch kommunizierenden Hormonen (Parathormon, Kalzitinin, Schilddrüsenhormone, Insulin, Wachstumshormon, Kortison, Sexualhormone, Leptin), Vitaminen (v.a. Vitamin D), lokalen Gewebefaktoren und zentralnervösen Faktoren wie  $\beta_2$ -adrenergen Fasern (Bartl et al. 2011). Einen der Schlüsselprozesse bildet das RANK-RANKL-Osteoprotegerin-System. Durch die

Zytokine RANKL (Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand) und Osteoprotegerin können Osteoblasten und Osteoklasten gegenseitig einander in ihrer Aktivität stimulieren oder hemmen. Osteoblasten und aktivierte T-Lymphozyten sezernieren RANKL, der an Osteoklasten an seinem Rezeptor RANK bindet. Dadurch wird die Reifung und das Überleben von Osteoklasten stimuliert und die Knochenresorption gesteigert. Osteoprotegerin wird auch von Osteoblasten produziert und wirkt als Gegenspieler zu RANKL. Es blockiert den RANK und hemmt damit die Knochenresorption. Der Wirkstoff Denosumab ist ein RANKL-Antikörper und wird in der Osteoporosetherapie eingesetzt (Bartl 2014).

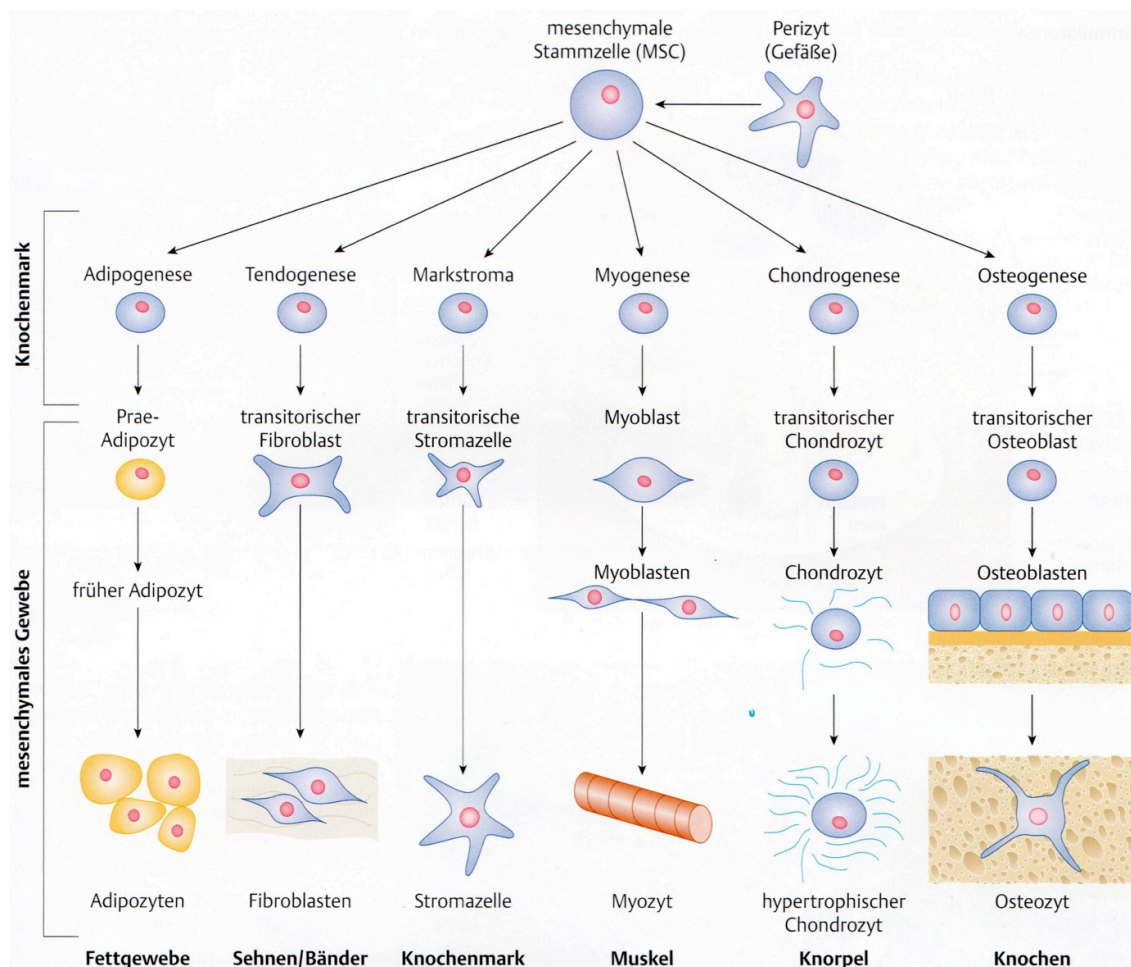
### **1.3. Zelltypen**

#### **1.3.1. MSC / HSC**

Die zellulären Vorgänger der Knochenzellen befinden sich im Knochenmark. Von dort werden sie rekrutiert und differenzieren sich in die entsprechenden Nachfolgezellen. Man unterscheidet zwei verschiedene Stammzelltypen: die mesenchymalen Stammzellen (MSC) und die hämatopoetischen Stammzellen (HSC). Als Stammzellen besitzen sie die Eigenschaften, sich sowohl selbst zu erneuern, als auch unterschiedliche Differenzierungsformen anzunehmen (Weissman 2000).

MSC können ihre Differenzierung in verschiedene Richtungen einschlagen, siehe Abb. 3. Am Ende der unterschiedlichen Differenzierungswege können somit ausgehend von den MSC Fett-, Sehnen-/Bänder-, Knochenmark-, Muskel- Knorpel- und Knochenzellen (zudem wohl auch Nervenzellen) entstehen (James 2013). In dieser Arbeit lag der Fokus auf dem osteogenen Differenzierungsweg.

Die HSC als zweite im Knochenmark anzutreffende Stammzellart, sind historisch gesehen die ersten überhaupt identifizierten Stammzellen (Becker et al. 1963). Sie sorgen für eine lebenslange Produktion von Blutzellen (Mikkola et al. 2006) inklusive der Monozyten, aus denen wiederum die für den Knochen wichtigen Osteoklasten hervorgehen (Bartl 2014).



**Abb. 3: Verschiedene Differenzierungsmöglichkeiten der mesenchymalen Stammzelle (MSC).**  
 Abdruck mit freundlicher Genehmigung des Thieme Verlags, entnommen aus (Bartl 2014).

### 1.3.2. Osteoblasten – knochenaufbauende Zellen

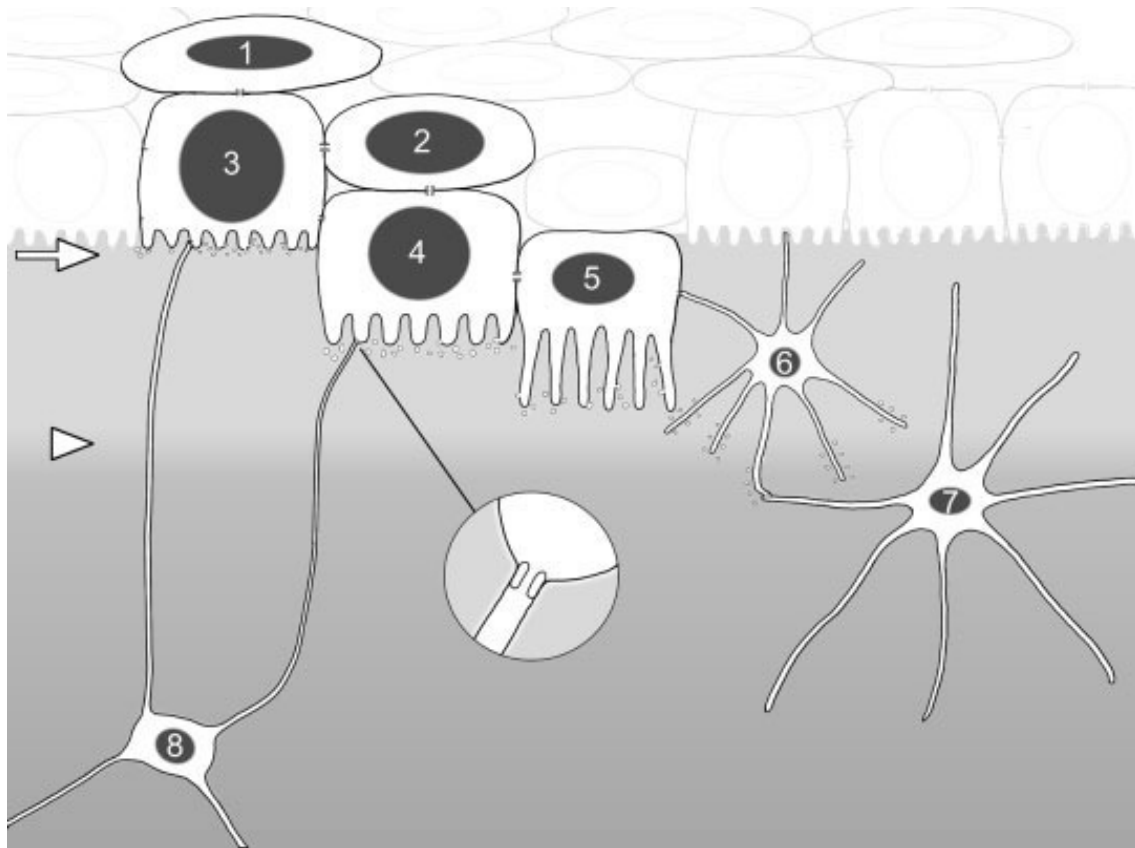
Osteoblasten sind die für den Aufbau neuer Knochenmatrix und Mineralisierung zuständigen Knochenzellen. Sie produzieren die Bestandteile des Osteoids wie zum Beispiel Kollagen Typ 1, Osteokalzin, Osteonektin und BMP. Durch folgende Hormone und Zytokine werden sie gesteuert: Insulin-like growth factors, Transforming growth factor- $\beta$ , Fibroblast growth factors, Platelet derived growth factors, BMPs und Prostaglandine. Aktivierend wirken zudem Fluoride, Statine, Strontium und Parathormon. Leptin und sympathische Nervenfasernaktivität hemmen die Knochenproduktion. Der Osteoblast stammt von der mesenchymalen Stammzelle ab und kann sich anschließend in Osteozyten weiter differenzieren,

eine Fehldifferenzierung zu Adipozyten entsteht vermehrt im Lauf des Lebens und kann zu Osteoporose beitragen (Bartl et al. 2011, Bartl 2014). An der Knochenoberfläche sitzen die Osteoblasten in würfelförmigen Formen auf. Die Zellmembran ist in Richtung der Knochenoberfläche polarisiert und bildet dort neue Knochensubstanz. Typischerweise exprimieren sie den Transkriptionsfaktor Runx2. Die Abgrenzungen und Definitionen der unterschiedlichen Differenzierungsformen sind noch nicht ausreichend identifiziert und verstanden, sodass man oft auch übergreifend von der „osteoblast lineage cell“ spricht und damit sowohl mesenchymale Vorgängerzellen, Präosteoblasten, Osteoblasten, Osteozyten und weitere Subspezies meint, siehe auch Abb. 4 (Long 2012).

### **1.3.3. Osteozyten – knochenüberwachende Zellen**

Osteozyten machen 90-95% aller Knochenzellen aus und sind damit der mit Abstand häufigste Zelltyp im Knochen. Sie können, im Gegensatz zu den meisten anderen Körperzellen, mehrere Dekaden leben und bilden ein lakunokanalikuläres Netzwerk aus (Bonewald et al. 2013). Auf dem Differenzierungsweg vom Osteoblasten hin zum reifen Osteozyten findet eine Transformation statt. Franz-Odenaal et al. teilen diesem Verlauf acht verschiedene Entwicklungsstadien zu (Franz-Odenaal et al. 2006).

In diesem Prozess beginnt die zuerst würfelförmige Osteoblastenzelle Dendriten auszubilden. Anfangs werden diese nur zur mineralisierenden Front gerichtet. Die später in den Knochen „eingebettete“ Zelle richtet die Dendriten nun auch zur Knochenoberfläche und zum Gefäßsystem und hat zwei Hauptaufgaben: sie reguliert die Mineralisierung und bildet neue dendritische Verbindungen aus (Bonewald 2011).



**Abb. 4: Osteoblasten-Osteozyten-Transformation.**

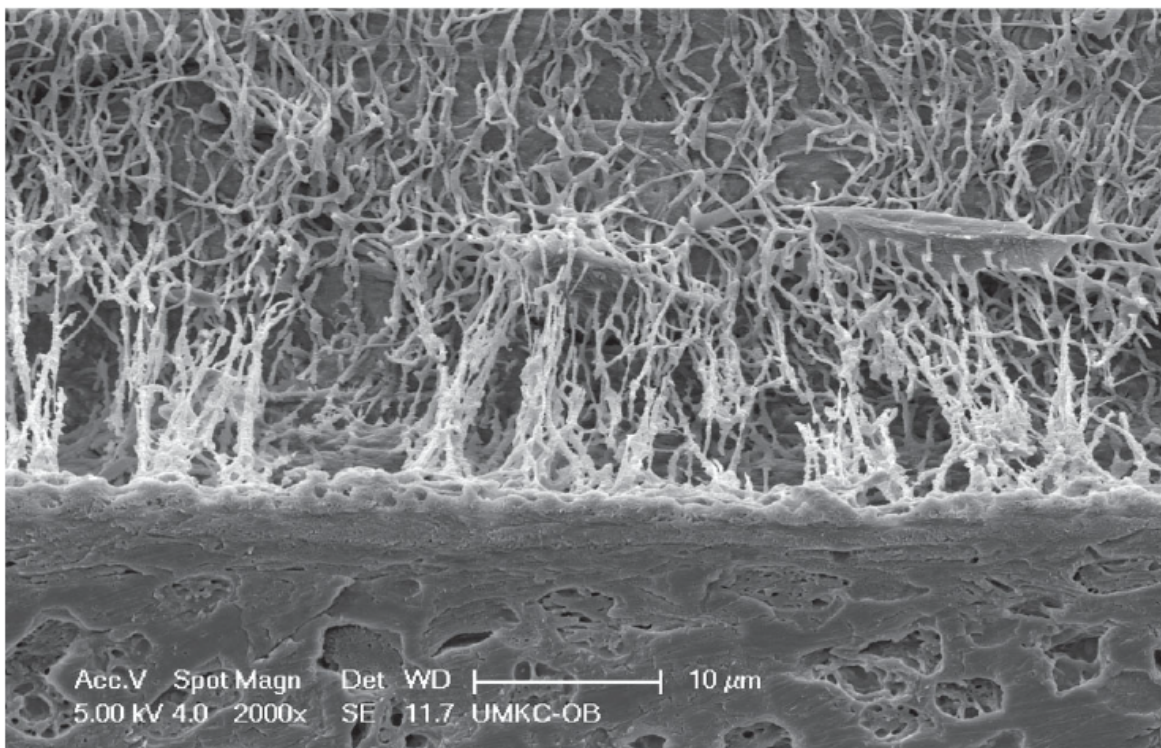
1. Präosteoblast, 2. Präosteoblastischer Osteoblast, 3. Osteoblast, 4. Osteoblastischer Osteozyt (Typ-I-Präosteozyt), 5. Osteoid-Osteozyt (Typ-II-Präosteozyt), 6. Typ-III-Präosteozyt, 7. Junger Osteozyt, 8. Alter Osteozyt

Die Vergrößerung zeigt eine Gap Junction in ihrer Entwicklung zwischen dem Osteozyten und dem einbettenden Osteoblasten. Der Pfeil zeigt auf die Osteoidablagerungsfront. Der Pfeilkopf auf die Mineralisierungsfront.

Abdruck mit freundlicher Genehmigung des John Wiley and Sons Verlags, entnommen aus (Franz-Odendaal et al. 2006).

Im Differenzierungsprozess vom Osteoblast zum Osteozyten ändert sich die Expression einiger Marker. Alkalische Phosphatase wird im Verlauf weniger exprimiert, Casein Kinase II und Osteocalcin erhöht. Einige Marker kommen neu hinzu: PHEX, MEPE und DMP-1, FGF23, SOST und Oxygen regulated protein 150 – letzteres vermutlich ein Protektor gegen Hypoxie. Erstaunlicherweise werden auch Osteoklastenmarker exprimiert, wie die Saure Phosphatase und Cathepsin K (Ruchon et al. 2000, Toyosawa et al. 2001, Fisher et al. 2003, Poole et al. 2005, Feng et al. 2006, Bonewald 2011).

Der eingebettete Osteozyt knüpft ein extensives Netzwerk mit Zellfortsätzen, die Dendriten oder Canaliculi genannt werden und sich in kleinen Knochenporen befinden. Durch Gap Junctions verbinden sich die Dendriten mit anderen Zelldendriten und Blutgefäßen (Civitelli 2008). Es entsteht ein funktionales Synzytium in einem gigantischen Zellverband, der über Flüssigkeitsströme miteinander in Kontakt steht (Bonewald 2011). Schätzungen gehen davon aus, dass in einem durchschnittlichen Skelett eines erwachsenen Menschen ca. 42 Milliarden Osteozyten durch eine Gesamtzahl von  $23 \times 10^{12}$  (23 Billionen) Dendriten untereinander und mit Knochenoberflächenzellen vernetzt werden. Die Gesamtlänge der Osteozytenfortsätze beträgt dabei zirka 175 000 km und besitzt eine totale Oberfläche von 250 km<sup>2</sup> (Buenzli et al. 2015).



**Abb. 5: Osteozytenlakunen mit zur Knochenoberfläche zeigenden Canaliculi.**

Säuregeätzte und in Harz eingebettete Probe aus murinem Knochen. Abdruck mit freundlicher Genehmigung des John Wiley and Sons Verlags, entnommen aus (Bonewald 2011).

In der Vernetzung der Dendriten von elementarer Bedeutung ist das Protein Connexin 43. Sechs Connexinmonomere bilden einen Hemikanal, das Connexon, durch welches nicht nur Kationen, sondern auch Substanzen bis zu einer Größe von 1 kDa, wie z.B. ATP oder Signalmoleküle wie Eicosanoide, verkehren können (Stauber et al. 2013). Es besteht in diesem Netzwerk ein Flüssigkeitsstrom, der

eine Scherbeanspruchung erzeugt. Zilien an den Osteozytenfortsätzen, eine intakte Glykokalyx und ein komplexes Strukturnetzwerk (u.a. Aktinfilamente, Integrine und Verbindungselemente mit der perizellulären Matrix, sog. „Tethering elements“) erkennen diesen Strom und setzen ihn in zelluläre Signale um. Verbindungen mit der arteriovenösen Endstrombahn ermöglichen zudem einen Austausch von Mineralien (Jakob et al. 2013, Goggin et al. 2016). Dieses Osteozytennetzwerk bildet im menschlichen Organismus somit einen Sensor für die mechanische Beanspruchung des Knochens (Buenzli et al. 2015). Der Bedarf des Knochens an „Baumaterial“ wie Calcium und Phosphat kann mittels Signalproteinen wie FGF23 dem Organismus gemeldet werden (Bonewald 2011). Lokale Schwachstellen und Mikrodefekte können detektiert und entsprechend repariert werden (Bartl et al. 2011). Mit Hilfe der Osteozyten und ihres Netzwerkes ist der Knochen ein höchst dynamisches und anpassungsfähiges Organ, das im physiologischen Zustand seine aktuelle Beanspruchung stets mit dem erforderlichen Bestand an Knochendichte synchronisiert und seine Stabilität aufrechterhält.

Es konnte gezeigt werden, dass sich bei systemischen Krankheiten das Dendritennetzwerk verändert. So verändert sich in Mausmodellen mit fettinduziertem Diabetes Mellitus Typ 2 die Anordnung des Dendritennetzwerkes. Dies stellt vermutlich einen Faktor für die bei Diabetes beobachtete erhöhte Knochenbruchrate dar (Mabilleau et al. 2016). Im Alter und bei Osteoporose nimmt die Gesamtzahl der Osteozyten ab (Goggin et al. 2016).

#### **1.3.4. Osteoklasten – knochenabbauende Zellen**

Osteoklasten gehen aus HSC hervor, also Zellen der Hämatopoese, die im Knochenmark beherbergt sind. Sie sind mehrkernige Riesenzellen, zuständig für die Mobilisierung der organischen und anorganischen Materialien des Knochens. Mit einer stark gefalteten Zellmembran liegen sie der Knochenoberfläche auf und sezernieren proteolytische Enzyme und Salzsäure, um Hydroxylapatit und Knochenmatrix abzubauen und dem Organismus Calcium aus dem riesengroßen Speicher des Knochens bereitzustellen. Die Quantität des Abbaus durch Osteoklasten wird durch deren Anzahl und die Abbaukapazitäten der einzelnen



Zellen bestimmt. Dabei spielen Hormone und Zytokine eine Rolle, unter anderem PTH, Östrogen, Leptin, Thyroxin, Wachstumshormone, sowie RANKL und CSF-1. Die zwei Letztgenannten sind wichtige Angriffspunkte in der Osteoporose-Therapie, nämlich die Bisphosphonate und der RANKL-Antikörper Denosumab. Sie unterdrücken die Knochenresorption letztendlich durch ein Herabsetzen der Zahl von Osteoklasten. Die so herbeigeführte Abwesenheit von Osteoklasten erzeugt allerdings auch nachteilige Effekte, da sie, wie schon in Abschnitt 1.2.2 beschrieben, eine wichtige physiologische Rolle im Remodeling spielen. Studien mit Wirkstoffen, die primär die Osteoklastenfunktion und nicht deren Zahl verändern – wie z.B. der Cathepsin-K-Inhibitor Odanacatib - bergen die Hoffnung, die Osteoblastenfunktion und die Knochenformation nicht zu stark zu beeinträchtigen und die Osteoporose-Therapie damit effektiver als mit den herkömmlichen Mitteln zu behandeln (Leung et al. 2011, Bartl 2014, Teitelbaum 2016).

#### 1.4. Molekulare Regulationsmechanismen durch FGF23, Klotho, PHEX und die SIBLINGs

Einen unverzichtbaren Bestandteil für die Kommunikation des Osteozyten mit seinen Partnerzellen sind Proteine, die von ihm selbst gebildet und an unterschiedlichen Zielorten mit anderen Zellen wechselwirken: FGF23, Klotho, PHEX und die sogenannte SIBLING-Familie (Small Integrin-Binding Ligand N-Linked Glycoproteins, dazu gehören unter anderem DMP1 und MEPE).

Phyla/Class	Timeline million years	PHEX	KLOTHO	FGF23	SIBLINGs
Unicellular eukaryotes	2000				
Round worms	600	PHEX	Klotho		
Marine chordates	550				
Insects	400				
Boney Fish	500				FGF23
Amphibia	360				
Terrestrial vertebrates	300				SIBLINGs

**Abb. 6: Zeitliches Schema zur Evolution der Schlüsselspieler in der vertebralen Knochenmineralisierungshomöostase.**

PHEX und Klotho tauchten vor ca. 600 Mio. Jahren auf, gefolgt von FGF23 vor 500 Mio. und den SIBLINGs vor 300 Mio. Jahren.

Zu den SIBLINGs zählen: MEPE, DMP1, OPN, DSPP, BSP, Statherin

Abdruck mit freundlicher Genehmigung des John Wiley and Sons Verlags, entnommen aus (Rowe 2012).

Im evolutionären Kontext tauchen zuerst PHEX und Klotho vor 600 Mio Jahren bei den Spulwürmern auf, erst später folgt FGF23 in den Knochenfischen. Die im Wasser lebenden Knochenfische besitzen noch keine Osteozyten, sodass sich die physiologische Knochen-Nieren-Achse wohl erst festigte, als sich das Leben vor ca. 300 Mio. Jahren von den Ozeanen aufs Land begab und sich an die Trockenheit und die höhere Gravitationskraft in terrestrischer Umgebung anpassen musste. Gleichzeitig wurde mit den SIBLINGs eine Gruppe von Proteinen geschaffen, die das Zusammenspiel ergänzen und verfeinern sollten (Rowe 2012). Der Fokus in dieser Arbeit bleibt dabei auf Klotho und FGF23.

#### **1.4.1. PHEX**

Die Abkürzung des Gens und dessen gleichnamigen Proteins bzw. Enzyms PHEX, erstmals beschrieben 1995 (HYP-Consortium 1995), bedeutet direkt übersetzt „Phosphat regulierendes Gen mit Homologien zu den auf dem X-Chromosom lokalisierten Endopeptidasen“. PHEX ist eine Zink-Metalloendopeptidase, die in der Plasmamembran verankert ist und seine aktive Bindungsstelle extrazellulär hat. PHEX reguliert die Expression und/oder die Stabilität von FGF23. Aus einem Verlust der PHEX-Aktivität resultiert ein Anstieg der FGF23-Expression (Rowe 2012).

Durch loss-of-function Mutationen im PHEX-Gen kommt es zur X-chromosomalen Hypophosphatämie, der häufigsten Form familiärer hypophosphatämischer Rachitis mit charakteristisch erniedrigten Phosphatserumwerten und erhöhter renaler Phosphatausscheidung mit niedrigen oder normalen 1,25-Dihydroxvitamin-D Konzentrationen. Dies führt zu erniedrigter Körpergröße, Knochenschmerzen, Zahnanomalien, Abnormalitäten der unteren Extremitäten und radiologisch nachweisbarer Rachitis bei Kindern. PHEX wird vorwiegend in Knochen (Osteoblasten und -zyten) und Zähnen gebildet (Cheon et al. 2014).

### 1.4.2. Klotho



**Abb. 7: Klotho**

*The Triumph of Death, or The 3 Fates. Flämischer Wandteppich (wahrscheinlich Brüssel, ca. 1510-1520). Victoria and Albert Museum, London.*

Klotho ist dargestellt als die rechte der drei Töchter von Zeus und Themis. Sie spinnt den Lebensfaden. In der Mitte Lachesis, die durch Abmessen die Länge des Lebensfadens festlegt und links Athropos, die den Faden abschneidet, um das Leben zu Ende zu bringen.

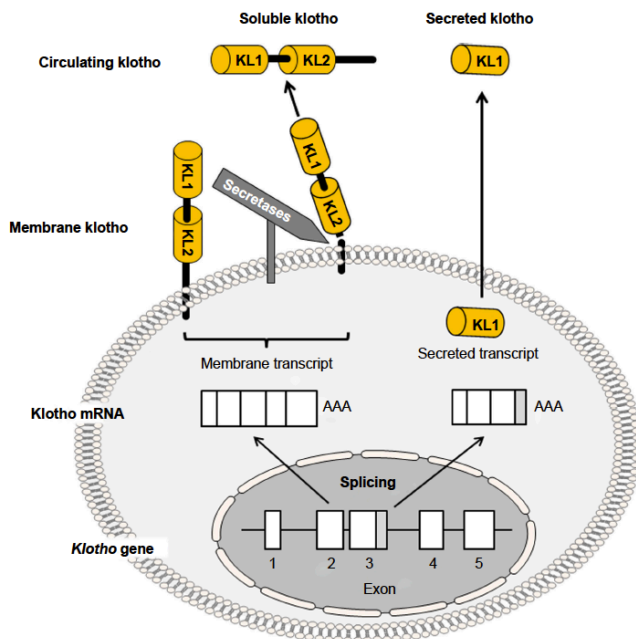
(Abdruck entnommen aus den Wikimedia Commons – gemeinfreie Nutzung)

Klotho ist etymologisch gesehen der griechischen, den Lebensfaden spinnenden Schicksalsgöttin entlehnt. Es reguliert Signaltransduktionswege, die den Alterungsprozess beeinflussen. Der Knockout des Klotho-Gens in Mäusen verursacht unter anderem eine verkürzte Lebensdauer, Infertilität, Arteriosklerose, Hautatrophie, Osteoporose und Lungenemphyseme (Kuro-o et al. 1997). Eine Überexpression im Gegenzug resultiert in längerer Lebensdauer und besserer Kognition (Kurosu et al. 2005, Dubal et al. 2014).

Neben dem ursprünglich entdeckten Klotho wurden zwei weitere, ähnlich aufgebaute Proteine namens  $\beta$ - und  $\gamma$ -Klotho beschrieben. Das ursprüngliche Klotho wurde daraufhin  $\alpha$ -Klotho genannt. Der Einfachheit dienend wird in der Literatur und dieser Arbeit  $\alpha$ -Klotho weiterhin als Klotho bezeichnet (Ito et al. 2000, Ito et al. 2002).

Drei Isoformen von Klotho sind beschrieben: membranständig (membrane), löslich (soluble) und sekretiert (secreted). Die membranständige Form wird vom Klotho-Gen auf Chromosom 13q12 kodiert. Das Protein aus 1012 Aminosäuren besteht aus einer N-terminalen Signalsequenz, zwei als KL1 und KL2 bezeichneten extrazellulären Domänen mit Glycosylhydrolase-1-Aktivität, einer Transmembranhelixdomäne und einer kurzen C-terminalen intrazellulären Domäne. Die lösliche Form entsteht durch Abspaltung der extrazellulären Domänen, vermittelt durch membranverankerte Metalloproteinasen wie ADAM10 und ADAM17. Es können dabei je nach Prozessierungsstelle ( $\alpha$ - oder  $\beta$ -cut) zwei verschieden große Pro-

dukte entstehen (130 oder 65 kDa), die in Blut, Urin oder Liquor zirkulieren, denn durch den  $\beta$ -cut können auch die Domänen KL1 und KL2 getrennt werden. Die dritte, sekretierte Klotho-Form entsteht durch alternatives Splicing der Klotho-mRNA und wird sekretiert (Chen et al. 2007, Bian et al. 2015). Sie besteht aus einem Protein von 549 Aminosäuren mit ca. 70 kDa, das der KL1-Domäne entspricht, sich aber in den C-terminalen 15 Aminosäuren unterscheidet.



**Abb. 8: Klotho Isoformen**  
 „Membranständiges Klotho“ geht aus dem Klotho-Gen hervor. „Sekretiertes Klotho“ entsteht durch alternatives Splicing in Exon 3. Die zwei Ektodomänen KL1 und KL2 werden durch Sekretasen vom transmembranen Teil des membranständigen Klothos abgespalten und ins Blut als „lösliches Klotho“ abgegeben. Dadurch entstehen zwei verschiedene Formen von Klotho im Blutkreislauf.  
 Abdruck mit freundlicher Genehmigung des DOVE MEDICAL PRESS LTD, entnommen aus (Bian et al. 2015).

Klotho wird vor allem im distalen Konvolut der Niere und im Gehirn gebildet. Geringere Anteile exprimieren Zellen folgender Organe: Plexus choroideus, Hypophyse, Gonaden, Harnblase, Skelettmuskel, Darm, Plazenta, Schilddrüse und Innenohr (Kuro-o et al. 1997, Kato et al. 2000, Kamemori M. et al. 2002, Ben-Dov et al. 2007). Membranständiges Klotho fungiert als Korezeptor zu FGF23. Die geringe Rezeptoraffinität von FGF23 zu seinem Rezeptor wird erst durch Kofaktoren wie Heparin und Klotho erhöht indem es den FGFR1c-Rezeptor in einen für FGF23 spezifischen Rezeptor verwandelt (Kurosu et al. 2006, Urakawa et al. 2006).

Klotho gerät durch seine vielseitigen, oft noch nicht gänzlich verstandenen Funktionen zunehmend in das Interesse unterschiedlicher Fachdisziplinen. Einige der wichtigsten Erkenntnisse werden im Folgenden dargestellt. Zu bemerken ist, dass in der Literatur meist nicht unterschieden wird, ob es sich bei dem zirkulierenden Klotho um eine prozessierte Domäne der ursprünglich

membranständigen Variante handelt oder um die durch alternatives Splicing entstandene sekretierte Form. Allerdings wird in der neueren Literatur angezweifelt ob die sezernierte Variante beim Menschen überhaupt eine bedeutende Rolle spielt (Erben 2018, Kuro 2018, Kuro 2019). Möglicherweise wird die mRNA für das alternativ gespleisste Transkript schnell degradiert und nicht in ein Protein übersetzt. Weiterführende Arbeiten in der Arbeitsgruppe in der Orthopädie konnten ein Produkt gentechnisch erzeugen. Der Nachweis in verschiedenen Zellsystemen ist derzeit aber eher inkonsistent.

Klotho besitzt „anti-aging“-Effekte. Es schützt u.a. vor oxidativem Stress (Yamamoto et al. 2005), inhibiert Insulin-like growth factor-1/Insulin-Signalwege, wodurch der Insulinmetabolismus positiv beeinflusst wird (Tatar et al. 2003, Kurosu et al. 2005), antagonisiert Wnt-Signalwege (Liu et al. 2007) und verzögert das Altern von Zellen und Stammzellen (Bian et al. 2015).

Klotho wirkt präventiv gegen kardiovaskuläre Erkrankungen. Niedrige Klotho-Plasmaspiegel erhöhen das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen. Neben mehreren anderen positiven Effekten auf das Endothel wird dort zum Beispiel die Aufrechterhaltung der NO-Produktion unterstützt – NO stellt einen wesentlichen Faktor im physiologischen System des Endothels dar (Saito et al. 1998, Ikushima et al. 2006). Die Plasmaspiegel von Klotho korrelieren positiv mit denen des „guten“ Cholesterins HDL und negativ mit dem Entzündungswert CRP sowie dem Alter (Semba et al. 2011). Klotho wirkt zudem antiinflammatorisch, verhindert vaskuläre Verkalkung und Herzhypertrophie (Martin-Nunez et al. 2014).

Die Reihe der bisher bekannten Calciumhomöostase-Mediatoren - PTH, der Calciumrezeptor, Calcitonin und  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  - werden um Klotho als weiteren Schlüsselspieler in der engmaschigen Aufrechterhaltung normaler Calciumplasmawerte erweitert. Calcium besitzt wichtige Funktionen im Organismus des Menschen: in der Zellkommunikation, der neuronalen Informationsübertragung, Muskelfunktion, Blutgerinnung, als enzymatischer Kofaktor, es nimmt wichtige Funktionen in der Membran, im Zytoskelett, in der Sekretion und in der Biomineralisation ein (Shaker et al. 2000). Je stärker die Hypokalzämie, desto mehr  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasen}$  werden Klotho-vermittelt in die

Zellmembran eingebaut, der Natriumgradient wird erhöht. Im Plexus chorioideus kommt es dadurch zu einem Calciumtransport in den Liquor. In der Niere wird die Calciumreabsorption erhöht. In der Nebenniere wird die PTH-Ausschüttung erhöht und PTH ermöglicht eine renale Calciumreabsorption und eine Resorption aus dem Knochen. Zudem entfernt Klotho terminale Sialinsäuren von luminal gelegenen TRPV5 Kanälen in den Epithelzellen der Niere, stabilisiert diese auf der Zelloberfläche und erhöht folglich die Calciumreabsorption (Cha et al. 2008, Nabeshima et al. 2008, Nabeshima 2009, Pavlatou et al. 2016).

