

Diplomarbeit

**Einfluss von adrenalen Steroidhormonen auf
ossäre Zellen am Beispiel des Aldosterons**

eingereicht von

Alexander Russo

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Klinischen Abteilung für Endokrinologie und Stoffwechsel,

LKH Univ.-Klinikum Graz

unter der Anleitung von

Univ.-Prof.in Dr.in med.univ. Barbara Obermayer Pietsch

und

Daniela Hofer, BSc, MSc, PhD

Graz, 30.03.2015

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 30.03.2015

Russo Alexander eh

Danksagung

Ich möchte hiermit der Universitätsklinik für Innere Medizin, Klinische Abteilung für Endokrinologie und Stoffwechsel des LKH-Universitätsklinikums Graz für die Bereitstellung der Materialien und Utensilien danken.

Einen Großen Dank an die Leiterin der Forschungsgruppe, Prof.in Dr.in Barbara Obermayer Pietsch, die mich offenherzig annahm und mir die Möglichkeit gegeben hat, aktiv an diesem Projekt teilzunehmen.

Einen besonderen Dank möchte ich vor allem an Dr.in Daniela Hofer; MSc für die ausgezeichnete Betreuung und exzellente Zusammenarbeit in diesen Monaten aussprechen.

Weiters danke ich noch dem ganzen Team der Forschungsgruppe, darunter Verena, Julia, Olivia, Lisa, Natascha, Christian und Matthias für diese gemeinsame Zeit.

Ein großer Dank geht an meine Familie wegen der finanziellen und motivierenden Unterstützung während meiner Zeit in Graz, ohne die es nicht möglich gewesen wäre, das Studium erfolgreich abzuschließen.

Weiters danke ich noch meiner Freundin und all meinen Freunden und Bekannten, die mich während meiner Studienzeit zur Seite gestanden sind und mich unterstützt haben.

Zusammenfassung

Einleitung: Klinische Studien dokumentieren eine bedeutende Rolle der Steroidhormone in der Knochenentwicklung und im Knochenstoffwechsel. Aldosteron, ein Steroidhormon, das in der Nebennierenrinde produziert wird, wird in physiologischen Serumkonzentrationen mit einer gesteigerten Osteoblastenproliferation in Verbindung gebracht. Supraphysiologische Konzentrationen, bspw. aufgrund eines Hyperaldosteronismus, wirken sich klinisch negativ auf den Knochen aus.

Das Ziel unserer Studie ist es, einen direkten molekularbiologischen Zusammenhang zwischen Aldosteron und dem Knochenstoffwechsel zu untersuchen.

Methoden: Für unsere Versuche wurden humane Osteosarkomzelllinien, MG-63 und U-2 OS, mit unterschiedlichen Aldosteronkonzentrationen behandelt. Die Zellproliferation wurde mittels WST-1 Tests gemessen und die Genexpression relevanter Knochenstoffwechselgene mit qRT-PCR analysiert. Osteocalcin wurde im Zellkulturüberstand mittels Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) gemessen.

Ergebnisse: Die Zugabe von Aldosteron führte zu einer dosisabhängigen Verminderung der Zellproliferation in U2OS nach 24 h, die bei MG63 nicht zu beobachten war. U2OS und MG63 zeigten eine veränderte Genexpression des Östrogenrezeptors (ESR1). Die Genexpression von Knochenstoffwechselgenen, wie Osteocalcin (BGLAP), Osteoprotegerin (OPG), Osteopontin (OPN) und Osteonektin (SPARC) wurden durch die Zugabe von Aldosteron im Zellkulturversuch nicht signifikant beeinflusst, ebenso nicht die Osteocalcin-Sekretion.

Diskussion: Wir konnten erstmals eine antiproliferative Wirkung von supraphysiologischen Aldosteronkonzentrationen in Knochenzellen zeigen. Eine direkte Wirkung von Aldosteron könnte durch die Beeinflussung des Steroidstoffwechsels auftreten. Andererseits ist dabei aber auch an eine primäre PTH-Wirkung zu denken. Weitere experimentelle Studien sind notwendig, um klinisch relevante Effekte des Aldosterons auf den Knochenstoffwechsel zu detektieren

Abstract

Introduction: Clinical studies document a significant role of steroid hormones in bone development and bone metabolism. There is a relation between the physiological serum concentrations of aldosterone, a steroid hormone produced in the adrenal cortex, and an increased osteoblast proliferation. Supraphysiological concentrations e.g. due to hyperaldosteronism have shown clinically negative effects on bone.

The aim of our study was to investigate a direct molecular link between aldosterone and bone metabolism.

Methods: We used the human osteosarcoma cell-lines MG -63 and U-2 OS for our experiments. Osteosarcoma cells were treated with different aldosterone concentrations. Cell proliferation was measured by WST-1 test. Gene expression of relevant genes in bone metabolism was analyzed by qRT-PCR. Osteocalcin was measured in cell culture supernatants by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA).

Results: The addition of aldosterone resulted in a dose-dependent decrease of cell proliferation in U-2 OS after 24 h, which was not observed in MG-63. U-2 OS and MG-63 have shown different gene expression patterns of the estrogen receptor (ESR1). The gene expression of bone metabolism genes such as osteocalcin (BGLAP), osteoprotegerin (OPG), osteopontin (OPN) and osteonectin (SPARC) was not significantly affected by the addition of aldosterone in the cell culture experiments, as well as osteocalcin secretion in cell culture supernatants.

Discussion: We show for the first time an anti-proliferative effect of supraphysiological aldosterone concentrations in bone cell lines. A direct effect of aldosterone on bone metabolism might occur via a potential influence of steroids on bone cells. On the other hand, there might also be an indirect effect by PTH, which we could not consider in our present experiments. Further experimental studies are needed to detect clinically relevant effects of aldosterone on bone metabolism.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	3
Glossar und Abkürzungen	8
Abbildungsverzeichnis.....	10
Tabellenverzeichnis.....	12
1 Einleitung	13
1.1 Das Steroidhormon Aldosteron	13
1.1.1 Biosynthese, Wirkmechanismus und Abbau.....	13
1.1.2 Regulierung des Blutdruckes und des Mineralhaushaltes	14
1.1.3 Primärer und sekundärer Hyperaldosteronismus.....	16
1.1.4 Aldosteron und Knochenstoffwechsel.....	16
1.1.5 Aldosteron und Vitamin D	18
1.1.6 Profibrotische und Proinflammatorische Wirkung	20
1.1.7 Aldosteron und chronische Herzinsuffizienz	20
1.2 Der Knochen als endokrine Drüse	22
1.2.1 „Bone remodelling“	22
1.2.2 Leptin - ein antiosteogener Faktor	24
1.2.3 Das Knochenhormon Osteocalcin	26
1.2.4 Die „Pankreas-Gonaden-Achse“.....	27
1.2.5 Glu-OC: Ein Mediator von Wachstum und Reifung.....	28
1.3 Hypothese	29
2 Material und Methoden.....	30
2.1 Die Zellen	30
2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	30
2.3 Passagieren und Kultivieren.....	31
2.4 Umkehrphasen-Mikroskopie.....	32
2.5 Zellviabilitätstest mit WST-1	33
2.5.1 Zubereitung der Aldosteron-Stock Lösungen	33
2.5.2 Zubereitung der Aldosteron-Versuchskonzentrationen.....	34
2.5.3 Übertragen der Zellen in 96-Well Zellkulturplatten.....	34
2.5.4 Übertragen der Aldosteronlösung in 96 WP	35
2.5.5 Zellzählung	36
2.5.6 Spektroskopische Messung für den WST 1 Versuch.....	37

2.6	RNA Isolierung	38
2.6.1	Methode nach Chomczynski und Sacchi	38
2.6.2	Behandlung mit Aldosteron.....	39
2.6.3	RNA Messung.....	40
2.6.4	Herstellung der RNA Samples für die cDNA Synthese	40
2.7	Reverse Transkriptase PCR/ cDNA Synthese	41
2.8	RT-qPCR und Genexpressionsanalyse.....	42
2.8.1	Verdünnung der cDNA für die RT-qPCR	42
2.8.2	Vorbereitung der RT-qPCR	43
2.8.3	Genexpression.....	44
2.8.4	Genexpressionsanalyse nach Aldosteronbehandlung	45
2.9	ELISA- Osteocalcin -Messung aus Zellüberständen	45
2.9.1	Das TAKARA-Kit.....	45
2.9.2	Das Prinzip	46
2.10	Statistik.....	46
3	Ergebnisse – Resultate	48
3.1	Ergebnisse Umkehrphasenmikroskopie	48
3.2	Ergebnisse WST 1-Versuch	49
3.3	Ergebnisse Genexpressionsversuche	52
3.3.1	Baseline-Genexpression.....	52
3.3.2	Genexpression nach Aldosteronbehandlung	54
3.4	Ergebnisse Osteocalcin- ELISA	58
4	Diskussion.....	62
5	Literaturverzeichnis	64

Glossar und Abkürzungen

FBS – Fetal bovine Serum (Fötales Rinderserum)

DMSO - Dimethylsulfoxid

DMEM- Dulbecco's Modified Eagle'smedium

CASY- Cell counter and Analyzer System

WP- Well plates

WST 1- Zellproliferationsreagenz

HCT- Hämocytometer

RNA- Ribonukleinsäure

cDNA- complementary desoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)

ELISA- Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

OPG- Osteoprotegerin

OPN- Osteopontin

SPARC- Osteonectin

OC- Osteocalcin

GAPDH- Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

ESR 1- Östrogenrezeptor 1

ESR 2- Östrogenrezeptor 2

ml- milliliter

ng- nanogramm

ug- microgramm

EtOH- Ethanol

MM- Mastermix

Glu-OC- undercarboxyliertes Osteocalcin

TMBZ- 3,3 5,5Tetramethylbenzidinesolution

rpm- revolutions per minute (Umdrehungen pro minute)

RT-qPCR- Real time quantitative Polymerase Kettenreaktion

RT- Raumtemperatur

MR-Mineralkortikoidrezeptor

NNR- Nebenniererinde

ADH-Adiuretin

DOC-Desoxykortikosteron

AcTH- Adrenocorticotropin
IHA- bilaterale Hyperplaseie der ZG
APA- Aldosteron produzierendes Adenom
EH- Essentieller Hypertonus
ACE- Angiotensin-Converting Enzym
PTH- Parathormon
DOC- Desoxykortikosteron
PA- Primärer Hyperaldosteronismus
SA- Sekundärer Hyperaldosteronismus
CART- cocain-amphetamin-regulated transcript
NPY- Neuropeptid Y
RANKL- Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
M-CSF- Makrophage Colony Stimulating Faktor
RAAS- Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
FGF-23- Fibroblast growth Faktor-23

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Strukturformel von Aldosteron	14
Abbildung 2; Das RAAS System	15
Abbildung 3: Mögliche Mechanismen der ALD-PTH Interaktion.....	17
Abbildung 4: Klotho/FGF-23 Beeinflussung der Aldosteronsynthese	19
Abbildung 5: Aldosteron und die Beeinflussung im kardiovaskulären System	21
Abbildung 6: Knochenaufbau- und Abbauprozesse	23
Abbildung 7: Osteoklastenreifung	24
Abbildung 8: Leptinwirkung am Knochen	25
Abbildung 9: Leptin inhibiert den Serotonin Signalweg	26
Abbildung 10: Die Pankreas-Gonaden Achse	28
Abbildung 11: Hämozytometer	36
Abbildung 12: Muster Hämocytometer	36
Abbildung 13; Zellzählung	37
Abbildung 14: Humane Osteosarkomzellen U2-OS in Kultur	48
Abbildung 15: Humane Osteosarkomzellen MG-63 in Kultur	48
Abbildung 16: WST-1 Viabilitätstest in U-2 OS Zellen 24h nach Aldosterongabe	49
Abbildung 17: WST-1 Viabilitätstest in MG-63 Zellen 24h nach Aldosterongabe .	49
Abbildung 18: WST-1 Viabilitätstest in MG-63 Zellen 48h nach Aldosterongabe .	50
Abbildung 19: WST-1 Viabilitätstest in U-2 OS Zellen 48h nach Aldosterongabe	51
Abbildung 20: WST-1 Viabilitätstest in U-2 OS Zellen 72h nach Aldosterongabe.	51
Abbildung 21: WST-1 Viabilitätstest in MG-63 Zellen 72h nach Aldosterongabe .	51
Abbildung 22: Baseline-Genexpression in MG-63 Zellen.	53
Abbildung 23: Baseline-Genexpression in U-2 OS Zellen.	53
Abbildung 24: Genexpression von Knochen relevanten Genen in U-2 OS Zellen.	54
Abbildung 25: Genexpression von Knochen relevanten Genen in U-2 OS Zellen unter Aldosterongabe.	55
Abbildung 26: Genexpression von Knochen relevanten Genen in MG-63 Zellen anhand des Fold Change.	55
Abbildung 27: Genexpression von Knochen relevanten Genen in MG-63 Zellen unter Aldosterongabe	56
Abbildung 28: Genexpression des ESR-1 Gen in U-2 OS (links) und MG-63 (rechts) Zellen anhand des Fold Change.	57

Abbildung 29: Genexpression von ESR 1 unter Aldosterongabe bei U-2 OS und MG-63	57
Abbildung 30: Interpolierte Osteocalcin-Standardkurve	58
Abbildung 31: Spektroskopische Messwerte nach Durchführung des OC-ELISAs in MG-63 Zellen.....	59
Abbildung 32: Osteocalcin-Mengen bei verschiedenen Aldosteronkonzentrationen in MG- 63 Zellen.....	59
Abbildung 33: Spektroskopische Messwerte nach Durchführung des OC-ELISAs in U-2 OS Zellen.....	60
Abbildung 34: Osteocalcin-Mengen bei verschiedenen Aldosteronkonzentrationen in U-2 OS Zellen.....	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Herstellung von Aldosteronstocks.....	33
Tabelle 2: Herstellung von Aldosteronversuchslösungen.....	34
Tabelle 3: Schema des WST-1 Versuchs.....	35
Tabelle 4: Aldosteronbehandlung für die Genexpressionversuche in U-2 OS und MG-63.....	39
Tabelle 5: Mastermix zur Herstellung von cDNA.....	41
Tabelle 6: Schema PCR/ Genexpression.....	43
Tabella 7: Ansatz Mastermix/PCR.....	44
Tabelle 8: Baseline Genexpression in MG-63 und U-2 OS Zellen.....	52
Tabelle 9: Spektroskopische Werte der OC-Standardreihe.....	58
Tabelle 10: spektroskopische Werte und OC-Mengen bei der MG-63 Zelllinie.....	59
Tabelle 11: Spektroskopische Werte und OC-Mengen bei der U-2 OS Zelllinie....	61

1 Einleitung

1.1 Das Steroidhormon Aldosteron

Da Aldosteron das zentrale Element in meiner Diplomarbeit ist, mit dem alle Experimente durchgeführt wurden (siehe Kapitel 2), erläutere ich im ersten Kapitel meiner Diplomarbeit physiologische bzw. pathophysiologische Eigenschaften dieses Steroidhormones, die in der Literatur erwähnt werden.

1.1.1 Biosynthese, Wirkmechanismus und Abbau

Aldosteron ist ein Steroidhormon und wird ausgehend von Cholesterin in der „Zona glomerulosa“ (ZG) der Nebennierenrinde (NNR) gebildet. Es besteht, wie Cholesterin, aus einem Sterangerüst, das eine Aldehydgruppe besitzt. Alle Steroidhormone sind fettlösliche („lipophile“) Stoffe und werden mit Hilfe von speziellen Transportern, meistens Proteine, über den hydrophilen Blutweg zu den entsprechenden Zielorganen transportiert.

An der Zielzelle passiert Aldosteron die lipophile Zellmembran ohne externe Hilfe und kann bis zum Zellkern vordringen. Es folgt die spezifische Bindung an den „Mineralkortikoidrezeptor“ (MR), der intrazellulär in der Targetzelle vorhanden ist und gleichzeitig seine Wirkung über die Veränderung der Genexpression verschiedener Gene entfaltet. Auch Glukokortikoide können am MR binden besitzen jedoch eine um 1000-fach verminderte Affinität als Mineralkortikoide. Da aber in jeder Zelle die Kortisolkonzentration 100-mal höher als die Aldosteronkonzentration ist, bedarf es ein besonderes Enzym, das die Umwandlung von biologisch aktivem Kortisol zu biologisch inaktiven Kortison als Hauptaufgabe hat. Diese Aufgabe übernimmt das Enzym 11- β -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase (11 β HSD). Aldosteron wird wie alle Steroide über die Leber glukoronidiert und anschließend sulfatiert. Auf diese Weise wird es löslicher gemacht und über die Niere bzw. Galle ausgeschieden (1,2).

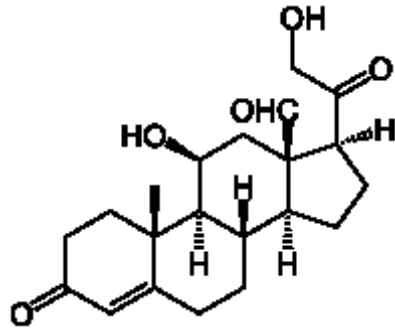


Abbildung 1: Chemische Strukturformel von Aldosteron (3)

1.1.2 Regulierung des Blutdruckes und des Mineralhaushaltes

Das RAAS (Renin-Aldosteron-Angiotensin-System) ist der wichtigste endogene Blutdruck- und Mineralhaushaltregulator unseres Körpers. Verschiedene Stimuli wie Hypovolämie, Hyponaträmie und verminderte Nierendurchblutung führen über komplexe Mechanismen zur Bildung der Protease Renin in den juxtaglomerulären Mesangiumzellen der Niere. Auf dem Blutweg entlassen, spaltet Renin das von der Leber gebildete Angiotensinogen in Angiotensin 1. Durch ACE (Angiotensin-Converting Enzym) wird Angiotensin 1 zu Angiotensin 2 umgewandelt.

Angiotensin 2 kann jetzt über seine vasokonstriktorische Wirkung den peripheren Widerstand und somit den Blutdruck erhöhen (4). Noch dazu steigert Angiotensin 2 sowohl den Salzappetit als auch das Durstgefühl und bewirkt die Freisetzung von Adiuretin, auch Antidiuretisches Hormon (ADH) genannt (2).

ADH ist ein Peptidhormon und wird im Hypothalamus gebildet und von dort auf neuronalem Weg zum Hypophysenhinterlappen transportiert und gespeichert. Seine Hauptaufgabe ist die Kontrolle der Plasmaosmolalität (290 mosm/kg). Durch den Einbau von zusätzlichen Wasserkanälen, den sogenannten Aquaporinen, in den Sammelrohren- bzw. distalen Tubuli der Niere, kann vermehrt Wasser rückresorbiert werden und somit ein hyperosmolares Plasma ausgeglichen werden. Eine Abnahme der Extrazellulärflüssigkeit oder ein Blutdruckabfall führen über Dehnungsrezeptoren in den Herzvorhöfen auch zu einer ADH Freisetzung (Gauer-Henry Reflex) (2).

Darüber hinaus stellt Angiotensin 2 den wichtigsten Stimulator für die Aldosteronfreisetzung aus den Nebennieren dar (5).

Aldosteron greift im Mineralhaushalt ein, indem es die renale Natrium- und Wasserretention steuert. Diese Steuerung erfolgt durch die Aktivierung von Natriumkanälen in der Membran der Tubulusepithelzellen der Niere und durch den Einbau von Na/ATPasen aus dem Zytoplasma in die Zellmembran. Aus Letzerem wird Natrium aktiv aus dem Lumen in die Tubulusepithelzellen aufgenommen und gleichzeitig vermehrt Kalium ausgeschieden. Somit fördert Aldosteron als einziges Hormon die Kaliumausscheidung (2). Eine Hyperkaliämie ist neben Angiotensin 2 der zweitwichtigste Stimulator der Aldosteronfreisetzung. Die Konversion von DOC (Deoxykortikosteron) zu Aldosteron wird durch die Aktivierung des CYP11B2-Gens katalysiert. Angiotensin 2, Kalium und im geringeren Maße ACTH und PTH können an spezifische G-Proteine der Zellmembran der Zona glomerulosa Zellen andocken und einen Kalziumeinstrom bewirken. Das eingeströmte Kalzium aktiviert Ca^{2+} abhängige Proteinkinasen, die zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren des CYP11B2 Gens führen und somit die Aldosteronbildung ermöglichen (5).

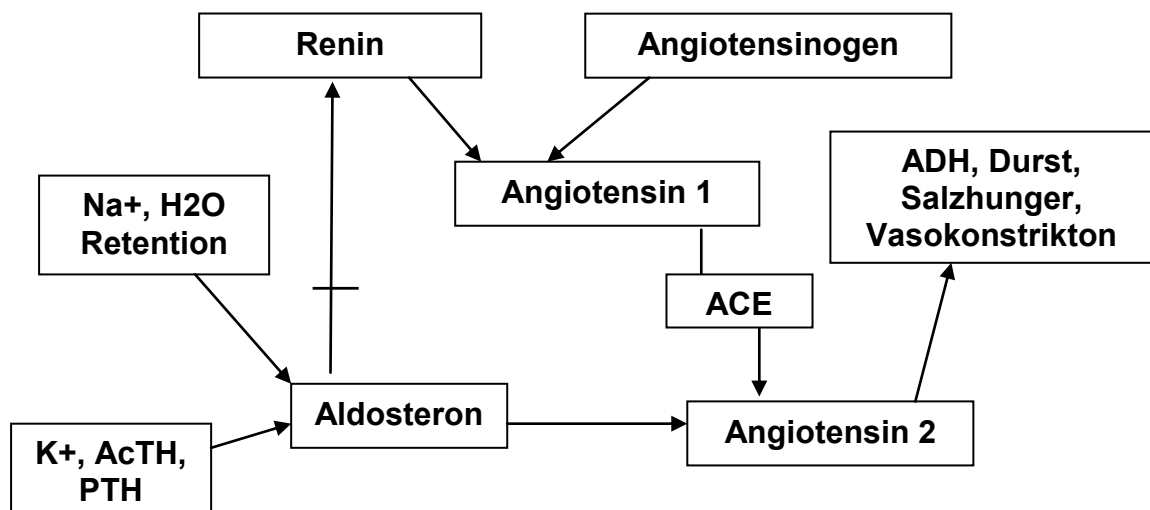


Abbildung 2; Das RAAS System

ACE-Hemmer und AT1-Antagonisten gehören heutzutage zur Standardtherapie der Hypertonie. ACE-Hemmer inhibieren das gleichnamige Enzym und bremsen somit die Umwandlung von Angiotensin 1 zu Angiotensin 2. AT1-Antagonisten

binden an den Angiotensin 2 Rezeptor und inhibieren dadurch seine Wirkung (6,7).

1.1.3 Primärer und sekundärer Hyperaldosteronismus

Ein primärer Hyperaldosteronismus (PA), oder auch Conn-Syndrom ist durch eine autonome Produktion von Aldosteron seitens der Nebennieren gekennzeichnet. Dabei handelt es sich entweder um ein Aldosteron-produzierendes Adenom (APA), oder um eine bilaterale Hyperplasie der Zona glomerulosa-Zellen (IHA). Diese Patienten weisen unter anderem erniedrigte Serum-Renin Werte und Serum Angiotensin 2 Werte, sowie eine erhöhte ALD/Renin Ratio als Zeichen der negativen Rückkoppelung durch Aldosteron auf den juxtaglomerulären Apparat der Nieren (siehe Abbildung 2) und auf die dort vorhandene Renin-Bildung auf. Eine klassische klinische Trias äußert sich mit einer schwer einstellbaren Hypertonie, einer Hypokaliämie und einer metabolischen Azidose (4).

Ein sekundärer Hyperaldosteronismus (SA) ist durch eine gesteigerte RAAS Aktivität gekennzeichnet. Mögliche Ursachen können eine Herzinsuffizienz, eine Leberzirrhose, eine Nierenarterienstenose oder eine exzessive Salzzufuhr sein. Die Plasma Renin- und Angiotensin 2 Werte sind permanent erhöht, die ALD/Renin Ratio gering. Die Plasma Aldosteronwerte sind jedoch weniger hoch und die klinischen Symptome weniger stark ausgeprägt als bei einem PA (4).

1.1.4 Aldosteron und Knochenstoffwechsel

Es gibt mittlerweile zahlreiche Studien, die eine Assoziation zwischen Aldosteron und den Knochenstoffwechsel dokumentieren. Sarcuni et al. beschreiben, dass Patienten mit einem primären Hyperaldosteronismus, IHA und APA, ein höheres Risiko für Osteoporoseentwicklung aufweisen, als Patienten mit normalen Aldosteronblutwerten (8). Petramala et al. vergleichen Knochenparameter von 4 verschiedenen Gruppen, IHA, APA, EH (Essentieller Hypertonus) und HS (healthy subjects). In Patienten mit APA und IHA zeigte sich eine höhere Prävalenz für

Osteopenie bzw. Osteoporoseerscheinungen, als bei Patienten mit EH. Bei APA waren die Werte deutlicher ausgeprägt als bei IHA (9).

Der hauptsächliche pathophysiologische Mechanismus ist eine bidirektionale Interaktion zwischen Aldosteron und Parathormon. Experimentelle Studien weisen auf einen direkten stimulierenden Effekt von Parathormon (PTH) auf die Aldosteronsekretion hin. Diese Theorie wird durch das Vorhandensein von PTH-PTHrP-Komplexen auf der Zellmembran der ZG-Zellen bekräftigt (10).

Aldosteron hingegen übt seine Wirkung auf die Parathormonsekretion vorwiegend indirekt aus. Ceccoli et al. berichten über erhöhte kalziuretische Werte sowie niedrige Serumkalzium-Werte nach 24h bei Patienten mit PA. Diese Patienten weisen allesamt erhöhte Serum-PHT Werte als Ausdruck eines sekundären Hyperparathyroidismus auf (11). Eine direkte Wirkung von Aldosteron auf die Parathormonausschüttung konnte noch nicht identifiziert werden, ist jedoch laut Sarcuni et al. in Bezug auf den ermittelten Werten (73% Osteoporoseprävalenz, 43% Wirbelkörperfrakturen) sehr wahrscheinlich (8).