Die Einflüsse auf die Phosphathomöostase geschehen FGF23-abhängig und sind in Abschnitt 1.4.3 weiter erläutert.

Klotho spielt in der Niereninsuffizienz eine Rolle und wirkt renoprotektiv. In Zuständen akuter und chronischer Niereninsuffizienz herrscht systemischer Klotho-Mangel. Erniedrigte Serum-Klotho-Spiegel und erhöhte Serum-FGF23-Spiegel gelten als frühe Marker der chronischen Niereninsuffizienz und als Risikofaktoren für kardiovaskuläre Pathologien. Niedrige Serumspiegel löslichen Klothos korrelieren mit dem Auftreten und dem Schweregrad kardiovaskulärer Ereignisse, hohe Spiegel reduzieren dieses Risiko. Klotho-Mangel reduziert das extrazelluläre Volumen durch die Reduktion von Na-K-2Cl-Cotransportern in der Henle'schen Schleife, was erhöhte ADH und Aldosteron-Ausschüttungen bewirkt (Fischer et al. 2010). Medikamentöse Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems zum Beispiel mittels eines ACE-Hemmers erhöht vermutlich wieder die Klotho-Spiegel (Hu et al. 2010, Hu et al. 2011, de Seigneux et al. 2016).

Klotho wirkt tumorprotektiv. Es sind zunehmend Hinweise für den Einfluss auf Tumoren wie bei Brustkrebs beschrieben. Dies geschieht auf epigenetischer Ebene durch Veränderungen der DNA-Methylierung und folglich veränderter Aktivität von Tumorsuppressorgenen. Zudem ist hierbei die Bedeutung Klothos als Wnt-Antagonist hervorzuheben - die Wnt-Signalwege sind bereits bekannt für ihre Rolle in der Carcinogenese (Liu et al. 2007, Perez-Plasencia et al. 2008, Wolf et al. 2008, Lee et al. 2010, Pan et al. 2011, Wang et al. 2011, Satoh et al. 2012, Pavlatou et al. 2016).

Klotho hat zudem Einflüsse im zentralen Nervensystem (ZNS). Zwei Studien sollen hierbei exemplarisch herausgegriffen werden: In einer longitudinalen

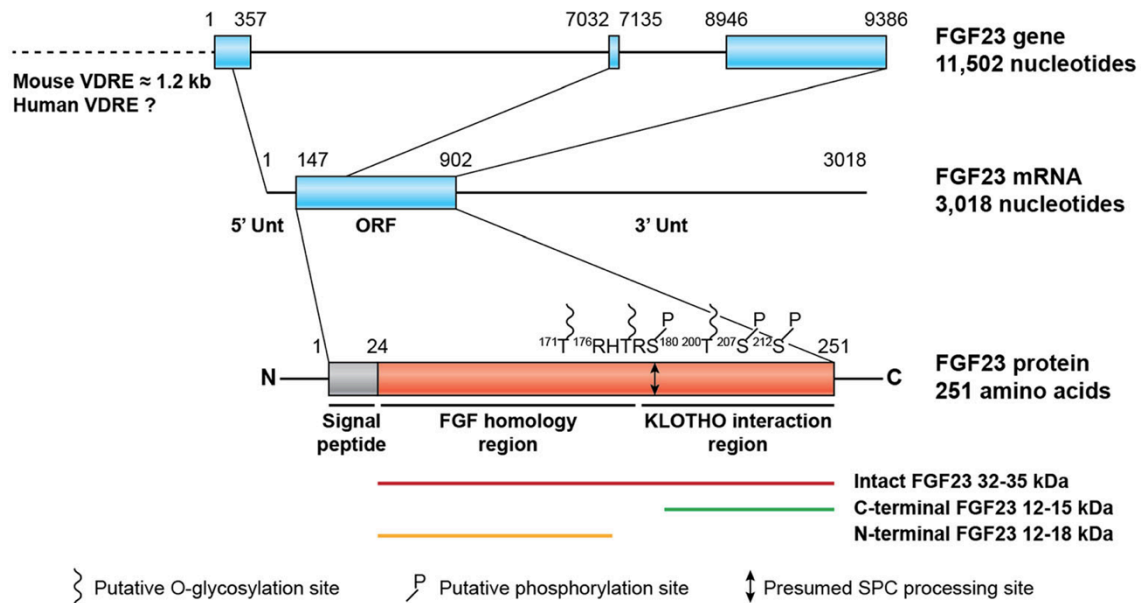
bevölkerungsbezogenen Studie mit 804 Patienten im Alter von 65 Jahren und aufwärts aus der Toskana (Italien) wurden drei Gruppen nach Höhe der Serum-Klothowerte gebildet. In der Gruppe mit den niedrigsten Klothowerten wurden im Vergleich signifikant schlechtere kognitive Werte im Mini Mental State-Test mit einem Score von unter 24 festgestellt. Zudem scheint Klotho ein unabhängiger Prädiktor für die Gesamtmortalität zu sein (Semba et al. 2011).

In einer Studie mit Mäusen, denen man peripher das Klotho-Fragment  $\alpha$ KL-F verabreichte - welches ähnlich seiner löslichen Form aufgebaut ist - induzierte man kognitive Verbesserungen und neuronale Resilienz, obwohl dieses Protein die Blut-Hirn-Schranke nicht überqueren kann. Es zeigte sich, dass die Therapie das Abspalten der NMDAR Untereinheit GluN2B erhöhte und die NMDAR-abhängige synaptische Plastizität verbesserte. Somit scheint sich hier ein mögliches neues Antidementivum herauszukristallisieren (Leon et al. 2017).

### **1.4.3. FGF23**

FGF23 ist ein Mitglied der Fibroblast Growth Factor Familie. Es wirkt als phosphaturisches Hormon, das zusammen mit PTH und  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin D<sub>3</sub> die Phosphathomöostase aufrechterhält. Dem Osteozyten in seinem lacunocanaliculären Netzwerk dient es als endokriner Faktor, der entfernten Organen wie der Niere den Bedarf des Knochen an Mineralien wie Phosphat rückmeldet (Bonewald 2011).

Die Erstbeschreibung von FGF23 erfolgte im Jahre 2000 in Zellen des venterolateralen Thalamuskerns (Yamashita et al. 2000). Seine Hauptproduktion findet im Knochen in Osteozyten und Osteoblasten statt (Liu et al. 2007, Yoshiko et al. 2007). Weitere FGF23-exprimierende Zellen sind Zementoblasten, Odontoblasten und Chondrozyten, sowie Zellen der Speicheldrüsen, Magen, Skelettmuskel, der weibliche Brustdrüsen, Leber und Herz (ADHR-Consortium 2000, Shimada et al. 2001, Riminucci et al. 2003, Weber et al. 2003, Shimada et al. 2004, Yoshiko et al. 2007).



**Abb. 9 Struktur des humanen FGF23 im Gen, mRNA und als Protein.**

Es gibt drei Exons innerhalb des FGF23 Gens auf Chromosom 12p13. Dieses kodiert für ein 32-kDa großes Glykoprotein, bestehend aus 251 Aminosäuren. Das sekretorische Hormon besitzt eine 24 Aminosäuren große, hydrophobe Signalsequenz. Die C-terminale Region interagiert mit Klotho und kann trunkiert und somit inaktiviert werden. Abdruck mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature, entnommen aus (Blau et al. 2015).

Das Protein FGF23 ist aus 251 Aminosäuren aufgebaut und teilt mit den anderen Fibroblast Growth Factors eine hoch konservierte Sequenz, spezifisch sind hingegen seine C-terminale Struktur und seine dreidimensionale Konfiguration (Yamashita 2005, Fukumoto et al. 2007). Die FGF23-Aminosäuresequenzen von Ratte und Maus sind zu 72 bzw. 71 % homolog zum humanen FGF23 (Blau et al. 2015). Es gibt zwei Formen zirkulierenden FGF23: intaktes, biologisch aktives FGF23 und die inaktive, C-terminal trunkierte Form (Bonewald et al. 2013).

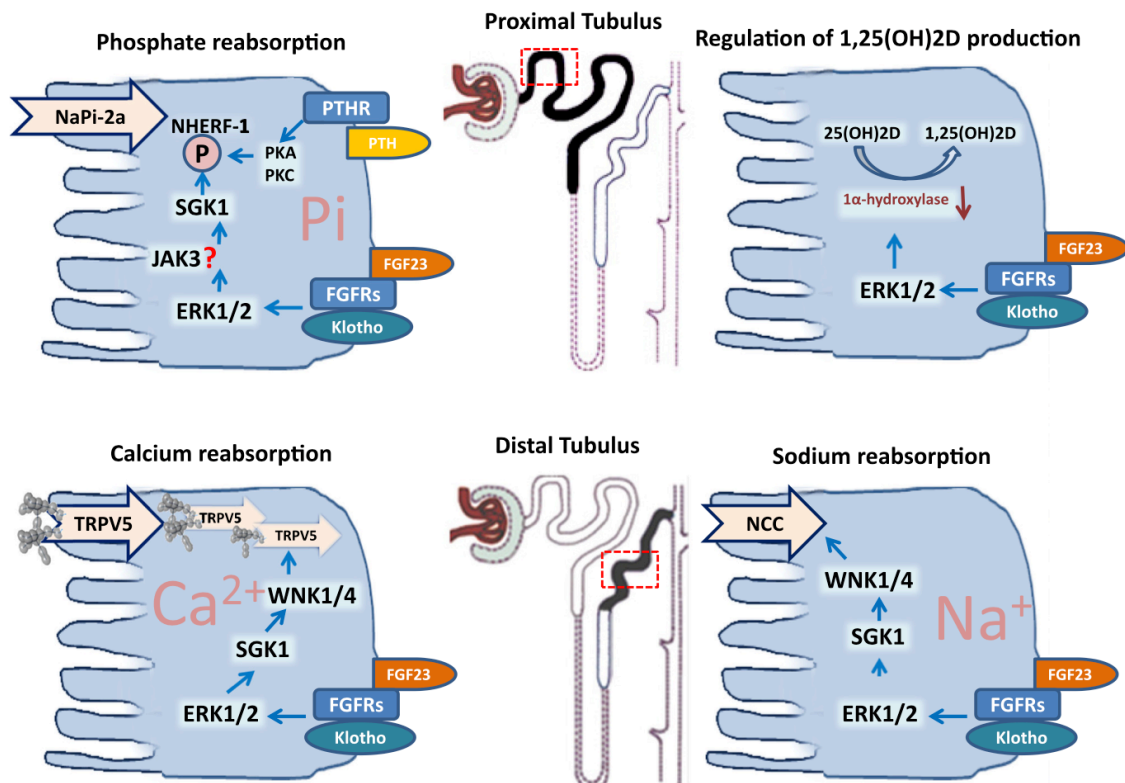
Die Rezeptoren an denen FGF23 bindet, sind die drei Subtypen 1, 3 und 4 des FGFR Rezeptors (FGFR), von denen der FGFR Subtyp 1 (IIIc) die wohl wichtigste Rolle spielt (Gattineni et al. 2008, Gattineni et al. 2011, Gattineni et al. 2014). Urakawa et al. entdeckten, dass der primär relativ unspezifische FGFR1-Rezeptor erst mit Hilfe des Korezeptors Klotho zum spezifischen Rezeptor für FGF23 wird und durch Heparin stabilisiert wird (Urakawa et al. 2006).

Als wichtiges Steuerelement der Phosphathomöostase verringert FGF23 die Konzentration des anorganischen Phosphats und 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> im Serum.



Phosphat nimmt im Körper wichtige biologische Funktionen ein, unter anderem in intrazellulären Signalwegen, enzymatischen Reaktionen, im Energiemetabolismus und als Bestandteil in Phosphoproteinen, Phospholipiden, Nukleinsäuren und dem knöchernen Hydroxylapatit (Shaker et al. 2000, Blau et al. 2015).

FGF23 agiert unabhängig mit zwei unterschiedlichen Effekten an den proximalen und den distalen Nierentubuli. Im Konkreten ist die Signalkaskade, die der FGF23/Klotho/FGFR-Rezeptorkomplex auslöst, folgendermaßen aufgebaut: Zirkulierendes FGF23 bildet zusammen mit Klotho und dem FGF-Rezeptor den Rezeptorkomplex, der die nachfolgende ERK1/2-Signalkaskade aktiviert. SGK1 (Serum/Glucocorticoid-regulated kinase-1) phosphoryliert NHERF (Na/H exchange regulatory cofactor), was zur Internalisierung und Degradierung des Natrium-Phosphat-Cotransporters führt. Diese Phosphorylierung des NHERF kann dabei ebenfalls über PTH, den PTH-Rezeptor und die Proteinkinasen A und C erfolgen. In den proximalen Nierentubuli verringert FGF23 die Transkription, Translation und Translokation der Natrium-Phosphat-Cotransporter NaPi 2a und 2c. Dies führt zu niedrigerer Phosphatreabsorption aus dem Urin, erhöhter Phosphatausscheidung und somit niedrigeren Serum-Phosphatwerten. Über einen alternativen, noch unbekanntem ERK1/2-Weg wird die Expression des Enzyms 1- $\alpha$ -Hydroxylase gehemmt. Dies verringert die Synthese von aktivem 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin-D<sub>3</sub> und hemmt die Phosphatabsorption in Darm und Knochen. In den distalen Nierentubuli wird über denselben Rezeptorkomplex und die Signalkaskade ERK1/2 und SGK1 der WNK1/4-Komplexes aktiviert, welcher die Anwesenheit glykosylierter TRPV5 und NCC-Proteine erhöht und damit die tubuläre Natrium- und Calciumreabsorption steigert (Shimada et al. 2004, Berndt et al. 2007, Erben et al. 2016).

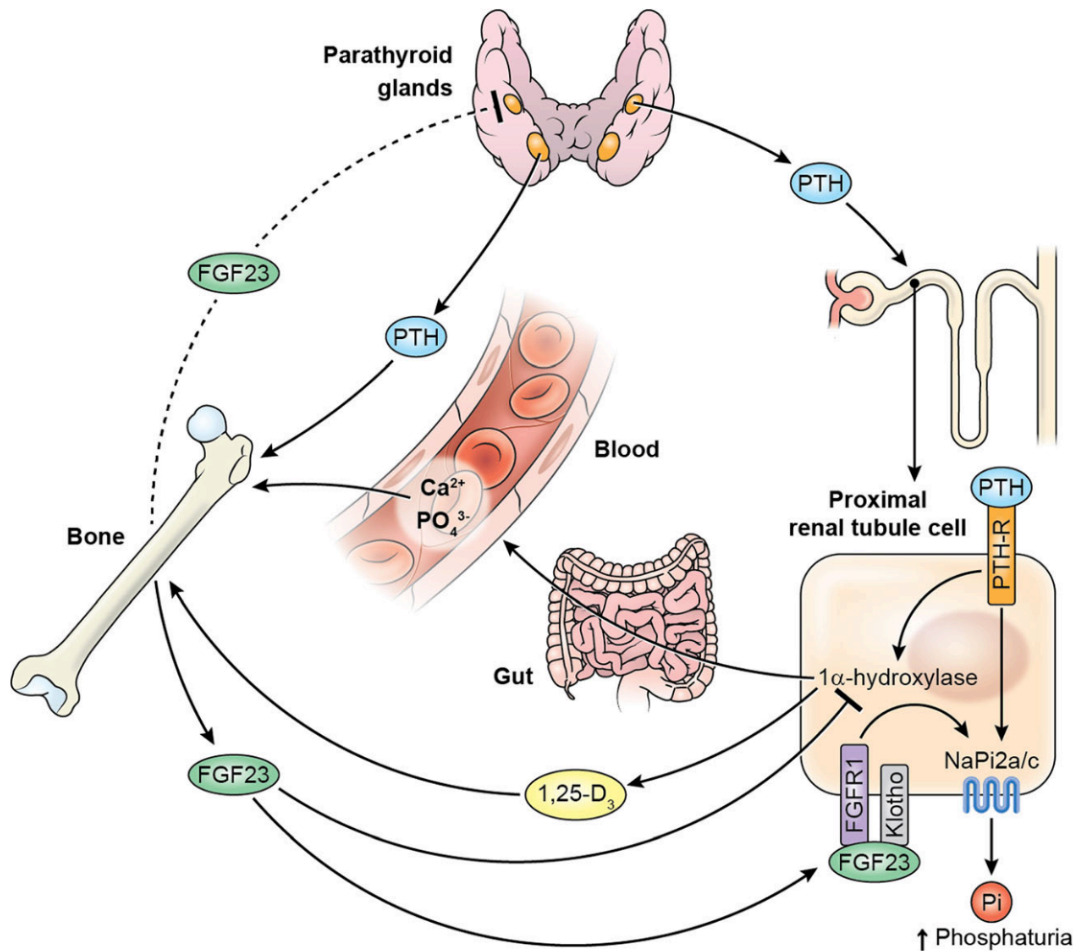


**Abb. 10 FGF23-Klotho Signalwege in der Niere.** In proximalen Nierentubuli bindet FGF23 an den Rezeptorkomplex mit Klotho und FGFR und aktiviert eine Signalkaskade mit ERK1/2 und SGK1. SGK1 phosphoryliert NHERF-1 und sorgt somit für eine Internalisierung und Degradation von NaPi-2a und somit zu erhöhter renaler Phosphatausscheidung. Alternativ kann die NHERF-1-Phosphorylierung auch über PTH (PTHR -> PKA, PKC) geschehen. Die genaue Signalkaskade nach ERK1/2, die zur Hemmung der 1- $\alpha$ -Hydroxylase führt, ist noch unbekannt. In den distalen Tubuli folgt nach SGK1 die Aktivierung des WNK1/4-Komplexes und damit Erhöhung der luminalen Membrananwesenheit von glykolysiertem TRPV5 und NCC. Dies erhöht die tubuläre Calcium- und Natriumreabsorption. Abdruck gehemigungsfrei durch die Creative-Commons Attribution 4.0 International License, entnommen aus (Erben et al. 2016).

#### 1.4.4. Physiologische Mechanismen und Pathologien zwischen FGF23, PTH und Vitamin D

Das Verhältnis von FGF23 und PTH ist relativ komplex. In Tier- und *in vitro*-Modellen verringert FGF23 Klotho-abhängig die PTH-Expression und -Sekretion. In klinischen Studien sind die Beweise allerdings trotz der Belege von Klotho-Expression in der Nebenschilddrüse noch lange nicht so eindeutig (Blau et al. 2015). In einem Fallbeispiel einer Patientin mit homozygoter Klotho Missense-Mutation, die sich klinisch mit Hyperparathyroidismus präsentiert, wird dies

pathophysiologisch mit einem möglichen fehlenden PTH-inhibitorischen Effekt von FGF23 begründet (Ichikawa et al. 2007).



**Abb. 11: Die PTH-Vitamin D-FGF23-Achse.**

FGF23 wird vom Knochen sezerniert und erzeugt wie PTH über NaPi 2a/c-Cotransporter eine Phosphaturie. Bezüglich der  $1\alpha$ -Hydroxylase wirkt PTH induzierend, FGF23 allerdings hemmend. Das durch die  $1\alpha$ -Hydroxylase aktivierte 1,25-Vitamin-D erhöht das Serum-Calcium und -Phosphat durch erhöhte enterale Resorption und es unterstützt die Knochenmineralisation. Die Effekte von FGF23 auf die Nebenschilddrüse sind noch nicht abschließend erforscht. Abdruck mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature, entnommen aus (Blau et al. 2015).

In einem Patienten mit einer Translokation, die in erhöhter Klotho-Produktion resultiert, zeigte sich jedoch auch eine erhöhte PTH-Sekretion, was vermuten lässt, dass FGF23 ebenso die PTH-Sekretion Klotho-abhängig steigern kann (Brownstein et al. 2008). Zusätzlich ist in Pathologien mit exzessiven FGF23-Werten (TIO, XLH) keine PTH-Inhibition zu erkennen. (Ben-Dov et al. 2007, Ichikawa et al. 2007, Krajisnik et al. 2007, Brownstein et al. 2008, Canalejo et al. 2010, Chong et al. 2011, Kuro-o 2011, Blau et al. 2015, Schnedl et al. 2015).

Ist die Regulation durch FGF23 gestört, können verschiedene angeborene oder erworbene Erkrankungen des Phosphathaushaltes entstehen. Erhöhte FGF23-Spiegel verursachen Hypophosphatämie, abnormale  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$ -Werte und Rachitis bzw. Osteomalazie. Bei niedrigen FGF23-Werten kommt es zu hyperphosphatämischen Entgleisungen mit Tumorkalzinoese, erhöhtem  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin  $\text{D}_3$  und Kalzifikationen des Weichteilgewebes (Martin et al. 2012).

Eine angeborene Missense-Mutation im FGF23-Gen mit erhöhten FGF23-Spiegeln führt zum Krankheitsbild der autosomal-dominanten hypophosphatämischen Rachitis mit renaler Phosphatverschwendung und beeinträchtigter Knochenmineralisierung (ADHR-Consortium 2000).

Zusammenhänge von FGF23 mit weiteren Krankheitsbildern, wie linksventrikulärer Hypertrophie (Faul et al. 2011), vaskulären Dysfunktionen (Mirza et al. 2009, Mirza et al. 2011), vaskulären Kalzifikationen (Desjardins et al. 2012, Scialla et al. 2013), und erhöhtem kardiovaskulärem Risiko (Dalal et al. 2011, Moldovan et al. 2014) befinden sich noch auf dem Diskussionsstand.

Bei chronischer Niereninsuffizienz wird bereits sehr früh - vermutlich durch eine frühzeitige Phosphatretention im Rahmen der eingeschränkten Nierenfunktion - die FGF23-Synthese aus den Osteozyten angeregt. Es folgt eine progressive Abnahme der Calcitriol-Serumspiegel und eine wiederum proportionale Zunahme der PTH-Werte. FGF23 zusammen mit dem ebenfalls phosphaturisch wirkenden Hormon PTH verhindert eine klinisch relevante Hyperphosphatämie. Ob und bis zu welchem Grade diese Vorgänge adaptiv oder maladaptiv sind, ist noch nicht klar. Diese relativ neuen Erkenntnisse ergänzen die traditionellen Pathophysiologieverständnisse des sekundären Hyperparathyreodismus bei chronischer Niereninsuffizienz und werden unter dem Begriff CKD-MBD (*Chronic Kidney Disease - Mineral Bone Disease*) zusammengefasst. Zu den Knochenveränderungen kommen Laborveränderungen und Gefäßverkalkungen, die letztendlich zu erhöhten kardiovaskulären Erkrankungen, Frakturen und erhöhter Mortalität führen (Wolf 2010, Bartl 2014).

Diagnostisch und therapeutisch sind Verwendungen von FGF23 als Marker und Target bei Krankheiten wie der Niereninsuffizienz und Hypophosphatämie in Erprobung. Vorstellbar ist zudem, das weite Spektrum der Interaktionen von

FGF23 als Voraussetzung für Medikamente gegen Knochenkrankheiten und andere chronische Erkrankungen, z.B. im Bereich des kardiovaskulären Systems zu nutzen (Bonewald et al. 2013).

#### **1.4.5. Osteoporose als beispielhafte Knochenstoffwechselkrankheit**

Die vom National Institutes of Health (NIH) 2001 formulierte und am meisten akzeptierte Definition der Osteoporose lautet: „Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und eine Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes charakterisiert ist, mit der Folge vermehrter Knochenbrüchigkeit.“

Diagnostiziert wird die Krankheit vor allem mit dem röntgenologischen Verfahren der Knochendichtemessung. Von einer manifesten Osteoporose spricht man, wenn bereits eine oder mehrere Frakturen als Folge der Osteoporose aufgetreten sind.

Es gibt relativ wenige Daten zur Prävalenz der Osteoporose in Deutschland auf Basis einer erniedrigten Knochendichtemessung. Eine retrospektive Analyse von Versicherten der Techniker Krankenkasse im Zeitraum 2006 bis 2009 ergab eine Gesamtprävalenz von 14%, wobei 24% aller Frauen und 6% aller Männer erkrankt sind. Man geht bei diesen Daten von einer jährlichen Inzidenz von 885 000 in der deutschen Gesamtbevölkerung aus. 52% der Betroffenen hatten Frakturen, oft Mehrfachfrakturen, die mit erheblichen Folgen für deren Lebensqualität und hohen Kosten für das Gesundheitssystem verbunden sind (Hadjji et al. 2013). Weitere Daten auch aus Österreich und der Schweiz weisen auf eine hohe Relevanz hinsichtlich sozioökonomischer Aspekte in diesen Ländern hin (*„DVO-Leitlinie Osteoporose 2017“*).

Auf ätiologischer Ebene versteht man die Krankheit des „porösen Knochens“ als Verschiebung des Gleichgewichts im Remodeling hin zum vermehrten Abbau als systemische Pathologie. Die vier wichtigsten beeinflussenden Faktoren sind dabei: Genetik, Hormone, Bewegung und Ernährung.

Die schlechte Qualität und Mikroarchitektur des Knochens bei Menschen mit Osteoporose ist eine Folge komplexer molekularer und zellulärer Prozesse. Diese Vorgänge spielen sich für den Beobachter meist im Verborgenen ab und es vergehen oft Jahre bis Jahrzehnte bis der Patient davon beeinträchtigt ist. Das

Zusammenspiel zwischen Osteozyten, Osteoblasten, Osteoklasten und weiterer beteiligter Zellen, das zu Gunsten eines Abbaus programmiert ist, macht sich meist erst durch eine oder mehrere Frakturen bemerkbar (Bartl et al. 2011).

Ziel medizinischer Forschung in diesem Bereich sollte sein, mit einem tieferegreifenden Verständnis der Prozesse im Knochen und dessen Zell- und Stoffwechselsystem pathologische Verläufe am Patienten rechtzeitig erkennen und behandeln zu können. Das hochkomplexe Zusammenspiel im Knochen beherbergt einen riesigen, noch zu hebenden Schatz der Therapiemöglichkeiten. Schon zugelassene oder sich auf dem Forschungsstand befindliche neue Medikamente, wie z.B. der Enzyminhibitor von Cathepsin K (Odanacatib), der RANKL-Antikörper Denosumab, sowie Teriparatid und Abaloparatid und der Sklerostin-Antikörper Romosozumab stellen dabei womöglich nur einen Anfang dar (Lorentzon 2019).

### **1.5. Ziel der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit versteht sich als Teil des Erkenntnisprozesses physiologischer, pathologischer, zellulärer und molekularer Vorgänge im Knochen. Die Erkenntnisse können dienen, neue mögliche Targets in der Therapie von Störungen des Knochenmetabolismus wie der Osteoporose sowie anderer Knochenkrankheiten zu identifizieren. Insbesondere der Einfluss von FGF23 und seinem Kofaktor Klotho auf Knochenzellen und Mineralisierungsprozesse soll mit einem neuartigen 3D-Ansatz analysiert werden. Daten für eine direkte, lokale Beeinflussung von FGF23 im Knochen sind bisher nicht ausreichend vorhanden.

Durch zellbiologische Experimente auf dem Differenzierungsweg von der mesenchymalen Stammzelle über den Osteoblasten bis hin zum Osteozyten in einer dreidimensionalen Kultur sollen neue Erkenntnisse in der Knochenstoffwechselforschung gewonnen werden. Man erhofft sich, den Zellen ein möglichst naturgetreues Umfeld zu bieten, mit einem gleichzeitig leicht aufzubauenden und praktikablen System. Ein erstes Hauptaugenmerk liegt dabei auf der Optimierung dieses Systems: verschiedene Medien werden für verschiedene Zelltypen getestet, die optimale Zellzahl im 3D-Gel ermittelt und allgemeines Verhalten, wie z.B. Ausbildung von Dendriten, Überlebensfähigkeit oder morphologische Veränderung der Gele werden beobachtet. Dabei kommen

qualitative Methoden zum Einsatz, die eine Grundlage für spätere quantifizierbare Methoden bilden soll.

Stimulationen mit osteogenen Faktoren sowie mit FGF23 und Klotho werden vorgenommen. Der Grad der Mineralisierung wird über verschiedene Zeiträume verglichen. Es wird außerdem getestet, ob die Zellen für RNA-Analysen genutzt werden können. Diskutiert wird eine höchstmögliche Optimierung des Systems mit Einschätzung von Nutzen und Aufwand.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

AxioCam MRC	Carl Zeiss AG, Jena
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank, Inkubator HERAcell 240	Heraeus, Kleinostheim
Elektrophoresekammern	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Heizblock	HLC-Haep Labor Consult, Bovenden
Hochleistungs pH-mV-Meter	WTW GmbH, Weilheim
Mikropipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Sterilwerkbank HERA SAFE KS	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Thermocycler MJ Research	Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf
UV-Transilluminator mit Video, Kamera Modul	LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg

#### 2.1.2. Verbrauchsmaterial

25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup>	Biochrom, Berlin
Zellkulturflaschen	
6 well, 48 well Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
BD Falcon™ 5 ml	BD GmbH, Heidelberg
Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
PCR Softtubes 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Abimed GmbH, Langenfeld
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellschaber (24 cm, 30 cm)	Biochrom AG, Berlin



Zellschaber 24 cm, 30 cm

Biochrom AG, Berlin

Zellsiebe (100 µm)

SPL LIFE SCIENCE, Gyeonggi-Do, Korea

### 2.1.3. Chemikalien/ Reagenzien

Agarose

Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Alizarin Rot S

Chroma-Gesellschaft Schmid & Co.,  
Stuttgart

β-Mercaptoethanol

Sigma.Aldrich GmbH, München

Bovine Serum Albumin (BSA)

Sigma.Aldrich GmbH, München

Bromphenolblau

Sigma.Aldrich GmbH, München

Kollagenase NB4 Standard Grade from

SERVA, Heidelberg

Clostridium histolyticum

Dexamethason

Sigma.Aldrich GmbH, München

dNTP Set

Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

EDTA

AppliChem GmbH, Darmstadt

Essigsäure

Merck KGaA, Darmstadt

Ethidiumbromid

Sigma-Aldrich GmbH, München

Formaldehyd (37 %)

Merck KGaA, Darmstadt

GelRed

Genaxxon Bioscience, Ulm

Glutaraldehyd

Sigma-Aldrich GmbH, München

Formaldehyd (37 %)

Merck KGaA, Darmstadt

Glycerin-Gelatine

Sigma-Aldrich GmbH, München

Heparin Natriumsalz 10 µg/ml

Sigma-Aldrich GmbH, München

Isopropanol

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Methanol

Applied Biosystems GmbH, Darmstadt

MgCl<sub>2</sub>

Promega GmbH, Mannheim

M-MLV-Puffer (5 x)

Promega GmbH, Mannheim

Natriumchlorid

AppliChem GmbH, Darmstadt

Oligo-(dT)-Primer

Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Ölrot-O

Merck KGaA, Darmstadt

Paraffin

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Paraformaldehyd

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

PBS Dulbecco mit Ca <sup>2+</sup> , mit Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG, Berlin
PBS Dulbecco ohne Ca <sup>2+</sup> , ohne Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG, Berlin
PCR-Puffer (10 x)	Promega GmbH, Mannheim
peQGold 100 bp DNA Leiter Plus	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich GmbH, München
Trypsin-EDTA 0,05 % in PBS	PAA Laboratories, Cölbe
Xylencyanoblau	Sigma-Aldrich GmbH, München
Zitronensäure	AppliChem GmbH, Darmstadt

#### **2.1.4. Lösungen**

##### 10 x TBE-Puffer

890 mM Tris  
890 mM Borsäure  
20 mM EDTA (pH 8.0)

##### Ladepuffer Gelelektrophorese

6,85 M Glycerol  
1 mM EDTA  
4,6 mM Xylencyanolblau  
3,7 mM Bromphenolblau

##### DNA-Marker für Gelelektrophorese

1:10 peQGold DNA-Leiter  
1:10 Ladepuffer

##### TE-Puffer

10 mM Tris-HCl  
1 mM EDTA

##### Citrat-Aceton-Formaldehyd-

##### Fixierungslösung

66,3 % Aceton

25,5 % Citrate Solution

8,2 % Formaldehyd

0,5 % Ölrot O-Stammlösung in  
Isopropanol

→ Für 0,3 % Ölrot O Gebrauchslösung 6 Teile der 0,5 % Lösung mit 4 Teilen Aqua  
bidest. mischen, 24 h stehen lassen und filtrieren

1 % Alizarin Rot S-Lösung

1 % Alizarin Rot S

0,25 % Ammoniaklösung

Gelneutralisationslösung für Rat-Tail-Kollagengel

26.8 g/l DMEM-High Glucose

7.4 g/l NaHCO<sub>3</sub>

17.8 g/l HEPES

pH 7.2

sterilfiltriert

Lagerung bei -20 °C

vor Gebrauch 20 % FCS zugeben

### **2.1.5. Enzyme**

rDNAse	Macherey-Nagel GmbH und Co. KG, Düren
MMLV-Reverse-Transkriptase	Promega GmbH, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Promega GmbH, Mannheim

### **2.1.6. Rekombinante Proteine**

Mouse Klotho (1819-KL)	R&D Systems, Wiesbaden
------------------------	------------------------

### **2.1.7. Kits**

Alkaline Phosphatase, Leukocyte Kit	Sigma-Aldrich GmbH, München
-------------------------------------	-----------------------------

86-C

NucleoSpin® RNA II	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Original VECTASTAIN® ABC Kit	Vector Laboratories Inc., Linaris Biolog. Produkte GmbH, Wertheim
VECTOR NovaRED Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratories Inc., Linaris Biolog. Produkte GmbH, Wertheim

## **2.1.8. Zellkultur**

### **2.1.8.1. Murine Zelllinien**

Die verwendeten MLO-Y4 und MLO-A5 Zelllinien wurden von Dr. Lynda Bonewald, University of Missouri at Kansas City, etabliert und für die Experimente freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Zellen stammen aus Femurknochen einer transgenen Maus, in der das immortalisierende T-Antigen exprimiert ist, das die Kontrolle über den Osteocalcin-Promoter hat. Sie befinden sich in verschiedenen Differenzierungsstadien auf dem Weg vom Osteoblasten zum Osteozyten. MLO-A5 entsprechen einem früheren Differenzierungsstadium als Postosteoblasten bzw. Präosteozyten und MLO-Y4 einem späteren, dem Osteozyten ähnlichen Differenzierungsgrad (Rosser et al. 2012). Im Modell von Franz-Odenaal et al. würden somit MLO-A5 dem Entwicklungsstadium 4-6 entsprechen, MLO-Y4 7-8 (s. Abb. 4).