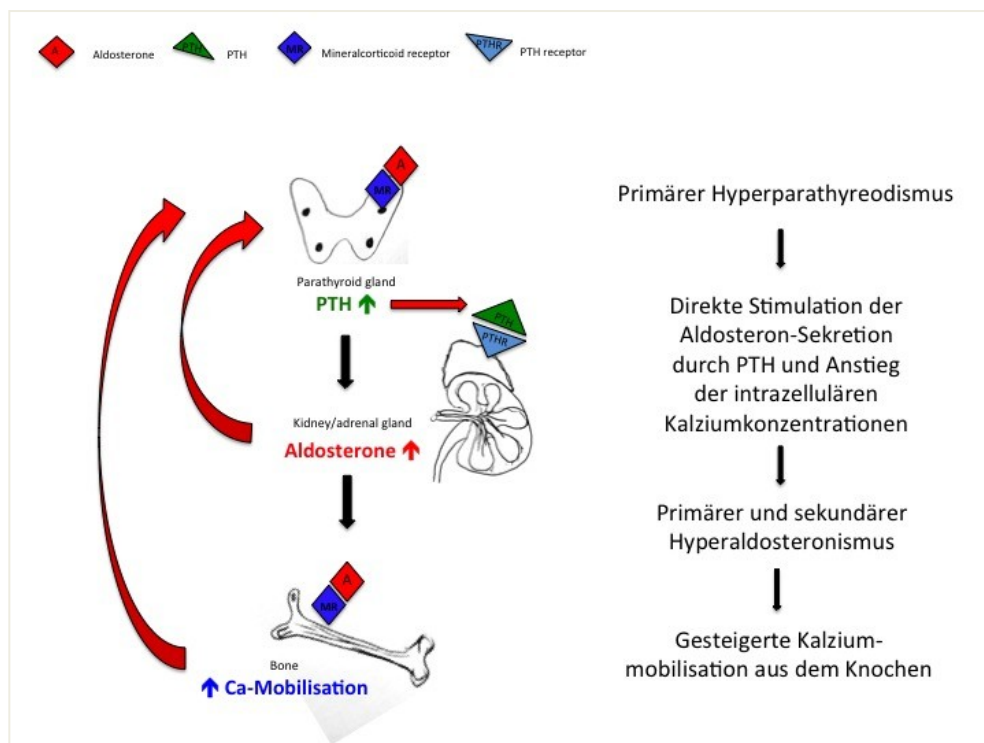


Abbildung 3: Mögliche Mechanismen der ALD-PTH Interaktion

Die Behandlung eines primären Hyperparathyroidismus mit einer Parathyrektomie führt reflexartig zu einem Rückgang der Plasma Aldosteronkonzentration (12).

Nach einer 6-monatigen Spironolactontherapie bei Patienten mit einem PA konnte eine verminderte renale Kalziumausscheidung und ein vermindertes Serum-PTH, sowie ein vermehrtes Serum-Kalzium im Vergleich zur Vorbehandlung festgestellt werden (8).

1.1.5 Aldosteron und Vitamin D

Mehrere Studien belegen einen protektiven Effekt von Vitamin D₃ in Bezug auf eine pathologisch erhöhte Aldosteronsekretion. Vitamin D₃ moduliert die Renin Genexpression unabhängig von anderen Parametern wie Kalzium, PTH und Angiotensin 2. Angiotensin 2 kann über einen negativen Rückkoppelungsmechanismus die Calcitriol Formation in der Niere hemmen und zwar über eine Vermehrung der renalen Klotho Gen-Expression. In weiterer Folge bindet Klotho als Co-Rezeptor an FGF-23 (Fibroblast-Growth Faktor-23). FGF-23 kann dadurch seinen inhibitorischen Effekt auf die 1-alpha Hydroxylase Aktivität ausüben, das die Reaktion von 25(OH) Vitamin D₃ (Cholecalciferol) zu 1,25(OH)₂ Vitamin D₃ (Calcitriol) katalysiert. Nebenbei hemmen die Klotho-FGF-23 Komplexe die Phosphatresorption aus den proximalen Tubuli der Niere (13,14).

Ein Defekt im Klotho Gen führt bei Mäusen zum sogenannten „Premature-Aging-Syndrom“. In diesem Fall kommt es zu einer Überproduktion von Vitamin D₃, da die Klotho-FGF-23 Achse lahmgelegt wird und der inhibitorische Effekt von FGF-23 auf die Vitamin D₃ Produktion wegfällt. Als weitere Folge entsteht eine Hypervitaminose, die mit Gefäßkalzifizierungen, Hyperphosphatämie, Hyperkalziämie, Wachstumsretardierungen, Hautatrophien und frühzeitigem Tod assoziiert ist. Des Weiteren kann eine Hyperkalziämie zu einer Hemmung der renalen Natriumrückresorption aus den Tubuluszellen der Niere führen, das wiederum zu einer Hyponatriämie und sekundär zu einem Hyperaldosteronismus führt. Kalziumarme Diät konnte die Lebenserwartung dieser Mäuse in den erwähnten Versuchen erhöhen (15,16).

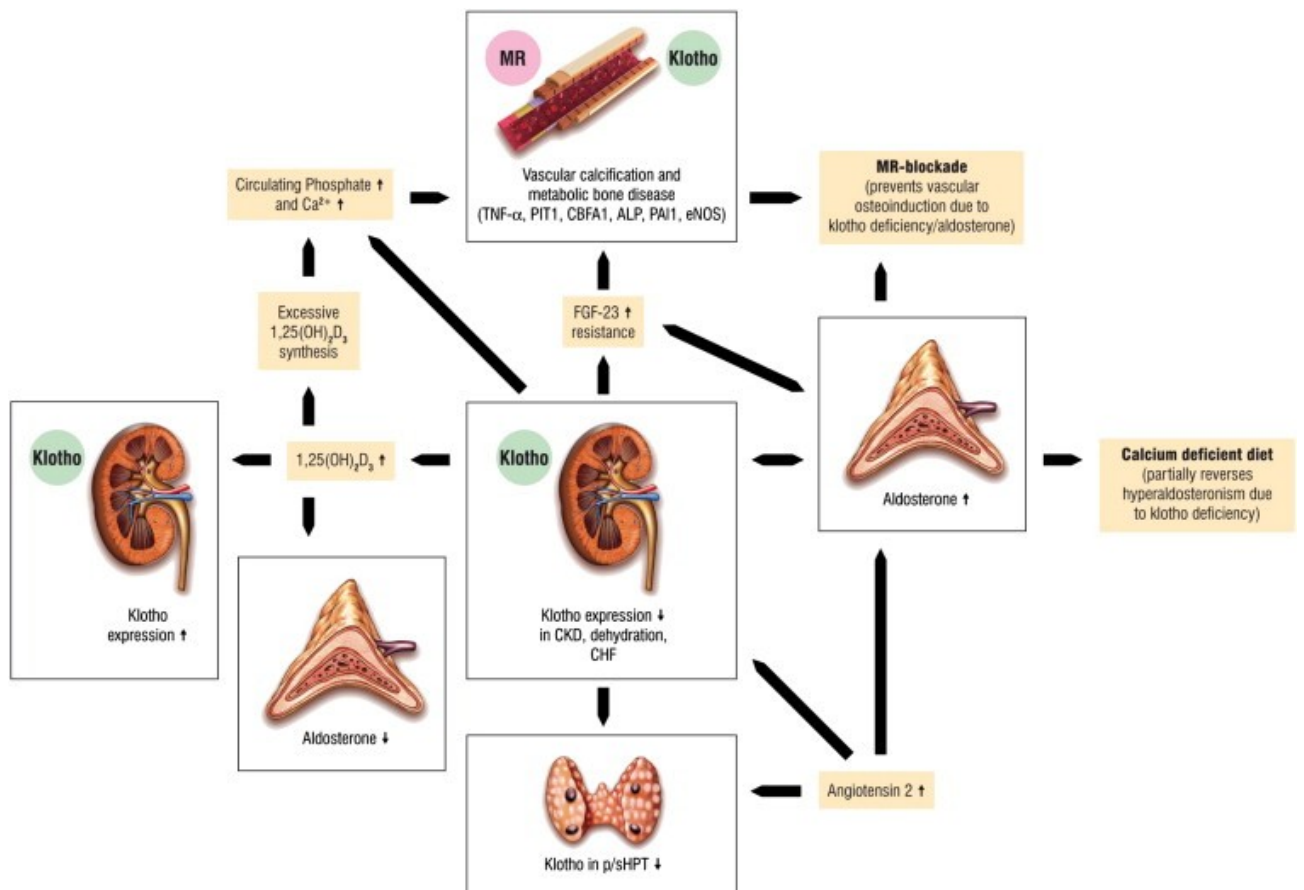


Abbildung 4: Klotho/FGF-23 Beeinflussung der Aldosteronsynthese (10).

Aus einer Studie von Kong und Li aus dem Jahr 2003 ging hervor, dass VDR (-/-) (Vitamin D-Rezeptor) defiziente Mäuse eine gesteigerte RAAS Aktivität aufwiesen, die durch hohe Plasma Renin- und Angiotensin 2 Werte bestätigt wurde. Diese Mäuse zeigten ein gesteigertes Trinkverhalten und eine vermehrte Salzexkretion als Folge der erhöhten Angiotensin 2 Plasma-Konzentration (Steigerung des Durst- und Salzhungers). Durch die Gabe von ACE-Hemmern oder AT-1 Antagonisten konnte dieser Effekt rückgängig gemacht werden (17).

Da Vitamin D in die Reninsynthese eingreifen kann, hat diese Pathologie Bedeutung im Zusammenhang mit einem SA. Wie in 1.1.3 dargestellt, ist bei einem PA das RAAS System herunter reguliert und somit bleibt der Effekt von Vitamin D auf die Reninsynthese aus. Salcuni et al. und Ceccoli et al. fanden keine signifikanten Differenzen in der Plasma 25-OH Vitamin D Konzentration zwischen Patienten mit PA und Patienten mit nonPA (8,11). Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz profitierten von einer therapeutischen Vitamin D3 Gabe (18).

1.1.6 Profibrotische und Proinflammatorische Wirkung

Das Vorhandensein von Mineralkortikoidrezeptoren auf extrarenalen, nicht epithelialen Zellen, wie Kardiomyocyten, Endothelzellen und Gefäßmuskelzellen weist auf eine systemische Wirkung von Aldosteron im kardiovaskulären System hin (5). Chokkar et al. berichteten von einer verminderten Alpha-Antiproteinase Serum-Konzentration nach iatrogenen Aldosterongabe über 4-6 Wochen als Zeichen eines durch Aldosteron systemisch induzierten oxidativen Stress-Status (19). Histopathologische Untersuchungen an Mäusen zeigten beginnende Gefäßwandverdickungen, Herzmuskeldegeneration und leukozytäre Infiltrationsmuster ab der zweiten Woche nach iatrogenen Aldosteron/Salz Gabe. Molekulargenetische Untersuchungen wiesen auf eine Hochregulierung von proinflammatorischen Faktoren, wie Osteopontin, COX-2 und MCP-1, AP-1, NF-kB und bFGF hin. Weiters konnten vermehrte Mengen an Kollagen-1, Fibronectin und Laminin als Zeichen fibrotischer Umbauprozesse beobachtet werden.

Die Gabe von AT-1 Antagonisten (Valsartan, SA) oder Aldosteronantagonisten (Spironolacton, PA) reduzierte den Entzündungsprozess, die interstitielle Matrix-Bildung und die kardiale Hypertrophie.

Dies zeigt unter anderem, dass proinflammatorische und profibrotische Effekte von Aldosteron nicht ausschließlich durch die erzeugte Hypertonie stattfinden müssen (20, 21, 22).

1.1.7 Aldosteron und chronische Herzinsuffizienz

In Abbildung 5 wird der Zusammenhang zwischen Herzinsuffizienz und Aldosteron nochmals schematisch erklärt.

1.2 Der Knochen als endokrine Drüse

Das menschliche Skelett ist bekannt für seine Funktion als Halte und Stützapparat bzw. blutbildendes Organ. Seit dem letzten Jahrzehnt wird dem Knochen zusätzlich eine bedeutende Rolle als endokrines Organ zugeschrieben, das unter anderem den Energiehaushalt, die Fertilität, sowie unser Wachstum koordiniert. Karsenty und Ferron beispielsweise, betrachten Knochengewebe als Bestandteil eines auf den gesamten Organismus übertragenen „Physiologienetzes“ (23). Organe (z.B. Knochen) bzw. Systeme (z.B. Skelett) können durch das Vorhandensein von bestimmten Mediatoren (Botenstoffe, Hormone) miteinander interagieren und unseren Organismus aufrechterhalten, oder im schlimmsten Fall krankhaft verändern.

In diesem Kapitel möchte ich die Rolle unseres Skelettes in einer auf den gesamten Organismus bezogenen Perspektive erläutern.