### **2.1.8.2. Humane Zellen**

Mesenchymale Stammzellen von vier verschiedenen Spendern wurden aus Hüftköpfen bzw. Spongiosa nach Hüftgelenkoperationen im Orthopädischen Universitätsklinikum König-Ludwig-Haus, Würzburg, mit Einverständnis der Patienten und Zustimmung der lokalen Ethikkommission, gewonnen (Ethik-Kommissions-Votum 06/30/2010 auf der Basis 84/2001). Die Präparation der Zellen wurde von einer erfahrenen TA durchgeführt und für die Experimente zur Verfügung gestellt.

In Abhängigkeit vom jeweiligen Experiment wurden die Zellen in 175, 75 und 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen, sowie Sixwell und 48-Well-Platten kultiviert.

### 2.1.8.3. Medien

Als Basis-Medium wurde  $\alpha$ -MEM, DMEM-HAM's F12 bzw. DMEM-High Glucose verwendet. Den Medien wurden die unten genannten Zusätze hinzugefügt. Kursiv gedruckt sind die Zusätze, die erst am Tag der Stimulation bzw. des Mediumwechsels zum Medium gegeben wurden. Alle Medien wurden bei 4 °C gelagert. Gelneutralisationslösung, Natrium-Selenit, Ascorbatphosphat, Dexamethason und Penicillin/Streptomycin wurden bei -20 °C gelagert. Ascorbatphosphat wurde zudem unter lichtgeschützten Bedingungen gelagert. Diese Medien, sowie FCS und Calf Serum wurden von PAA Laboratories, Cölbe, Zusätze von Sigma-Aldrich GmbH, München bezogen. Das FreeStyle 293 Expression Medium wurde von Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham MA USA, bezogen.

#### MLO-A5 Kontrolle

$\alpha$ -MEM

FCS	5 %
Calf Serum	5 %
Natrium-Selenit	100 nM
Penicillin/Streptomycin	1 x

#### MLO-A5 osteogene Differenzierung

$\alpha$ -MEM

FCS	10 %
Natrium-Selenit	100 nM
Penicillin/Streptomycin	1 x
<i>Ascorbatphosphat</i>	<i>50 <math>\mu</math>g/ml</i>
<i><math>\beta</math>-Glycerophosphat</i>	<i>10 mM</i>

#### MLO-Y4 Kontrolle

$\alpha$ -MEM

FCS	2,5 %
Calf Serum	2,5 %
Natrium-Selenit	100 nM

Penicillin/Streptomycin 1 x

#### MLO-Y4 osteogene Differenzierung

$\alpha$ -MEM

FCS 2,5 %

Calf Serum 2,5 %

Natrium-Selenit 100 nM

Penicillin/Streptomycin 1 x

*Ascorbatphosphat* 50  $\mu$ g/ml

*$\beta$ -Glycerophosphat* 10 mM

#### hMSC Kontrolle

DMEM/HAM'S F12 (with  
Glutamine)

FCS 10 %

Natrium-Selenit 100 nM

Ascorbatphosphat 50  $\mu$ g/ml

Penicillin/Streptomycin 1 x

#### hMSC osteogene Differenzierung

DMEM High Glucose (with  
Glutamine)

FCS 10 %

Ascorbatphosphat 50  $\mu$ g/ml

Natrium-Selenit 100 nM

*$\beta$ -Glycerophosphat* 10 mM

*Dexamethason* 100 nM

Penicillin/Streptomycin 1 x

#### HEK

DMEM High Glucose (mit  
L-Glutamin)

FCS 10 %

Natrium-Selenit	100 nM
Pyruvat	1 mM
Zeocin	50 µg/ml

#### FreeStyle293 Expression

Puromycin	5 µg/ml
-----------	---------

### **2.1.8.4. Weitere Stimulationsmedien /-zusätze**

#### Humanes FGF23R176Q

Am Orthopädischen Zentrum für Muskuloskelettale Forschung wurde eine Zelllinie etabliert, die FGF23 exprimiert und ins Medium abgibt. Die Zelllinie HEK-FGF23-R176Q enthält die stabil ins Genom integrierte codierende Sequenz des humanen FGF23-Gens. Diese Sequenz wurde durch positionsgerichtete Mutagenese so modifiziert, dass die Aminosäure Arginin in Position 176 des sekretierten Proteins zu Glutamin wird. Hierdurch wird eine natürliche Prozessierungsstelle zerstört und somit verhindert, dass das Protein durch Proteolyse abgebaut wird. Die Zellen werden üblicherweise in Zeocin-supplementiertem HEK-Medium kultiviert, um einen Selektionsdruck auszuüben. Das Kulturmedium dieser Zellen wurde als sogenanntes konditioniertes Medium gesammelt und für Stimulationsexperimente mit FGF23 eingesetzt. Überstände von HEK-FGF23-R176Q-Zellen aus verschiedenen Passagen (16, 22, 23, 26) wurden verwendet, wobei auf Zusätze des Antibiotikums verzichtet wurde.

#### Humanes Klotho

Ebenso wurde am Institut eine Zelllinie etabliert, die Klotho überexprimiert. Die Zelllinie HEK-Klotho hat die codierende Sequenz des humanen Klotho-Gens stabil in ihr Genom integriert. Hierbei handelt es sich um die sekretierte Form von Klotho, die 549 Aminosäuren umfasst. Diese Zellen wurden in Puromycin-supplementiertem Freestyle 293 Expression Medium kultiviert. Für Stimulationsexperimente wurden Überstände aus HEK-Klotho-Zellen

verschiedener Passagen (23,24) verwendet, die dann ohne Antibiotikum kultiviert wurden. Die Überstände wurden bereits fertig aufbereitet vom Labor für die Arbeit zur Verfügung gestellt.

### 2.1.8.5. 3D-Kollagengele

Für die 3D-Kollagengele wurde Kollagen aus Rattenschwänzen (Rat-Tail-Kollagen-Gel) gewonnen. Die Arbeitslösung mit 6 mg/ml in 0,1 % Essigsäure wurde freundlicherweise von Frau Prof. Heike Walles, Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Universität Würzburg, bereitgestellt.

### 2.1.9. PCR-Primerdesign

Alle Primer wurden von biomers.net GmbH, Ulm oder Eurofins MWG Operon, Ebersberg bezogen. Die Auswahl von Primer-Paaren erfolgte mit der Software „Primer3“ ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)). Dazu wurden Intron-überspannende mRNA-Bereiche des zu amplifizierenden Gens und Fragmentlängen vorgegeben. Die jeweiligen Amplifikationsbedingungen, wie optimale Annealing-Temperatur, Zyklenzahl und MgCl<sub>2</sub>-Konzentration, wurden für jede Primer-Kombination experimentell ermittelt. Eine Erklärung der Gensymbole befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

Gen	Sequenz 5'→3'	Produktlänge (bp)	Zyklen (n)	Tm (°C)	MgCl <sub>2</sub> (mM)
<b>mB2m for</b>	gtctttctggtgcttgctc	112	30	57	2
<b>mB2m rev</b>	agttcagtatgttcggcttc	112	30	5	2
<b>EGR1 for</b>	tcaccacatggacaacta	397	40	60	2
<b>EGR1 rev</b>	aggccactgactaggctgaa	397	40	60	2
<b>FGF23 for</b>	gctacagccaggaccagcta	133	40	55	0
<b>FGF23 rev</b>	tggctcctgttatcaccaca	133	40	55	0
<b>DMP1 for</b>	tctcccagttgccagatacc	141	40	53	1
<b>DMP1 rev</b>	ctatttgctgtccctctgg	141	40	53	1
<b>SOST for</b>	cctcctcctgagaacaacca	128	40	53	2
<b>SOST rev</b>	gtcaggaagcgggtgtagtg	128	40	53	2
<b>Runx2 for</b>	gccgggaatgatgagaacta	155	40	55	2



<b>Runx2 rev</b>	tggggaggatttgaagac	155	40	55	2
<b>PHEX for</b>	tgcttgatggctggataa	157	40	55	2
<b>PHEX rev</b>	cgccctacagtcgatgtcc	157	40	55	2
<b>ALPL for</b>	aaccagacacaagcattcc	151	40	55	2
<b>ALPL rev</b>	gagagcgaagggtcagtcag	151	40	55	2
<b>Gja1 for</b>	ggactgcttctctcacgtc	351	40	55	2
<b>Gja1 rev</b>	taattcgcccagtttctc	351	40	55	2

**Tabelle 1: Verwendete Primer**

### 2.1.10. Primäre Antikörper

Alle primären Antikörper für die Immunhistologie wurden von Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg bezogen. Zur Kontrolle unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Proben mit Präimmunseren von Mäusen bzw. Kaninchen inkubiert.

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
FGF23 (FL-251) sc-50292	1:200
Rabbit polyclonal IgG	
SOST (N-22) sc-130258	1:100
Rabbit polyclonal IgG	
DMP1 (LFMb-31) sc-73633	1:75
Mouse monoclonal IgG <sub>1</sub>	
Mouse Präimmunserum	1:75
Rabbit Präimmunserum	1:100
	1:200

**Tabelle 2: Verwendete Primär-Antikörper und Seren**

## **2.2. Methodik**

### **2.2.1. Zellkultur**

#### **2.2.1.1. Versorgung der Zellen**

Grundsätzlich wurden die Zellkulturarbeiten in einer sterilen Werkbank verrichtet, um die Gefahr der Kontamination gering zu halten. Alle verwendeten Zellen wurden in Brutschränken bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C kultiviert. Zum leichteren Verständnis wird in der Arbeit zwischen 2D und 3D-Kulturen unterschieden. 2D bedeutet, dass die Zellen auf einer ebenen Fläche ausgesät und kultiviert wurden. 3D bedeutet, dass die Zellen in einer Kollagen-Typ-1-Matrix kultiviert wurden, die es den Zellen ermöglicht, sich nicht nur in der horizontalen, sondern auch in der vertikalen Ebene zu orientieren, was für osteozytäre Zellen wegen ihrer dreidimensionalen Dendritenvernetzung in der Knochenmatrix eine besondere Rolle spielt.

#### **2.2.1.2. Bestimmung der Zellzahl**

Den Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt, sie wurden mit PBS gewaschen und mit Hilfe des Enzyms Trypsin abgelöst. Nach 5 min Zentrifugieren bei 1200 rpm wurde das entstandene Pellet in frischem Medium resuspendiert. Eine Probe wurde mit einer Pipette entnommen, mit Trypanblau und PBS vermischt und in eine Neubauer-Kammer gegeben, die zweimal in neun gerasterte Quadrate unterteilt ist. Es wurden alle vitalen Zellen in 10 Quadranten gezählt. Diese zeichnen sich durch einen transparenten und kugeligen Phänotyp aus. Tote Zellen mit defekter Zellmembran werden vom Trypanblau blau eingefärbt. Man multipliziert die Zellzahl mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor (z.B. 20 bei einer Verdünnung von 1:20), dem Gesamtvolumen der Zellsuspension in ml und dem Kammerfaktor 10<sup>3</sup>.

#### **2.2.1.3. Kollagenierung von Kulturgefäßen**

Beide MLO-Y4 und MLO-A5 Zelllinien benötigen für optimales Wachstum kollagenierte Flächen. Hierfür wurden sämtliche Kulturoberflächen mit einer Kollagenlösung bestehend aus 0,15 mg/ml Rat Tail Kollagen I beschichtet. Dazu

wurde Rat Tail Kollagen I (3,87 mg/ml) mit Essigsäure 0,02 M im Verhältnis 1:25,8 gemischt. Diese Lösung gibt man für 1 h bei Raumtemperatur auf die Kulturgefäße und saugt diese dann nach mehrmaligem Schwenken wieder ab. Die Kulturgefäße lässt man anschließend offen stehen bis alle Feuchtigkeitsreste verdunstet sind. Die Lösung kann laut Protokoll bis zu siebenmal verwendet werden (Rosser et al. 2012). Kollagenierte Kulturgefäße wurden bei 4 °C gelagert. Vor Verwendung wurde der pH der kollagenierten Behälter mit sterilem PBS (pH 7,4) neutralisiert.

#### **2.2.1.4. 3D-Kollagengele**

Nachdem die Zellen zweimal mit PBS gewaschen wurden und sich durch „Trypsinieren“ vom Boden ablösen, zentrifugiert man die Zellen ab, zählt sie und resuspendiert sie in Gelneutralisationslösung (s. Abschnitt 2.1.8.3) mit FCS. Das Kollagengel wurde vorher im Wasserbad verflüssigt, kräftig geschüttelt, 10 min bei Raumtemperatur und 1500 rpm zentrifugiert und anschließend auf Eis gestellt. Das Gel mischt man im Verhältnis 1:1 mit den resuspendierten Zellen und gießt es möglichst blasenfrei in Kammern einer 48-well Platte. Aufgrund der hohen Viskosität des Gels und seiner sich temperaturabhängig schnell ändernden Haftungs- und Viskositätseigenschaften ist es erforderlich, die letzten Schritte rasch durchzuführen. Bessere Pipettierergebnisse konnten durch zuvor kurz im Eisfach gekühlte Plastikpipetten erreicht werden. Nach einer Inkubationszeit von zirka 30 bis 45 min gibt man 1 ml Medium auf das nun verfestigte Gel, die Stimulationen erfolgten frühestens einen Tag darauf. Die hierbei verwendeten Medien wurden den jeweiligen Zellen angepasst, siehe hierzu auch die jeweiligen Abschnitte in 3.2.9. Der Medienwechsel erfolgte alle 3 - 5 Tage.

Der Verlauf der Kultur wurde mikroskopisch verfolgt und durch Fotografien dokumentiert. Die Gele wurden zum Ende der Kultivierung zweimal mit PBS gewaschen und entweder in 4 % PFA gelegt, um sie später in Paraffin einzubetten und zu schneiden. Hierbei wurde darauf geachtet, dass das verwendete PBS  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ -frei war, um falschpositive Ergebnisse bei den anschließenden Färbemethoden zu vermeiden. Für eine RNA-Isolation wurden die Gele zunächst mit Kollagenase verdaut und anschließend in mit  $\beta$ -Mercaptoethanol versetztem RA1-Puffer aufgenommen (s. 3.2.2.).

Aufgrund unterschiedlicher Charakteristika und Vorgaben wurden für unterschiedliche Zellen verschiedene Zelldichten in den Gelen verwendet. Für MLO-Y4 wurden meist  $1 \times 10^6$  Zellen/ml verwendet. Aufgrund der zeitlich später statt gefundenen Experimente und der im Laufe der Experimente gewonnenen Erkenntnis, dass leicht höhere Zelldichten vorteilhaft sein könnten, wurden für MLO-A5 Zelldichten von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml verwendet.

### **2.2.2. Isolation zellulärer RNA**

Zelluläre RNA wurde für Genexpressionsanalysen isoliert und aufgereinigt. Dazu wurde zunächst das Medium von den zu erntenden Zellen abgesaugt und 350  $\mu$ l RA1-Puffer, versetzt mit 3,5  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol zugefügt. Zellen, die sich auf einer Fläche befanden wurden mit einem Zellschaber abgeschabt und das Lysat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben.

Bei den 3D-Gelen musste zunächst einige Stunden die folglich beschriebene Verdauung mit Kollagenase erfolgen um die eingebetteten Zellen aus den Gelen zu lösen und die RNA gewinnen zu können: Von der Kollagenase wurde 1 g in 96 ml PBS gelöst, durch 0,2  $\mu$ m-Filter sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die Kollagenase wurde 1:1 mit PBS verdünnt und davon ca. 1 ml auf jedes Gel gegeben. Nach einigen Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37 °C wurden die gelösten Gele resuspendiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen, erneut zentrifugiert mit 5000 rpm für 10 min. Das Zellpellet konnte in 350  $\mu$ l Puffer RA1 + 3,5  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol lysiert werden.

Die Proben wurden bis zur anschließenden Isolation der RNA bei -20 °C gelagert. Die Isolation wurde laut dem Protokoll „Total RNA Isolation, Nucleo Spin RNA II“ von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach der Aufreinigung wurde die RNA mit 60  $\mu$ l H<sub>2</sub>O eluiert und bei -20 °C gelagert.

### **2.2.3. RNA-Konzentrationsbestimmung**

Wenn man quantitativ aussagekräftige vergleichende Expressionsanalysen mittels PCR machen möchte, ist es wichtig, mit einheitlichen Mengen an cDNA zu arbeiten. Dazu bestimmt man zunächst die RNA-Konzentration mittels Spektralanalyse in

einem Photometer. Dieses Verfahren wurde bei Proben aus 3D-Gelen allerdings nicht verwendet, da die Gesamtausbeute generell nur sehr gering ist und Verluste durch die Messung nicht hinnehmbar waren. Die anschließende cDNA-Synthese aus diesen Proben wurde daher standardisiert mit 17 µl RNA-Lösung durchgeführt.

#### **2.2.4. cDNA-Synthese**

Die RNA wird zunächst mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. 1 µg RNA wurde nach vorheriger Berechnung auf 17 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Proben aus 3D-Kollagengelen wurden nicht verdünnt, wie oben angegeben. Nach Zugabe von 50 pmol Oligo-dT Primer wurden die Proben 5 min bei 70 °C zum Annealing inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 7 µl Mastermix, bestehend aus Puffer, H<sub>2</sub>O, dNTPs und 200 U MMLV Reverse Transkriptase erfolgte die UMSchreibung in einem Thermoblock für 1 h bei 42 °C. Das Enzym wurde anschließend inaktiviert durch 10 min Inkubation bei 90 °C. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

#### **2.2.5. Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Die Polymerase Kettenreaktion ist ein von Kary B. Mullis entwickeltes und heutzutage in der Labortechnik weit verbreitetes Verfahren, um Gen-Abschnitte mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase zu amplifizieren (Mullis et al. 1986). Der Ablauf erfolgt nach standardisiertem Muster. Es beginnt mit der Denaturierung. Durch hohe Temperaturen von über 90 °C wird der DNA-Doppelstrang aufgetrennt. In der folgenden Annealing-Phase lagert sich ein Primer-Paar an die DNA-Sequenzen. Der jeweilige Primer legt sich mit seinem komplementären Code an den DNA-Strang, der dann von der hitzestabilen Taq-Polymerase abgelesen und synthetisiert wird. Man wiederholt diese Prozedur mit einer bestimmten Zyklenzahl, und kann das Genprodukt anschließend durch eine Gelelektrophorese detektieren.

Ein PCR-Ansatz setzt sich aus Folgendem zusammen:

10 mM      Tris-HCl (pH 8,8),  
50 mM      KCl,

1,5 mM	MgCl <sub>2</sub> ,
0,01 %	Triton X-100
je 200µM	dNTPs
0.1 µM	sense-Primer
0.1 µM	antisense-Primer
1 mM	Mg <sup>2+</sup>
1 unit	Taq-DNA-Polymerase
1 µl	cDNA Template

Der Ablauf der PCR folgte stets dem folgenden Schema:

94 °C	3 min
72 °C	2 min
94 °C	30 sec
Annealing-Temperatur	30 sec
72 °C	40 sec
Annealing-Temperatur	1 min
72 °C	2 min
10 °C	10 min

Die Annealing-Temperaturen der unterschiedlichen Primer-Paare mussten zunächst experimentell ermittelt werden. Für jede Primer-Kombination wurde jeweils ein Ansatz mitgeführt, dem keine DNA zugegeben wurde, um Kontaminationen auszuschließen (Negativ-Kontrolle).

### **2.2.6. Gelelektrophorese**

Die Effizienz der PCR-Amplifikation wurde mittels einer Agarosegel-Elektrophorese analysiert. Dazu wurden in Abhängigkeit von Fragmentlänge und Probenvolumen 1,5 – 3 %-ige Agarosegele in 0,5 x TAE mit 1 – 1,5 mm breiten Probentaschen vorbereitet. Die Proben wurden mit Ladepuffer gemischt und in die Taschen gegeben. Die Elektrophorese erfolgte bei 90 – 120 Volt für ca. 30 min in 0,5 x TAE. Als Größenstandard wurde ein 100 bp-Marker mitgeführt. Anschließend wurden die Gele für die Auswertung in einer UV-Kammer fotografiert.

### 2.2.7. Immunhistologie

Für immunhistologische Färbungen wurden die 3D-Gele zweimal mit Calcium- und Magnesium-freiem PBS pH 7,4 gewaschen und in 4 % Paraformaldehyd bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden sie von einer geübten MTA in Paraffin eingebettet und ca. 4 µm geschnitten auf Objektträger aufgezogen.

Für die Färbungen mussten die Schnitte in einem ersten Schritt entparaffiniert werden. Dafür wurden die Objektträger in Küvetten in folgenden Lösungen mit bestimmten Zeiten behandelt:

- zweimal 10 min Xylol
- absteigende Ethanolreihe (5 min 95 %, 5 min 95 %, 5 min 70 %, 5 min 50 %, 5 min H<sub>2</sub>O)

Dann demaskierte man die Schnitte zweimal fünf min mit einem 0,1 M Citratpuffer pH 6,0 bei 95 °C. Die Objektträger wurden abgekühlt und 5 min in H<sub>2</sub>O gespült.

Es folgte das Quenchen der endogenen Peroxidase-Aktivität 30 min lang in 0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung bei Raumtemperatur. Dann spülte man die Objekte 5 min in 1 x TBS-Puffer.

Man nahm die Objektträger aus der Küvette, wischte die Ränder trocken und umrandete die Schnitte mit einem Fettstift, damit bei den folgenden Schritten die verschiedenen Antikörper nicht ungewollt auf andere Schnitte gelangten. 20 min gab man die Blocklösung auf die Objektträger, kippte diese ab und inkubierte den ersten, mit der Blocklösung verdünnten Antikörper (jeweilige Verdünnungen s. 3.1.10) auf den Schnitten über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Als technische Kontrolle zu den Antikörpern benutzte man die Präimmunseren der Spezies, von der die Antikörper stammten, um das Ausmaß unspezifischer Bindungen der Antikörper beurteilen zu können.

Am zweiten Tag wurden die Objektträger zweimal in 1 x TBS gewaschen und der zweite Antikörper 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Wartezeit wurde das ABC-Reagenz aus dem VECTASTAIN® ABC Kit - Peroxidase angesetzt. Dieses wurde nach zweimaligem Waschen mit 1 x TBS für 30 min auf die Schnitte geben. Es folgte eine Inkubation mit Peroxidase-Substrat-Lösung 5 bis 15 min.

Nach zweimaligem Waschen mit destilliertem H<sub>2</sub>O folgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun für zirka 5 min, welche durch einen letzten Waschgang 10 min unter fließendem Leitungswasser abgeschlossen wurde.

Schließlich wurden Deckgläser mit heißer, flüssiger Glyceringelatine auf die Objektträger gegeben, um die Schnitte zu schützen.

### **2.2.8. Färbungen**

Die Färbungen von 2D-Kulturen wurden in Sixwell-Platten mit je 10 cm<sup>2</sup> Fläche pro Well durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst bis zur gewünschten Zelldichte auf den Wells kultiviert und dann fixiert und gefärbt. Die Beurteilung der Intensität der Färbungen erfolgte zum einen mit dem bloßen Auge im direkten Vergleich mit den Kontrollen, zum anderen mikroskopisch bei teilweise niedriger Vergrößerung. Zur Dokumentation wurden Zell-Färbungen auch eingescannt.

#### **2.2.8.1. Alizarinrot**

Alizarinrot wird für die histologische Charakterisierung von Calcium benutzt. In wässriger Lösung geht Alizarinrot eine chemische Reaktion mit Calciumionen ein und formt ziegelrote Ablagerungen. Das von Knochenzellen gebildete und zu einem guten Teil aus Calcium bestehende Hydroxylapatit kann somit sichtbar gemacht werden. (Puchtler et al. 1969, Lievremont et al. 1982, Stanford et al. 1995, Gregory et al. 2004).

Das Medium der Zellen in 2D-Kultur wird sorgfältig aspiriert. Man wäscht zweimal mit PBS und fixiert die Zellen durch 15 min Inkubation mit 10 %-igem Formaldehyd. Auf dreimaliges Waschen mit destilliertem Wasser je 5 bis 10 min folgt das Hinzugeben der Alizarinrot Färbelösung bei einem pH-Wert von 4,1. Verwendet wird eine 1 %-ige Alizarinrotlösung mit 0,25 %-igem Ammoniak. Diese wird mindestens 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbung wird abgeschlossen mit 2 Waschgängen à 5 min auf dem Schüttler mit destilliertem Wasser. In ähnlicher Weise werden die Färbungen der Paraffinschnitte von 3D-Kollagengelen angefertigt. Der Unterschied ist lediglich, dass die Zellen sich schon auf einem Objektträger - geschnitten und fixiert – befinden.



### 2.2.8.2. Alkalische Phosphatase

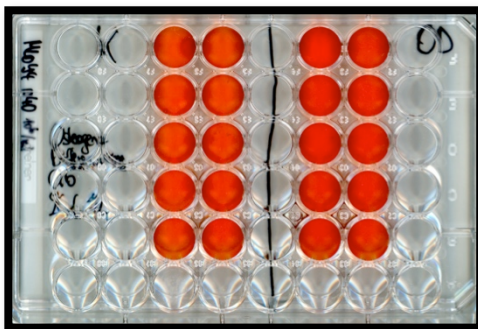
Verwendet wurde dazu das Kit Alkaline Phosphatase, Leukocyte Kit 86-C von Sigma-Aldrich. Es wird dabei eine semiquantitative Kennzeichnung der Aktivität des Enzyms Alkalische Phosphatase vorgenommen. Man lässt die Citrat-Aceton-Formaldehyd-Fixierungslösung sowie 900 µl H<sub>2</sub>O dest. auf Raumtemperatur erwärmen. Die Diazoniumsalzlösung und 20 µl Naphtol-AS-BI-Lösung werden zum H<sub>2</sub>O dest. gegeben und kurz vermischt. Nachdem das Medium von den Zellen abgesaugt ist, wird 1 ml der Fixierungslösung pro Well 30 sec hinzugegeben. Nach dreimaligem Waschen mit destilliertem H<sub>2</sub>O gibt man 900 µl Färbelösung je Well dazu und lässt diese 15 min bei Raumtemperatur unter Vermeidung direkter Lichtaussetzung inkubieren. Nach dreimaligem Waschen mit H<sub>2</sub>O dest. werden die gefärbten Zellen luftgetrocknet und ausgewertet.

### 2.2.8.3. Ölrot-O

Durch die Ölrot-O-Färbung werden Lipide in leuchtendem Rot angefärbt. Zuerst saugt man das Medium gründlich ab und wäscht dreimal mit PBS je 1 min. Die Fixation erfolgt mit Paraformaldehyd (4 %) für 1 h. Die Zellen werden einmal 1 min mit PBS gewaschen und anschließend mit der Ölrot-O-Lösung für 20 min gefärbt. Zuletzt wäscht man nochmals zweimal mit destilliertem H<sub>2</sub>O für 15 min, deckt die Zellen ein und wertet sie dann aus.

### 2.2.9. Stimulationsansätze der 3D-Kulturen mit MLO-A5 und MLO-Y4

Für alle Stimulationsversuche wurden die Medien mit den jeweiligen Zusätzen kurz vor der Stimulation frisch angesetzt.



**Abb. 12: Beispielhafter Aufbau einer Testreihe mit 3D-Kollagengelen**

Hier: MLO-Y4, 20 Proben

Zehn Proben links: Kontrolle (K)

Zehn Proben rechts: Osteogene

Differenzierung (OD)

### **2.2.9.1. Osteogene Differenzierung**

Es wurden Stimulationen von MLO-A5, MLO-Y4 und hMSC mit osteogenen Differenzierungsfaktoren durchgeführt. Es ist beschrieben, dass Ascorbatphosphat und  $\beta$ -Glycerophosphat (sowie Dexamethason bei hMSC) die osteogene Differenzierung und die Mineralisierung fördern (Kato et al. 2001). Die Zusammensetzung der Stimulationsmedien entsprechend der jeweiligen Zellarten ist in Abschnitt 2.1.8.3. angegeben.

### **2.2.9.2. Überprüfung der Signaltransduktion von FGF23 und Klotho**

Für Stimulationen der murinen Zellen wurde FGF23 und Klotho sowohl murinen als auch humanen Ursprungs verwendet. Zum einen wurde das Full-length-Klotho humanen Ursprungs verwendet, das aus kommerzieller Quelle bezogen wurde. Zum anderen wurden die sekretierten Formen von Klotho und FGF23 verwendet, welche in Abschnitt 2.1.8.3 beschrieben sind.

Um zu überprüfen, ob die verwendeten Ansätze die entsprechende FGFR1-Signalkaskade aktivieren, wurden zwei Versuchsaufbauten mit MLO-Y4 in 2D-Zellkulturen generiert. Als Zeiträume wurden 0,5, 1, 2, 4 und 24 h gewählt, da man weiß, dass es innerhalb dieser kurzen Zeitabstände zu einer Signalantwort kommt. (Urakawa et al. 2006) Eine adäquate Signalantwort wurde als Voraussetzung für die kommenden Stimulationen in den länger zu kultivierenden 3D-Zellkulturen gesetzt.

In der ersten Stimationsversuchsreihe in 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 70 % kultiviert. Der Stimulationsansatz beinhaltete zu 50 % das MLO-Y4-Medium plus 25 % der Überstände von humanem FGF23 und 25 % der humanen Klothoüberstände. Als Kontrollen wurden drei verschiedene Ansätze generiert, einmal das MLO-Y4 Medium alleine, einmal wurden die humanen Klothoüberstände durch das Freestyle-Medium ersetzt und einmal die humanen FGF23-Überstände durch das HEK-Medium ersetzt:

1. MLO-Y4-Medium
2. 25 % humanes FGF23, 25 % Freestyle-Medium, MLO-Y4-Medium
3. 25 % HEK-Medium, 25 % humanes Klotho, MLO-Y4-Medium

4. 25 % humanes FGF23, 25 % humanes Klotho, MLO-Y4-Medium

Eine zweite Versuchsreihe wurde ähnlich aufgebaut. Es wurde zusätzlich Heparin zu allen Ansätzen gegeben und der 24 h-Wert weggelassen. Außerdem wurde murines rekombinantes Klotho (s. 3.1.6) hinzugegeben, da zu diesem Zeitpunkt die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe noch nicht ausgewertet waren. Damit stand eine alternative Möglichkeit der potenziellen Anschaltung des Signalwegs zur Verfügung.

1. Heparin, MLO-Y4-Medium
2. 25 % HEK-Medium, 25 % Freestyle-Medium, Heparin, MLO-Y4-Medium
3. 25 % humanes FGF23, 1 µg/ml murines rekombinantes Klotho, Heparin, MLO-Y4-Medium
4. 25 % humanes FGF23, 25 % humanes Klotho, Heparin, MLO-Y4-Medium

Nach Ablauf der jeweiligen Stimulationszeiten wurde den Zellen das Medium abgesaugt. Sie wurden in mit β-Mercaptoethanol versetztem RA1-Puffer aus dem RNA-Isolationskit mittels eines Zellschabers vom Kulturgefäßboden gelöst und in ein Reaktionsgefäß zur späteren RNA-Isolation gegeben.

### **2.2.9.3 Stimulation mit FGF23**

Zuletzt wurden die Zellen in den 3D-Kollagengelkulturen mit FGF23 und Klotho stimuliert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3-5 Tage, die Zellernte nach 7, 14, 21 und 28 Tagen.

Eine Studie wurde mit MLO-A5 Zellen durchgeführt. Im ersten Stimulationsansatz gab man zu 75 % MLO-A5-Medium 0,1 µg/ml des murinen rekombinanten Klothos, sowie 25 % konditionierten Mediums von Zellen, die das humane FGF23 exprimieren und ins HEK-Medium abgeben. Ein zweiter Ansatz beinhaltete zu 50 % MLO-A5 Medium, dazu wurden 25 % des oben genannten Mediums mit humanem FGF23 in HEK-Medium und 25 % konditionierten Mediums von Zellen, die das humane Klotho in Freestyle-Medium exprimieren. Als Kontrollen diente sowohl nur das MLO-A5-Medium als auch 50 % des MLO-A5-Mediums zusammen

mit den alleinigen Medien Freestyle und HEK zu jeweils 25 %. Zusätzlich wurde eine Testreihe als Vergleich um Ascorbatphosphat und  $\beta$ -Glycerophosphat ergänzt.

1. MLO-A5-Medium
2. 25 % HEK-Medium, 25 % Freestyle-Medium, MLO-A5-Medium
3. hFGF23, 1 $\mu$ g/ml murines rekombinantes Klotho, MLO-A5-Medium
4. hFGF23, hKlotho, MLO-A5-Medium

Eine weitere Studie wurde mit MLO-Y4-Zellen als 3D-Kollagengelkultur durchgeführt. Als Probe diente einmal ein Ansatz mit 0,1  $\mu$ g/ml des murinen rekombinanten Klothos, 25 % der Lösung mit humanem FGF23 in HEK-Medium und 75 % MLO-Y4-Medium. Der zweite Ansatz beinhaltete 25 % des humanen Klothos in Freestyle-Medium und 25 % des humanen FGF23 in HEK-Medium mit 50 % MLO-Y4-Medium. Als Kontrolle diente auch hier einmal nur das MLO-Y4-Medium, sowie ein Ansatz mit 50 % MLO-Y4-Medium mit 25 % Freestyle und 25 % HEK-Medium. In allen vier Ansätzen mit den MLO-Y4-Zellen wurde zusätzlich Heparin mit 10  $\mu$ g/ml dazugegeben.

1. Heparin, MLO-Y4-Medium
2. 25 % HEK-Medium, 25 % Freestyle-Medium, Heparin, MLO-Y4-Medium
3. 25 % humanes FGF23, 0,1  $\mu$ g/ml murines rekombinantes Klotho, Heparin, MLO-Y4-Medium
4. 25 % humanes FGF23, 25 % humanes Klotho, Heparin, MLO-Y4-Medium

## **3. Ergebnisse**

### **3.1. Vorarbeiten**

#### **3.1.1. hMSC in 2D- und 3D-Kulturen**

Es wurde vorwiegend mit Zellen und Methoden gearbeitet, die im Labor noch nicht etabliert waren – vor allem MLO-A5 und MLO-Y4, daher wurde zunächst mit den bereits etablierten MSC Referenzwerte gewonnen. Die mesenchymalen Stammzellen der folgenden Spender wurden verwendet:

MSC 902: weiblich, 55 Jahre

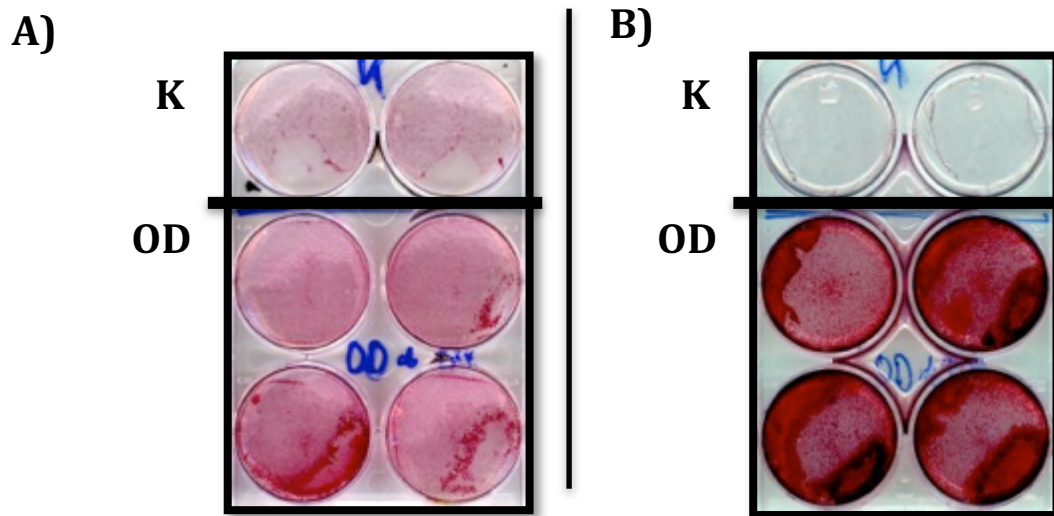
MSC 903: weiblich, 61 Jahre

MSC 904: männlich, 65 Jahre

MSC 906: männlich, 86 Jahre

MSC 909: männlich, 50 Jahre

Das Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen vom Spender MSC 904 wurde nach 12- sowie 34-tägiger Kultivierung mit osteogenem Medium analysiert. Die Färbung von Ca-Phosphat-Kristallen mit Alizarinrot S zeigt nach 2 Wochen eine moderate und nach 5 Wochen eine starke Anfärbung der osteogen differenzierten Ansätze im Vergleich zu undifferenzierten Kontrollen (Abb. 13 A + B). Es erfolgte ebenso eine Färbung mit dem ALP-Kit, hierbei zeigt sich eine durchgehende Färbung der Proben ohne Unterschied durch eine osteogene Stimulation. Alle Proben exprimieren das Enzym Alkalische Phosphatase in gleichem Maße.



**Abb. 13: Alizarinrotfärbung von hMSC eines männlichen , 65 Jahre alten Spenders in 2D-Kulturen (MSC 904).**

Jeweils obere Zwei Wells: Kontrolle, Untere Vier Wells: mit  $\beta$ -Glycerophosphat und Dexamethason

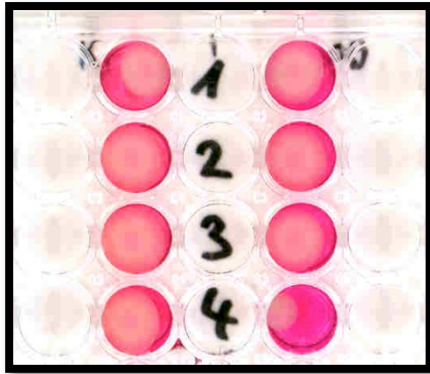
A) MSC 904 Alizarinrotfärbung nach 12 Tagen: leicht positive Färbungen leicht verstärkt in differenzierten Proben

B) MSC 904 Alizarinrotfärbung nach 34 Tagen: deutliche Färbung in den stimulierten Kulturen im Gegensatz zu den Kontrollen ohne osteogene Stimulanzen

Als weitere Methode wurde das von Reichert et al. etablierte Verfahren zur Einbettung von hMSC in 3D-Kollagen-Gelen (Reichert et al. 2009) rekonstruiert. Mehrere 0,5 ml-Gele wurden in kleine Vertiefungen (Wells) gegossen. Es wurde eine Zelldichte von  $10^7$  Zellen pro ml verwendet. Die hMSC-Kollagengele zeigten dabei spezielle Charakteristika:

Die Zellen breiteten sich durch initiale Vermischung der Zellen mit der Kollagen-Typ-1-Masse in drei Ebenen aus, also einer den üblichen Standardverfahren zusätzlichen Ebene. Während das von Reichert et al. entwickelte Verfahren eher dem Bereich Tissue Engineering dienen soll, werden die Zellen hier mit Fokus auf die zellbiologische Ebene erforscht.

Wie schon von Reichert et al. beschrieben, schrumpften auch hier die Gele bereits nach wenigen Tagen. Konnte man einzelne Zellen anfangs noch unter dem Mikroskop abgrenzen, erschwert die nach der Gelkontraktion sehr kompakte Zell-Kollagen-Masse eine lichtmikroskopische Betrachtung.



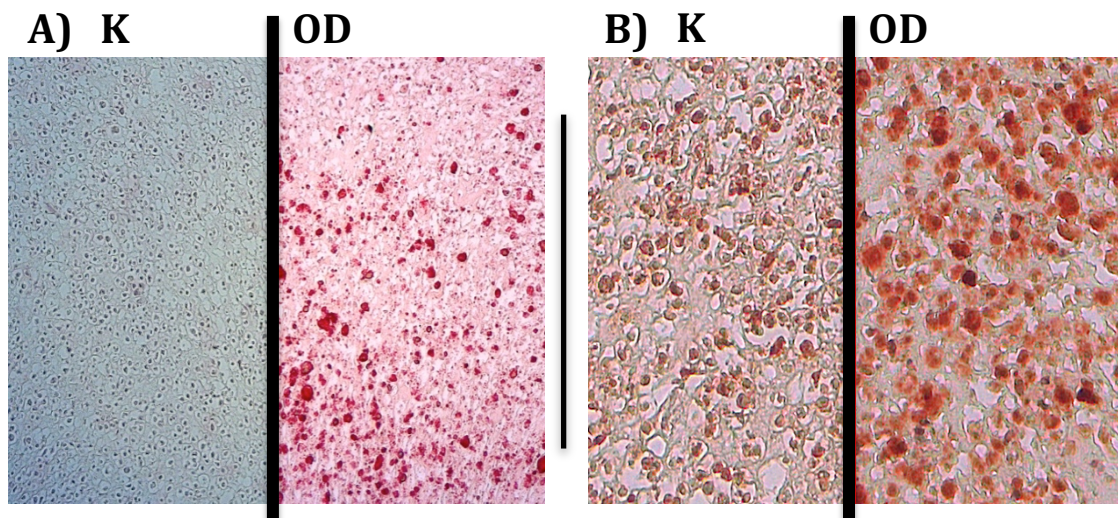
**Abb. 14: Gelkontraktion – MSC 906 in 3D-Kollagengelen** nach 24 h in Kultur.

Linke vier Proben mit Kontrollmedium, rechte vier Proben mit osteogenem Differenzierungsmedium, 1-4 sind jeweils die gleichen Ansätze.

Es zeigen sich unterschiedliche Kontraktionsgrade mit tendenziell etwas stärkerer Kontraktion in den osteogen stimulierten Proben.

Nach Kultivierungszeiten von bis zu 35 Tagen wurden die Zellen in den Paraffinschnitten mit den beschriebenen Methoden untersucht. In der Beurteilung erscheint es sinnvoller Aufnahmen mit übersichtlicheren Einstellungen zu wählen. Auch einfaches Einscannen der Objektträger (hier nicht gezeigt) reicht aus, um die Proben zu vergleichen. In einigen Schnitten sind die Zellen nicht sehr homogen verteilt, sodass hier auch nur einzelne Orte vermehrter Zellanreicherungen verglichen wurden.

Wie bei der zweidimensionalen Zellkultur ließen sich Phosphatkristalle auch in Schnitten Paraffin-eingebetteter Kollagengele mit osteogen differenzierten Zellen mit Alizarin-Rot anfärben. Schon bei geringer Vergrößerung gewinnt man einen guten Eindruck von der Intensität der Färbung (Abb. 15A). Durch Inkubation demaskierter Schnitte mit spezifischen Antikörpern, wie z.B. gegen FGF23, lässt sich die osteogene Differenzierung auch auf Proteinebene nachweisen (Abb. 15B).



**Abb. 15: Färbungen von Paraffinschnitten aus 3D-Kollagenzellkulturen mit MSC 904  
10 x Vergrößerung**

- A) MSC 904 3D Tag 34. Kontrolle und osteogene Differenzierung, Alizarinrotfärbung, deutliche Kristallanreicherung in der osteogen stimulierten Probe  
 B) MSC 904 3D Tag 34. Kontrolle und osteogene Differenzierung, humaner FGF23-Antikörper, deutliche Überexpression in der osteogen stimulierten Probe

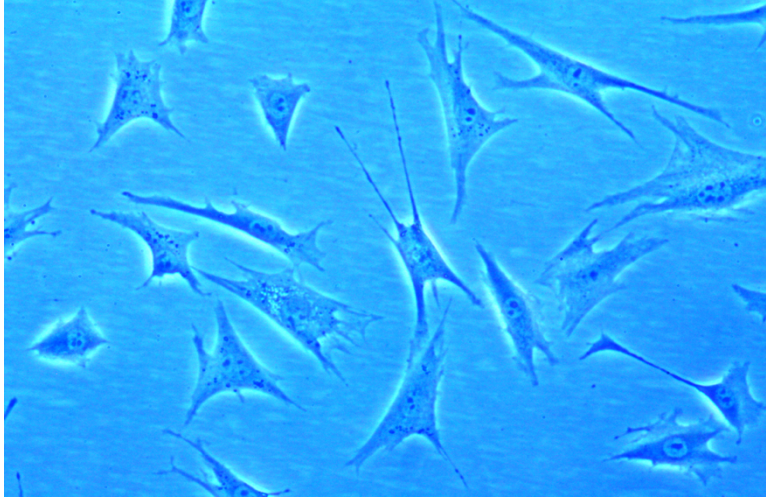
Des Weiteren kann die Expression des Proteins Sklerostin nach 35 Tagen Kultivierung mit Kontrollmedium nachgewiesen werden. Mit den osteogenen Stimulationsmedien zeigt sich hingegen keine positive Anfärbung von SOST. DMP1 kann in den Paraffinschnitten sowohl im Kontrollmedium als auch mit osteogenem Stimulationsmedium nicht nachgewiesen werden.

### **3.1.2. MLO-A5 und MLO-Y4 in 2D-Kultur**

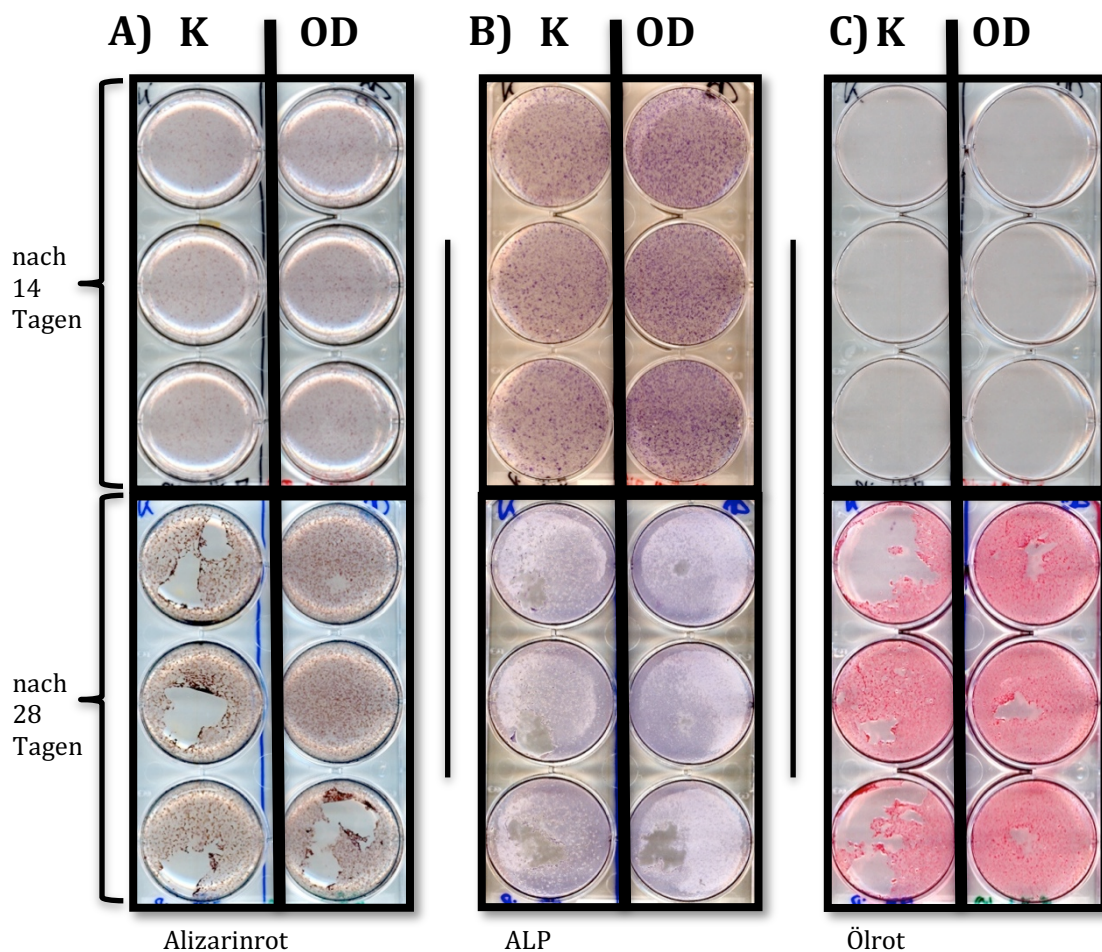
Die Kultivierung der beiden murinen Zelllinien MLO-A5 und MLO-Y4 war bisher in der Arbeitsgruppe nicht etabliert. Daher wurden zunächst die optimalen Bedingungen hinsichtlich der verwendeten Medien und der Vereinzelnung der Zellen ermittelt. Neben den von Dr. Lynda Bonewald empfohlenen Kulturbedingungen, wurde auch getestet, ob das üblicherweise zur Kultivierung der humanen mesenchymalen Stammzellen verwendete Medium geeignet ist. Es ergab sich jedoch kein entscheidender Vorteil durch Änderung der etablierten Kulturmedien. Daher wurden fortan die Protokolle von Frau Dr. Bonewald's Arbeitsgruppe als Arbeitsgrundlage verwendet. (Kato et al. 1997, Kato et al. 2001, Rosser et al. 2012)



In der 2D-Kultur zeigten die Zellen die für Osteozyten typischen Fortsätze (Abb. 16). Für ein adhärentes Wachstum war es unerlässlich, die Kulturgefäße zunächst mit Kollagen zu beschichten. Dies ist für die Kultivierung mit hMSC nicht erforderlich. Zur näheren Charakterisierung und zum direkten Vergleich mit hMSC wurden auch die murinen Zelllinien differenziert.



**Abb. 16: MLO-Y4 in 2D-Kultur, Ausbildung von Dendriten**



**Abb. 17: MLO-Y4 Osteogene Differenzierung**

Jeweils linke drei Wells: Kontrolle (K); rechte drei Wells osteogene Differenzierung (OD) mit Ascorbatphosphat und  $\beta$ -Glycerophosphat

A) Alizarinrot: nach 14 Tagen negativ, nach 28 Tagen leicht positiv

B) ALP: nach 14 Tagen vermehrt durch Stimulation, nach 28 Tagen beide stärker positiv

C) Ölrot: nach 14 Tagen negativ, nach 28 Tagen positiv

Anmerkung: nach 28 Tagen hatten sich bereits größere Teile abgelöst, sodass auf längere Kultivierungszeiten verzichtet wurde.

Die Zellen wurden in Kollagen-beschichteten Sixwell-Platten kultiviert. Es zeigt sich im Vergleich zu hMSC eine etwas höhere Tendenz zur Ablösung. Es wäre wohl nicht möglich gewesen, sie länger als vier Wochen auf den kleinen Flächen zu kultivieren, da sich bereits nach 28 Tagen große Bereiche abgelöst hatten, sodass wir auf längere Kultivierungen verzichteten.

Man kann erkennen, dass MLO-Y4-Zellen in der Alizarinrotfärbung Mineralkristalle bilden, die nach 14 Tagen nur geringgradig positiv sind und sich

dann nach 28 Tagen durch die Färbung deutlich positiv hervorheben. Dabei scheint es kaum einen Unterschied zwischen Kontrollmedium und Differenzierung mit osteogenen Differenzierungsfaktoren zu geben. ALP-Färbungen zeigen sich wie bei den hMSC durchgängig positiv mit geringgradig stärkerer Anfärbung der osteogen stimulierten Proben.

Es wurde zusätzlich eine Ölrotfärbung durchgeführt, dabei sind nach 14 Tagen keine Fettvakuolen sichtbar. Nach 28 Tagen in Kultur erscheint dann jedoch eine deutliche Anfärbung von Fettvakuolen.

### **3.2. MLO-A5 und MLO-Y4 im 3D-Kultursystem**

#### **3.2.1. Optimierung der Zellzahl in den 3D-Gelen**

Basierend auf den in der 3D-Kultur mit hMSC gewonnenen Erkenntnissen, wurden auch die beiden murinen Zelllinien für eine 3D-Kultur in Kollagengel eingebettet.

Dabei muss berücksichtigt werden, dass diese Zellen im Gegensatz zu den hMSC keinen engen Kontakt tolerieren (Rosser et al. 2012), sie stehen *in vivo* nicht mit ihren Zellkörpern, sondern mit Zellfortsätzen bzw. Dendriten in Kontakt, vergleichbar mit dem Netzwerk von Nervenzellen. Diese Besonderheit erforderte für den 3D-Versuchsaufbau die Entwicklung einer passenden Zelldichte. Es wurden drei verschiedene Zelldichten getestet und nach morphologischen Kriterien verglichen.

Das optimale Zell-Kollagen-Verhältnis sollte berücksichtigen, dass die Zellen in ausreichend Abstand zueinanderstehen, damit ihre Zellkörper keinen Kontakt zueinander haben. Sie sollten aber auch nicht zu weit voneinander entfernt stehen, sodass ein Kontakt durch Bildung von Dendriten potenziell möglich sein könnte.



$10^5$  Zellen / ml

$10^6$  Zellen / ml

$0.8 \times 10^7$  Zellen / ml

**Abb. 18: MLO-Y4 in 3D-Kollagengelen mit unterschiedlichen Zelldichten**

Nach zwei Tagen Kultivierung. Lichtmikroskopische Vergrößerung mit 20x. Die Farbsättigung wurde aus den Bildern herausgenommen und der Kontrast verstärkt, um die Zellen besser sichtbar zu machen.

Es zeigt sich im Vergleich der getesteten Zelldichten  $10^5$ ,  $10^6$  und knapp  $10^7$  Zellen / ml in den lichtmikroskopischen Beobachtungen der Zellen in Kultur folgende Ergebnisse:

Bei  $10^5$  Zellen / ml ist es relativ schwierig, überhaupt Zellen zu finden. Sie sind sehr weit voneinander entfernt. In der mittleren Dichte mit  $10^6$  Zellen / ml kann eine durchgehende Ausbildung von Fortsätzen beobachtet werden. Die Zellen haben dabei genug Nähe, um potenziell Kontakte über dendritische Prozesse zu knüpfen. In der höchsten verwendeten Dichte stehen die Zellen so nah beieinander, dass sich ihre Zellkörper berühren und kaum mehr Dendriten ausbildeten. Die Zellen verharren in einer kugeligen Formation. Dies bleibt auch im Verlauf mehrtägiger Kultivierung mit bis zu 21 Tagen bestehen; die Zellverteilungen und Morphologien bleiben über den gesamten Kultivierungszeitraum konstant. Es wurde fortan die mittlere Zelldichte von  $10^6$  Zellen / ml verwendet.

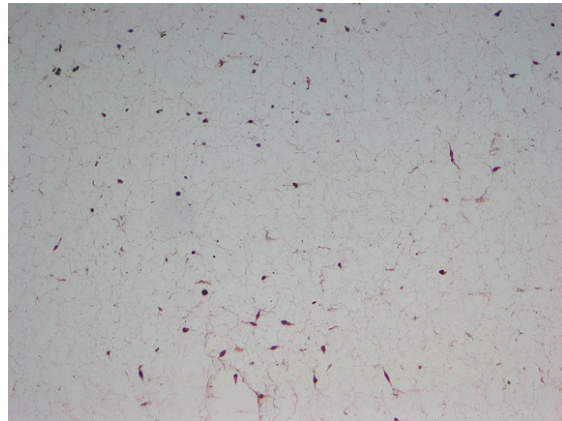
In den Paraffinschnitten der Gele zeigt sich im Gegensatz zu den Beobachtungen in Kultur, dass die von uns initial als „optimal“ ermittelte Zelldichte von  $10^6$  / ml in den Aufnahmen der Zellkulturen zwar recht dicht erscheint, in den Paraffinschnitten sind die Zellen aber wiederum wesentlich weiter entfernt und erschweren die Auswertungen (s. Abb. 19).

In einer später angelegten und eher zufällig durchgeführten Probe mit ca.  $2 \times 10^6$  Zellen / ml mit MLO-Y4 zeigen sich die Zellen in der Kultur in einem scheinbar

noch etwas besseren Dichteverhältnis. Im Paraffinschnitt stehen die Zellen jedoch trotzdem noch relativ weit auseinander (Abb 19).



In Kultur

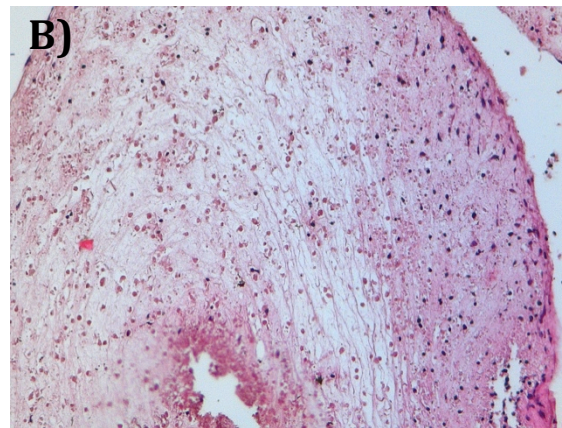
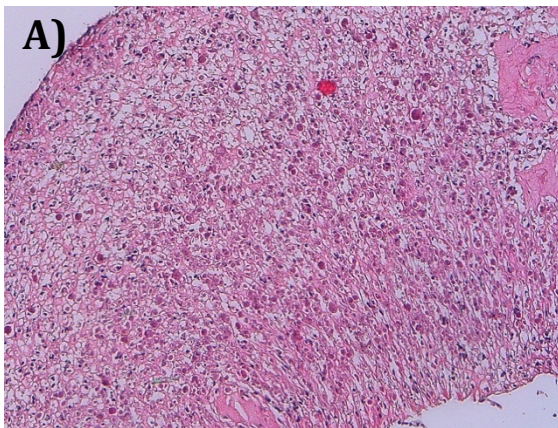


Paraffinschnitt mit Alizarinrotfärbung

**Abb. 19: MLO-Y4 in 3D-Kollagengel mit ca.  $2 \times 10^6$  / ml**

Etwas dichtere Verteilung der Zellen mit Dendritenausbildung, im Paraffinschnitt rechts trotzdem weitläufigere Verteilung.

**3.2.2. Zellverteilung in den 3D-Kollagengelen**

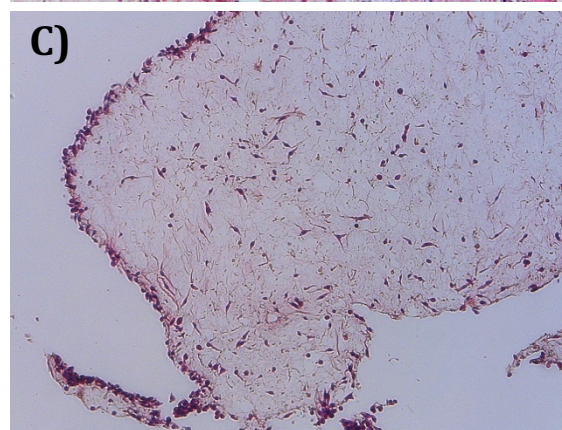


**Abb. 20: Zellverteilung im 3D-Kollagengel**  
Paraffinschnitte, H.E.-Färbung

A) hMSC: homogene, dichte Zellverteilung; homogene Färbung; Zelldichte:  $1 \times 10^7$  / ml

B) MLO-A5: homogene Verteilung der Zellkerne, Zellen weiter entfernt; inhomogene Anfärbung mit Bevorzugung der peripheren Bereiche; Zelldichte:  $2 \times 10^6$  / ml

C) MLO-Y4: zentrale weit verstreute Zellen, periphere Verdichtung der Zellen, inhomogene und nur leichte Färbung; Zelldichte:  $1 \times 10^6$  / ml

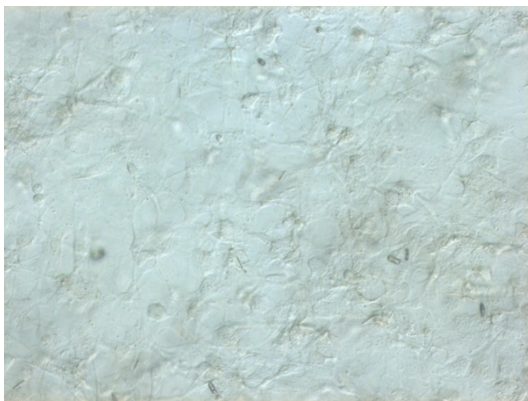


Die Verteilung der verschiedenen Zelltypen wurde in HE-gefärbten Paraffinschnitten der drei verwendeten Zellarten in den 3D-Gelen analysiert. Bei hMSC und MLO-A5 sind die Zellen relativ homogen über den gesamten Schnittbereich verteilt. Bei beiden Zellarten kontrahierten sich die Gele. hMSC verteilen sich dichter im Gel und sowohl die Zellen als auch die Gele werden mit H.E. homogen und kräftig angefärbt. MLO-A5-Zellen liegen etwas weiter entfernt im Gel. Die Färbung erfolgt insgesamt weniger kräftig und lässt die Randbereiche der Gele etwas intensiver erscheinen als die Gelzentren.

Die Verteilung der MLO-A4-Zellen im Kollagengel erfolgt wesentlich ungleichmäßiger und weiter entfernt voneinander, die Gele kontrahieren sich nicht. Auffällig war zudem eine dichte und palisadenförmige Anordnung der Zellen am Randbereich (s. Abb. 20).

### 3.2.3. Vitalität und Dendritenbildung

MLO-A5 und MLO-Y4 zeigten in der 3D-Kultur bereits nach kurzer Zeit einen Farbumschlag des Mediums von Rot nach Gelb als Zeichen für Vitalität und Verbrauch der Nährstoffe, s. Abb. 23. Innerhalb kurzer Zeit bzw. weniger Tage beginnen die Zellen, Dendriten in alle drei Ebenen auszubilden. Bei MLO-A5 erscheint das Dendritennetzwerk in der Übersicht gröber, weniger filigran und weniger gut strukturell abzugrenzen, als bei MLO-Y4.



MLO-A5  $2 \times 10^6$  Zellen /



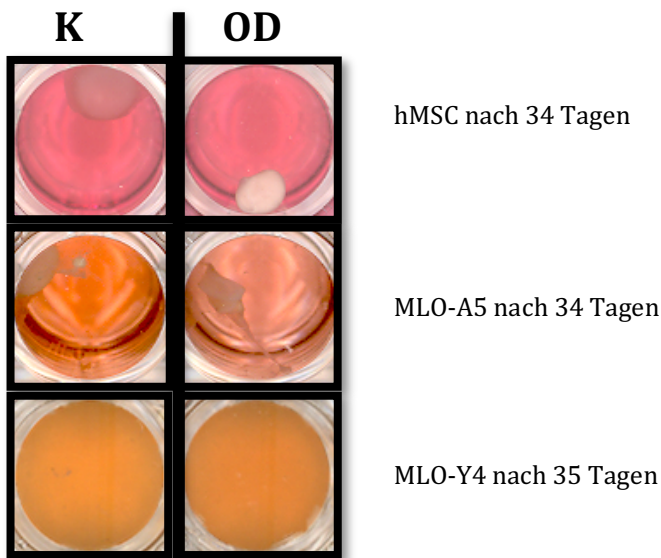
MLO-Y4 ca.  $2 \times 10^6$  Zellen / ml

**Abb. 21: Lichtmikroskopische Aufnahmen von MLO-A5 und MLO-Y4 am Tag 1 der 3D-Kultivierung, 20 x Vergrößerung.**

Das Dendritennetzwerk von MLO-A5 erscheint etwas gröber und weniger filigran als bei MLO-Y4.

### 3.2.4. Kontraktion der Gele – keine Gelkontraktion bei MLO-Y4

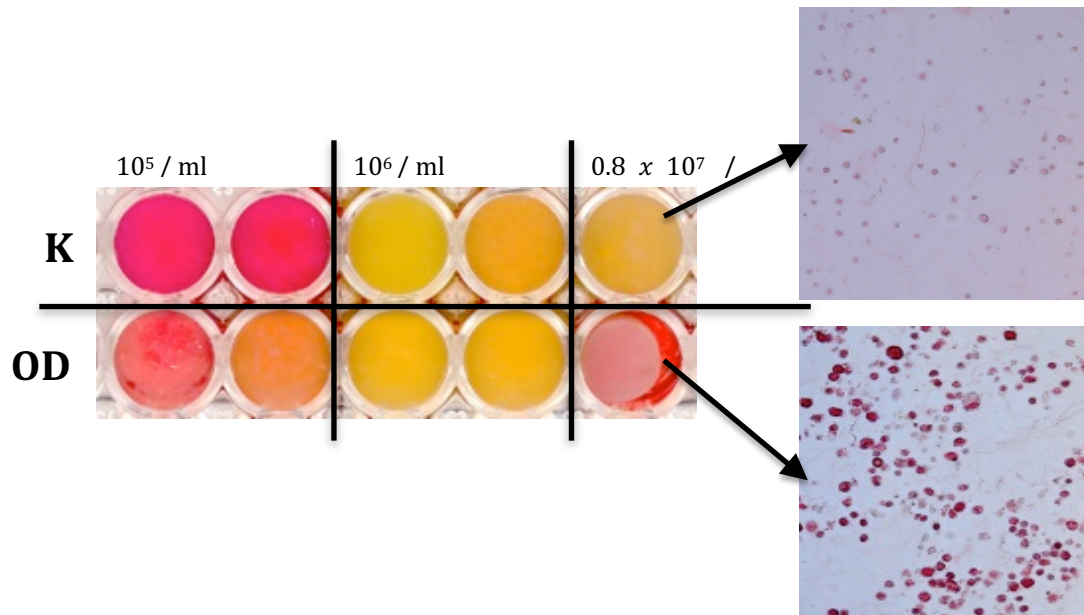
Gele, in denen MLO-A5 eingebettet sind, kontrahieren sich, wie die MSC auch, nach einigen Tagen in Kultur. Die Gele werden kleiner, erscheinen dann dichter und sind folglich schlechter lichtmikroskopisch zu bewerten, da das Licht nicht mehr ausreichend durch das Gel dringen kann. Dementsprechend sind auch in den Paraffinschnitten die Zellen dichter verteilt. Im direkten Vergleich sind MLO-A5 lediglich etwas weniger dicht und kompakt und erscheinen insgesamt etwas lockerer und fragiler.



**Abb. 22: Unterschiedliches Kontraktionsverhalten von hMSC, MLO-A5 und MLO-Y4 in 3D-Kollagengelen** jeweils links Kontrolle, rechts Osteogene Differenzierung

Anders allerdings erfolgt es in Gelen, in denen MLO-Y4 eingebettet sind. Dort zeigt sich auch bei langer Kultivierung mit bis zu 35 Tagen keine Kontraktion, die Zellen können somit die ganze Zeit über lichtmikroskopisch beurteilt werden. In den Paraffinschnitten sind die Zellen weiter verteilt und weniger verdichtet als in den nicht kontrahierten Gelen.

In den Kulturen mit unterschiedlichen Zelldichten von MLO-Y4 zeigt sich lediglich bei einer einzigen Probe mit einer Zelldichte von annähernd  $0,8 \times 10^7$  Zellen / ml und mit Zugabe der osteogenen Stimulationsfaktoren eine Kontraktion des Gels (s. Abb. 23).



**Abb. 23: Verschiedene Zelldichten von MLO-Y4 in 3D-Zellkulturen**

Kontrolle (K); Osteogene Differenzierung (OD) mit Ascorbatphosphat und  $\beta$ -Glycerophosphat

Links: Makroskopische Ansicht nach 16 Tagen in Kultur, verschiedene Zelldichten. Unterschiedliche Färbung der Medien. Mit den höheren Zelldichten erscheinen die Medien heller, was auf einen höheren Umsatz der Nährlösung deuten kann. Kontraktion der osteogen stimulierten Probe mit einer Zelldichte von  $0,8 \times 10^7$ .

Rechts: Alizarinrot S der Paraffinschnitte nach 28 Tagen in  $20 \times$  Vergrößerung bei einer Zelldichte von  $0,8 \times 10^7$  Zellen / ml. Mit osteogener Stimulation deutliche Anreicherung von Mineralisation.

Im Paraffinschnitt dieser osteogen differenzierten Probe zeigt sich zudem nebenbefundlich nach 36 Tagen Kultur eine Anfärbung der Zellkörper mit Alizarinrot S im Gegensatz zur Kontrolle.