1.2.1 „Bone remodelling“

Knochengewebe ist ein sehr dynamisches Gewebe, das zahlreichen Auf- und Abbauprozessen unterliegt. Diese Prozesse finden simultan statt, um ein Gleichgewicht zu erlangen und die Knochenmasse konstant zu halten. Fehlregulierungen dieses Gleichgewichtes können zu krankhaften Veränderungen führen. So spricht man von Osteoporose, wenn resorptive Vorgänge am Knochen überwiegen, von Osteopetrose, wenn Aufbauvorgänge die Überhand behalten. Zwei Zelltypen sind für die Einhaltung dieses Gleichgewichtes zuständig: die Osteoblasten und die Osteoklasten (24).

Osteoblasten sind für den Aufbau der Knochensubstanz zuständig, Osteoklasten stammen ursprünglich aus der Monozytären-Makrophagen-System (MMS) Familie und sind sogenannte resorptive Zellen. Um ihre Wirkung zu entfalten, müssen sie im Knochengewebe einen Reifungsprozess unterziehen. Dieser Prozess wird mit Hilfe von verschiedenen Mediatoren (siehe Abbildung 6) vollzogen (25).

Im Rahmen von knochendestruktiven Erkrankungen wie Tumore, rheumatoide Erkrankungen, Hyperparathyroidismus oder Mb Paget werden Faktoren gebildet (z.B. PTH), die mit einer Interaktion mit Osteoblasten oder Stromazellen

einhergehen. Diese führen zu einer vermehrten Genexpression einer Reihe von pro-osteoklastogenen Faktoren, wie z.B. M-CSF (Makrophage Colony Stimulating Faktor) und RANKL. Diese zwei Botenstoffe induzieren vorwiegend die Reifung eines Makrophagen zum fertigen Osteoklasten (24,25).

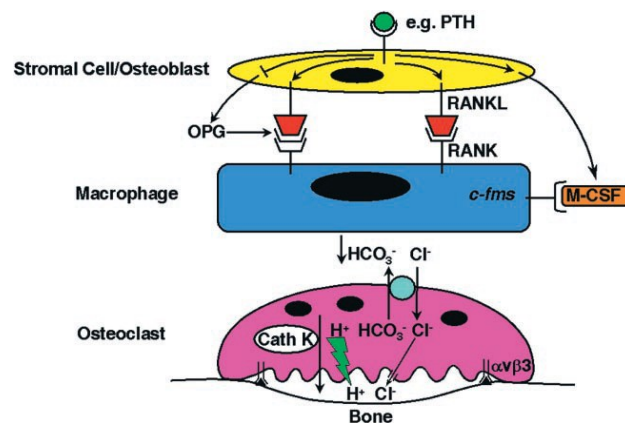


Abbildung 6: Knochenaufbau- und Abbauprozesse (25)

Das Gegenspiel zu RANKL und M-CSF ist OPG (Osteoprotegerin).

Das Ausmaß von Aufbau- bzw. Abbauprozessen am Knochen wird durch das Überwiegen einer dieser Gegenspieler bestimmt (25).

Sobald der Osteoklast gereift ist, kann er eine Verbindung mit der Knochenmatrix (Polarisation) über das alpha-V-beta-3 Integrin ($\alpha v \beta 3$) einhergehen. Die Verbindung aktiviert H^+ ATPasen auf der resorptiven Fläche der Osteoklasten-Zellmembran, die eine Ansäuerung des interstitiellen Raumes auf derselben bewirken. Durch die Aktivierung eines H^+/HCO_3^- Carriers auf der gegenüberliegenden, antiresorptiven Fläche kann der PH-Wert im Zellinneren konstant gehalten werden. Dieser angesäuerte Mikroraum (PH= 4,5) verschafft geeignete Bedingungen für resorptive Prozesse am Knochen (25).

Osteopetrose ist eine natürliche Folge von Osteoklastendysfunktion und verminderter Knochenresorption (25). In Abbildung 7 sieht man die in der Osteoklastenreifung relevanten Gene/ Mediatoren.

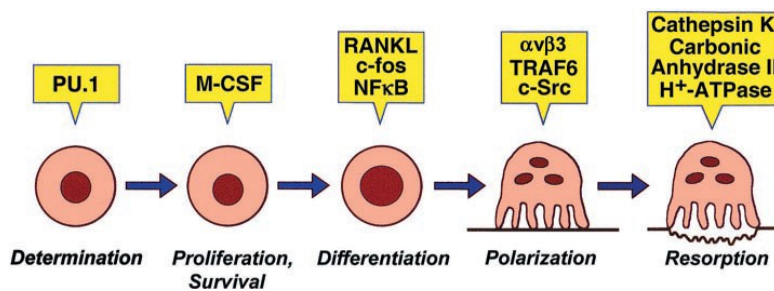


Abbildung 7: Osteoklastenreifung (25)

1.2.2 Leptin - ein antiosteogener Faktor

Ducy et al. konnten erstmals beweisen, dass Leptin (ob/ob) bzw. - Leptin-Rezeptor (eb/eb) defiziente Mäuse eine gesteigerte Knochenmasse aufwiesen. Die Tatsache, dass diese Mäuse auch hypogonad und adipös waren, ließ mehrere Fragen offen. Nämlich, warum im Rahmen eines Hypogonadismus und eines Hyperkortisolismus (Adipositas) vermehrt Knochenaufbau stattfindet? Gibt es einen zentralen Mechanismus, der den Knochenaufbau regelt bzw. Fertilität-Energiehaushalt und Knochenaufbau vernetzt? (26).

Leptin ist ein Peptidhormon und wird von adipozytären Zellen gebildet. Seine Hauptaufgabe ist es, dem Körper den Füllungsstatus unserer Fettspeicher zu signalisieren. Dazu gelangt es über noch unbekannte Mechanismen zum Hypothalamus und hemmt dort die Ausschüttung von Neuropeptid Y (NPY). Neuropeptid Y erhöht das Hungergefühl und bringt uns dazu zu essen (27).

Aber was bewirkt Leptin genau im Hypothalamus und wie beeinflusst es den Knochenstoffwechsel?

Takeda et al. beschrieben, dass Leptin über eine Aktivierung des Sympathikus agiert. Dazu wurden ob/ob Mäuse 5 Wochen lang mit einem Beta Mimetika therapiert. Nach dieser Behandlungszeit konnte eine verminderte Knochenmasse bei gleichem Körpergewicht festgestellt werden. Die Gabe von Beta Blockern hingegen führte bei Wildtyp Mäusen zu einer Vermehrung der Knochenmasse. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass Leptin nicht direkt, sondern indirekt über einen gesteigerten Sympathikotonus die Knochenmasse regulieren kann, jedoch unabhängig vom Körpergewicht (28).

Ein anderer postulierter Mechanismus ist die durch Leptin induzierte Bildung eines Stoffes namens CART (cocain-amphetamin-regulated transcript) in den nuclei arcuati des Hypothalamus. CART agiert osteoprotektiv indem es die RANKL Bildung in den Osteoblasten supprimiert. Tierversuche an Mäusen bestätigten, dass ein CART-Defizit mit einer verminderten Knochenmasse einhergeht, während eine CART-Überproduktion zu einer Vermehrung der Knochenmasse führte (29, 30, 31).

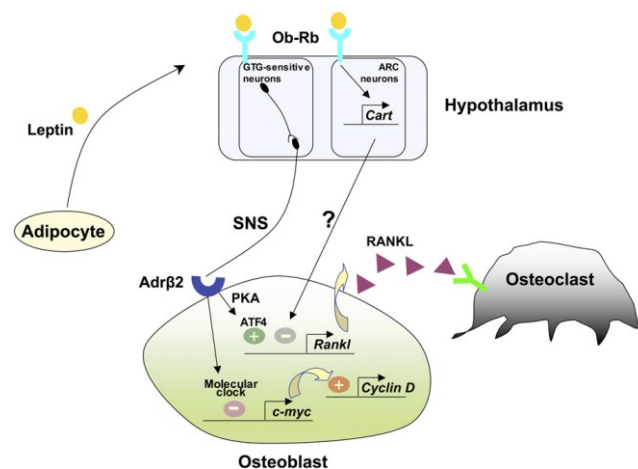


Abbildung 8: Leptinwirkung am Knochen (30)

Die Aktivierung des Sympathikus wird durch den Serotoninsignalweg vermittelt. Die Bindung von Leptin an seinen Rezeptor in den Nuclei raphne Zellen des Hypothalamus führt über einen komplexen Mechanismus zur Hemmung der Tryptophan-Hydroxylase 2. Dieses Enzym katalysiert die Reaktion von Tryptophan zu Serotonin. Das von den nuclei raphne in den ventromedialen Hypothalamus (Sympathikusaktivierung) bzw. in den nuclei arcuati projizierte Signal wird durch die Hemmung der Serotoninbildung unterdrückt. Die dadurch erhöhte Sympathikusaktivität verursacht eine Verminderung der Knochenmasse. Ein Leptinmangel führt zu einer Überproduktion von Serotonin, das den Sympathikus bremst und indirekt den Knochen aufbaut (32,23).

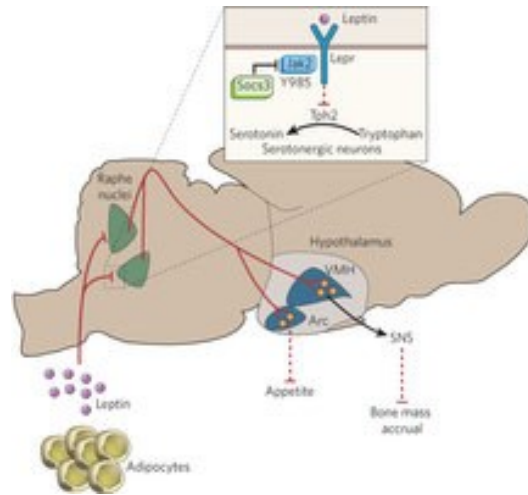


Abbildung 9: Leptin inhibiert den Serotonin Signalweg (23).

1.2.3 Das Knochenhormon Osteocalcin

Die Entdeckung des Knochenhormons Osteocalcin geht bis zum Jahre 1975 zurück, als Huaschka et al. ein kleines Protein in Hühnerknochen entdeckten, das die Fähigkeit besaß, Bariumsulfat an sich zu binden (33,34). Wenige Zeit später konnte Osteocalcin aus Rinderknochen isoliert werden. Dabei handelt es sich um eine Polypeptid-Kette aus 47 Aminosäuren mit drei sogenannten Gla-Domänen (33,35).

Eine Gla-Domäne ist eine Proteinregion, die postranslational an Glutamatresten carboxyliert wurde. Diese Carboxylierungen sind Vitamin K abhängig und werden mit Hilfe des Enzyms Gamma-Glutamyl-Carboxylase (GGCX) durchgeführt (36). Die carboxylierte Form (80%, cOC) besitzt die Fähigkeit Calciumionen an sich zu binden und bestimmt somit den Mineralisierungszustand des Knochens. Die untercarboxylierte Form (20%, ucOC) wird auf dem Blutweg entlassen und agiert als multifunktionelles Hormon (siehe Kapitel 1.2.4) (37).

1985 konnte die Bildungsstätte von Osteocalcin in den Osteoblasten entdeckt werden (38). Wenige Jahre später konnte ein anderes Gla-Protein im Knochen, das Matrix Gla Protein (MGP), erstmals identifiziert werden (39).

1.2.4 Die „Pankreas-Gonaden-Achse“

Bislang ist bekannt, dass untercarboxyliertes Osteocalcin (ucOC) an zwei Orten in unserem Körper agiert: an den Beta-Zellen des Pankreas und an den Leydig Zellen des Hodens. An den Beta-Zellen des Pankreas bewirkt Osteocalcin eine vermehrte Insulin Ausschüttung, sowie eine gesteigerte Beta-Zellproliferation. Insulin wiederum bewirkt durch Bindung an den Insulin-Rezeptor der Osteoblastenzellmembran eine Steigerung der Osteocalcinproduktion. Diese gegenseitige Beeinflussung trägt zur Aufrechthaltung einer geeigneten Glukosehomeostase bei (23,37). Die Unterbrechung dieses Regelkreislaufes führt zu einer verminderten Insulinsensitivität und einer gestörten Glukosetoleranz (Adipositas und Diabetes Typ 2).

Mäuse, die Osteocalcin (OC^{-/-}) defizient sind, oder den Insulinrezeptor auf der Osteoblastenzellmembran ausgeknockt hatten (InsRosb^{-/-}), wiesen diese Eigenschaften auf. Das Fehlen des Insulinrezeptors im Muskel oder Fettgewebe führte beispielsweise zu keinen Glukoseintoleranzerscheinungen (40, 41, 44).

Da die Decarboxylierung von Proteinen nur bei saurem Milieu möglich ist, (42), findet sie während eines Zustands von gesteigerter Knochenresorption (siehe Kapitel 1.2.1) statt. Insulin hemmt die Osteoprotegerin Genexpression in den Osteoblasten und favorisiert somit resorptive Prozesse am Knochen und die bei saurem Milieu stattfindende Decarboxylierungen von OC zu Glu-OC (43).

Anhand von Nagetierstudien ist bekannt, dass Glu-OC die Testosteronsynthese in den Leydig Zellen des Hodens stimulieren kann. OC-defiziente (OC^{-/-}) Mäuse wiesen nicht nur verkleinerte Hoden, Samenblasen und Nebenhoden auf, sondern es wurden auch eine verminderte Zahl von reifen Spermatozyten festgestellt. Um eine autokrine Bildung von Osteocalcin in den Leydigzellen auszuschließen, wurden Osteoblasten-spezifische Osteocalcin-Ausschaltungen in diesen Mäusen durchgeführt, die wiederum zu einer Verminderung der Gonadenreifung führten (45).

Die Wirkung von Glu-OC auf die Leydig Zellen des Hodens läuft unabhängig von der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse. Jedoch sind beide Signalwege für eine korrekte Entwicklung und Reifung der männlichen Geschlechtsorgane unabdingbar (46). So wiesen LH (Luteotropes Hormon) defiziente Mäuse (LH^{-/-})

den gleichen Phänotyp wie OC $-/-$ oder OCosb $-/-$ Mäuse auf (47).

Weitere Studien identifizierten einen G-Protein gekoppelten Rezeptor als Osteocalcin Rezeptor, der über die Erhöhung der cAMP Produktion seine Wirkung entfaltet.

Da man von Glu-OC bislang nur die Wirkung auf die männlichen Gonaden kennt, weiß man derzeit von 4 cAMP produzierenden Rezeptoren, die predominant in den Leydig Zellen des Hodens exprimiert werden (45). Experimente zeigten, dass eine Ausschaltung des Gprc6a-Rezeptors (G-Protein-gekoppelter Rezeptor 6 alpha) in Mäusen zu einem ähnlichen Phänotyp führte, wie bei OC $-/-$, OCosb $-/-$ oder LH $-/-$ Mäusen (49, 50).

Diese Regulation der Fertilität ist bislang auf die männliche Fruchtbarkeit beschränkt. Bis heute ist noch kein durch OC induziertes Analogon zur Regulierung der Fertilität bei Frauen bekannt (48).

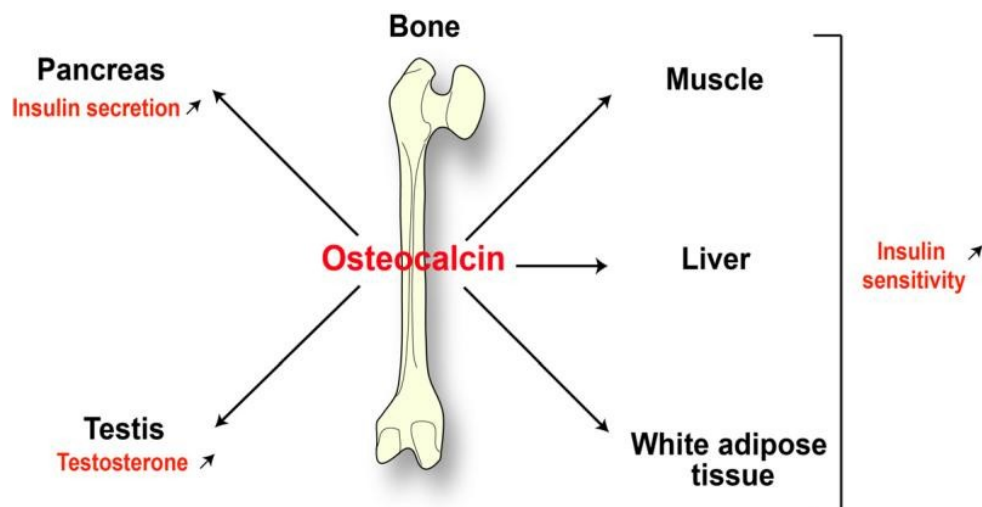


Abbildung 10: Die Pankreas-Gonaden Achse (47).

1.2.5 Glu-OC: Ein Mediator von Wachstum und Reifung

Da die Decarboxylierung von OC zu Glu-OC bei saurem Milieu stattfindet (42), induzieren resorptive Prozesse am Knochen gleichzeitig die Glu-OC Bildung. Insulin und Leptin sind katabole Stoffe, die den Energiehaushalt unseres Körpers regeln und über differente Mechanismen den Knochen abbauen können. Insulin

hemmt die OPG Produktion in den Knochen und stellt die Energie für die bevorstehenden, resorptiven Prozesse bereit (43). Die Wirkung von Leptin am Knochen hingegen vollzieht sich sowohl über eine Aktivierung des Sympathikus als auch über einen Mediator namens CART (28, 29, 30, 31). Die Rolle von Glu-Oc ist in diesem Fall jene als Mediator, um eine durch Insulin und Leptin vollzogene Kontrolle der Fertilität zu erreichen. Die Vernetzung von Wachstum und Reifung wird durch das Zusammenspiel Insulin/Leptin mit Osteocalcin bestimmt (23) und ist im Kindesalter sicherlich der entscheidende Punkt, um eine gesunde physische, psychische und geschlechtsspezifische Entwicklung bis zum Erwachsenenalter zu erreichen (51, 52).

Aus Studien weiß man, dass sowohl Leptinrezeptor-defiziente, als auch Insulinrezeptor-defiziente Mäuse im jungen Alter eine gestörte Glukosetoleranz und einen Hypogonadismus in Zusammenhang mit erhöhter Knochendichte aufwiesen (26, 40).

Die Vermutung liegt daher nahe, dass unzureichende resorptive Prozesse am Knochen, eine unzureichende Decarboxylierung von OC zu Glu-OC bewirken könnten und diese negative Vernetzung von Wachstum und Reifung ermöglicht.

1.3 Hypothese

In meinen Versuchen untersuche ich die Wirkung von Aldosteron auf den Knochenstoffwechsel in den Osteosarkomzelllinien U-2 OS und MG-63.

Anhand der Literatur vermute ich einen direkten Effekt von Aldosteron auf die Zellproliferation der Knochenzelllinien. Dieser Effekt soll anhand von Genexpressionsversuchen über Veränderungen der Genexpression verschiedener Knochenstoffwechselfgene erklärt werden. Zusätzlich soll die Auswirkung einer Aldosteron-Zugabe auf die Osteocalcinsekretion der verwendeten Knochenzellen gezeigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Die Zellen

Für die Untersuchungen wurden die beiden humanen Osteosarkomzelllinien U-2 OS und MG-63 verwendet, die mir dankbarerweise vom klinischen Institut für Endokrinologie und Stoffwechsel an der Universitätsklinik für Innere Medizin, Medizinische Universität Graz, zur Verfügung gestellt wurden. Die Zelllinie MG-63 stammt ursprünglich von einem 14-jährigen Jungen, die U-2 OS Zelllinie von einem 15-jährigen Mädchen, beide kaukasischen Ursprunges. Beide Zelllinien weisen ein adhärentes Wachstum in Kultur auf, und können anhand ihrer Morphologie unterschieden werden. MG-63 Zellen wurden aus Fibroblasten bzw. Fibroblasten ähnlichen Zellen gezüchtet, U2-OS sind wiederum epithelialen Ursprungs.

Aus der Literatur ist bekannt, dass MG-63 Zellen große Mengen an Interferon synthetisieren. U2-OS Zellen weisen eine Hochregulierung der Genexpression mehrerer Wachstumsfaktoren wie Gene für den Insulin-like growth faktor I und II (IGF1, IGF2) sowie das Gen für den Osteosarcome derived growth Faktor (ODGF) auf (53, 54).

2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für eine längerfristige Lagerung von Zelllinien wird flüssiger Stickstoff bei einer Temperatur von -196°C verwendet. Dies ermöglicht es, ihre zytogenetischen und biochemischen Eigenschaften nahezu unbegrenzt beizubehalten, da ab einer Temperatur von -130°C keine zelluläre Prozesse bzw. Reaktionen stattfinden (55).

Das Einfrieren ist ein strapaziöser Vorgang für Zellen. Dabei werden die Zellen in Form von Zellsuspensionen (suspendiert in Zellkulturmedium) in spezielle Kryoröhrchen übertragen. Um die Zellen dabei bei einem erneuten Auftauvorgang vor einer Zellyse zu schützen, wird ein organisches Lösungsmittel als „Kälteschutzmittel“ dazugegeben, das meist verwendete ist DMSO (56). Da DMSO aber zelltoxisch ist, müssen die Zellen erstens sehr rasch bei 37°C aufgetaut

werden und zweitens nach dem Auftauprozess sofort mit Medium verdünnt werden. Zur Entnahme aus dem Stickstofftank wird Schutzkleidung (Schutzhandschuhe und Schutzbrille) getragen. Die Position der aufzutauenden Zellen ist in speziellen Tankregistern gekennzeichnet.

Für einen möglichst raschen Auftauprozess wurden die Kryoröhrchen, mit den U-2 OS und MG-63 Zellen, in einem mit 37°C warmen Wasser, gefüllten Behälter ins Zellkulturlabor transportiert und dort im Wasserbad bei 37°C fertig aufgetaut. Sobald das Kryoröhrchen aufgetaut war, wurde der Inhalt mit den Zellen rasch in ein Zentrifugenröhrchen (50ml) übertragen das zuvor mit 10 ml Medium versehen wurde (Verdünnung des DMSO). Das Zentrifugenröhrchen wurde 5 Minuten bei 1000 Umdrehungen zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 10 ml frischem Medium resuspendiert. Nach Resuspension wurden die Zellen in T75 Zellkulturflaschen (T75 Flask= 75cm² Zellkulturflasche) übertragen und im Brutschrank bei geregelter Luftfeuchtigkeit und 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.3 Passagieren und Kultivieren

Nach dem Auftauen wurden U-2 OS und MG-63 Zellen solange kultiviert bis sie für die ersten Versuche herangezogen wurden. Je nach Zelltyp bzw. Zelllinie werden verschiedene Nährmedien benutzt, die die dazu erforderlichen Nährstoffe enthalten. Typische Basalmedien enthalten in der Regel Grundbausteine wie Aminosäuren, Einfachzucker, Vitamine und Salze, sowie Puffergemische, um den PH-Wert des Mediums, der sich nach Stoffwechselprozesse der Zellen ändert konstant zu halten. Ein weiterer Zusatz eines Standardnährmediums ist Serum, das verschiedene Wachstumsfaktoren, sowie Hormone, Proteine und Spurenelemente enthält, die für eine Beschleunigung von Wachstumsprozessen der kultivierten Zellen sorgen. Sehr häufig wird Rinderserum dazu verwendet, da es in großen Mengen produziert werden kann (57). Für die Tumorzelllinie MG-63 wurde das Medium DMEM/F12 supplementiert mit 10% FBS Medium und für U2-OS das Medium Mc Coy's supplementiert mit 10% FBS verwendet.

Sobald das Medium von den Zellen verstoffwechselt wird und die Zellen sich mehrmals verdoppelt haben, müssen die Zellen in eine neue Kulturflasche übertragen und mit frischem Medium versorgt werden. Dieser Prozess nennt sich

Passagieren und wird, je nach Wachstumsgeschwindigkeit und Konfluenz der Zellen durchgeführt. Sitzende oder adhärenente Zellen, wie MG-63 und U-2 OS, werden mit Trypsin oder Accutase (wirkt schonender auf die Zellen) behandelt. Die Behandlung mit diesen Enzymen sorgt dafür, dass einerseits die Zell-Zell-Verbindungen gelöst werden, andererseits die Zell-Matrix-Verbindung gelöst wird, um ein Detachment zu erzeugen.

Dafür wird zuerst der Zellüberstand abgesaugt und die adhärenenten Zellen mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen, das danach wiederum vollständig abgesaugt wird. Schlussendlich werden 5 ml Enzymlösung auf die Zellen ins T75 Flask zugegeben und die Zellen samt Enzymlösung für ca. 3-5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach erfolgreicher Ablösung der Zellen vom Boden der Flasks, werden die nun in Suspension schwimmenden Zellen, in ein Zentrifugenröhrchen übertragen und für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt, das Pellet mit frischem Medium resuspendiert und anschließend in eine neue Kulturflasche übertragen.

Um ein effizientes Wachstum der beiden Tumorzelllinie zu erlangen, werden nach der Passage $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml in die frische Kulturflasche übertragen. Die Bestimmung der Zellzahl kann manuell mit Hilfe eines Hämocytometers oder mit einem Zellzählgerät (CASY) durchgeführt werden. Jede Passage muss in einem Protokoll vermerkt werden und die Kulturflaschen mit der fortlaufenden Passagennummer beschriftet werden. Meistens benötigen die Zellen zwei bis drei Wochen um sich vom Auftauprozess zu erholen und um sich wieder an die neue Umgebung zu gewöhnen, wobei das Wachstum der Zellen in dieser Zeit sehr gering ist (LAG Phase). Sobald die LAG Phase vorüber ist kommt es zur LOG Phase, in der die Zellen meist ein exponentielles Wachstum aufweisen und für Versuche verwendbar sind.

2.4 Umkehrphasen-Mikroskopie

Umkehr- oder Umkehrphasen-Mikroskope sind Mikroskope, bei denen die Objektive von unten auf den Objektträger bzw. der Zellkulturflasche fokussieren,

während die Lichtquelle von oben auf das Objekt scheint. Da unsere Zellen adhärent am Flaschenboden wachsen können durch Umkehrmikroskope, wegen des kleineren Objektiv-Objekt Abstandes, viel schärfere Bilder erzielt werden.