### 3.2.5. mRNA-Expressionsanalyse von MLO-A5 und MLO-Y4 nach osteogener Differenzierung

Für PCR-Analysen mit den murinen Zelllinien mussten Spezies-spezifische Sequenzunterschiede der zu analysierenden Gene im Vergleich zu mRNA-Expressionsanalysen mit humanen MSC beachtet werden. Daher konnten etablierte Primer und PCR-Bedingungen nicht einfach übernommen werden, sondern mussten zunächst experimentell ermittelt werden.

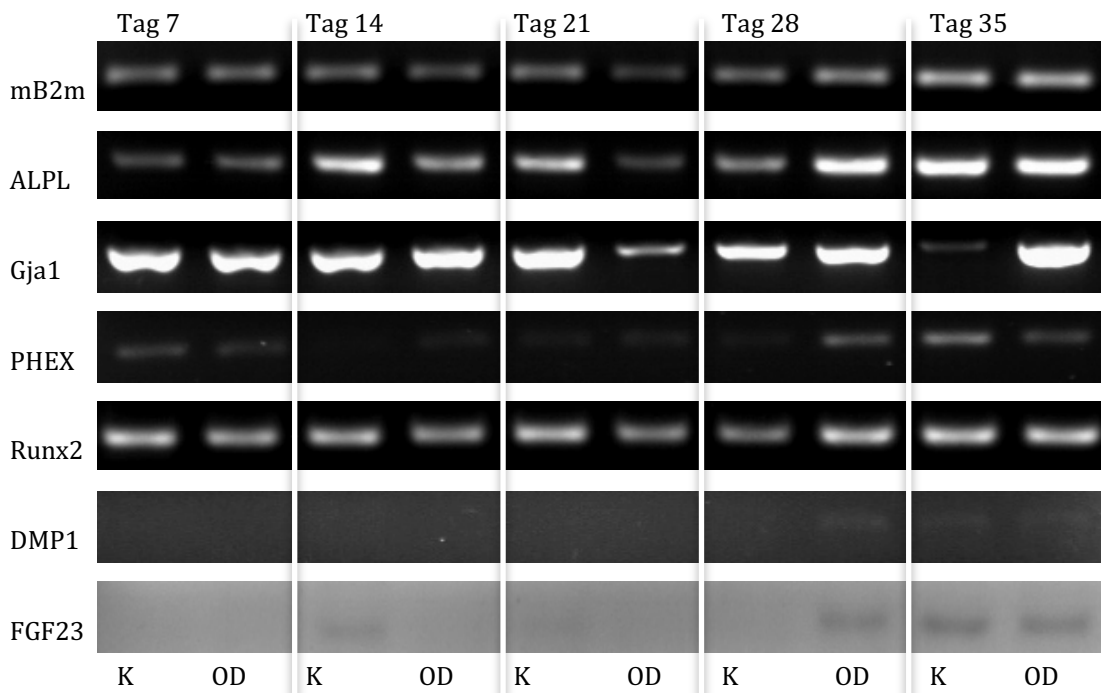
Die Ausbeute an RNA, die man nach Kollagenase-Verdau aus den freigesetzten Zellen isolieren kann, ist so gering, dass Verluste für eine exakte Konzentrationsbestimmung nicht hinnehmbar waren, sodass darauf verzichtet



und die Expressionslevel der analysierten Gene auf ein Housekeeping-Gen normiert wurden.

MLO-A5 und MLO-Y4 wurden nach osteogener Stimulation zu fünf verschiedenen Zeitpunkten untersucht (7, 14, 21, 28, 35 Tage).

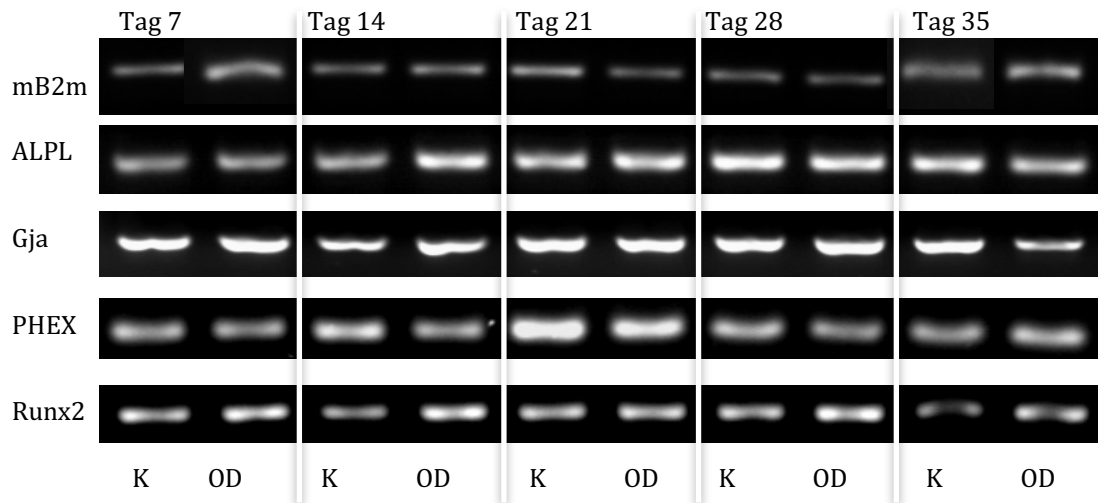
Für MLO-A5 zeigt sich in einem einmalig durchgeführten Versuch eine relativ stabile Expression von ALPL, Gja1 und Runx2 über bis zu 35 Tage lang. PHEX wird anfangs schwach exprimiert, ist an Tag 14 und 21 nicht nachweisbar und ist erst an Tag 28 und 35 wieder verstärkt sichtbar. DMP1 und FGF23 werden erst ab Tag 28 exprimiert. Deutliche Unterschiede zwischen osteogener Stimulation und Kontrolle zeigten sich bei den untersuchten Markern nicht.



**Abb. 24: mRNA-Expressionsanalyse von MLO-A5 nach osteogener Differenzierung in 3D-Kollagengelen.** Amplifikation von ALPL, Gja1, PHEX, Runx2, DMP1 und FGF23 nach 7, 14, 21, 28 und 35 Tagen. mB2m wurde als Referenzgen amplifiziert. K = unstimulierte Kontrolle, OD = osteogen differenziert.

Der gleiche Versuchsaufbau wurde mit MLO-Y4 in 3D-Kultur durchgeführt. Dort zeigt sich über die gesamte Kultivierungszeit eine relativ stabile Expression von ALPL, Gja1, PHEX und Runx2. Auch hier ergeben sich keine deutlichen Unterschiede mit dem osteogenen Stimulationsmedium im Vergleich zu der

Kontrolle. DMP1, FGF23 und SOST können nicht nachgewiesen werden.

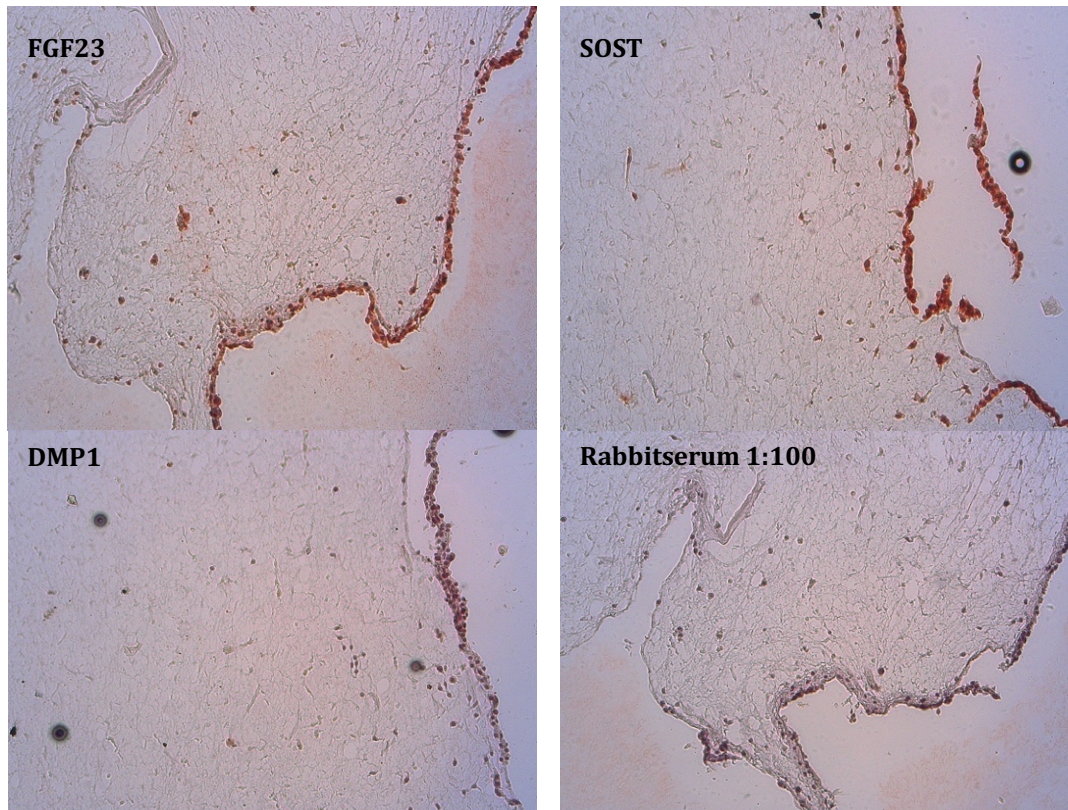


**Abb. 25: mRNA-Expressionsanalyse von MLO-Y4 nach osteogener Differenzierung in 3D-Kollagengelen.** Amplifikation von ALPL, Gja, PHEX, und Runx2 nach 7, 14, 21, 28 und 35 Tagen. mB2m wurde als Referenzgen amplifiziert, K = unstimulierte Kontrolle, OD = osteogen differenziert.

### 3.2.6. Analyse auf Proteinebene von MLO-A5 und MLO-Y4 mittels immunhistologischer Methoden nach osteogener Differenzierung

Zur Analyse auf Proteinebene wurden die Paraffinschnitte der 3D-Gele mit unterschiedlichen Antikörpern gefärbt und verglichen. MLO-A5 und MLO-Y4 wurden 28 bzw. 35 Tage lang in 3D kultiviert und mit osteogenem Differenzierungsmedium stimuliert.

Die fertigen Schnitte von MLO-A5 und MLO-Y4 können sowohl mikroskopisch als auch makroskopisch nicht immer auf den ersten Blick optimal ausgewertet werden, da die Zellen meist zu weit auseinander verteilt sind und somit vor allem der bei den hMSC bereits makroskopisch sehr leicht durchzuführende Vergleich hier nicht mehr anzuwenden ist. Es wurden meist die gesamten Gele lichtmikroskopisch untersucht und einzelne Gebiete innerhalb der Gele mit dichteren Zellverbänden herangenommen, um diese dann mit den anderen Proben zu vergleichen s. Abb. 26.



**Abb. 26: Beispiele immunhistologischer Färbungen von 3D-Kollagengelparaffinschnitten**  
 Paraffinschnitte von 3D-Gelen mit MLO-Y4 nach 35 Tagen Kultivierung mit Kontrollmedium.  
 Es wurden die Bereiche mit dichteren Zellhaufen zum Vergleich genommen.  
 FGF23 und SOST sind positiv gefärbt, DMP1 und Rabbitserum negativ.  
 Rabbitserum 1:100 dient als Kontrolle, um die Hintergrundaktivität der Färbung zu kontrollieren.

Um die Auswertungen übersichtlich darzustellen, werden in Tabelle 3 und 4 die Anfärbungen nach Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern miteinander verglichen. Positiv bedeutet dabei eine deutliche Anfärbung, schwach positiv, dass lediglich eine geringgradige Anfärbung erkennbar ist, negativ bedeutet keine Anfärbung in allen Bereichen.

<b>Antikörper</b>	<b>7 Tage</b>	<b>15 Tage</b>	<b>21 Tage</b>	<b>28 Tage</b>
	<b>K/OD</b>	<b>K/OD</b>	<b>K/OD</b>	<b>K/OD</b>
DMP1	-/-	-/-	-/-	-/-
SOST	(+)/+	+/+	+/+	(+)/+
FGF23	+/+	+/+	+/(+)	+/+

**Tabelle 3: Untersuchung der Antikörper auf Proteinebene mittels immunhistologischer Färbung von MLO-A5 in 3D-Kultur nach osteogener Differenzierung.**

- : negativ -> keine Anfärbung

+ : positiv -> deutliche Anfärbung

(+) : schwach positiv -> leichte Anfärbung

In den 3D-Kulturen mit MLO-A5 und osteogener Differenzierung zeigt sich:

DMP1 kann auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden, ist in der RNA-Expressionsanalyse jedoch nach 35 Tagen positiv. SOST zeigt sich über den gesamten Kultivierungszeitraum auf Proteinebene positiv, kann auf RNA-Ebene allerdings nicht nachgewiesen werden. FGF23 ist auf Proteinebene über den gesamten Zeitraum deutlich positiv angefärbt, auf RNA-Ebene zeigen sich Banden erst ab einem Kultivierungszeitraum von 28 und 35 Tagen. Deutliche Unterschiede zwischen dem Kontrollmedium und osteogener Differenzierung zeigten sich nicht.

In den 3D-Kulturen mit MLO-Y4 und osteogener Differenzierung zeigt sich:

DMP1 kann über den gesamten Zeitraum sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene nicht nachgewiesen werden. SOST kann auf Proteinebene erst nach mindestens 28 Tagen in Kultur nachgewiesen werden, auf RNA-Ebene kann SOST nicht nachgewiesen werden. FGF23 ist nur auf Proteinebene und erst ab 21 Tagen in Kultur nachweisbar, auf RNA-Ebene konnte es nicht nachgewiesen werden. In einigen Paraffinschnitten mit MLO-Y4 waren die Zellen sehr vereinzelt, sodass hier z.B. als ein schwach positives Ergebnis gewertet wird, wenn lediglich einzelne Zellen mit Anfärbungen nachweisbar sind und keine größeren Zellverbände im Gel vorhanden sind.

Antikörper	7 Tage	15 Tage	21 Tage	28 Tage	35 Tage
	K/OD	K/OD	K/OD	K/OD	K/OD
DMP1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
SOST	-/-	-/-	-/-	-/+	+/+
FGF23	-/-	-/-	(+)/(+)	(+)/(+)	+/+

**Tabelle 4: Analyse von MLO-Y4 in 3D-Kultur nach osteogener Differenzierung auf Proteinebene mittels immunhistologischer Färbungen der Paraffinschnitte**

- : negativ -> keine Anfärbung

+ : positiv -> deutliche Anfärbung

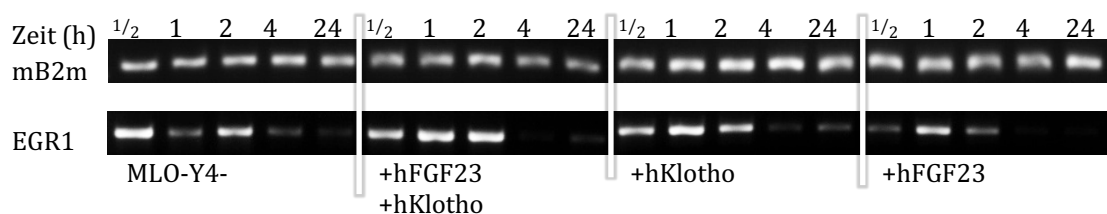
(+) : schwach positiv -> leichte Anfärbung

### 3.3. Osteogene Differenzierung von MLO-A5 und MLO-Y4 unter Einfluss von FGF23 und Klotho

#### 3.3.1. Validierung der Signaltransduktion

Es wird mittels des responsiven Gens EGR1 überprüft, ob mit dem von uns verwendeten FGF23 und Klotho die FGFR1-Signalkette in MLO-Y4 aktiviert werden kann.

In einem ersten Versuchsaufbau wird das humane FGF23 und das humane Klotho als sekretierte Form aus Zellüberständen verwendet (s. Absatz 2.1.8.4 und 2.2.9.3). Es zeigt sich sowohl durch Zugabe beider Zellüberstände als auch nur durch Zugabe von Klotho eine erhöhte Expression von EGR1 nach den Zeitwerten  $1/2$  h, 1 h und 2 h. Nur durch Zugabe von FGF23 zeigt sich eine erhöhte Expression nach 1 h. Im Kontrollmedium zeigt sich jedoch auch im  $1/2$  h und 2 h Wert eine erhöhte Expression.



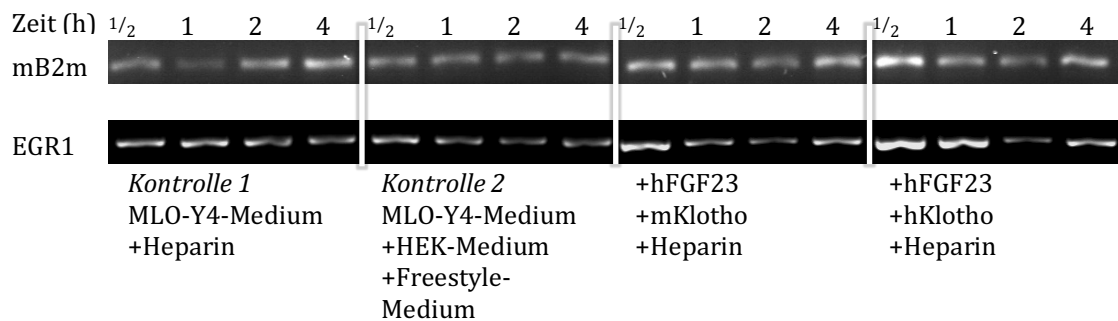
**Abb. 27: mRNA-Genexpressionsanalyse von mit humanem FGF23 und Klotho stimulierten MLO-Y4 in 2D-Zellkultur zur Überprüfung des FGFR1-Signalings**

hFGF23: humanes FGF23 als sekretierte Form aus überexprimierenden Zellen

hKlotho: humanes Klotho als sekretierte Form aus überexprimierende Zellen

Es wurde eine Wiederholung des Versuchs mit ähnlichem Aufbau durchgeführt. Die Stimulanzien wurden um eine Probe mit Klotho murinen Ursprungs in der Full-length-Form von Klotho (mKlotho) ergänzt.

Es werden zwei Kontrollgruppen verwendet: Als erste eine mit dem normalen Zellmedium, als zweite zusätzlich HEK- und Freestylemedium, welche die verwendeten Medien der Zellen sind, die humanes Klotho und FGF23 überexprimieren. Es zeigt sich nun eine deutliche Expression von EGR1 im  $1/2$  h-Wert (murines Full-length-Klotho + humanes sekretiertes FGF23), sowie im  $1/2$  und 1 h-Wert (humanes sekretiertes FGF23 und humanes sekretiertes Klotho). In beiden Kontrollen bleibt EGR1 durchgehend negativ. Man kann daher von einer ausreichenden Aktivierung der Signalkaskade ausgehen sowohl durch Zugabe von humanem FGF23 und Klotho in seinen sekretierten Formen, als auch durch Zugabe von humanem FGF23 und murinem Klotho in seiner Full-length-Form.



**Abb. 28: mRNA-Genexpressionsanalyse von mit humanem FGF23 + humanem Klotho, sowie humanem FGF23 und murinem (Full-length-Form) stimulierten MLO-Y4 in 2D-Zellkultur zur Überprüfung des FGFR1-Signalings**

mKlotho: murines Klotho als Full-length-Form

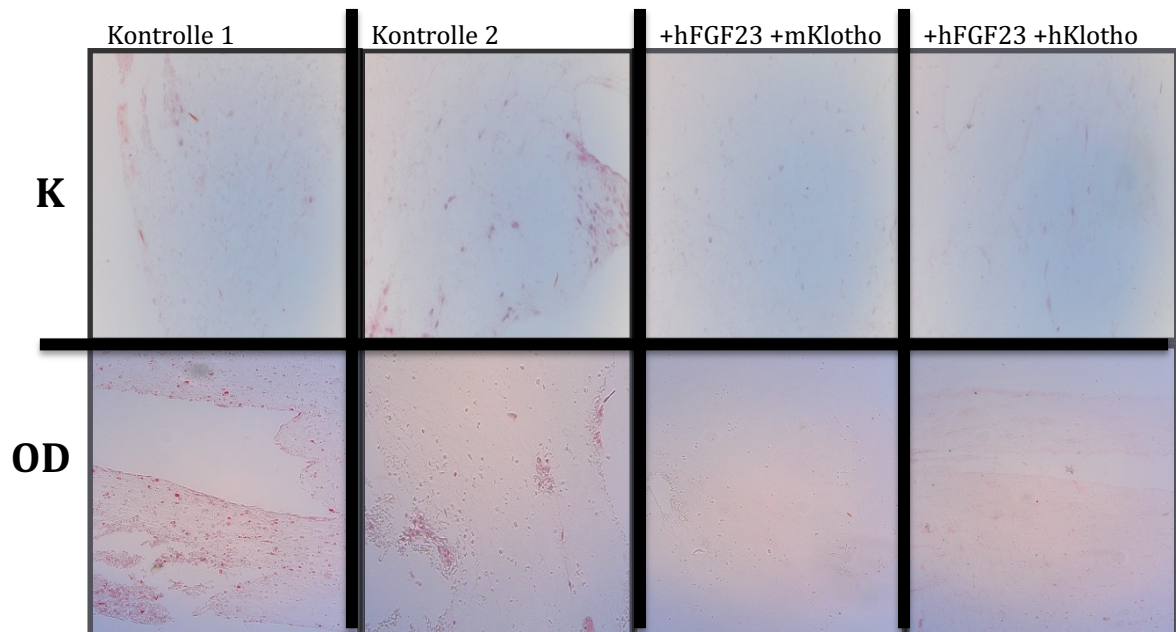
hFGF23: humanes FGF23 als sekretierte Form aus überexprimierenden Zellen

hKlotho: humanes Klotho als sekretierte Form aus überexprimierende Zellen

### 3.3.2. Stimulation mit FGF23 im 3D-Gel

Um die Auswirkungen einer Zugabe von FGF23 und Klotho zu den Zellen in 3D-Kultur zu analysieren, wurde ein Experiment mit osteogener Differenzierung mit Ernte nach 21 Tagen und immunhistologischer Analyse durchgeführt. Verwendet wird hier das FGF23 humanen Ursprungs (sekretierte Form) einmal mit dem Klotho humanen Ursprungs (sekretierte Form) und einmal mit dem murinem Klotho (Full-length Form), s. auch Abschnitt 2.2.9.3.

Dabei zeigt die Alizarinrotfärbung der Proben folgende Ergebnisse: Mit den osteogenen Faktoren, wie auch bei hMSC, wird in den 3D-Gelen mit MLO-A5 eine deutliche Mineralisierung erzeugt. In den Kontrollen ohne Ascorbatphosphat und  $\beta$ -Glycerophosphat ist hingegen keine bzw. nur wenig Mineralisierung sichtbar. Wird den 3D-Gelen FGF23 und Klotho zugegeben, so bilden die Zellen trotz der osteogenen Stimulation keine Mineralkristalle, s. Abb. 29.



**Abb. 29: MLO-A5 in 3D-Kollagengel, 28 Tage, Alizarinrot**

Kontrolle (K): MLO-A5-Differenzierungsmedium

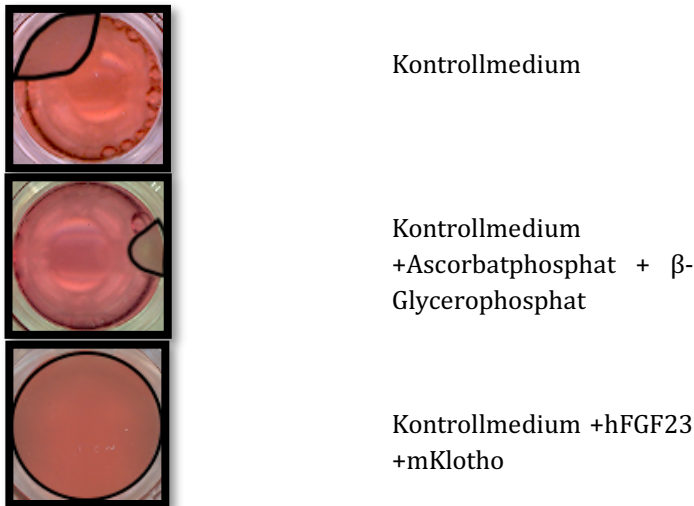
Osteogene Differenzierung (OD): MLO-A5-Differenzierungsmedium mit Ascorbatphosphat und  $\beta$ -Glycerophosphat

Kontrolle 1: MLO-A5-Differenzierungsmedium

Kontrolle 2: +HEK-Medium +Freestyle-Medium

Stimulation mit FGF23 (sekretierte Form) und Klotho (Klotho einmal humanem (sekretiert), einmal murinen (Full-length) Ursprungs)

Auffällig ist zudem, dass einige der osteogen differenzierten Gele deutlich stärker kontrahieren als deren Kontrollen. Die Gele mit Zugabe von FGF23 humanen Ursprungs und Klotho murinen Ursprungs kontrahieren wiederum deutlich weniger.



**Abb. 30: Unterschiedliches Kontraktionsverhalten von MLO-A5 mit osteogenem Differenzierungsmedium und Zugabe von humanem, sekretiertem FGF23 (hFGF23) und murinem Full-length Klotho (mKlotho) nach 20 Tagen in 3D-Kultur**

Zur Verdeutlichung der Ausmaße des Gels wurden diese schwarz umrandet. Stärkere Kontraktion durch Zugabe der osteogenen Differenzierungsmedien, keine Kontraktion durch Zugabe von humanem FGF23 (sekretierte Form) + murinem Klotho (Full-length Form)

In den immunhistologischen Auswertungen der Proben ist FGF23 und SOST meist positiv angefärbt, es zeigen sich keine deutlichen Unterschiede zwischen osteogener Differenzierung sowie Zugabe von FGF23 und Klotho. DMP1 bleibt stets ohne Anfärbung.

Antikörper	Kontrolle K/OD	HEK-Medium Freestyle- Medium K/OD	hFGF23 mKlotho K/OD	hFGF23 hKlotho K/OD
DMP1	-/-	-/-	-/-	-/-
SOST	(+)/+	-/(+)	+/+	+/+
FGF23	-/+	+/+	+/+	+/+

**Tabelle 5: Analyse von MLO-A5 nach 21 Tagen in 3D-Kultur mit osteogener Differenzierung und Stimulation mit FGF23 und Klotho auf Proteinebene mittels immunhistologischer Färbung.**

- : negativ -> keine Anfärbung

+ : positiv -> deutliche Anfärbung

(+) : schwach positiv -> leichte Anfärbung

Für die Studien mit MLO-Y4 wurde eine Zeitreihe mit Ernte nach 7, 14, 21 und 28 Tagen gewählt. FGF23 kann in den meisten Proben auf Proteinebene



nachgewiesen werden. SOST ist ebenso zumeist nachweisbar, für DMP1 kann nur in zwei Kontrollproben eine immunhistologische Anfärbung gesehen werden. Deutliche Unterschiede durch die Gabe von FGF23 und Klotho werden nicht deutlich. Einzig FGF23 scheint durch die Zugabe von humanem FGF23 und humanem Klotho in den Tagen 14, 21 und 28 auf Proteinebene nicht exprimiert zu werden.

Antikörper	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 28
	K1/K2/D1/D2	K1/K2/D1/D2	K1/K2/D1/D2	K1/K2/D1/D2
DMP1	-/-/-/-	-/-/-/-	(+/-/-/-	(+/-/-/-
SOST	+/-/(+)/-	-/(+)/(+)/(+)	-/(+)/(+)/(+)	(+)/(+)/(+)-
FGF23	+/(+)/(+)/(+)	(+)/(+)/(+)-	(+)/(+)/(+)-	(+)/(+)/(+)-

**Tabelle 6: Analyse auf Proteinebene mittels immunhistologischer Färbungen der Paraffinschnitte von MLO-Y4 in 3D-Kultur nach osteogener Differenzierung und Stimulation mit FGF23 und Klotho**

Kontrolle 1 (K1): MLO-Y4-Medium

Kontrolle 2 (K2): +HEK-Medium +Freestyle-Medium

Differenzierung 1 (D1): +hFGF23 +mKlotho

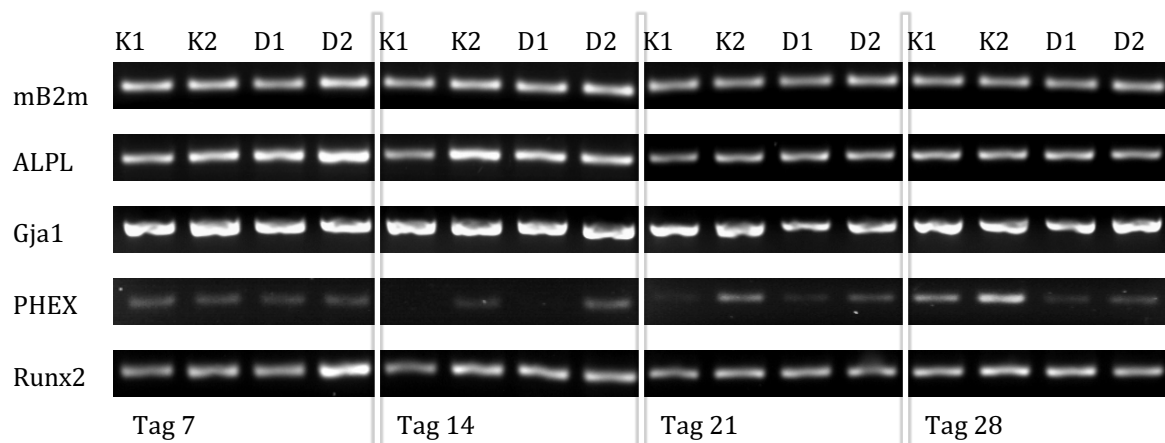
Differenzierung 2 (D2): +hFGF23 +hKlotho

- : negativ -> keine Anfärbung

+ : positiv -> deutliche Anfärbung

(+) : schwach positiv -> leichte Anfärbung

Es wurden zusätzlich Genexpressionsanalysen mittels PCR gemacht. Alle Proben exprimieren relativ stabil über 28 Tage ALPL, Gja1 und Runx2 ohne deutliche Unterschiede durch Zugabe von FGF23 und Klotho. PHEX ist auch in einigen Proben exprimiert, zeigt aber keine solch stabile Expression. Für SOST, DMP1 und FGF23 kann auf dieser Ebene keine Expression nachgewiesen werden.



**Abb. 30: Analyse der MLO-Y4 in 3D-Kollagengelen**

Kontrolle 1 (K1): MLO-Y4-Medium

Kontrolle 2 (K2): +HEK-Medium +Freestyle-Medium

Differenzierung 1 (D1): +hFGF23 +mKlotho

Differenzierung 2 (D2): +hFGF23 +hKlotho

Anmerkung: SOST, DMP1 und FGF23 keine Banden darstellbar

## 4. Diskussion

Die Auswertung der Ergebnisse werde ich in den folgenden Abschnitten diskutieren. Dabei soll ein Hauptaugenmerk auf den Versuchsaufbau und dessen Optimierung gelegt werden. Die Ergebnisse aus den teilweise sehr langen und zeitintensiven Versuchsreihen mit bis zu sechs Wochen erlaubten oft keine ausreichende Validierung durch mehrmalige Wiederholung. Die überwiegend qualitativen Daten sollen Grundlage bieten für künftige Studien mit diesen Systemen, die dann quantitativ ausgewertet werden können. Es soll diskutiert werden, wie ergiebig das System ist und welche Ergebnisse sich in welcher Art lohnen, reproduziert zu werden.

### 4.1. Grundlegende Erfahrungen mit hMSC, MLO-A5 und MLO-Y4

Es wurden für die Arbeitsgruppe wertvolle Erfahrungen mit hMSC und den Zelllinien MLO-A5 und MLO-Y4 gemacht. Voraussetzung für den Bezug von hMSC war der im gleichen Haus stattfindende orthopädisch-klinische OP-Betrieb, der die laufende Bereitstellung von neuen Hüftköpfen sicherte.

Die Zelllinien MLO-A5 und MLO-Y4 wurden von Frau Dr. Bonewald aus den USA gesendet, bei uns eingefroren und standen so in unserem Labor ständig aus leicht zu beziehender Quelle bereit. Die Zellen mussten einen langen Transportweg von den USA nach Deutschland überstehen. Es ist nicht bekannt, ob die Zellen durch den Transport und die Passagen (bis zu 60) trotz Immortalisierung degenerieren können. Diesen Problemen könnte man mit einer selbstständigen Herstellung von Osteozyten/Osteoblasten aus Mäuseknochen begegnen, wie es zum Beispiel von Stern et al. beschrieben wird (Stern et al. 2012). Damit wären allerdings neue Kapazitäten, die Bereitstellung von Mäusen, sowie ein hoher zeitlicher Aufwand verbunden.

MLO-A5 und MLO-Y4 sind die mit am meisten verbreiteten osteozytären Zelllinien, entwickelt von Dr. Lynda Bonewalds Arbeitsgruppe. Mit Austestung der verschiedenen Medien an den Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden, sodass es keinen Anlass gab, von den Protokollen von Kato et al. und Rosser et al. abzuweichen (Kato et al. 1997, Kato et al. 2001, Rosser et al. 2012). Die Medien unterscheiden sich zwar von den bisher in der Arbeitsgruppe

verwendeten, waren aber recht einfach und kostengünstig zu beziehen. Im Allgemeinen kann man sagen, dass der Umgang mit den Zellen mit relativ wenig Aufwand zu bewerkstelligen ist. Lediglich die Kollagenierung der Kulturflaschen stellt sich als sehr zeitaufwändig dar. Eine mögliche Alternative könnte sein, bereits kollagenierte Kulturbehälter zu kaufen, welche allerdings im Anschaffungspreis höher sind als die normalen, unkollagenierten Behältnisse.

#### **4.1.1. Färbungen der Kulturen**

##### **4.1.1.1. hMSC**

MSC werden durch die Zusätze  $\beta$ -Glycerophosphat und Dexamethason zur Mineralisierung und osteogenen Differenzierung angeregt. Dafür sprechen auch die positiven ALP-Färbungen.

Eine Ölrot-O-Färbung hätte noch gemacht werden können, um das Ergebnis mit den MLO-Y4 zu vergleichen.