2.5 Zellviabilitätstest mit WST-1

Ein Zellviabilitätstest gibt einen ersten Einblick um die Wirkung einer bestimmten Substanz auf die Proliferation von Zellen zu detektieren. Es eignet sich hierfür der Zellproliferationstest mit WST-1 Reagenz sehr gut. Bei WST-1 handelt es sich um ein Tetrazoliumsalz, das von den Mitochondrien der Zellen abgebaut werden kann, sofern die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität aufrecht ist. Stoffwechselaktive Zellen (proliferationsfähige Zellen) sind in der Lage einen Farbumschlag nach Zugabe von WST-1 zu erzeugen, der bei einer bestimmten Wellenlänge von einem Spektrometer erfasst werden kann. Durch kleine Farbintensitätsunterschiede kann damit Rückschluss auf die Proliferation einer Zellgruppe in An- oder Abwesenheit einer bestimmten Substanz, in unserem Fall Aldosteron, geschlossen werden (58).

2.5.1 Zubereitung der Aldosteron-Stock Lösungen

5 mg Aldosteron in Pulverform wurden mit 1 ml EtOH gelöst (Ausgangs-Lösung) und daraus 4 Stock-Lösungen (50 µg/ml, 5 µg/ml, 500 ng/ml und 50 ng/ml) hergestellt. Die einzelnen Verdünnungen sind in Tabelle 1 zusammengefasst:

Aldosteronstocks	Verdünnung	Herstellung der Aldosteronstocks
50 ng/ml	1:10	100 µl 500 ng/µl Stock + 900 µl EtOH
500 ng/ml	1:10	100 µl 5 µg/ml Stock + 900 µl EtOH
5 µg/ml	1:10	100 µl 50 µg/ml Stock + 900 µl EtOH
50 µg/ml	1:100	10 µl 5 mg/ml Stock + 990 µl EtOH

Tabelle 1: Herstellung von Aldosteronstocks.

2.5.2 Zubereitung der Aldosteron-Versuchskonzentrationen

Aus den Stocks wurden die Aldosteronlösungen für die Versuche hergestellt. Dazu wurde folgendes Schema angewandt:

Gewünschte Aldosteronkonzentration	Aldosteron-Stock	Herstellung der Aldosteronlösung
0 ng/ml	_____	10 µl EtOH + 990 µl Medium
0,1 ng/ml	50 ng/ml Stock	2 µl Stock + 998 µl Medium
0,5 ng/ml	50 ng/ml Stock	10 µl Stock + 990 µl Medium
1 ng/ml	500 ng/ml Stock	2 µl Stock + 998 µl Medium
5 ng/ml	500 ng/ml Stock	10 µl Stock + 990 µl Medium
10 ng/ml	5 µg/ml Stock	2 µl Stock + 998 µl Medium
50 ng/ml	5 µg/ml Stock	10 µl Stock + 990 µl Medium
100 ng/ml	50 µg/ml Stock	2 µl Stock + 998 µl Medium
500 ng/ml	50 µg/ml Stock	10 µl Stock + 990 µl Medium

Tabelle 2: Herstellung von Aldosteronversuchslösungen.

Die Aldosteronlösungen für die einzelnen Konzentrationen wurden in Mc Coy's Medium (für U-2 OS Zellen) und DMEM/F12 (für MG-63 Zellen) hergestellt. Als Negativkontrolle wurde EtOH statt Aldosteron verwendet.

2.5.3 Übertragen der Zellen in 96-Well Zellkulturplatten

Für den Versuch wurden U-2 OS und MG-63 in 96 Well-Zellkulturplatten (96 WP) ausgesät. Dazu wurden sie trypsinisiert und anschließend gezählt (siehe Kapitel 2.5.5). Es wurden bei MG-63 2×10^4 Zellen/ml und bei U-2 OS 1×10^4 Zellen/ml in die einzelnen Wells gegeben, um geeignete Voraussetzungen für den WST-1 Zellproliferationsversuch zu schaffen. Nachdem die Zellen auf die gewünschte Zellzahl verdünnt worden sind, werden je 100 µl Zellsuspension in die einzelnen Wells pipettiert und die Platten über Nacht in den Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ gegeben. Da die Proliferation nach Zugabe der Aldosteronlösungen an drei

verschiedenen Zeitpunkten (24, 48 und 72h) gemessen wurde, waren pro Zelllinie drei Platten für die Messungen erforderlich.

2.5.4 Übertragen der Aldosteronlösung in 96 WP

Nach der Übernacht-Inkubation wurden am nächsten Tag die Aldosteronlösungen (siehe Tabelle 3) in die Wells übertragen. Das Medium wurde zuvor mit einer sterilen Glaspasteurpipette mithilfe einer Absaugpumpe abgesaugt. Im Anschluss wurden sorgfältig jeweils 100 µl von den jeweiligen Aldosteronlösungen in die Wells pipettiert. Jeder Ansatz wurde in Triplikaten gemessen, d.h. es waren insgesamt 300 µl von jeder zu messenden Aldosteronkonzentration pro Messzeitpunkt notwendig, also 900 µl für alle 3 Messzeitpunkte. Insgesamt wurden pro Aldosteronkonzentration inklusive miteinbezogener Pipettiergenauigkeiten jeweils 1 ml (1000 µl) Aldosteronlösung hergestellt (siehe Tabelle 2).

Das Schema einer Platte sah wie folgt aus:

24h-48h-72h

Pipettierschema

0	0,1	0,5	1	5	10	50	100	500			Blank
0	0,1	0,5	1	5	10	50	100	500			Blank
0	0,1	0,5	1	5	10	50	100	500			Blank
		M	G	-	6	3					
		U	2	-	O	S					
0	0,1	0,5	1	5	10	50	100	500			Blank
0	0,1	0,5	1	5	10	50	100	500			Blank
0	0,1	0,5	1	5	10	50	100	500			Blank

Tabelle 3: Schema des WST-1 Versuchs.

2.5.5 Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe eines Hämozytometers (HCT, Neubauer Zählkammer), das zur lichtmikroskopischen Zählung aller Arten von kleinen Teilchen, die sich in Zellsuspension befinden, verwendet wird (59). Die Grundplatte des HCT weist ein Quadrat mit 1 mm Seitenlänge, das wiederum in 16 kleine (4X4) Quadrate unterteilt wird, auf.

10 μl Zellsuspension wurden auf die Zählfläche des HCT gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Der Raum zwischen Grundplatte und Deckplatte stellte die Zählkammer dar.

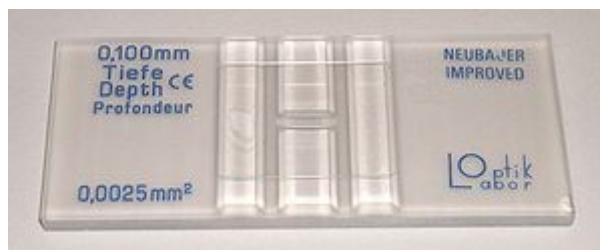


Abbildung 11: Hämozytometer (59)

Mithilfe des HCT und einem Umkehrphasen-Lichtmikroskops, können einzelne Partikel, in unserem Fall Zellen, gezählt werden.

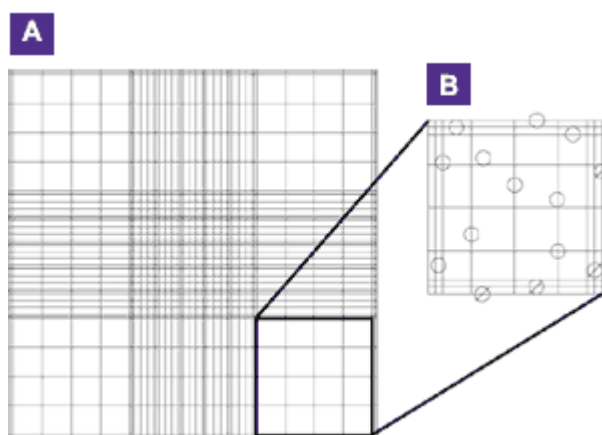


Abbildung 12: Muster Hämozytometer (60)

Alle Zellen, die sich in einem 4x4 Quadratmuster befinden, sowie an 2 Seitenrändern dieser Quadrate, wurden zur Zellzählung herangezogen. Die

Zählung wurde in allen 4x4 Quadraten durchgeführt und anschließend der Mittelwert ermittelt. Dunkle Zelldebris und andere kleinere Partikel wurden nicht gezählt.

Die Zellviabilität konnte mithilfe des Farbstoffs Trypanblau bestimmt werden. Dafür wurde die Zellsuspension 1:1 mit dem Farbstoff vermischt (10 µl Zellsuspension und 10 µl Trypanblau) und die Zellen wie zuvor ausgezählt. Tote Zellen waren blau gefärbt, viable Zellen blieben weiß, wodurch sich der Prozentsatz „tot: lebend“ in einer Zellsuspension bestimmen ließ.

Die Zellanzahl eines ausgezählten Quadrats, entsprach der gezählten Zellzahl x 10^4 Zellen/ml.

DIAGRAM II
CORNER SQUARE (ENLARGEMENT)

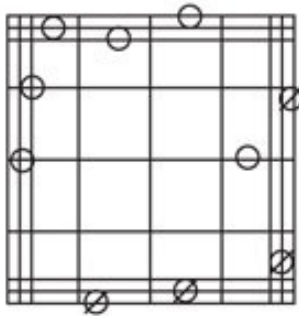


Abbildung 13; Zellzählung (61)

Anhand der ermittelten Zellzahl, konnten die Zellen bei MG-63 auf 2×10^4 Zellen/ml und bei U-2 OS auf 1×10^4 Zellen/ml durch Zugabe von Medium verdünnt werden und anschließend in die WP übertragen werden.

2.5.6 Spektroskopische Messung für den WST 1 Versuch

Nach 24, 48 und 72h Aldosteron-Inkubation wurde die Zellproliferation mithilfe von WST-1 bestimmt. 10 µl WST-1 Reagenz (Roche Diagnostics GmbH) wurden in die einzelnen Wells pipettiert und für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Es kam zu einem Farbumschlag, der durch das WST-1 Reagenz verursacht wurde. Der Farbunterschied in den jeweiligen Wells konnte nach 2 Stunden spektroskopisch bei 490 nm Wellenlänge am Photometer ermittelt werden. Die Messung und die Reagenz Zugabe fand an den drei Messtagen immer zur selben Uhrzeit statt. Die

Daten der einzelnen Messzeitpunkte wurden in Excel Tabellen zusammengefasst. Der Versuch wurde drei Mal durchgeführt und anschließend statistisch ausgewertet.

2.6 RNA Isolierung

2.6.1 Methode nach Chomczynski und Sacchi

Für die geplante Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Realtime Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) war es notwendig, vorerst die RNA aus unseren Zellen zu isolieren. Aus der RNA wurde in weiterer Folge die cDNA synthetisiert, die letztendlich für die Genexpressionsanalyse verwendet wurde.

Wir haben uns für die Methode der RNA-Isolierung mittels TriReagent/ Chloroform/Isopropanol entschieden (auch „single step Methode nach Chomczynski und Sacchi“). Weitere Möglichkeiten der RNA-Isolierung wären mithilfe von firmenspezifischen Kit Systemen, die RNA mithilfe von Säulchen extrahieren. Diese Kitsysteme können zwar sehr genau sein, sind jedoch auch kostenintensiver.

Nachdem die Zellen im Rahmen einer Passage pelletiert wurden, wurden sie in 1 ml Trireagenz resuspendiert und in ein Eppendorf Gefäß übertragen. Trireagenz enthält Guanidiniumthiocyanat, das die Zellen lysieren kann und RNAsen und andere Enzyme inaktiviert, sowie Phenol, in dem sich Proteine und andere Zellbestandteile lösen können. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation bei 4 °C für 15 Minuten und 12000 Umdrehungen konnte eine vollständige Phasentrennung erfolgen. Es bildeten sich drei Phasen. Die obere wässrige Phase enthielt die RNA, die Interphase die DNA, während in der untersten Schicht, der organischen Phase, oder Chloroform/Phenolphase, die Proteine, Fette und weitere Zellbestandteile gelöst waren. Nach sorgfältigem Übertragen der wässrigen Phase in ein neues Eppendorfgefäß, wurden 0,5 ml Isopropylalkohol hinzugegeben. Dieses Isopropanol sorgte dafür, dass die Nukleinsäure, in unserem Fall RNA, einerseits wieder präzipitiert wurde und andererseits, dass mögliche letzte Protein oder DNA-Verunreinigungen von der RNA entfernt wurden und sich daraus nach 15 minütiger Inkubation bei

Raumtemperatur und darauffolgender 10 minütiger Zentrifugation bei 4°C und 12000 Umdrehungen ein RNA-Pellet bilden konnte. Ein weiterer Waschgang erfolgte nach Zugabe von 1 ml 75% EtOH und 10 minütiger Zentrifugation. Der Ethanol-Überstand wurde so gut wie möglich entfernt und das Pellet luftgetrocknet. Schlussendlich wurde das RNA-Pellet in 50 µl RNase freiem Wasser sorgfältig gelöst und auf- und abpipettiert.

2.6.2 Behandlung mit Aldosteron

Für die Genexpressionsanalyse in U-2 OS und MG-63 wurden beide Zelllinien in 12-Well-Platten ausgesät (2×10^5 Zellen/ml U-2 OS und 1×10^5 Zellen/ml MG-63). Nach erfolgter Adhärenz der Zellen (nach Übernacht-Inkubation im Brutschrank) wurden die Zellen mit je 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml Aldosteron behandelt. Als Negativkontrolle (0 ng/ml) wurde EtOH verwendet. Die Behandlung wurde mit drei verschiedenen Passagen der Zelllinien wiederholt, um eine statistische Auswertung der Genexpression zu ermöglichen. Die mit Aldosteron behandelten Zellen wurden für 24h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und am nächsten Tag pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml Tri-Reagenz resuspendiert und bei -80 °C aufbewahrt, bis alle Wiederholungs-Versuche abgeschlossen waren.

Konzentrationen (ng)				
0	1	10	100	MG-63
0	1	10	100	U-2 OS

Tabelle 4: Aldosteronbehandlung für die Genexpressionversuche in U-2 OS und MG-63.

2.6.3 RNA Messung

Nachdem die Aldosteron-Behandlungen abgeschlossen waren, konnte die RNA mit der oben beschriebenen Methode gewonnen werden (Siehe Kapitel 2.6.1). Insgesamt hatten wir pro Zelllinie 12 verschiedene RNAs (4 Konzentrationen x 3 Passagen), die jetzt quantitativ und qualitativ gemessen werden konnten. Dies erfolgte mit Hilfe eines Spectrophotometers, dem Nanodrop 2000, der die Konzentration und die Verunreinigung (z.B. Phenol oder Proteine) der RNA quantifizieren konnte.

2.6.4 Herstellung der RNA Samples für die cDNA Synthese

Der nächste Schritt war die Vorbereitung der RNA Samples für die cDNA Synthese. Dazu wurden 10 µl RNA für jede zu untersuchende Aldosteronkonzentration benötigt. Die gewünschte Menge an RNA sollte 1000 ng sein. Zur Berechnung diente folgende Formel:

$$\frac{1000 \text{ ng}}{\text{Ermittelte RNA Konzentration}}$$

Als Beispiel: Bei einer gemessenen RNA Konzentration von 276,3 ng/µl ergab das laut Formel zu ermittelnde RNA Volumen:

$$\frac{1000 \text{ ng}}{276,3 \text{ ng}/\mu\text{l}}$$

= 3,681 µl

Das bedeutete für eine benötigte Menge an 1000 ng Gesamt-RNA betrug das benötigte Volumen an RNA für dieses sample 3,68 µl RNA, der Rest (6,32 µl) wurde mit RNase freiem Wasser ergänzt. Insgesamt betrug das Volumen dann 10 µl (RNA + Wasser) das für die cDNA Synthese benötigt wurde.

Bei einer gemessenen RNA Konzentration unter 100 ng/µl, wurde 500 ng RNA in cDNA umgeschrieben, da das Volumen ansonsten 10 µl RNA überschritten hätte.

2.7 Reverse Transkriptase PCR/ cDNA Synthese

Um RNA in cDNA umzuschreiben wurde der High-Capacity cDNA Reverse Transcription KIT der Firma Applied Biosystems verwendet. Für die Transkription eines RNA Samples in cDNA wurden 10 µl RNA-Ansatz (siehe Kapitel 2.6.4) und 10 µl Reverse Transkriptase Mastermix (MM) benötigt. 10 µl RNA Sample wurden in speziellen PCR Tubes vorpipettiert und auf Eis gegeben. Der nächste Schritt war die Zubereitung des MM.

10 µl MM enthielten wie folgt:

Substanzen	Volumen pro RNA Sample (µl)	Volumen für 12 samples (µl) ¹
25x dNTP Mix (100mM)	0,8	10,4
10x RT Random Primer	2	26
Multiscribe Reverse Transcriptase	1	13
10x RT-Puffer	2	26
Nuclease freies Wasser	4,2	54,6
Gesamtvolumen	10µl	130

Tabelle 5: Mastermix zur Herstellung von cDNA.

Zuerst wurde Wasser vorgelegt, dann Puffer, die Primer und die Basenpaare und ganz zum Schluss die Reverse Transcriptase (instabil bei Raumtemperatur). 10 µl MM wurden zu den jeweils 10 µl RNA Samples vorsichtig dazugegeben. Nach vorsichtigem Auf- und Abpipettieren wurden die PCR Tubes in den Thermocycler gegeben und cDNA synthetisiert. Das Programm des Thermocyclers war wie folgt:

¹ Pro Zelllinie, 1 MM-Ansatz mehr wegen Pipettierfehler

- 10 Minuten bei 25°C,
- 120 Minuten bei 37°C,
- 5 Minuten bei 85°C
- Endtemperatur 4°C

2.8 RT-qPCR und Genexpressionsanalyse

Die PCR (Polymerase Kettenreaktion) ist eine molekularbiologische Methode, bei der es zu einer Amplifikation von Nukleinsäuren kommt (62). Dazu benötigt man genspezifische Oligonukleotide (Primer), die an einen spezifischen DNA-Abschnitt an die DNA binden können und weiters Basenpaare und ein Enzym (Polymerase), damit eine DNA-Amplifizierung erfolgen kann.

Die Amplifizierung erfolgt wiederum in einem Thermocycler, der mithilfe verschiedener Temperaturschritte erstens die DNA denaturiert, weiters die Primer anheften lässt und schlussendlich die Polymerase die einzelnen Basen einbauen lässt und somit die Nukleinsäure amplifiziert.

Bei der Realtime PCR, der PCR-Methode die für unseren Versuch verwendet wurde, wurde die gewonnene (amplifizierte) DNA in „Echt-Zeit“ (Real time) quantifiziert. Dabei nahm die DNA-Menge nach jedem PCR-Zyklus exponentiell zu. Das bedeutet, je mehr DNA-Menge zu Beginn der PCR vorhanden war, desto weniger PCR-Zyklen waren notwendig, um die DNA bis zu einem vordefinierten Treshold zu amplifizieren. Je niedriger die Zykluszahl, die für die Amplifizierung eines Gens notwendig war, desto mehr DNA eines Gens war somit zu Beginn vorhanden und desto höher war die Expression dieses Gens in der untersuchten Zelle. Somit konnte man Rückschlüsse sowohl auf die Menge des vorhandenen Genmaterials als auch auf die Genexpressionsrate eines Gens ziehen.

2.8.1 Verdünnung der cDNA für die RT-qPCR

Die cDNA wurde auf 10 ng/µl verdünnt. In den PCR Tubes waren 1000 ng bzw. 500 ng cDNA in 20 µl gelöst. Durch die Zugabe von 80 µl bzw. 30 µl Wasser

waren 1000 ng bzw. 500 ng cDNA in 100 µl bzw. 50 µl gelöst und somit eine Konzentration von 10 ng/µl cDNA erreicht.

2.8.2 Vorbereitung der RT-qPCR

Für die Genexpressions-Analyse wurden spezifische Lightcycler-Platten (Roche) und TaqMan Genexpressions-Assays (Life Technologies) verwendet. Dies waren spezielle Sonden, die an einem Ende mit einem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporterfluoreszenzfarbstoff markiert waren. Durch die Taq-Polymerase wurde die Sonde an den komplementären DNA Strang angeheftet, der Reporterfluoreszenzfarbstoff wurde aber durch die Exonuclease Aktivität derselben von der Sonde und dem Quencher abgetrennt und ein Fluoreszenzsignal konnte gemessen und quantifiziert werden. Pro Platte konnten maximal 2 Gene untersucht werden.

Das Schema einer Platte ist in Tabelle 6 zusammengefasst.

Pipettierschema einer Lightcycler-Platte												
	0	0	0	1	1	1	10	10	10	100	100	100
V1	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1
V2	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1
V3	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1	Gen1
V1	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2
V2	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2
V3	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2	Gen2

Tabelle 6: Schema PCR/ Genexpression.

Die einzelnen RT-qPCR Reaktionen wurden pro zu untersuchender Aldosteronkonzentration in Triplikaten gemessen.

Je 2 µl cDNA wurden in die einzelnen Wells vorgelegt und die Platte auf Eis gegeben. Als nächstes wurden die Mastermixe für die einzelnen Gene hergestellt.

Substanzen	Menge pro Ansatz	Menge gesamt ²
Aqua _{bidest}	2,5 µl	92,5 µl
AoD	0,5 µl	18,5 µl
2xTaqMan MM	5 µl	185 µl
Summe	8 µl	

Tabella 7: Ansatz Mastermix/PCR.

AoD (Assay of Demand) sind TaqMan Gene-Expression Assays, die sowohl die Primer, als auch die Sonden, die für die DNA Amplifikation benötigt wurden, beinhalteten.

8 µl MM wurden in die Wells mit der cDNA pipettiert. Die Platte wurde mit einer speziellen Lightcycler-Folie verschweißt und für zwei Minuten bei 2500 rpm zentrifugiert. Danach wurde die Platte in den Lightcycler gegeben und die RT-qPCR gestartet. Das verwendete Protokoll am Lightcycler war das „Taqman Run Protocol“.

2.8.3 Genexpression

Es wurde eine Baseline Genexpression beider Zelllinien von mehreren Knochen- und Steroid relevanten Genen, darunter ***Osteoprotegerin (OPG)***, ***Osteopontin (OPN)***, ***Osteonectin (SPARC)***, ***Östrogenrezeptor-1 (ESR1)***, ***Östrogenrezeptor-2 (ESR2)***, ***Osteocalcin (OC)***, ***Parathormon-Rezeptor (PTH1R)***, ***Alkalische Phosphatase (ALPL)***, ***Mineralkortikoid-Rezeptor (NR3C2)***, ***Vitamin D-Rezeptor (VDR)***, ***1-alpha Hydroxylase (CYP27B1)***, ***25-Hydroxylase (CYP2R1)***, ***Androgen-Rezeptor (AR)***, ***Fibroblasten Wachstumsfaktor 23 (FGF 23)***, ***G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR6A)***, ***Gamma-glutamyl Carboxylase (GGCX)***, ***Matrix-gla-Protein (MGP)***, ***Kortikosteroid 11-β-dehydrogenase isozyme 1 (HSD11B1)***, ***Kortikosteroid 11-β-dehydrogenase isozyme 2 (HSD11B2)***, ***Klotho***, ***Runt-related Transkriptionsfaktor 2 (RUNX2)***, ***Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)***, sowie die Housekeeping

² Pro Gen, 1MM mehr wegen Pipettierfehler

Gene **β_2 -Microglobulin (B2M)**, **Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH)** und **Beta-Actin (AcB)**, durchgeführt.

2.8.4 Genexpressionsanalyse nach Aldosteronbehandlung

Die Gene **OPG**, **OPN**, **SPARC**, **OC**, und **ESR1** wurden unter Aldosteronbehandlung untersucht. GAPDH wurde als Housekeeping Gen zum Vergleich herangezogen. Die Daten wurden in Excel anhand der Methode nach Pfaffl ausgewertet.

2.9 ELISA- Osteocalcin -Messung aus Zellüberständen

ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) ist eine biochemische Methode, bei der verschiedene Substanzen im Serum, Urin oder auch Zellkulturüberständen mit Hilfe von Antikörper-Antigen Interaktionen detektiert werden können. Die Menge an Antikörper-Antigen-Bindung wird letztendlich durch die Zugabe eines Substrates und der dazu verursachten Farbumschlagreaktion photometrisch gemessen (63).

Die Menge an untercarboxyliertem Osteocalcin (uOC) wurde aus Zellkulturüberständen von U-2 OS und MG-63, die zuvor mit Aldosteron behandelt wurden, untersucht. Dafür wurde der TAKARA KIT „Undercarboxylated Osteocalcin (Glu-OC) EIA Kit“ verwendet.

2.9.1 Das TAKARA-Kit

Im Kit befand sich eine 96 Well Platte dessen Boden mit Anti-Glu-OC monoklonalem Antikörper beschichtet war. Weiters enthielt das Kit ein POD-Antikörper Konjugat (Peroxidase Antikörper) ein 8 ng Glu-OC Konjugat für die Standards³, ein 2 x Waschpufferkonjugat und das Substratkonjugat TMBZ.

³

2.9.2 Das Prinzip

Als Erstes musste das POD Antikörper Konjugat in 11 ml destilliertem Wasser und das Standard Konjugat in 1 ml destilliertem Wasser diluiert werden. Die Standard Konjugat Konzentration war dann 8 ng/ml Glu-OC. Aus diesem Basisstock wurden Standard Lösungen zu je 4 ng/ml, 2 ng/ml, 1 ng/ml, 0,5 ng/ml 0,25 ng/ml und 0,125 ng/ml hergestellt. Da es 1:2 Verdünnungen waren, wurden je 0,5 ml der unmittelbar höheren Konzentration mit 0,5 ml destilliertem Wasser vermischt.