##### **4.1.1.2. MLO-Y4**

Die Färbungen der MLO-Y4-Zellen in Kultur über zwei und vier Wochen zeigen, dass MLO-Y4 als Zellen der späten Osteoblast-Osteozyt-Transformation kaum mineralisieren. Die Produktion von Mineralkristallen ist eher eine Aufgabe der Osteoblasten, zum Beispiel der MLO-A5-Zellen.

Die Ergebnisse nach vier Wochen könnten für eine gewisse Dedifferenzierung sprechen. Mineralisierung ist hier stärker ausgeprägt. Die Zellen produzieren Fettvakuolen, sichtbar an der nach vier Wochen stärker positiven Ölrot-O-Färbung. Experimente mit MLO-Y4 und einer adipogenen Differenzierung bzw. einer Ölrot-O-Färbung nach osteogener Differenzierung und Ausbildung von Fettvakuolen sind bisher nicht beschrieben, sodass sich hier weitere Untersuchungen lohnen könnten (Abruf pubmed vom 27.04.2019 mit den Stichwörtern „MLO-Y4 oilred“ und „MLO-Y4 adipogenic“ führte zu keinem Suchergebnis).

ALP ist ein Marker für osteogene Differenzierung, wird aber im späten Verlauf nur noch wenig produziert. Dies ist mit den Ergebnissen insofern vereinbar, dass man nach zwei Wochen leichte Expression von ALP feststellt, die nach vier Wochen weiter verstärkt wird. Dies könnte darauf deuten lassen, dass die Zellen einen

Schritt zurück in der Osteoblast-Osteozyt-Transformation in Richtung Osteoblast dedifferenzieren.

Zu berücksichtigen ist dabei, dass die Zellen schon nach einigen Tagen sehr dicht wachsen und dies dann bis zum Endpunkt von vier Wochen beibehalten. Rosser et al. empfehlen, die Zellen bei einer Konfluenz von 60-75 % zu halten, da Osteozyten ihr Verhalten durch zu starke Konfluenz verändern können (Rosser et al. 2012). Der dichte Kontakt, der hier nicht mehr nur durch die Dendriten, sondern in direkter Zellkörpernähe stattfindet könnte den Zellen zu einer veränderten Expression bzw. Dedifferenzierung verhelfen.

Ascorbatphosphat und  $\beta$ -Glycerophosphat erzeugen keine sichtbaren Veränderungen der Zellen im Vergleich mit den Kontrollen ohne diese Zusätze.

Ergänzend wäre noch eine simultane Studie mit MLO-A5, welche aus Zeitgründen im Rahmen dieser Dissertation nicht mehr durchgeführt wurden.

#### **4.1.2. Test des FGF23-Signalings**

Die zwei Versuchsaufbauten, in denen MLO-Y4 mit FGF23 und Klotho stimuliert wurden konnten ausreichend gute Ergebnisse erzielen. Für die Versuche wurden die beiden Stimulanzen extern mit dem Kulturmedium auf die Zellen geben. In unserer Arbeitsgruppe standen große Mengen der Stimulanzen, gewonnen aus humanen Zelllinien zur Verfügung. Die entsprechenden murinen Proteine hätten im Gegensatz dazu mit hohem finanziellem Aufwand dazugekauft werden müssen. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen des humanen und des murinen FGF23, so wird erkennbar, dass beide mit 251 Aminosäuren gleich lang sind. Die Sequenzen stimmen in 70,1 % der Aminosäuren überein. Klotho ist in der humanen Variante 1012 Aminosäuren und in der murinen Variante 1014 Aminosäuren lang. Diese beiden Aminosäuresequenzen stimmen zu 85,5 % miteinander überein. (Anmerkung: Für die Vergleiche wurden die jeweiligen Sequenzen aus der Proteindatenbank des NCBI genommen und mit Hilfe des Programmes LALIGN des Swiss Institute of Bioinformatics verglichen.)

Ob die humanen Proteine an den murinen Zellen trotz der strukturellen Unterschiede die gewünschte Wirkung erzielen können, musste getestet werden. Dazu wurden zwei Testreihen mit MLO-Y4-Zellen und Stimulierung mit FGF23 und

Klotho (und Heparin als Rezeptorstabilisator) vorgenommen. Zusätzlich wurde murines Klotho erworben und zum Vergleich eingesetzt.

Mittels PCR der RNA von EGR1 wurde überprüft, ob der Klotho-abhängige FGF23-Signalweg stimuliert wird. Als Grundlage dienen die Versuche von Urakawa et al., die durch intravenöse Injektion von FGF23 in die Maus eine Erhöhung der Expression von EGR1 innerhalb einer Stunde bzw. einer halben Stunde beobachteten (Urakawa et al. 2006).

Man würde für unsere Studien erwarten, dass in den frühen Zeitwerten (0,5 h; 1 h; 2 h) die Banden von EGR1 signifikant im Vergleich zur Kontrolle verstärkt sind.

In der ersten Testreihe sind allein durch Gabe des Kontrollmediums die Banden von EGR1 im 0,5 h und 2 h - Wert erhöht. Dies ist in den stimulierten Proben auch der Fall, außer bei denen mit alleiniger Gabe von humanem FGF23. Würde man nur die 1 h - Werte miteinander vergleichen, könnte man schon eher dem Schluss nahekommen, dass entweder FGF23 oder Klotho alleine oder beide zusammen die Expression von EGR1 erhöhen. Allerdings dürfte durch alleinige FGF23-Stimulation keine Bande erhöht sein, da der Kofaktor Klotho obligat benötigt wird.

In der zweiten Durchführung haben sich die Ergebnisse besser dargestellt. Wenn man die 1 h - Werte gegenüberstellt, ist EGR1 nur in der Probe Kombination humanes Klotho mit humanem FGF23 und dem zusätzlichen Rezeptorstabilisator Heparin erhöht.

Auf diesen Daten basierend wurden die folgenden Experimente vorgenommen. Es gilt festzustellen, dass mit  $n = 2$  wenig Validität vorhanden ist, um eindeutig sagen zu können, dass die Kombination humanes FGF23 und Klotho an murinen Zellen wirkt. Zu viele Einflussfaktoren bis zur Visualisierung der mRNA-Expression in der Gelelektrophorese können dieses Ergebnis auch zufällig erscheinen lassen. Man sollte also für zukünftige Reproduktionen diese Daten noch einmal endgültig validieren. Dass dies hier nicht schon stattgefunden hat ist vor allem organisatorischen und zeitlichen Hindernissen geschuldet.

## 4.2. 3D-Kollagengele

### 4.2.1. Versuchsaufbau

Osteozyten sind Zellen, die sich *in vivo* im Knochen in drei Ebenen orientieren. Die konventionellen Zellkulturen auf einer Fläche können diese komplexe Gewebearchitektur nicht entsprechend abbilden. Diese These wird bekräftigt durch Ergebnisse, die eine Dedifferenzierung und Nachweise von Adipogenese beschrieben, wenn Osteozyten in 2D kultiviert werden (Ishihara et al. 2012, Torreggiani et al. 2013).

Mittels eines einfach herzustellenden dreidimensionalen Versuchsaufbaus sollte den Zellen eine vertrautere Umgebung mit hauptsächlich aus Kollagen Typ 1 bestehenden Gelen geschaffen werden. Es wurde dabei der Versuchsaufbau von Reichert et al. gewählt, der hMSC in Gele mit hohem Anteil an Kollagen Typ 1 einbettete, um es als Gewebe für den Einsatz im Tissue Engineering zu testen (Reichert et al. 2009). Diese Methode wurde adaptiert, die Zelllinien MLO-A5 und MLO-Y4 benutzt und erfolgreich bis zu 35 Tage kultiviert und analysiert. Das Medium wurde alle ein bis zwei Tage gewechselt, um den Stoffwechsel der Zellen aufrecht zu erhalten. Es wurde angenommen, dass das Medium durch Diffusion alle Zellen innerhalb des Geles erreicht. Ähnliche Aufbauten sind beschrieben, teils auch mit sehr viel komplexeren Konstruktionen (Yoneno et al. 2005).

Boukhechba et al. beschreiben ein System, in dem humane primäre Osteoblasten in biphasischen Calciumphosphat-Keramikpartikeln als Zellkulturträger eingebettet liegen, das von Medium umspült wird. Die Osteoblasten entwickeln sich innerhalb einer Woche ohne Zugabe von Differenzierungsagenzien zu Zellen mit osteozytärem Genexpressionsmuster (Boukhechba et al. 2009). Eine Rekonstruktion dieses Versuchsaufbaus war für uns nicht möglich, da einige der Materialien nicht beziehbar waren.

Ein relativ dynamisches Konstrukt entwickelte eine japanische Arbeitsgruppe. In dem sogenannten „High-Aspect Ratio Vessel“ (HARV), einem Aufbau entwickelt im Rahmen von Gravitationsstudien der NASA, werden Knochenzellen aus den Schädelkalotten von Ratten in Kollagen Typ 1 eingebettet. Die rotierenden Bioreaktoren können ein Umfeld geringer Schwerkraft mit dynamischen

Laminarströmungen erzeugen. Silikonoxygenierungsmembranen verbessern die Gasdiffusion und den Transfer von Nährstoffen. Die produzierten Gewebe sind mit  $2,8 \times 0,25$  cm relativ groß. Es konnte gezeigt werden, dass dadurch Zelldifferenzierung, Osteoblastenmigration und -überleben verbessert werden konnten. Dieser Aufbau eröffnet neue Felder in der Osteozytenforschung, mit dem sich Einflüsse von Flüssigkeitsströmen, Scherkräften und Schwerkraft studieren lassen könnten (Wolf et al. 1991, Schwarz et al. 1992, Nan-Chang Su et al. 2003).

Honma et al. greifen das Problem der Osteozytendifferenzierung auf. In 3D-Modellen ist sie reduziert, findet aber in gewissem Grade immer noch statt (Honma et al. 2013). Die Arbeitsgruppe beschreibt die Einflüsse auf eine 3D-Kollagen-Typ-1-Kultur mit primären Osteozyten durch Zugabe von Matrigel, einer Lösung, die Extrazellulärkomponenten wie Laminin, Kollagen Typ 4 und einige Wachstumsfaktoren enthält. Es verändert nicht nur die Morphologie, sondern auch die Expression osteozytärer Marker. Die Dedifferenzierung, die unter 2D-Konditionen beobachtet wurde, wurde in signifikantem Maße inhibiert. Möglicherweise sind einige der in Matrigel befindlichen Komponenten essenziell für 3D-Kulturen mit nur einer Zelllinie wie z.B. MLO-Y4, wenn man annimmt, dass diese Zellen im physiologischen Setting auf die Produktion extrazellulärer Komponenten durch andere Zellen angewiesen sind.

Als zweiten Zusatz kristallisiert sich für Honma et al. FCS als essenziell heraus. Komplettes Fehlen von FCS in Medium und Kulturmatrix resultierte in morphologischen Abweichungen, die wahrscheinlich durch reduzierte Überlebensfähigkeit hervorgerufen wird. Dabei ergaben unterschiedlich hohe Konzentrationen von FCS keine erheblichen Unterschiede. In unseren Experimenten wurde FCS von vornherein sowohl in der Gelneutralisationslösung, als auch im Kulturmedium verwendet.

Es gilt zu überdenken auch für künftige 3D-Studien mit MLO-Y4 diese Daten zu berücksichtigen und Matrigel hinzuzufügen. Als optimale Zusammensetzung wird in der Veröffentlichung 50 % Matrigel und 0,2 % FCS in einer Kollagen-Typ-1-Matrix vorgeschlagen (Honma et al. 2014).

Herausgehoben werden soll noch eine aktuellere Veröffentlichung einer japanischen Arbeitsgruppe von 2017 (Tanaka et al. 2017). Sie benutzen wie in



dieser Arbeit MLO-Y4 in einer Kollagen-Typ-I-3D-Kultur mit bis zu mehreren Wochen Kultivierungszeit. Dabei wurden die Osteozytenfortsätze im Verlauf gemessen, es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Länge der Fortsätze mit der Länge der Kultivierung.

Der in dieser Arbeit verwendete Aufbau ist relativ einfach zu rekonstruieren. Das dreidimensionale Setting der Knochenzelle wurde als einfaches *in vitro*-Modell hergestellt. Die Vitalität der Zellen wird durch mikroskopische Beobachtung verfolgt. Dabei kommt der Beobachtung zugute, wenn die Gele sich nicht kontrahieren, da sie sonst im dichter werdenden Gel schlechter durchleuchtet werden können. Das Handling mit den Gelen verläuft relativ einfach, einzig die Einbettung der Zellen in das Gel erfordert manuelles und strategisches Geschick. Man sollte versuchen, die Zellen homogen durch vorige Mischung in der Pipette zu verteilen und keine Luftblasen in die Gele zu bringen, da dies spätere Auswertungen erschweren kann.

Nachteile ergeben sich durch die – in einem späteren Abschnitt gesondert diskutierten – erschwerten Auswertungsvorgänge. Die Studienzeiträume sind in den Experimenten recht lange ausgelegt (zwei bis fünf Wochen). Das System ist starr, die mechanischen Einwirkungen, denen der Knochen physiologischerweise ausgesetzt ist, sind nicht berücksichtigt. Man kann zudem die Frage stellen, ob das Medium alle Zellen durch Diffusion erreicht und somit alle Zellen ausreichend ernährt werden können.

#### **4.2.2. Visuelle Analyse des 3D-Zellmodells**

Mit der Lichtmikroskopie stand für die Untersuchungen eine der kostengünstigsten, einfachsten, überall und jederzeit zur Verfügung stehenden Analysemethoden bereit. Es konnte der Verlauf und die Vitalität der Proben visuell beurteilt werden, diese Methode bildet einen unverzichtbaren Bestandteil in der Forschung mit den 3D-Gelen in Kultur. Außerdem konnte sie in der Auswertung der immunhistologischen Schnitte und Färbungen eingesetzt werden.

Allerdings gibt es auch einige Einschränkungen, neben der eingeschränkten Vergrößerungsmöglichkeit im Rahmen der Beugungsgrenze (200 nm). Die Durchleuchtung der 3D-Gele funktionierte gut, solange die Gele nicht kontrahiert

waren, im zunehmenden Kontraktionszustand der Gele konnte das Licht nicht mehr durch das Gel penetrieren.

Mit den herkömmlichen Geräten können nur einzelne Zeitpunkte aufgenommen werden. Dynamische Prozesse können nicht ununterbrochen über längere Zeiträume verfolgt werden, wenn die Proben aus den Brutschränken herausgenommen werden müssen. Es können primär nur zweidimensionale Aufnahmen erfolgen.

Webster et al. und Goggin et al. vergleichen in ihren Übersichtsarbeiten verschiedene Möglichkeiten, Osteozyten in ihrem Umfeld zu erforschen (Webster et al. 2013, Goggin et al. 2016). Grundsätzlich gilt festzustellen, dass es nicht die eine perfekte Lösung gibt. Jedes System birgt seine Vor- und Nachteile und aufgrund unterschiedlicher physikalischer Einschränkungen und einer meist inversen Beziehung zwischen räumlicher Auflösung und maximal möglichem Volumen. Eine Kombination der Verfahren zur kompletten Darstellung des gesamten osteozytären Netzwerkes innerhalb des Kollagengels erscheint sinnvoll. Goggin et al. empfehlen, sowohl Lichtmikroskopie, radiologische und elektronenmikroskopische Technik einzusetzen.

Mit Hilfe spezieller Hard- und Software können lichtmikroskopische Zeitrafferaufnahmen von Mineralisierungen und anderen kinetischen Prozessen gefertigt werden. Die Zellen werden automatisch alle 15 min während der Kultivierung im Brutschrank aufgenommen. Die Bewegungen der Zellkörper und die Ablagerung von Mineralisierung analysiert man mittels Alizarinrotfluoreszierung (Dallas et al. 2009, Dallas et al. 2010). Man könnte dies auch mit 3D-Kulturen ausprobieren, um Bewegungen und Mineralisierung über längere Zeiträume zu studieren. Allerdings ist mit der herkömmlichen Lichtmikroskopie keine dreidimensionale Darstellung möglich und es sind die oben beschriebenen Nachteile und Einschränkungen zu berücksichtigen.

Die *Konfokalmikroskopie* als relativ junges Verfahren kann 3D-Bilder generieren, nachdem die Zellen zum Beispiel mit Fluoreszenz gefärbt wurden. Damit können morphologische Prozesse wie Zellform und -verteilung, Nuclei, Dendritenform

verschiedener Proben verglichen werden (Nan-Chang Su et al. 2003, Honma et al. 2014).

Weitere neue Entwicklungen, wie die *hochauflösende episkopische Mikroskopie* oder die *Lichtscheiben-Mikroskopie* sind in den letzten Jahren vorangebracht worden und sind hoffnungsvolle Anwärter auf neue Einsichten in der osteozytären Forschung (Mohun et al. 2012, Goggin et al. 2016).

Auf Ebene der radiologischen Verfahren steht unter anderen mit der *Mikrocomputertomographie* ( $\mu$ CT) eine Methode bereit, die dreidimensionale Bilder auch in Kultur anfertigen kann. Ein großer Vorteil der Methode ist dabei die hohe Gewebepenetration. Mit Hilfe neuerer Methoden ist es zudem möglich, Voxelgrößen unter 1  $\mu$ m zu erreichen, womit zum Beispiel die Morphologien von Osteozytenlakunen dargestellt werden könnten. Größter Nachteil bezüglich der Darstellung der 3D-Kollagengele dürfte der schlechte Kontrast von Weichteilgewebe sein. (Goggin et al. 2016).

Will man auf noch kleineren Ebenen arbeiten, können mit der *Elektronenmikroskopie* Bilder mit einer Auflösung jenseits des Diffraktionslimits von sichtbarem Licht bei einigen wenigen Hundert Nanometern gezeigt werden. Durchführungen mit 3D-Gelen sind beschrieben (Nan-Chang Su et al. 2003). Dabei müssen allerdings zumeist sehr dünne, fixierte Präparate verwendet werden, sodass die Kulturen nicht weitergeführt werden können. Goggin et al. verwenden die „serial block-face“ Rasterelektronenmikroskopie und glauben, dass diese Methode quantitative 3D-Daten durch Visualisierung der Zellmorphologie, der internen Struktur und Verteilung der Osteozyten innerhalb der Matrix ermöglichen könnte (Goggin et al. 2016).

Mögliche Einschränkungen ergeben sich bei den meisten potenziellen Visualisierungsmaßnahmen durch die örtlichen Voraussetzungen. Technische Apparate müssten in Nähe des Labors stehen um kontinuierliche Kultivierungen niedrigschwellig auswerten zu können. Fixierte Proben könnten allerdings versendet und dann an anderem Ort ausgewertet werden – z.B. im Rahmen von Kooperationen mit Instituten, die in den jeweiligen Bildgebungen erfahren sind. Es sollte dann die Frage diskutiert werden, ob die damit erreichten Daten den

finanziellen, organisatorischen und zeitlichen Aufwand rechtfertigen. Häufige Transporte sind nötig und Studien sollten im Voraus sehr exakt geplant und koordiniert werden.

#### **4.2.3. Gelkontraktion**

Ein mit dem bloßen Auge sichtbares Phänomen ist die Kontraktion der Kollagengele. Je nach Zellart kommt es zu unterschiedlichem Kontraktionsverhalten.

MSC kontrahieren am stärksten. Verstärkt wird dieser Effekt durch osteogene Differenzierung und Mineralisierung. Bei MLO-A5 ist nur eine leichte Kontraktion sichtbar. MLO-Y4 zeigen keinerlei Kontraktion, selbst nach 35 tägiger Kultur behalten die Gele ihre Ursprungsgröße. Lediglich eine MLO-Y4 Probe mit hoher Zelldichte und osteogener Differenzierung kontrahierte. Es könnte sein, dass durch die sehr hohe Zelldichte und die Medienstimuli eine Dedifferenzierung stattfindet.

Reichert et al. beschreiben die Gelkontraktion als eines der Hauptprobleme, die der Aufbau für Vorhaben im Bereich des Tissue Engineering bereitet. Die Gelkontraktion korreliert den Auswertungen zufolge mit Zelldichte, Zellproliferation im Gel, Serum- und Kollagenkonzentration, Gehalt und Länge der Kollagenfasern und den Wachstumsfaktoren, die für die Kultur benutzt werden (Reichert et al. 2009). Nach meinen Ergebnissen könnte die Gelkontraktion zusätzlich von der Zellart abhängig sein, sie korreliert womöglich mit dem Grad der osteogenen Differenzierung. Die Frage stellt sich, ob das Ausmaß der Gelkontraktion abnimmt, je weiter die verwendete Zelle in der Osteoblasten-Osteozytentransformation fortgeschritten ist, mit der Einschränkung, dass MSC in osteogener Differenzierung das Gel noch stärker kontrahieren.

Zur Beobachtung und Erforschung dieses Phänomens könnte in zukünftigen Reproduktionen regelmäßig und systematisch Aufnahmen von den Gelen gemacht werden und das Volumen gemessen werden. Vergleichende Studien mit noch weiteren Zellarten wären denkbar. Außerdem würden die Volumenangaben Grundlage bilden für weitere Datenerhebungen wie z.B. Abstand der Zellen im Gel im Verhältnis zum Gesamtgel im kontrahierten bzw. nicht-kontrahierten Zustand.

Spezielle Gelkontraktionsassays als automatische und quantitative Messmethoden mittels verschiedener Bildprozesstechnologien sind beschrieben (Chen et al. 2013).

#### **4.2.4. Osteogene Differenzierung und FGF23-Stimulation**

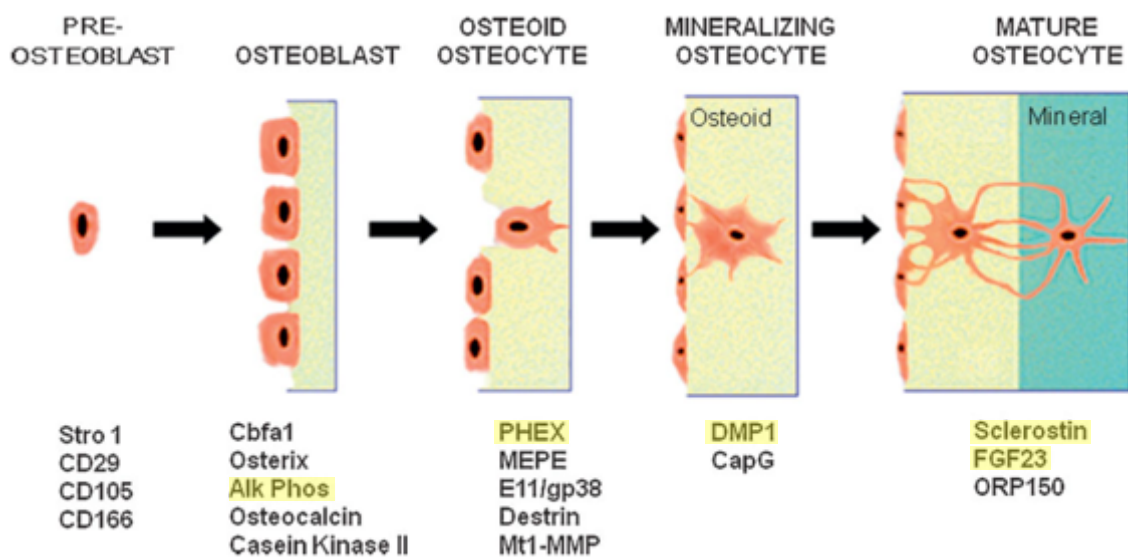
Es wurde untersucht, ob das 3D-Zellsystem für Differenzierungen und zellbiologische Auswertungen geeignet ist. Zunächst wurden MLO-A5 und MLO-Y4 sowie MSC in den Gelen osteogen differenziert. Das bedeutet, dass den Zellen zu ihrem üblichen Kulturmedium Ascorbatphosphat,  $\beta$ -Glycerophosphat und – nur bei den MSC – Dexamethason zugegeben wurde. Siehe hierzu Abschnitt 2.1.8.3. Man erwartet sich von osteogen differenzierten Zellen die Expression osteogener Marker, wie z.B. ALP, Runx2, FGF23. Je nach Grad der Differenzierung fand eine Mineralisierung der Extrazellulärmatrix durch die Zellen statt, bewertet durch Beurteilung der Farbsättigung durch die Alizarinrotfärbung. Bezogen auf die Mineralisierung konnte man bei MSC eine starke Mineralisierung feststellen, auch MLO-A5 mineralisierten gut. MLO-Y4 mineralisierten kaum, was aufgrund der osteozytären Differenzierung so zu erwarten ist. Bei ihnen färbten sich in allen Schnitten hauptsächlich peri- und intrazellulären Bezirke an.

Als nächstes wurde den Zellen zusätzlich zur osteogenen Differenzierung FGF23 und Klotho gegeben. FGF23, das obligatorisch den Kofaktor Klotho benötigt, um am Rezeptor FGFR wirken zu können ist in Abschnitt 1.4 ausführlicher beschrieben. Die Auswirkungen wurden zuerst an MLO-Y4, später an MLO-A5 ausgetestet. Signifikante Muster konnten in den Immunhistologien wie in den PCRs auch über die verschiedenen Zeiträume nicht verfolgt werden. Möglich ist, dass diese Prozesse auf submikroskopischer Ebene stattfinden und schon kleine Veränderungen der molekularen Expression der Osteozyten durch ihr riesiges Netzwerk zu Effekten im Organismus führen.

Ein nachvollziehbares Muster konnte in der Stimulation von MLO-A5 nachvollzogen werden, welche die wahrscheinlich bemerkenswertesten Ergebnisse dieser Studien sind. Es zeigte sich, dass FGF23 die spontane Mineralisierung von MLO-A5 nach drei Wochen Stimulation in den 3D-Gelen inhibierte. Was dieser Prozess für Auswirkungen hat, kann bisher nur vage

formuliert werden. Eine lokale Inhibierung könnte den Stoffwechsel davon abhalten, die Zellen komplett mit Mineralkristallen einzuschließen. Die Kanalikuli der Osteozyten brauchen womöglich Abstand zu der harten und starren Knochenmasse, um den Flüssigkeitsstrom und die Zell-Zellkontakte aufrechterhalten zu können.

Die Expression der verschiedenen Marker in der osteozytären Differenzierung verändert sich in deren Verlauf. Siehe hierzu Abbildung 31.



**Abb. 31: Expression von Markern während der Osteoblasten-Osteozytentransformation.**

Gelb markiert sind die untersuchten Gene.

Modifiziert und mit freundlicher Genehmigung des John Wiley and Sons Verlags, entnommen aus aus (Bonewald 2011)

MLO-A5 und MLO-Y4 unterscheiden sich sowohl in Differenzierung als auch in Genexpression. In Tabelle 7 werden grobe Merkmale und Unterschiede verglichen. Beide Zelllinien stammen aus langen Röhrenknochen von 14 Tage alten Mäusen. Die Zellen sind mittels SV40 T-Antigen-Kontrolle durch einen exprimierten Osteocalcin-Promoters in den Mäusen immortalisiert (Kalajzic et al. 2013). Die Ergebnisse sind bei unseren Daten nicht immer mit den bisher veröffentlichten Daten vereinbar, vergleiche hierzu die Tabellen 5 und 6. DMP1 zum Beispiel ist in immunhistologischen Auswertungen nie positiv exprimiert, was eher darauf zurückzuführen sein könnte, dass ein Problem in der Durchführung oder mit dem Antikörper bestand.

Zell-linie	Prolife- ration	Minera- lisierung	ALP	OC	E11	Cx43	DMP1	SOST	FGF23
MLO-A5	Ja	Ja	+++	+++	++	++	++	+	+
MLO-Y4	Ja	Nein	+/-	++	+++	+++	++	-	+

**Tabelle 7: Eigenschaften der osteozytären Zelllinien MLO-A5 und MLO-Y4, modifiziert aus (Kalajzic et al. 2013)**

Im Folgenden soll im Einzelnen auf die durch die Genexpressionsanalysen untersuchten Gene und deren Bedeutung im klinischen Kontext und in den Experimenten eingegangen werden.

#### **4.2.4.1. Housekeeping-Gen (HG)**

Genexpressionsanalysen mit Hilfe von PCRs benötigen Standardisierungen. HGs sollten unbeachtet der experimentellen Konditionen stets konstitutiv und höchst stabil exprimierte Gene sein. Sie dienen als Referenzwert für Gene, von denen man nicht weiß, wie stark sie in den Proben exprimiert werden. Davon hängt die Zuverlässigkeit und Exaktheit der Auswertung ab.

Es wurde für die murinen Proben **mB2m** verwendet, ein weit verbreitetes HG. Die Expressionen in den Experimenten im 3D-Modell fallen stets unterschiedlich stark aus. Dies ist vor allem auf den Umstand zurückzuführen, dass durch die geringe RNA-Ausbeute aus den 3D-Gelen keine Messung der RNA-Konzentration stattfinden konnte. Dadurch sind die Mengen an synthetisierter cDNA sehr unterschiedlich und alle Genexpressionsanalysen müssen mit den Werten von mB2m in Relation gesetzt werden.

Es muss berücksichtigt werden, dass mB2m in qPCR-Vergleichsstudien von HGs mit Dünndarmproben von Mäusen als recht unzuverlässiges Referenzgen angesehen wird (Wang et al. 2010). Ähnliche Ergebnisse konnten mit MSC von Mäusen bestätigt werden. Andere Gene wie TBP, YWHAZ und GUSB werden als weitaus stabiler angesehen (Ragni et al. 2013). Für MLO-A5 und MLO-Y4 sind keine Studien mit HGs bekannt, oben genannte Daten sollten aber für Reproduktionen berücksichtigt werden.

#### **4.2.4.2. Alkalische Phosphatase**

Es gibt vier humane Isoformen des aktiven Proteins Alkalische Phosphatase, davon drei gewebespezifische in Darm, Plazenta und Keimzellen und eine – in diesem Kontext wichtige - gewebeunspezifische, die in nahezu allen Geweben exprimiert wird (Harris 1990). Sie spaltet das aus dem Energiestoffwechsel anfallende und Zellmembran-gebundene Pyrophosphat und erzeugt Phosphat, das anschließend vom Osteoblasten zusammen mit Calcium als Hydroxylapatit in die Kollagenmatrix eingebaut werden kann. Mutationen im Gen der gewebeunspezifischen Form führen zum seltenen Krankheitsbild der *Hypophosphatasie*. Phosphat fehlt zum Einbau in Knochen und Zahn und das sich akkumulierende anorganische Phosphat erzeugt einen hemmenden Effekt auf die Mineralisierung. Zusätzlich vermitteln Calciumpyrophosphate eine immunologische Zellaktivierung und Entzündung (Whyte et al. 1995, Hessle et al. 2002, Beck et al. 2009).

Je nach Art der Mutation kommt es zu verschiedenen Formen und Ausprägungen vom Tod des Neugeborenen mit kaum existierender skelettaler Mineralisierung bis hin zum Erwachsenen mit lediglich dentaler Symptomatik. Versuche, die Patienten mit intravenösen Infusionen löslicher Alkalischer Phosphatase zu behandeln schlugen bisher fehl, was vermuten ließ, dass für eine effiziente Mineralisierung die gewebeunspezifische Alkalischen Phosphatase auf den Chondrozyten, Osteoblasten und Matrixvesikeln benötigt wird (Whyte et al. 2012). In den PCR-Analysen der Proben wird die Alkalische Phosphatase (ALP) stets hoch exprimiert. Dabei sind keine Veränderungen durch Zugaben von FGF23 oder durch längere Kultivierung in den 3D-Gelen sichtbar.

#### **4.2.4.3. Gja1**

Osteozyten besitzen ein extensives Netzwerk aus langen, dendritenartigen Zellfortsätzen, das sich durch den ganzen Knochen spannt. Connexin 43 (Cx43), das Produkt des Gens *Gja1*, ermöglicht ein funktionelles Synzytium im Knochen. Cx43 - Monomere können als Hemikanäle mit der Extrazellulärmatrix oder in Zell-Zellkontakten als Gap Junctions kommunizieren. Viele Gap Junctions aggregieren zusammen zu einer Plaque mit tausenden von Kanälen und können von < 100 nm



bis zu mehreren  $\mu\text{m}$  im Durchmesser reichen. Sie sind enorm wichtig für die Qualität des Knochens, das Überleben von Osteozyten und für die Kontrolle der Expression wichtiger Osteozytengene, die die osteoklastische und osteoblastische Funktion betreffen. Mäuse, deren Osteoblasten bzw. Osteozyten kein Cx43 synthetisieren, sind vermehrter Osteozytenapoptose, endokortikaler Resorption und periostaler Knochenformation ausgesetzt. Vermutlich kontrolliert Cx43 Osteoklasten- und Osteoblastenaktivität durch Regulation von OPG und Sclerostin. Cx43-Deletion in MLO-Y4 zeigte erhöhte Apoptoseraten und erniedrigte Expression von OPG (Bivi et al. 2012, Buo et al. 2014).

In unseren Experimenten wird Gja1 in MLO-A5 und MLO-Y4 mit wenigen Ausnahmen kontinuierlich stark exprimiert. Eine schwache Expressionsbande von Gja1 in der Kontrolle von MLO-A5 in 3D an Tag 35 ist wohl keinem besonderen Expressionsmuster zuzuschreiben. Sie könnte auf Fehlern in der Methodik der Genexpressionsanalyse und der nur einmalig stattgefundenen Auswertung beruhen. Diese Ergebnisse kann man in die Richtung interpretieren, dass die gewählten Kulturbedingungen der 3D-Zellkultur der Biologie der Osteozyten förderliche Bedingungen vorsehen.

#### **4.2.4.4. Runx2**

Runx2 wird in den Veröffentlichungen als „ d e r Hauptfaktor der osteogenen Transkription“ gedeutet. Den Weg zur osteoblastären Differenzierung ebnet Runx2 als Schlüsselfaktor neben anderen Transkriptionsfaktoren und extrazellulären Signalen und hemmt zugleich die Adipogenese. Für normale Knochenentwicklung werden hohe Runx2-Expressionslevels benötigt, niedrige Level ergeben abnormale Knochenentwicklung. Im Laufe der osteogenen Differenzierung wird Runx2 allmählich hochreguliert. Jedoch ist der Faktor im späten Stadium der Osteoblastendifferenzierung nicht mehr essenziell und muss für die terminale Differenzierung in Osteozyten supprimiert werden. Auch für chondrozytäre Differenzierung wird der Faktor benötigt (James 2013, Liu et al. 2013).

In unseren Daten wird Runx2 stets stabil hoch exprimiert, was in erster Linie dafür spricht, dass die Zellen sich in osteogener Differenzierung befinden. Allerdings, wider Erwarten, wird Runx2 auch in den Kulturen mit MLO-Y4 hoch exprimiert.

Man würde, sollte man den veröffentlichten Daten glauben, eher eine weniger starke bis gar keine Expression von Runx2 erwarten. Es könnte auch ein weiteres Indiz für Dedifferenzierung bzw. adipogene oder chondrogene Differenzierung sein.

#### **4.2.4.5. DMP1**

DMP1 ist ein von osteogenen Knochenzellen produziertes Protein, das zur Gruppe der Small Integrin-Binding Ligand N-Link Glycoproteins (SIBLINGs) gehört und am stärksten von Osteozyten exprimiert wird. Essenzielle Funktionen im Phosphathaushalt und am Osteozyten führen bei Verlust zu Rachitis und Osteomalazie (Feng et al. 2006). DMP1 ist notwendig für eine normale Osteozyten-Differenzierung (Schiavi 2006). Mäuse ohne DMP1 zeigen defekte Reifung der Osteoblasten zu Osteozyten und Defekte in der Mineralisierung. Zudem erzeugen DMP1-Mutationen im Menschen autosomal-rezessive hypophosphatämische Rachitis und Osteomalazie. Sowohl in Mäusen als auch in Menschen mit DMP1-Veränderungen ist die FGF23-Expression in den Osteozyten und im gesamten Organismus erhöht (Kyono et al. 2012). Dabei ist beschrieben, dass in jungen Osteozyten, die sich nahe der Knochenoberfläche befinden, DMP1 erhöht ist. Sind die Osteozyten älter und mehr im Knochen eingebettet, ist DMP1 niedriger exprimiert (Toyosawa et al. 2012). Dies deckt sich auch mit Genexpressionsanalysen von DMP1 in MLO-Y4 in 3D-Kollagengelen in der bereits erwähnten Arbeit von Tanaka et al. (Tanaka et al. 2017).

In unseren PCR-Analysen und in den Immunhistologien wurde DMP1 in kaum einer Probe positiv detektiert. Lediglich in MLO-Y4 konnte man mittels PCR ganz schwach (nur durch starke Veränderung des Kontrasts in den Aufnahmen) Banden generieren. Die Gründe dafür sehe ich am ehesten in den verwendeten Antikörpern und Primern. Eine positive Expression hätte den Daten der Literatur nach erwartet werden können.

#### **4.2.4.6. SOST**

Sclerostin, das vom SOST-Gen gebildete Protein wird in reifen, tiefer eingebetteten Osteozyten hoch exprimiert. Es bindet an Lrp5/6, welches den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg inhibiert und damit ein negativer Regulator der Formation neuen

Knochens ist. PTH und mechanische Beanspruchung senken die Expression von Sclerostin in Osteozyten und fördern somit Knochenformation (Robling et al. 2008, Dallas et al. 2010, Saini et al. 2013). In MLO-Y4 im 3D-Kollagengel sind inzwischen Expressionen von SOST beschrieben, diese werden nach ca. 7-10 Tagen in dieser Kulturform exprimiert (Tanaka et al. 2017).

Mit Romosozumab ist ein monoklonaler Antikörper gegen Sclerostin nach einigen Phase III-Studien auf dem Weg in die Zulassung, bzw. wurde in Japan bereits zugelassen (Stand März 2019) (Markham 2019).

SOST wurde in den Proben kaum bis gar nicht exprimiert. Durch die immunhistologischen Färbungen mit SOST-Antikörper konnten einige Proben positiv gefärbt werden, ein signifikantes Expressionsmuster war allerdings nicht erkennbar.

#### **4.2.4.7. FGF23**

Für eine ausführliche Beschreibung von FGF23 siehe auch Kapitel 1.4.

FGF23 erscheint den immunhistologischen Auswertungen nach relativ stabil exprimiert. In den PCRs sind nur selten positive Ergebnisse zu sehen. Womöglich ist dies zurückzuführen auf Probleme mit dem Primer oder bei der Durchführung der PCR.

#### **4.2.1. Probleme in der Auswertung**

In der Ergebnisarbeit und bei der Auswertung der Studien ergaben sich einige Probleme, die den Gewinn aussagekräftiger Daten teilweise stark beeinträchtigten. Ziel wird es sein, diese Probleme in der Reproduktion möglichst gering zu halten.

##### **4.2.1.1. Geringe Probenmaterialmengen**

Es kann aus den 3D-Gelen nur wenig RNA gewonnen werden. Die Gele sind in ihrer Größe beschränkt und die Zellkonzentration kann nicht sehr weit gesteigert werden, sodass eine Grenzmenge an Probenmaterial schnell erreicht ist.

Viel Material wird zu Beginn der Studien zum Etablieren der PCR genutzt. Die Auswertungen der Genexpression sind somit auf wenige gezielt ausgewählte Gene zu begrenzen.

Mit dem Microarray würde eine Methode zur Verfügung stehen, bei der dieses Problem weitgehend umgangen werden könnte. Bei nur geringer experimenteller Aufwandsarbeit kann eine hohe Anzahl an Nukleinsäuren oder Proteinen aus einer kleinen Menge Probenmaterial verglichen werden. Man könnte damit einzelne Gene ausfindig machen, die im Vergleich interessant erscheinen und dann eingehender untersucht werden. Probleme könnten allerdings durch die sehr hohen Kosten für die Durchführung eines solchen Microarrays entstehen. Man müsste sehr genau überlegen, welche Proben man zum Vergleich nimmt. Außerdem benötigen auch Ergebnisse aus Microarrays anschließend tiefergehender Validierung.

Eine weitere Lösung wäre, das Volumen der Gele zu vergrößern, um so bei gleichbleibender Zellkonzentration eine höhere Zellausbeute zu erreichen. Dazu bräuchte man größere Wells in die man die Gele gießt. Dabei stellt sich bei zunehmender Größe die Frage in den Vordergrund, ob das Medium noch ausreichend durch alleinige passive Diffusion bis in den Kern des Geles dringen kann. In anderen Arbeiten sind Settings mit größeren Gelen beschrieben, siehe Abschnitt 4.2.1.

In der Arbeitsgruppe der bereits vorher erwähnten Arbeit von Tanaka et al. scheint es gelungen zu sein, genug RNA zu gewinnen, um die RNA-Mengen zu normieren und die Ergebnisse besser vergleichen zu können. Allerdings ist in der Veröffentlichung nicht näher erwähnt, wie dies erreicht werden konnte. Die Zellmengen sind ähnlich groß wie in der hier beschriebenen Methodik (je Kollagengel 1 ml mit  $1,5 \times 10^6$  Zellen / ml).

#### **4.2.1.2. Auswertung Schnittpräparate**

Die Anfertigung von Schnittpräparaten der Gele und anschließender Färbung stellte neben der Genexpressionsanalyse ein Hauptverfahren in den Auswertungen dar. Zellverteilung und -morphologie konnten damit gut beurteilt werden. Mittels spezifischer Antikörper wurden bestimmte Strukturen detektiert. Vorteil dieser Methode ist, dass sie sehr weit verbreitet, seit Jahrzehnten erprobt und in Forschung und Klinik nach wie vor von unersetzbarem Nutzen ist. Dank erfahrener

medizinisch-technischer Assistenz kann man sehr dünne und homogene Schnitte anfertigen lassen.

Technische Grenzen sind in diesem Verfahren allerdings sehr rasch erreicht. Die Zellen sind in den verwendeten Zellkonzentrationen nicht besonders dicht ausgesät. Oft werden nur Zellkörper und -dendriten angefärbt. Damit können grobe Übersichtsaufnahmen nicht gut verglichen werden. Ein leicht veränderter Weißabgleich bei der Aufnahme reicht aus, um subjektive Beurteilungen der Stärke der Anfärbung zu beeinflussen.

Die Zellen verteilen sich sehr unterschiedlich in den Gelen. Kontrahieren die Gele stärker, verdichten sich die Zellen auf den Schnitten am Rand. Diese sind dann meist auch besser angefärbt. Man könnte sich auch vorstellen, dass Zellen, die mehr am Rand und damit näher am ernährenden Medium stehen besser versorgt und damit überlebensfähiger sind. Möglich ist auch, dass sie aufgrund ihrer dichten, randständigen Anordnung eine andere Differenzierung eingehen, ähnlich der Anordnung im Knochen, wo Osteozyten eingebettet von der Knochenmatrix innerhalb der Mineralisierung liegen und Osteoblasten sich dicht angeordnet außen verteilen. Damit würden dann innerhalb des Geles verschiedene Differenzierungsstufen der Zellen und folglich in den Proben eine inhomogene Zellmasse, die unterschiedliche Genexpressionsmuster vorliegen.

Bei den Experimenten mit MSC wurden sehr viel höhere Zellkonzentrationen verwendet, die eine viel dichtere Verteilung in den Gelen erlaubte. Immunhistologische Färbungen erzeugen dadurch im Gesamtbild viel besser vergleichbare Proben. Dies ist mit MLO-A5 und MLO-Y4 nicht möglich, da sie viel mehr Platz benötigen und man daher nicht diese hohen Konzentrationen verwenden kann. Die Zellen sind viel weiter voneinander entfernt und das Gesamtbild einer angefärbten Probe erscheint weniger stark angefärbt wie bei MSC und somit weniger gut vergleichbar.

Mögliche Lösungen für diese Probleme könnten dabei zum einen sein stark vergrößerte Nahaufnahmen einzelner Zellen zuvergleichen, anstatt größere Übersichtsaufnahmen zu fertigen, die kaum Unterschiede aufzeigen. Andere Aufnahmemethoden z.B. mit Fluoreszenzfarbstoffen könnten vermutlich deutlichere Ergebnisse liefern.

#### **4.2.2. Empfehlungen für zukünftige Reproduktionen**

Ein Vorschlag für den Aufbau künftiger Experimente zur Validierung der Ergebnisse beruht auf den im Verlauf der Arbeit gewonnenen Erfahrungen. Aktuelle Erkenntnisse sollten somit unbedingt berücksichtigt werden.

Zellart: MLO-A5, Zelldichte:  $2 \times 10^6$  / ml

Aussäung im Kollagen-Typ-1-Gel mit Verwendung von FCS (befindet sich in unseren Experimenten in der Gelneutralisierungslösung), sowie 50 % Matrigel. Nach Aussäen im Gel wird nach dem Protokoll von (Kato et al. 2001) die Mineralisierung mit Ascorbatphosphat und  $\beta$ -Glycerophosphat angeregt. Einer Probenreihe gibt man Klotho, FGF23 und Heparin hinzu. Als Kontrolle dient eine Probenreihe ohne diese Zusätze. Als zusätzliche Kontrolle wird eine Probe mit HEK- und Freestylemedium benötigt, da Klotho und FGF23 in diesen Medien gelöst hinzugegeben werden. Die Kultivierung findet bis zu fünf Wochen mit Ernte alle sieben Tage statt.

Damit ergibt sich folgender Aufbau in der Übersicht dargestellt:

Kontrolle 1: MLO-A5-Differenzierungsmedium ( + Ascorbatphosphat +  $\beta$ -Glycerophosphat)

Kontrolle 2: zusätzlich HEK- und Freestylemedium

Probe: zusätzlich Klotho, FGF23, Heparin

#### **4.3. Ausblick**

In dieser Arbeit konnten neue, relevante Erkenntnisse zur Etablierung eines 3D-Osteozytendifferenzierungssystems entwickelt werden. Studien mit 3D-Modellen bilden einen Grundstock in modernen Tissue Engineering-Verfahren, werden aber auch immer wichtiger in der zellbiologischen Erforschung des Knochens, die sich in einem *in vitro*-Modell zunehmend dem *in vivo* Setting nähert. Es werden Wege geebnet für weitergehende Forschung an Knochenzellen und über den Einfluss relevanter Faktoren auf molekulare Vorgänge. Strukturelle Probleme, die unter anderem durch Fehler in den Überlegungen, erschwerte Auswertungsbedingungen und fehlende Reproduktionen begründet sind, überschatten dabei nicht die

wichtigen Erkenntnisse, die gemacht wurden und in zukünftigen Experimenten validiert werden können.

Die Bedeutung der Erkenntnisse durch Forschung an biologischen Einflüssen wie FGF23 und Klotho im interdisziplinären Kontext der Osteologie, Nephrologie, Endokrinologie, Orthopädie/Unfallchirurgie, Geriatrie und vieler weiterer medizinischer Fachbereiche nimmt nicht ab. Immer mehr molekulare Vorgänge des Knochens werden verstanden, die wiederum Behandelnde und Pharmaindustrie für die Entwicklung neuer Therapien von Krankheiten des Knochens und des menschlichen Metabolismus motivieren. Als unmittelbare Folge für den klinisch tätigen Arzt bestätigt das gewonnene Verständnis die Bedeutsamkeit therapeutischer Konzepte wie Mobilisation und Bewegung.

## 5. Zusammenfassung

### 5.1. Zusammenfassung

Osteozyten stehen vermehrt im Fokus als wesentliche Regulatoren der Knochenmineralisierung. Das ähnlich einem neuronalen Netzwerk aufgebaute lakunokanalikuläre Netzwerk der Osteozyten breitet sich im Knochen in drei Ebenen aus. Es wurde in dieser Arbeit ein 3D-Kollagengel-Modell verwendet und dort die Osteoblasten- bzw. Osteozytenzelllinien MLO-A5 und MLO-Y4, sowie humane mesenchymale Stammzellen aus Hüftköpfen eingebettet. Es wurden die optimalen Kulturbedingungen entwickelt und die Zellen über mehrere Wochen kultiviert, beobachtet und mit dem herkömmlichen 2D-Kulturmodell verglichen. MLO-A5 und MLO-Y4 bilden die zelltypischen Zellfortsätze. Die Gele kontrahieren, wenn hMSC und MLO-A5 eingebettet sind, mit MLO-Y4 zeigt sich über den gesamten Kultivierungszeitraum keinerlei Kontraktion der Kollagengele. Die Zellen wurden zudem osteogen differenziert und mit FGF23 und Klotho stimuliert. Es ergaben sich erste Hinweise auf eine FGF23 / Klotho-abhängige Inhibierung der lokalen Mineralisierung in osteogen differenzierten MLO-A5.

Es konnten einige osteogene Marker durch PCR und in den histologischen Schnitten mittels Antikörperfärbungen nachgewiesen werden, eindeutige Expressionsmuster und deren zeitliche Verläufe im Vergleich der osteogenen Differenzierungen und Zugabe von FGF23 und Klotho sind allerdings noch nicht identifizierbar und bedürfen womöglich höherer Fallzahlen und weiterer Untersuchungsmethoden. Insgesamt gesehen erweist sich das System aber als einfach und mit niederschwellig erreichbaren Methoden und Materialien durchzuführen.



## 6. Anhang

### 6.1. Literaturverzeichnis

ADHR-Consortium (2000). "*Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23.*" *Nature*.

Bartl, R. (2014). *Klinische Osteologie: Entstehung, Diagnostik, Prävention und Therapie aller Knochenkrankungen*, Thieme.

Bartl, R., C. Bartl and K. Baum (2011). *Osteoporose : Prävention ; Diagnostik ; Therapie*. Stuttgart, New York, Thieme.

Beck, C., H. Morbach, M. Stenzel, P. Schneider, H. Collmann, G. Girschick and H. J. Girschick (2009). "[*Hypophosphatasia*]." *Klin Padiatr* 221(4): 219-226.

Becker, A. J., E. A. McCulloch and J. E. Till (1963). "*Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells.*" *Nature* 197(4866): 452-454.

Ben-Dov, I. Z., H. Galitzer, V. Lavi-Moshayoff, R. Goetz, M. Kuro-o, M. Mohammadi, . . . J. Silver (2007). "*The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats.*" *J Clin Invest* 117(12): 4003-4008.

Berndt, T. and R. Kumar (2007). "*Phosphatonins and the regulation of phosphate homeostasis.*" *Annu Rev Physiol* 69: 341-359.

Bian, A., J. A. Neyra, M. Zhan and M. C. Hu (2015). "*Klotho, stem cells, and aging.*" *Clinical Interventions in Aging* 10: 1233-1243.

Bivi, N., K. W. Condon, M. R. Allen, N. Farlow, G. Passeri, L. R. Brun, . . . L. I. Plotkin (2012). "*Cell autonomous requirement of connexin 43 for osteocyte survival: consequences for endocortical resorption and periosteal bone formation.*" *J Bone Miner Res* 27(2): 374-389.

Blau, J. E. and M. T. Collins (2015). "*The PTH-Vitamin D-FGF23 axis.*" *Rev Endocr Metab Disord* 16(2): 165-174.

Bommas-Ebert, U., P. Teubner and R. Voß (2006). *Kurzlehrbuch Anatomie und Embryologie*. Stuttgart, New York, Thieme.

Bonewald, L. F. (2011). "*The amazing osteocyte.*" Journal of Bone and Mineral Research 26(2): 229-238.

Bonewald, L. F. and M. J. Wacker (2013). "*FGF23 production by osteocytes.*" Pediatr Nephrol 28(4): 563-568.

Boukhechba, F., T. Balaguer, J. F. Michiels, K. Ackermann, D. Quincey, J. M. Bouler, . . . N. Rochet (2009). "*Human primary osteocyte differentiation in a 3D culture system.*" J Bone Miner Res 24(11): 1927-1935.

Brownstein, C. A., F. Adler, C. Nelson-Williams, J. Iijima, P. Li, A. Imura, . . . R. P. Lifton (2008). "*A translocation causing increased alpha-klotho level results in hypophosphatemic rickets and hyperparathyroidism.*" Proc Natl Acad Sci U S A 105(9): 3455-3460.

Buenzli, P. R. and N. A. Sims (2015). "*Quantifying the osteocyte network in the human skeleton.*" Bone 75: 144-150.

Buo, A. M. and J. P. Stains (2014). "*Gap junctional regulation of signal transduction in bone cells.*" FEBS Lett 588(8): 1315-1321.

Canalejo, R., A. Canalejo, J. M. Martinez-Moreno, M. E. Rodriguez-Ortiz, J. C. Estepa, F. J. Mendoza, . . . M. Rodriguez (2010). "*FGF23 fails to inhibit uremic parathyroid glands.*" J Am Soc Nephrol 21(7): 1125-1135.

Caplan, A. I. and D. Correa (2011). "*PDGF in bone formation and regeneration: new insights into a novel mechanism involving MSC.*" J Orthop Res 29(12): 1795-1803.

Cha, S. K., B. Ortega, H. Kurosu, K. P. Rosenblatt, O. M. Kuro and C. L. Huang (2008). "*Removal of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1.*" Proc Natl Acad Sci U S A 105(28): 9805-9810.

Chen, C. D., S. Podvin, E. Gillespie, S. E. Leeman and C. R. Abraham (2007). "*Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17.*" Proc Natl Acad Sci U S A 104(50): 19796-19801.

Chen, H. C., T. H. Yang, A. R. Thoreson, C. Zhao, P. C. Amadio, Y. N. Sun, . . . K. N. An (2013). "*Automatic and Quantitative Measurement of Collagen Gel Contraction Using Model-Guided Segmentation.*" Meas Sci Technol 24(8): 85702.

Cheon, C., H. Lee, S. Kim, M. Kwak, G. Kim and H. Yoo (2014). "A novel *de novo* mutation within *PHEX* gene in a young girl with hypophosphatemic rickets and review of literature." *Ann Pediatr Endocrinol Metab* 19(1): 36-41.

Chong, W. H., A. A. Molinolo, C. C. Chen and M. T. Collins (2011). "Tumor-induced osteomalacia." *Endocr Relat Cancer* 18(3): R53-77.

Civitelli, R. (2008). "Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage." *Arch Biochem Biophys* 473(2): 188-192.

Clarke, B. (2008). "Normal bone anatomy and physiology." *Clin J Am Soc Nephrol* 3 Suppl 3: S131-139.

Dalal, M., K. Sun, A. R. Cappola, L. Ferrucci, C. Crasto, L. P. Fried and R. D. Semba (2011). "Relationship of serum fibroblast growth factor 23 with cardiovascular disease in older community-dwelling women." *Eur J Endocrinol* 165(5): 797-803.

Dallas, S. L. and L. F. Bonewald (2010). "Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte." *Ann N Y Acad Sci* 1192: 437-443.

Dallas, S. L., P. A. Veno, J. L. Rosser, C. Barragan-Adjemian, D. W. Rowe, I. Kalajzic and L. F. Bonewald (2009). "Time lapse imaging techniques for comparison of mineralization dynamics in primary murine osteoblasts and the late osteoblast/early osteocyte-like cell line MLO-A5." *Cells Tissues Organs* 189(1-4): 6-11.

de Seigneux, S. and P. Y. Martin (2016). "Phosphate and FGF23 in the renoprotective benefit of RAAS inhibition." *Pharmacol Res* 106: 87-91.

Desjardins, L., S. Liabeuf, C. Renard, A. Lenglet, H. D. Lemke, G. Choukroun, . . . G. European Uremic Toxin Work (2012). "FGF23 is independently associated with vascular calcification but not bone mineral density in patients at various CKD stages." *Osteoporos Int* 23(7): 2017-2025.

Dubal, D. B., J. S. Yokoyama, L. Zhu, L. Broestl, K. Worden, D. Wang, . . . L. Mucke (2014). "Life Extension Factor *Klotho* Enhances Cognition." *Cell Rep*.

"DVO-Leitlinie Osteoporose 2017."

Erben, R. G. (2018). "*alpha-Klotho's* effects on mineral homeostasis are fibroblast growth factor-23 dependent." *Curr Opin Nephrol Hypertens* 27(4): 229-235.

Erben, R. G. and O. Andrukhova (2016). "*FGF23-Klotho signaling axis in the kidney.*" Bone.

Faul, C., A. P. Amaral, B. Oskouei, M. C. Hu, A. Sloan, T. Isakova, . . . M. Wolf (2011). "*FGF23 induces left ventricular hypertrophy.*" J Clin Invest 121(11): 4393-4408.

Feng, J. Q., L. M. Ward, S. Liu, Y. Lu, Y. Xie, B. Yuan, . . . K. E. White (2006). "*Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism.*" Nat Genet 38(11): 1310-1315.

Fischer, S. S., D. S. Kempe, C. B. Leibrock, R. Rexhepaj, B. Siraskar, K. M. Boini, . . . F. Lang (2010). "*Hyperaldosteronism in Klotho-deficient mice.*" Am J Physiol Renal Physiol 299(5): F1171-1177.

Fisher, L. W. and N. S. Fedarko (2003). "*Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins.*" Connect Tissue Res 44 Suppl 1: 33-40.

Franz-Odenaal, T. A., B. K. Hall and P. E. Witten (2006). "*Buried alive: how osteoblasts become osteocytes.*" Dev Dyn 235(1): 176-190.

Fukumoto, S. and T. Yamashita (2007). "*FGF23 is a hormone-regulating phosphate metabolism--unique biological characteristics of FGF23.*" Bone 40(5): 1190-1195.

Gattineni, J., P. Alphonse, Q. Zhang, N. Mathews, C. M. Bates and M. Baum (2014). "*Regulation of renal phosphate transport by FGF23 is mediated by FGFR1 and FGFR4.*" Am J Physiol Renal Physiol 306(3): F351-358.

Gattineni, J., C. Bates, K. Twombly, V. Dwarakanath, M. L. Robinson, R. Goetz, . . . M. Baum (2008). "*FGF23 decreases renal NaPi-2a and NaPi-2c expression and induces hypophosphatemia in vivo predominantly via FGF receptor 1.*" Am J Physiol Renal Physiol 297: 282-291.

Gattineni, J., K. Twombly, R. Goetz, M. Mohammadi and M. Baum (2011). "*Regulation of serum 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> levels by fibroblast growth factor 23 is mediated by FGF receptors 3 and 4.*" Am J Physiol Renal Physiol 301: 371-377.

Goggin, P. M., K. C. Zygalakis, R. O. Oreffo and P. Schneider (2016). "*High-resolution 3D imaging of osteocytes and computational modelling in*

*mechanobiology: insights on bone development, ageing, health and disease.*" Eur Cell Mater 31: 264-295.

Gregory, C. A., W. G. Gunn, A. Peister and D. J. Prockop (2004). "*An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction.*" Anal Biochem 329(1): 77-84.

Hadji, P., S. Klein, H. Gothe, B. Haussler, T. Kless, T. Schmidt, . . . R. Linder (2013). "*The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data.*" Dtsch Arztebl Int 110(4): 52-57.

Harris, H. (1990). "*The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know.*" Clin Chim Acta 186(2): 133-150.

Hessle, L., K. A. Johnson, H. C. Anderson, S. Narisawa, A. Sali, J. W. Goding, . . . J. L. Millan (2002). "*Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization.*" Proc Natl Acad Sci U S A 99(14): 9445-9449.

Honma, M., Y. Ikebuchi, Y. Kariya, M. Hayashi, N. Hayashi, S. Aoki and H. Suzuki (2013). "*RANKL subcellular trafficking and regulatory mechanisms in osteocytes.*" J Bone Miner Res 28(9): 1936-1949.

Honma, M., Y. Ikebuchi, Y. Kariya and H. Suzuki (2014). "*Establishment of optimized in vitro assay methods for evaluating osteocyte functions.*" J Bone Miner Metab.

Hu, M. C., M. Shi, J. Zhang, H. Quinones, C. Griffith, M. Kuro-o and O. W. Moe (2011). "*Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease.*" J Am Soc Nephrol 22(1): 124-136.

Hu, M. C., M. Shi, J. Zhang, H. Quinones, M. Kuro-o and O. W. Moe (2010). "*Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia-reperfusion injury and its replacement is protective.*" Kidney Int 78(12): 1240-1251.

HYP-Consortium (1995). "*A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. The HYP Consortium.*" Nat Genet 11(2): 130-136.

Ichikawa, S., E. A. Imel, M. L. Kreiter, X. Yu, D. S. Mackenzie, A. H. Sorenson, . . . M. J. Econs (2007). "*A homozygous missense mutation in human KLOTHO causes severe tumoral calcinosis.*" J Clin Invest 117(9): 2684-2691.

Ikushima, M., H. Rakugi, K. Ishikawa, Y. Maekawa, K. Yamamoto, J. Ohta, . . . T. Ogihara (2006). "*Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells.*" *Biochem Biophys Res Commun* 339(3): 827-832.

Ishihara, Y., Y. Sugawara, H. Kamioka, N. Kawanabe, H. Kurosaka, K. Naruse and T. Yamashiro (2012). "*In situ imaging of the autonomous intracellular Ca(2+) oscillations of osteoblasts and osteocytes in bone.*" *Bone* 50(4): 842-852.

Ito, S., T. Fujimori, Y. Hayashizaki and Y. Nabeshima (2002). "*Identification of a novel mouse membrane-bound family 1 glycosidase-like protein, which carries an atypical active site structure.*" *Biochim Biophys Acta* 1576(3): 341-345.

Ito, S., S. Kinoshita, N. Shiraishi, S. Nakagawa, S. Sekine, T. Fujimori and Y. I. Nabeshima (2000). "*Molecular cloning and expression analyses of mouse betaklotho, which encodes a novel Klotho family protein.*" *Mech Dev* 98(1-2): 115-119.

Jacobs, C. R. (2000). "*The mechanobiology of cancellous bone structural adaption.*" *Journal of Rehabilitation Research and Development* 37(2): 209-216.

Jakob, F. and D. Felsenberg (2013). "*Grundlagen des Knochenstoffwechsels und pharmakologische Daten.*" *Der MKG-Chirurg* 6(2): 72-79.

James, A. W. (2013). "*Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation.*" *Scientifica (Cairo)* 2013: 684736.

Jerosch, J., A. Bader and G. Uhr (2002). *Knochen: Curasan-Taschenatlas spezial*. Stuttgart, New York, Thieme.

Kalajzic, I., B. G. Matthews, E. Torreggiani, M. A. Harris, P. Divieti Pajevic and S. E. Harris (2013). "*In vitro and in vivo approaches to study osteocyte biology.*" *Bone* 54(2): 296-306.

Kamemori M., Ohyama Y., Kurabayashi M., Takahashi K., Nagai R. and F. N. (2002). "*Expression of klotho protein in the inner ear.*" *Hear Res.* 171: 103-110.

Kato, Y., E. Arakawa, S. Kinoshita, A. Shirai, A. Furuya, K. Yamano, . . . Y. Nabeshima (2000). "*Establishment of the anti-Klotho monoclonal antibodies and detection of Klotho protein in kidneys.*" *Biochem Biophys Res Commun* 267(2): 597-602.

Kato, Y., A. Boskey, L. Spevak, M. Dallas, M. Hori and L. F. Bonewald (2001). "*Establishment of an osteoid preosteocyte-like cell MLO-A5 that spontaneously mineralizes in culture.*" *Journal of Bone and Mineral Research* 16(9): 1622-1633.

Kato, Y., J. Windle, B. Koop, G. Mundy and L. F. Bonewald (1997). "*Establishment of an Osteocyte-like Cell Line, MLO-Y4.*" *Journal of Bone and Mineral Research* 12(12): 2014-2023.

Krajisnik, T., P. Bjorklund, R. Marsell, O. Ljunggren, G. Akerstrom, K. B. Jonsson, . . . T. E. Larsson (2007). "*Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1alpha-hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells.*" *J Endocrinol* 195(1): 125-131.

Kular, J., J. Tickner, S. M. Chim and J. Xu (2012). "*An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level.*" *Clin Biochem* 45(12): 863-873.

Kuro, O. M. (2018). "*Molecular Mechanisms Underlying Accelerated Aging by Defects in the FGF23-Klotho System.*" *Int J Nephrol* 2018: 9679841.

Kuro, O. M. (2019). "*The Klotho proteins in health and disease.*" *Nat Rev Nephrol* 15(1): 27-44.

Kuro-o, M. (2011). "*Klotho and the aging process.*" *Korean J Intern Med* 26(2): 113-122.

Kuro-o, M., Matsumara Y., Alzawa H., Kawaguchi H., Suga T., Utsugi T., . . . N. Y. (1997). "*Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing.*" *Nature* 390(6655): 45-51.

Kurosu, H., Y. Ogawa, M. Miyoshi, M. Yamamoto, A. Nandi, K. P. Rosenblatt, . . . M. Kuro-o (2006). "*Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho.*" *J Biol Chem* 281(10): 6120-6123.

Kurosu, H., M. Yamamoto, J. D. Clark, J. V. Pastor, A. Nandi, P. Gurnani, . . . M. Kuro-o (2005). "*Suppression of aging in mice by the hormone Klotho.*" *Science* 309(5742): 1829-1833.

Kyono, A., N. Avishai, Z. Ouyang, G. E. Landreth and S. Murakami (2012). "*FGF and ERK signaling coordinately regulate mineralization-related genes and play essential roles in osteocyte differentiation.*" *J Bone Miner Metab* 30(1): 19-30.

Lee, J., D. J. Jeong, J. Kim, S. Lee, J. H. Park, B. Chang, . . . M. S. Lee (2010). "*The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma.*" *Mol Cancer* 9: 109.

Leon, J., A. J. Moreno, B. I. Garay, R. J. Chalkley, A. L. Burlingame, D. Wang and D. B. Dubal (2017). "*Peripheral Elevation of a Klotho Fragment Enhances Brain*

*Function and Resilience in Young, Aging, and alpha-Synuclein Transgenic Mice.*" Cell Rep 20(6): 1360-1371.

Leung, P., M. Pickarski, Y. Zhuo, P. J. Masarachia and L. T. Duong (2011). "*The effects of the cathepsin K inhibitor odanacatib on osteoclastic bone resorption and vesicular trafficking.*" Bone 49(4): 623-635.

Lievremont, M., J. Potus and B. Guillou (1982). "*Use of alizarin red S for histochemical staining of Ca<sup>2+</sup> in the mouse; some parameters of the chemical reaction in vitro.*" Acta Anat (Basel) 114(3): 268-280.

Liu, H., M. M. Fergusson, R. M. Castilho, J. Liu, L. Cao, J. Chen, . . . T. Finkel (2007). "*Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging.*" Science 317(5839): 803-806.

Liu, S., W. Tang, J. Zhou, L. Vierthaler and L. D. Quarles (2007). "*Distinct roles for intrinsic osteocyte abnormalities and systemic factors in regulation of FGF23 and bone mineralization in Hyp mice.*" Am J Physiol Endocrinol Metab 293(6): E1636-1644.

Liu, T. M. and E. H. Lee (2013). "*Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development.*" Tissue Eng Part B Rev 19(3): 254-263.

Long, F. (2012). "*Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage.*" Nat Rev Mol Cell Biol 13(1): 27-38.

Lorentzon, M. (2019). "*Treating osteoporosis to prevent fractures: current concepts and future developments.*" J Intern Med.

Mabilleau, G., R. Perrot, P. R. Flatt, N. Irwin and D. Chappard (2016). "*High fat-fed diabetic mice present with profound alterations of the osteocyte network.*" Bone 90: 99-106.

Markham, A. (2019). "*Romosozumab: First Global Approval.*" Drugs.

Martin, A., V. David and L. D. Quarles (2012). "*Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways.*" Physiol Rev 92(1): 131-155.

Martin, A., V. David and L. D. Quarles (2012). "*Regulation and function of the FGF23/Klotho pathways.*" Physiol Rev 92: 131-155.

Martin-Nunez, E., J. Donate-Correa, M. Muros-de-Fuentes, C. Mora-Fernandez and J. F. Navarro-Gonzalez (2014). "*Implications of Klotho in vascular health and disease.*" World J Cardiol 6(12): 1262-1269.



McLean, C. Y., P. L. Reno, A. A. Pollen, A. I. Bassan, T. D. Capellini, C. Guenther, . . . D. M. Kingsley (2011). "*Human-specific loss of regulatory DNA and the evolution of human-specific traits.*" *Nature* 471(7337): 216-219.

Mikkola, H. K. and S. H. Orkin (2006). "*The journey of developing hematopoietic stem cells.*" *Development* 133(19): 3733-3744.

Mirza, M. A., J. Alsio, A. Hammarstedt, R. G. Erben, K. Michaelsson, A. Tivesten, . . . T. E. Larsson (2011). "*Circulating fibroblast growth factor-23 is associated with fat mass and dyslipidemia in two independent cohorts of elderly individuals.*" *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(1): 219-227.

Mirza, M. A., A. Larsson, H. Melhus, L. Lind and T. E. Larsson (2009). "*Serum intact FGF23 associate with left ventricular mass, hypertrophy and geometry in an elderly population.*" *Atherosclerosis* 207(2): 546-551.

Mohun, T. J. and W. J. Weninger (2012). "*Episcopic three-dimensional imaging of embryos.*" *Cold Spring Harb Protoc* 2012(6): 641-646.

Moldovan, D., I. Moldovan, C. Rusu, I. Kacso, I. M. Patiu and M. Gherman-Caprioara (2014). "*FGF-23, vascular calcification, and cardiovascular diseases in chronic hemodialysis patients.*" *Int Urol Nephrol* 46(1): 121-128.

Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "*Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.*" *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.

Nabeshima, Y. (2009). "*Discovery of alpha-Klotho unveiled new insights into calcium and phosphate homeostasis.*" *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85(3): 125-141.

Nabeshima, Y. and H. Imura (2008). "*alpha-Klotho: a regulator that integrates calcium homeostasis.*" *Am J Nephrol* 28(3): 455-464.

Nan-Chang Su, G., M. Hidaka, Y. Kimura and G. Yamamoto (2003). "*In Situ Collage Gelatio: A New Method for Constructing Large Tissue in Rotary Culture Vessels.*" *In Vitro Cellular & Development Biology - Animal* 39(8): 368-374.

Orimo, H. (2010). "*The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease.*" *J Nippon Med Sch* 77(1): 4-12.

Pan, J., J. Zhong, L. H. Gan, S. J. Chen, H. C. Jin, X. Wang and L. J. Wang (2011). "*Klotho, an anti-senescence related gene, is frequently inactivated through promoter hypermethylation in colorectal cancer.*" *Tumour Biol* 32(4): 729-735.

Pavlatou, M. G., A. T. Remaley and P. W. Gold (2016). "*Klotho: a humeral mediator in CSF and plasma that influences longevity and susceptibility to multiple complex disorders, including depression.*" *Transl Psychiatry* 6(8): e876.

Perez-Plasencia, C., A. Duenas-Gonzalez and B. Alatorre-Tavera (2008). "*Second hit in cervical carcinogenesis process: involvement of wnt/beta catenin pathway.*" *Int Arch Med* 1(1): 10.

Poole, K. E. S., R. L. Van Bezooijen, N. Loveridge, H. Hamersma, S. E. Papapoulos, C. W. Löwik and J. Reeve (2005). "*Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation.*" *The FASEB Journal* 19(13): 1842-1844.

Puchtler, H., S. N. Meloy and M. S. Terry (1969). "*On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium.*" *J Histochem Cytochem* 17(2): 110-124.

Ragni, E., M. Vigano, P. Rebulli, R. Giordano and L. Lazzari (2013). "*What is beyond a qRT-PCR study on mesenchymal stem cell differentiation properties: how to choose the most reliable housekeeping genes.*" *J Cell Mol Med* 17(1): 168-180.

Reichert, J. C., A. Heymer, A. Berner, J. Eulert and U. Noth (2009). "*Fabrication of polycaprolactone collagen hydrogel constructs seeded with mesenchymal stem cells for bone regeneration.*" *Biomed Mater* 4(6): 065001.

Riminucci, M., M. T. Collins, N. S. Fedarko, N. Cherman, A. Corsi, K. E. White, . . . P. Gehron Robey (2003). "*FGF-23 in fibrous dysplasia of bone and its relationship to renal phosphate wasting.*" *J Clin Invest* 112(5): 683-692.

Robling, A. G., P. J. Niziolek, L. A. Baldrige, K. W. Condon, M. R. Allen, I. Alam, . . . C. H. Turner (2008). "*Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin.*" *J Biol Chem* 283(9): 5866-5875.

Rosser, J. and L. F. Bonewald (2012). "*Studying osteocyte function using the cell lines MLO-Y4 and MLO-A5.*" *Methods Mol Biol* 816: 67-81.

Rowe, P. S. (2012). "*The chicken or the egg: PHEX, FGF23 and SIBLINGs unscrambled.*" *Cell Biochem Funct* 30(5): 355-375.

Ruchon, A. F., H. S. Tenenhouse, M. Marcinkiewicz, G. Siegfried, J. E. Aubin, L. DesGroseillers, . . . G. Boileau (2000). "*Developmental expression and tissue distribution of Phex protein: effect of the Hyp mutation and relationship to bone markers.*" J Bone Miner Res 15(8): 1440-1450.

Saini, V., D. A. Marengi, K. J. Barry, K. S. Fulzele, E. Heiden, X. Liu, . . . P. D. Pajevic (2013). "*Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide type 1 receptor (PPR) signaling in osteocytes regulates anabolic and catabolic skeletal responses to PTH.*" J Biol Chem 288(28): 20122-20134.

Saito, Y., T. Yamagishi, T. Nakamura, Y. Ohyama, H. Aizawa, T. Suga, . . . R. Nagai (1998). "*Klotho protein protects against endothelial dysfunction.*" Biochem Biophys Res Commun 248(2): 324-329.

Satoh, M., H. Nagasu, Y. Morita, T. P. Yamaguchi, Y. S. Kanwar and N. Kashihara (2012). "*Klotho protects against mouse renal fibrosis by inhibiting Wnt signaling.*" Am J Physiol Renal Physiol 303(12): F1641-1651.

Schiavi, S. (2006). "*Bone talk.*" Nat Genetics 38: 1230-1231.

Schnedl, C., A. Fahrleitner-Pammer, P. Pietschmann and K. Amrein (2015). "*FGF23 in Acute and Chronic Illness.*" Dis Markers 2015: 358086.

Schünke, M., E. Schulte, U. Schumacher, M. Voll and K. Wesker (2007). *Prometheus: Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem.* Stuttgart, Thieme.

Schwarz, R. P., T. J. Goodwin and D. A. Wolf (1992). "*Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels- an application of simulated micro-gravity.*" J Tissue Cult 14: 51-58.

Scialla, J. J., W. L. Lau, M. P. Reilly, T. Isakova, H. Y. Yang, M. H. Crouthamel, . . . I. Chronic Renal Insufficiency Cohort Study (2013). "*Fibroblast growth factor 23 is not associated with and does not induce arterial calcification.*" Kidney Int 83(6): 1159-1168.

Semba, R. D., A. R. Cappola, K. Sun, S. Bandinelli, M. Dalal, C. Crasto, . . . L. Ferrucci (2011). "*Plasma klotho and cardiovascular disease in adults.*" J Am Geriatr Soc 59(9): 1596-1601.

Semba, R. D., A. R. Cappola, K. Sun, S. Bandinelli, M. Dalal, C. Crasto, . . . L. Ferrucci (2011). "*Plasma klotho and mortality risk in older community-dwelling adults.*" J Gerontol A Biol Sci Med Sci 66(7): 794-800.

Shaker, J. L. and L. Deftos (2000). *Calcium and Phosphate Homeostasis*. Endotext. L. J. De Groot, P. Beck-Peccoz, G. Chrousos et al. South Dartmouth (MA), MDText.com, Inc.

Shimada, T., H. Hasegawa, Y. Yamazaki, T. Muto, R. Hino, Y. Takeuchi, . . . T. Yamashita (2004). "*FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis.*" *J Bone Miner Res* 19(3): 429-435.

Shimada, T., M. Kakitani, Y. Yamazaki, H. Hasegawa, Y. Takeuchi, T. Fujita, . . . T. Yamashita (2004). "*Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism.*" *Journal of Clinical Investigation* 113(4): 561-568.

Shimada, T., S. Mizutani, T. Muto, T. Yoneya, R. Hino, S. Takeda, . . . T. Yamashita (2001). "*Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia.*" *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(11): 6500-6505.

Stanford, C. M., P. A. Jacobson, E. D. Eanes, L. A. Lembke and R. J. Midura (1995). "*Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP).*" *J Biol Chem* 270(16): 9420-9428.

Stauber, T., D. Horn and U. Kornak (2013). "*Monogene Ionenkanalerkrankungen des Knochens.*" *medizinische genetik* 25(4): 493-500.

Stern, A. R., M. M. Stern, M. E. Van Dyke, K. Jahn, M. Prideaux and L. F. Bonewald (2012). "*Isolation and culture of primary osteocytes from the long bones of skeletally mature and aged mice.*" *Biotechniques* 52(6): 361-373.

Tanaka, T., M. Hoshijima, J. Sunaga, T. Nishida, M. Hashimoto, N. Odagaki, . . . H. Kamioka (2017). "*Analysis of Ca(2+) response of osteocyte network by three-dimensional time-lapse imaging in living bone.*" *J Bone Miner Metab.*

Tatar, M., A. Bartke and A. Antebi (2003). "*The endocrine regulation of aging by insulin-like signals.*" *Science* 299(5611): 1346-1351.

Teitelbaum, S. L. (2016). "*Therapeutic implications of suppressing osteoclast formation versus function.*" *Rheumatology (Oxford)* 55(suppl 2): ii61-ii63.

Torreggiani, E., B. G. Matthews, S. Pejda, I. Matic, M. C. Horowitz, D. Grcevic and I. Kalajzic (2013). "*Preosteocytes/osteocytes have the potential to dedifferentiate becoming a source of osteoblasts.*" *PloS ONE* 8(9): e75204.

Toyosawa, S., K. Oya, S. Sato and K. Ishida (2012). "[Osteocyte and DMP1]." *Clin Calcium* 22(5): 713-720.

Toyosawa, S., S. Shintani, T. Fujiwara, T. Ooshima, A. Sato, N. Ijuhin and T. Komori (2001). "*Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts.*" *J Bone Miner Res* 16(11): 2017-2026.

Urakawa, I., Y. Yamazaki, T. Shimada, K. Iijima, H. Hasegawa, K. Okawa, . . . T. Yamashita (2006). "*Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23.*" *Nature* 444(7120): 770-774.

Wang, F., J. Wang, D. Liu and Y. Su (2010). "*Normalizing genes for real-time polymerase chain reaction in epithelial and nonepithelial cells of mouse small intestine.*" *Anal Biochem* 399(2): 211-217.

Wang, L., X. Wang, X. Wang, P. Jie, H. Lu, S. Zhang, . . . H. Jin (2011). "*Klotho is silenced through promoter hypermethylation in gastric cancer.*" *Am J Cancer Res* 1(1): 111-119.

Weber, T. J., S. Liu, O. S. Indridason and L. D. Quarles (2003). "*Serum FGF23 levels in normal and disordered phosphorus homeostasis.*" *J Bone Miner Res* 18(7): 1227-1234.

Webster, D. J., P. Schneider, S. L. Dallas and R. Muller (2013). "*Studying osteocytes within their environment.*" *Bone* 54(2): 285-295.

Weissman, I. L. (2000). "*Stem Cells.*" *Cell* 100(1): 157-168.

Whyte, M. P., C. R. Greenberg, N. J. Salman, M. B. Bober, W. H. McAlister, D. Wenkert, . . . H. Landy (2012). "*Enzyme-replacement therapy in life-threatening hypophosphatasia.*" *N Engl J Med* 366(10): 904-913.

Whyte, M. P., M. Landt, L. M. Ryan, R. A. Mulivor, P. S. Henthorn, K. N. Fedde, . . . S. P. Coburn (1995). "*Alkaline phosphatase: placental and tissue-nonspecific isoenzymes hydrolyze phosphoethanolamine, inorganic pyrophosphate, and pyridoxal 5'-phosphate. Substrate accumulation in carriers of hypophosphatasia corrects during pregnancy.*" *J Clin Invest* 95(4): 1440-1445.

Wolf, D. A. and R. P. Schwarz (1991). "*Analysis of gravity-induced particle motion and fluid perfusion flow in the NASA-designed rotating zero-head-space tissue culture vessel.*" *NASA Technical Paper* 3143: 1-22.

Wolf, I., S. Levanon-Cohen, S. Bose, H. Ligumsky, B. Sredni, H. Kanety, . . . T. Rubinek (2008). "*Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer.*" *Oncogene* 27(56): 7094-7105.

Wolf, M. (2010). "*Forging forward with 10 burning questions on FGF23 in kidney disease.*" *J Am Soc Nephrol* 21(9): 1427-1435.

Yamamoto, G., J. D. Clark, J. Pastor, P. Gurnani, A. Nandi, H. Kurosu, . . . M. Kuro-o (2005). "*Regulation of Oxidative Stress by the Anti-aging Hormone Klotho.*" *J Biol Chem* 280: 38029-38034.

Yamashita, T. (2005). "*Structural and biochemical properties of fibroblast growth factor 23.*" *Ther Apher Dial* 9(4): 313-318.

Yamashita, T., M. Yoshioka and N. Itoh (2000). "*Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain.*" *Biochem Biophys Res Commun* 277(2): 494-498.

Yoneno, K., S. Ohno, K. Tanimoto, K. Honda, N. Tanaka, T. Doi, . . . K. Tanne (2005). "*Multidifferentiation potential of mesenchymal stem cells in three-dimensional collagen gel cultures.*" *J Biomed Mater Res A* 75(3): 733-741.

Yoshiko, Y., H. Wang, T. Minamizaki, C. Ijuin, R. Yamamoto, S. Suemune, . . . N. Maeda (2007). "*Mineralized tissue cells are a principal source of FGF23.*" *Bone* 40(6): 1565-1573.

Zipfel, B., J. M. DeSilva, R. S. Kidd, K. J. Carlson, S. E. Churchill and L. R. Berger (2011). "*The foot and ankle of Australopithecus sediba.*" *Science* 333(6048): 1417-1420.

## 6.2 Abkürzungsverzeichnis

<b>%</b>	Prozent
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>ADAM</b>	A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein
<b>ALPL</b>	Alkaline Phosphatase Gene
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BMP</b>	Bone Morphogenetic Protein
<b>BSP</b>	Bone Sialoprotein
<b>Cx43</b>	Connexin 43
<b>CKD-MBD</b>	Chronical Kidney Disease – Mineral Bone Disease
<b>CRP</b>	C-reaktives Protein
<b>DMP1</b>	Dentin Matrix Protein 1
<b>DNA</b>	Desoxyrubonucleic Acid
<b>DSPP</b>	Dentin Sialophosphoprotein
<b>EGR1</b>	Early Growth Response Protein 1
<b>ERK1/2</b>	Extracellular Signal Regulated Kinase
<b>FCS</b>	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
<b>FGF(R)</b>	Fibroblast Growth Factor (Receptor)
<b>Gja1</b>	Gap Junction $\alpha$ 1 Protein
<b>GUSB</b>	$\beta$ -Glucuronidase
<b>HG</b>	Housekeeping-Gen
<b>HDL</b>	High Density Lipoprotein
<b>hMSC</b>	Human Mesenchymal Stem Cell – Humane mesenchymale Stammzelle
<b>HSC</b>	Hematopoetic Stem Cell - Hämatopoetische Stammzelle
<b>IGF</b>	Insulin-like Growth Factor
<b>KS</b>	Kälberserum
<b>mB2m</b>	Murines $\beta$ 2-Microglobulin
<b>MEPE</b>	Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein
<b>MLO</b>	Murine Long Bone Osteocyte

<b>NCC</b>	Natrium Chlorid Cotransporter
<b>NHERF</b>	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Exchanger Regulatory Factor
<b>NMDAR</b>	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>OPG</b>	Osteoprotegerin
<b>OPN</b>	Osteopontin
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PHEX</b>	Phosphat-Regulating Gene With Homologies To Endopeptidases On X-Chromosome
<b>PTH</b>	Parathormon
<b>qRT-PCR</b>	Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction
<b>RANKL</b>	Receptor Activator Of Nuclear Factor $\kappa$ -B Ligand
<b>RNA</b>	Ribonucleic Acid
<b>Runx2</b>	Runt-Related Transcription Factor 2
<b>SGK1</b>	Serum / Glucocorticoid Regulated Kinase 1
<b>SIBLING</b>	Small Integrin-Binding Ligand N-Linked Glycoprotein
<b>SOST</b>	Sclerostin
<b>TBP</b>	TATAA-box Binding Protein
<b>TRPV5</b>	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member
<b>YWHAZ</b>	Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein, Zeta Polypeptide
<b>WNK1/4</b>	With No Lysine Kinase 1/4



## 6.3 Abbildungslizenzen

### Abbildungen 1,2 und 3

Von: [Permission@thieme.de](mailto:Permission@thieme.de) [permission@thieme.de](mailto:permission@thieme.de)  
Betreff: AW: Lizenzen für die Verwendung von Abbildungen in Promotionsarbeit  
Datum: 15. März 2019 um 09:10  
An: Ulrich Goschenhofer [ugosch@posteo.de](mailto:ugosch@posteo.de)

Sehr geehrter Herr Goschenhofer,

vielen Dank für Ihre Anfrage zur Nutzung von Abbildungen aus unseren Publikationen in Ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeit an einer bundesdeutschen Hochschule.

Nach § 60c des Urheberrechts-Wissensgesellschafts-Gesetzes (UrhWissG) ist Ihnen die Nutzung einzelner Abbildungen zur eigenen nicht-kommerziellen Forschung auch ohne Lizenz durch den Verlag in den Grenzen dieses Gesetzes gestattet.

Sollten Sie eine darüberhinausgehende Nutzung planen, etwa im Rahmen einer Veröffentlichung in einem Verlag oder auf einer kommerziellen Internetplattform, wenden Sie sich bitte erneut an [permissions@thieme.de](mailto:permissions@thieme.de). Wir machen Ihnen gern ein entsprechendes Lizenzangebot.

Den genauen Wortlaut des Gesetzes finden Sie hier:  
<https://www.bmjv.de/SharedDocs/Gesetzgebungsverfahren/Dokumente/BGBl-UrhWissG.html?nn=6712350>

Die Abbildungsdaten können wir Ihnen, falls benötigt, in der Regel kostenpflichtig zur Verfügung stellen. Bitte lassen Sie uns in diesem Fall wissen, welche Abbildungen Sie genau verwenden möchten. Wir machen dann gern ein entsprechendes Angebot.

Für Rückfragen stehen wir selbstverständlich zur Verfügung.

Mit freundlichen Grüßen  
Barbara Elias

This email is without prejudice and subject to contract

Barbara Elias  
Permissions Associate  
Georg Thieme Verlag KG  
Thieme Publishers  
Rüdigerstraße 14, 70469 Stuttgart, Germany

Email: [barbara.elias@thieme.de](mailto:barbara.elias@thieme.de)  
Tel. +49 [0]711 8931 681  
Fax +49 [0]711 8931 143  
[www.thieme.de](http://www.thieme.de), [www.thieme.com](http://www.thieme.com)

Visit us at [www.thieme.com](http://www.thieme.com)

Thieme Publishers is a division of Georg Thieme Verlag KG, a limited partnership. Domicile and Commercial Register: Stuttgart, HRA 3499.

-----Ursprüngliche Nachricht-----  
Von: Ulrich Goschenhofer <[ugosch@posteo.de](mailto:ugosch@posteo.de)>  
Gesendet: Donnerstag, 14. März 2019 20:28  
An: [Permission@thieme.de](mailto:Permission@thieme.de)  
Betreff: Lizenzen für die Verwendung von Abbildungen in Promotionsarbeit

Sehr geehrte Damen und Herren der Lizenzabteilung des Thieme-Verlages,

ich möchte gerne 3 Abbildungen aus einem Buch von Reiner Bartl in meiner Doktorarbeit verwenden. Nähere Infos hierzu finden Sie weiter unten. Die Dissertationsarbeit wird nach stattgehabter Prüfung in 5 Ausfertigungen in der Unibibliothek Würzburg sowie in PDF-Form im OPUS bzw der digitalen Bibliothek der Unibibliothek Würzburg veröffentlicht werden (voraussichtlich im Sommer 2019).

Hier die Daten:  
"Klinische Osteologie" von Reiner Bartl, erschienen 2014 im Thieme-Verlag mit der ISBN 9783131701619 Ich möchte folgende 3 Abbildungen verwenden:  
- Abb. 1.3 auf Seite 20  
- Abb. 1.9 auf Seite 26  
- Abb. 1.10 auf Seite 27

Bitte teilen Sie mir mit, ob die Lizenzierung möglich ist und wenn ja, ob bestimmte Bedingungen damit verbunden sind.

Vielen Dank im voraus und mit ergebenen Grüßen, Ulrich Goschenhofer

## Abbildung 4

### JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Dec 17, 2018

---

This Agreement between Ulrich Goschenhofer ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4491520857685
License date	Dec 17, 2018
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Developmental Dynamics
Licensed Content Title	Buried alive: How osteoblasts become osteocytes
Licensed Content Author	Tamara A. Franz-Odenaal, Brian K. Hall, P. Eckhard Witten
Licensed Content Date	Oct 28, 2005
Licensed Content Volume	235
Licensed Content Issue	1
Licensed Content Pages	15
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Original Wiley figure/table number(s)	Figure 1
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Languages	German
Title of your thesis / dissertation	Auswirkungen von FGF23 und Klotho auf lokale Mineralisierungsprozesse von Knochenzellen in 3D-Zellkulturen
Expected completion date	Jun 2019
Expected size (number of pages)	1
Requestor Location	Ulrich Goschenhofer Kirchgasse 3  Hofheim, 97461 Germany Attn: Ulrich Goschenhofer
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

#### TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or

one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

### Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts**, You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you

shall not assert any such right, license or interest with respect thereto

- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.
- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days

from receipt by the CCC.

- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

#### **WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS**

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

##### **The Creative Commons Attribution License**

The Creative Commons Attribution License (CC-BY) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

##### **Creative Commons Attribution Non-Commercial License**

The Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY-NC) License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

##### **Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License**

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

##### **Use by commercial "for-profit" organizations**

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes

requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.  
Further details can be found on Wiley Online Library  
<http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

**Other Terms and Conditions:**

**v1.10 Last updated September 2015**

**Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or  
+1-978-646-2777.**

---

---

---

## Abbildung 5 und 31

### JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Dec 17, 2018

---

This Agreement between Ulrich Goschenhofer ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4491520106963
License date	Dec 17, 2018
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Journal of Bone and Mineral Research
Licensed Content Title	The amazing osteocyte
Licensed Content Author	Lynda F Bonewald
Licensed Content Date	Jan 20, 2011
Licensed Content Volume	26
Licensed Content Issue	2
Licensed Content Pages	10
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	2
Original Wiley figure/table number(s)	Figure 1 and 2
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Languages	German
Title of your thesis / dissertation	Auswirkungen von FGF23 und Klotho auf lokale Mineralisierungsprozesse von Knochenzellen in 3D-Zellkulturen
Expected completion date	Jun 2019
Expected size (number of pages)	1
Requestor Location	Ulrich Goschenhofer Kirchgasse 3  Hofheim, 97461 Germany Attn: Ulrich Goschenhofer
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

#### TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or

one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

### Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts**, You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you



shall not assert any such right, license or interest with respect thereto

- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.
- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days

from receipt by the CCC.

- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

#### **WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS**

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

##### **The Creative Commons Attribution License**

The Creative Commons Attribution License (CC-BY) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

##### **Creative Commons Attribution Non-Commercial License**

The Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY-NC) License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

##### **Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License**

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

##### **Use by commercial "for-profit" organizations**

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes

requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.  
Further details can be found on Wiley Online Library  
<http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

**Other Terms and Conditions:**

**v1.10 Last updated September 2015**

**Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or  
+1-978-646-2777.**

---

---

---

## Abbildung 6

### JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Dec 17, 2018

---

This Agreement between Ulrich Goschenhofer ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4491520703848
License date	Dec 17, 2018
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Cell Biochemistry & Function
Licensed Content Title	The chicken or the egg: PHEX, FGF23 and SIBLINGS unscrambled
Licensed Content Author	Peter S. N. Rowe
Licensed Content Date	May 9, 2012
Licensed Content Volume	30
Licensed Content Issue	5
Licensed Content Pages	21
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Original Wiley figure/table number(s)	Figure 1
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Languages	German
Title of your thesis / dissertation	Auswirkungen von FGF23 und Klotho auf lokale Mineralisierungsprozesse von Knochenzellen in 3D-Zellkulturen
Expected completion date	Jun 2019
Expected size (number of pages)	1
Requestor Location	Ulrich Goschenhofer Kirchgasse 3  Hofheim, 97461 Germany Attn: Ulrich Goschenhofer
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

#### TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or

one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

### Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts**, You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you

shall not assert any such right, license or interest with respect thereto

- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.
- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days

from receipt by the CCC.

- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

#### **WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS**

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

##### **The Creative Commons Attribution License**

The Creative Commons Attribution License (CC-BY) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

##### **Creative Commons Attribution Non-Commercial License**

The Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC-BY-NC) License permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

##### **Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License**

The Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

##### **Use by commercial "for-profit" organizations**

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes

requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.  
Further details can be found on Wiley Online Library  
<http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

**Other Terms and Conditions:**

**v1.10 Last updated September 2015**

**Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or  
+1-978-646-2777.**


---

---

---



## Abbildung 8

	
<b>Confirmation Number: 11775223</b> <b>Order Date: 12/17/2018</b>	
<b>Customer Information</b>	
<b>Customer:</b> Ulrich Goschenhofer <b>Account Number:</b> 3001021887 <b>Organization:</b> Ulrich Goschenhofer <b>Email:</b> ugosch@gmail.com <b>Phone:</b> +49 1735346326 <b>Payment Method:</b> Invoice	
<b>This is not an invoice</b>	
<b>Order Details</b>	
<b>Clinical Interventions in Aging</b>	Billing Status: <b>N/A</b>
<b>Order detail ID:</b> 71724813 <b>ISSN:</b> 1176-9092 <b>Publication Type:</b> Journal <b>Volume:</b> <b>Issue:</b> <b>Start page:</b> <b>Publisher:</b> DOVE MEDICAL PRESS LTD. <b>Author/Editor:</b> Society for Applied Research in Aging	<b>Permission Status:</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>Granted</b> <b>Permission type:</b> Republish or display content <b>Type of use:</b> Republish in a thesis/dissertation <b>Order License Id:</b> 4491530901781  <b>Requestor type:</b> Publisher, not-for-profit <b>Format:</b> Print, Electronic <b>Portion:</b> chart/graph/table/figure <b>Number of charts/graphs/tables/figures:</b> 1 <b>The requesting person/organization:</b> Ulrich Goschenhofer <b>Title or numeric reference of the portion(s):</b> Figure 1 <b>Title of the article or chapter the portion is from:</b> Auswirkungen von FGF23 und Klotho auf lokale Mineralisierungsprozesse von Knochenzellen in 3D-Zellkulturen <b>Editor of portion(s):</b> Ulrich Goschenhofer <b>Author of portion(s):</b> Ulrich Goschenhofer <b>Volume of serial or monograph:</b> 23000 words <b>Page range of portion:</b> 16 <b>Publication date of portion:</b> 2019 <b>Rights for:</b> Main product <b>Duration of use:</b> Life of current edition <b>Creation of copies for the disabled:</b> no <b>With minor editing privileges:</b> no <b>For distribution to:</b> Worldwide <b>In the following language(s):</b> Original language of publication <b>With incidental promotional use:</b> no

<b>Lifetime unit quantity of new product</b>	Up to 499
<b>Title</b>	Auswirkungen von FGF23 und Klotho auf lokale Mineralisierungsprozesse von Knochenzellen in 3D-Zellkulturen
<b>Institution name</b>	Universität Würzburg
<b>Expected presentation date</b>	Jun 2019
<b>Note:</b> This item was invoiced separately through our <b>RightsLink service</b> . <a href="#">More info</a>	
<b>\$ 0.00</b>	
<hr/>	
<b>Total order items: 1</b>	<b>Order Total: \$0.00</b>

[About Us](#) | [Privacy Policy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Pay an Invoice](#)

Copyright 2018 Copyright Clearance Center

## Abbildung 9 und 11

### SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Dec 17, 2018

---

This Agreement between Ulrich Goschenhofer ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4491520426020
License date	Dec 17, 2018
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders
Licensed Content Title	The PTH-Vitamin D-FGF23 axis
Licensed Content Author	Jenny E. Blau, Michael T. Collins
Licensed Content Date	Jan 1, 2015
Licensed Content Volume	16
Licensed Content Issue	2
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	non-commercial (non-profit)
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	2
Will you be translating?	yes, without original language
Number of languages	1
Circulation/distribution	<501
Author of this Springer Nature content	no
Title	Auswirkungen von FGF23 und Klotho auf lokale Mineralisierungsprozesse von Knochenzellen in 3D-Zellkulturen
Institution name	Universität Würzburg
Expected presentation date	Jun 2019
Portions	Figures 1 and 3
Specific Languages	German
Requestor Location	Ulrich Goschenhofer Kirchgasse 3  Hofheim, 97461 Germany Attn: Ulrich Goschenhofer
Billing Type	Invoice
Billing Address	Ulrich Goschenhofer Kirchgasse 3

Hofheim, Germany 97461  
Attn: Ulrich Goschenhofer

Total 0.00 EUR

Terms and Conditions

### Springer Nature Terms and Conditions for RightsLink Permissions

**Springer Nature Customer Service Centre GmbH (the Licensor)** hereby grants you a non-exclusive, world-wide licence to reproduce the material and for the purpose and requirements specified in the attached copy of your order form, and for no other use, subject to the conditions below:

1. The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version).

If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Where **print only** permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional electronic re-use.
3. Permission granted **free of charge** for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.
4. A licence for 'post on a website' is valid for 12 months from the licence date. This licence does not cover use of full text articles on websites.
5. Where '**reuse in a dissertation/thesis**' has been selected the following terms apply: Print rights of the final author's accepted manuscript (for clarity, NOT the published version) for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline ([www.sherpa.ac.uk/romeo/](http://www.sherpa.ac.uk/romeo/)).
6. Permission granted for books and journals is granted for the lifetime of the first edition and does not apply to second and subsequent editions (except where the first edition permission was granted free of charge or for signatories to the STM Permissions Guidelines <http://www.stm-assoc.org/copyright-legal-affairs/permissions/permissions-guidelines/>), and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the licence.
7. Rights for additional components such as custom editions and derivatives require additional permission and may be subject to an additional fee. Please apply to [Journalpermissions@springernature.com](mailto:Journalpermissions@springernature.com)/[bookpermissions@springernature.com](mailto:bookpermissions@springernature.com) for these rights.
8. The Licensor's permission must be acknowledged next to the licensed material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.
9. Use of the material for incidental promotional use, minor editing privileges (this does not include cropping, adapting, omitting material or any other changes that affect the meaning, intention or moral rights of the author) and copies for the disabled are permitted under this licence.
10. Minor adaptations of single figures (changes of format, colour and style) do not require the Licensor's approval. However, the adaptation should be credited as shown in Appendix below.

## **Appendix — Acknowledgements:**

### **For Journal Content:**

Reprinted by permission from [**the Licensor**]: [**Journal Publisher** (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [**JOURNAL NAME**] [**REFERENCE CITATION** (Article name, Author(s) Name), [**COPYRIGHT**] (year of publication)]

### **For Advance Online Publication papers:**

Reprinted by permission from [**the Licensor**]: [**Journal Publisher** (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [**JOURNAL NAME**] [**REFERENCE CITATION** (Article name, Author(s) Name), [**COPYRIGHT**] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[**JOURNAL ACRONYM**].)]

### **For Adaptations/Translations:**

Adapted/Translated by permission from [**the Licensor**]: [**Journal Publisher** (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [**JOURNAL NAME**] [**REFERENCE CITATION** (Article name, Author(s) Name), [**COPYRIGHT**] (year of publication)]

### **Note: For any republication from the British Journal of Cancer, the following credit line style applies:**

Reprinted/adapted/translated by permission from [**the Licensor**]: on behalf of Cancer Research UK: : [**Journal Publisher** (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [**JOURNAL NAME**] [**REFERENCE CITATION** (Article name, Author(s) Name), [**COPYRIGHT**] (year of publication)]

### **For Advance Online Publication papers:**

Reprinted by permission from The [**the Licensor**]: on behalf of Cancer Research UK: [**Journal Publisher** (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [**JOURNAL NAME**] [**REFERENCE CITATION** (Article name, Author(s) Name), [**COPYRIGHT**] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[**JOURNAL ACRONYM**].)]

### **For Book content:**

Reprinted/adapted by permission from [**the Licensor**]: [**Book Publisher** (e.g. Palgrave Macmillan, Springer etc)] [**Book Title**] by [**Book author(s)**] [**COPYRIGHT**] (year of publication)]

## **Other Conditions:**

Version 1.1

**Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.**

---

## **7. Danksagung**

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Franz Jakob für die Bereitstellung des Themas und der Ressourcen im Rahmen der Forschungstätigkeit, sowie der Korrekturarbeiten.

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Birgit Mentrup für ihre Geduld und konsequente Qualitätsorientierung im Rahmen der engmaschigen Betreuung und Korrekturlesungen.

Des Weiteren danke ich dem gesamten Labor im Orthopädischen Zentrum für Muskuloskelettale Forschung, insbesondere Dr. rer. nat. Stephanie Graser und Doris Schneider für die stetigen Hilfen und für die angenehme Atmosphäre. Ich habe das halbe Jahr, welches ich für die Forschungsarbeiten aufgewendet habe in sehr angenehmer Erinnerung und schöpfe in meinem Berufsalltag als Allgemeinmediziner immer wieder aus wertvollen Erkenntnissen, die ich im Rahmen der gesamten Promotionsarbeit gewonnen habe.

Meiner Familie danke ich für die Motivation, insbesondere meinem Großvater, Prof. Dr. med. Werner Strik. Er hat mich wiederholt von drohender Stagnation abgehalten. Meiner Ehefrau Verena Goschenhofer danke ich für die Geduld und das Freihalten meines Rückens von anderen Tätigkeiten.

Dr. med. Maximilian Heitmann und Daniel Oppelt danke ich für das gewissenvolle Korrekturlesen.

## **8. Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Name: Ulrich Othmar Goschenhofer  
Adresse: Kirchgasse 3, 97461 Hofheim  
Geburtstag: 02.08.1989, Würzburg  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: verheiratet, 3 Kinder

### **Ausbildung und Weiterbildung:**

2008 Regiomontanus-Gymnasium Haßfurt – Allgemeine Hochschulreife  
2009 – 2016 Studium Humanmedizin Universität Mainz und Würzburg  
20.06.2016 Approbation als Arzt  
Ab 10/2016 Weiterbildung zum Facharzt Allgemeinmedizin

Ulrich Goschenhofer