Nachdem die Standardlösungen fertig hergestellt waren wurden jeweils 100 µl Standardlösungen und Zellkulturüberstand in die 96 WP pipettiert.

Pro Zelllinie waren 12 Zellkulturüberstände zu vermessen (3 Versuche x 4 Konzentrationen). Die Messung wurde in Duplikaten durchgeführt.

Nach Zugabe von Standards und der Zellüberstände wurde die Platte 2 Stunden bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln inkubiert und anschließend mit Waschpuffer 3 x gewaschen. Dazu wurde das mitgelieferte Waschpufferkonjugat zuvor in 11 ml destilliertem Wasser gelöst. Nach dem Waschen wurden jeweils 100 µl POD Antikörper- Konjugat-Lösung sorgfältig in jedes Well pipettiert. Nach wiederum einer Stunde Inkubationszeit bei RT im Dunkeln wurde die Platte 4 x mit Waschpuffer gewaschen und im Anschluss wurden 100 µl des TMBZ Substrats (3,3' 5,5'-Tetramethylbenzidine) in jedes Well dazugegeben. Das TMBZ-Konjugat wurde zuvor in 12 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Nachdem der Farbumschlag deutlich sichtbar war (ca. 15 Minuten Inkubation bei RT), wurden 100 µl Schwefelsäure zum Stoppen der Reaktion in jedes Well dazugegeben und die Platte rasch bei 450 nm mittels Photometer gemessen.

Die photometrischen Absorptions-Daten wurden in Excel Tabellen gespeichert und mithilfe der Standard-Konzentrationen wurde eine Standardkurve erstellt. Anhand der Standardkurve konnten schlussendlich die einzelnen Osteocalcin-Konzentrationen mit dem Programm GraphPad berechnet werden.

2.10 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism (GraphPad Software, Version 6). Alle Versuche wurden mindestens zwei Mal wiederholt (n=3). Für die

Zellproliferationsversuche mittels WST-1 wurden die einzelnen Messparameter mit One-way ANOVA und anschließendem Bonferroni post-Test analysiert.

Die Standardkurve für die Auswertung der ELISA-Daten wurde ebenfalls in GraphPad gemacht, sowie die Logarithmierung der Kurve und die anschließende Interpolation der Werte.

Basale Genexpressionsdaten und dCt-Werte wurden in Microsoft Office EXCEL ausgewertet. Für die statistische Auswertung der Genexpressions-Unterschiede nach Aldosteron-Zugabe, wurden eine One-way ANOVA und der Dunnett post-Test angewandt.

Die dazugehörigen Diagramme wurden einerseits in MS Office EXCEL, sowie in GraphPad erstellt.

3 Ergebnisse – Resultate

3.1 Ergebnisse Umkehrphasenmikroskopie

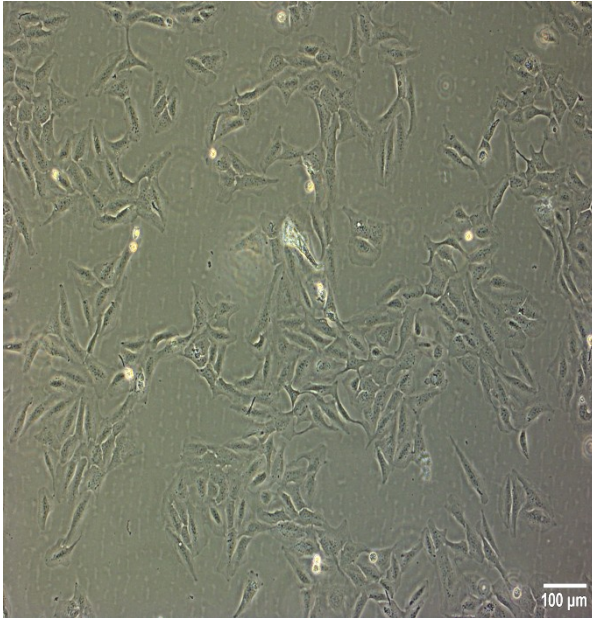


Abbildung 14: Humane Osteosarkomzellen U2-OS in Kultur

Auf dem Bild kann man adhärenente Zellen erkennen, die weite Ausläufer (Pseudopodien) bilden. Die Dichte und die dazu gehörenden desosomialen Kontakte sind aber nicht so ausgeprägt wie bei MG-63. Im Cytoplasma kann man feine Granula erkennen, ein Merkmal für einen aktiven Stoffwechsel.

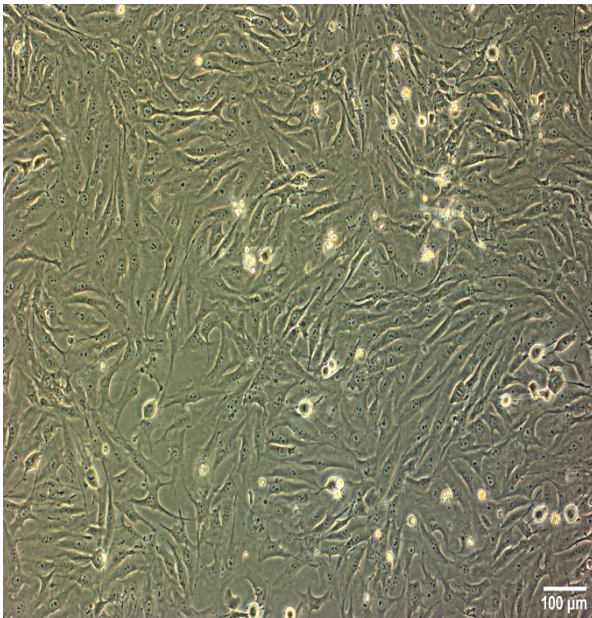


Abbildung 15: Humane Osteosarkomzellen MG-63 in Kultur

Humane MG-63 Zellen wachsen besser als U2-OS Zellen und weisen dadurch eine höhere Zelldichte und eine größere Anzahl an Zellkontakten auf. Sie haben morphologisch auch pseudopodiale Ausläufer, sowie feine Granula im Cytoplasma. Der Zellkern ist fast immer zu erkennen. Das Stroma ist aufgrund der hohen Zelldichte spärlicher ausgebildet.

3.2 Ergebnisse WST 1-Versuch

24h nach Aldosteronzugabe war bei U-2 OS ein dosisabhängiger Effekt zu erkennen.

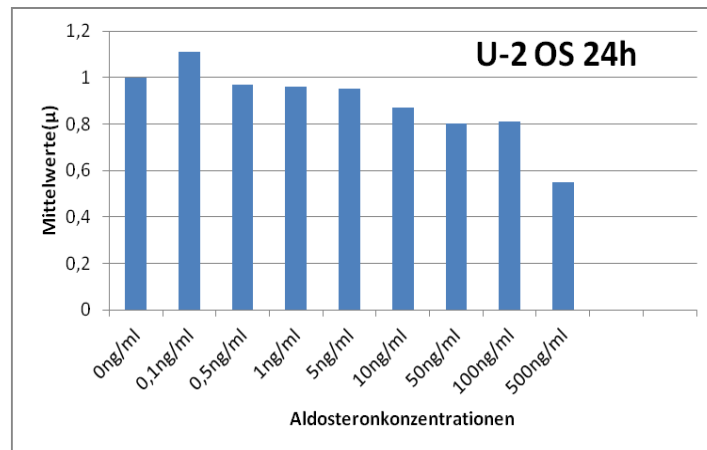


Abbildung 16: WST-1 Viabilitätstest in U-2 OS Zellen 24h nach Aldosterongabe.

In Bezug auf die Negativkontrolle mit EtOH war unter physiologischen Serum-Aldosteronkonzentrationen (0,05 ng/ml-0,35 ng/ml) eine Zunahme der Proliferation zu beobachten, während unter supraphysiologischen Bedingungen die Proliferation mit steigender Aldosterondosis abnahm.

Bei MG-Zellen war nach 24h kein dosisabhängiger Effekt sichtbar.

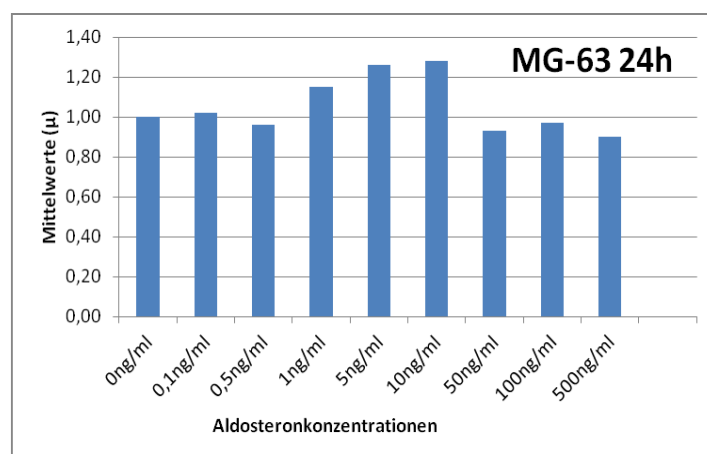


Abbildung 17: WST-1 Viabilitätstest in MG-63 Zellen 24h nach Aldosterongabe.

Die Zugabe von 1 ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml Aldosteron führten nach 24 h zu einer stärkeren Proliferation der MG-63 Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle mit EtOH.

Nach 48h kam es, in Bezug auf den 24h Wert, zu Proliferationszunahmen im niedrigen Aldosteron-Konzentrationsbereich (0,1 ng/ml, 0,5 ng/ml und 1 ng/ml), sowie im superphysiologischen Aldosteron-Konzentrationsbereich (50 ng/ml, 100ng /ml und 500 ng/ml). Bei 5 ng/ml und 10 ng/ml Aldosteronzugabe fand im Vergleich zum 24h Wert eine Proliferationsabnahme statt. Die mit Aldosteron behandelten Zellen wuchsen, im Vergleich zur Negativkontrolle mit EtOH, in jeder behandelten Konzentration besser.

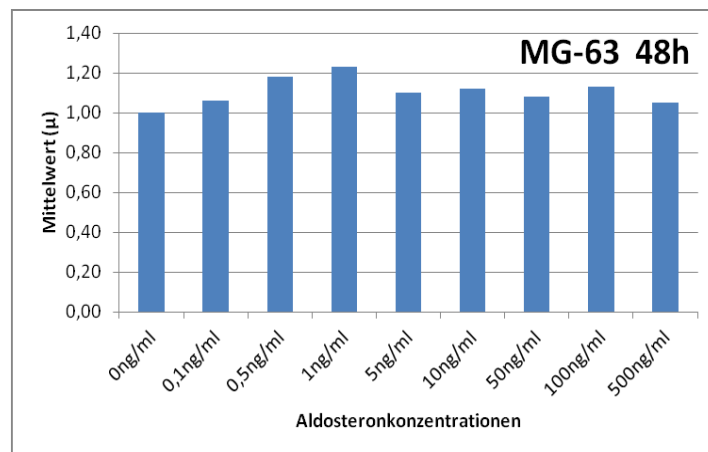


Abbildung 18: WST-1 Viabilitätstest in MG-63 Zellen 48h nach Aldosterongabe

Bei U-2 OS Zellen war im Vergleich zum 24h Wert eine deutliche Abnahme der Proliferation bei einer Aldosteron-Konzentration von 0,1 ng/ml zu beobachten. Weiters war, so wie bei MG-63, eine Proliferationszunahme im superphysiologischen Aldosteron-Konzentrationsbereich zu sehen. Im Vergleich zur Negativkontrolle mit EtOH wuchsen die behandelten Zellen in jeder Aldosteronkonzentration schlechter.

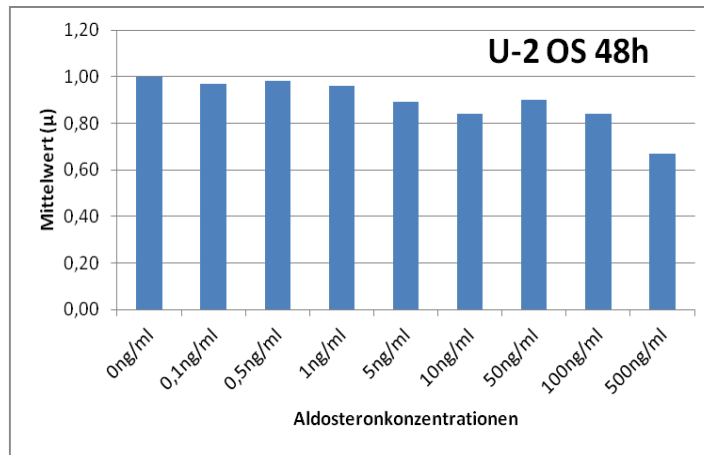


Abbildung 19: WST-1 Viabilitätstest in U-2 OS Zellen 48h nach Aldosterongabe.

72 h nach Aldosteronzugabe fand sowohl bei U-2 OS als auch bei MG-63 eine Proliferationszunahme in jeder behandelten Aldosteronkonzentration im Vergleich zum 48h Wert statt. Auch im Vergleich zur Negativkontrolle mit EtOH proliferierten die mit Aldosteron behandelten Zellen besser.

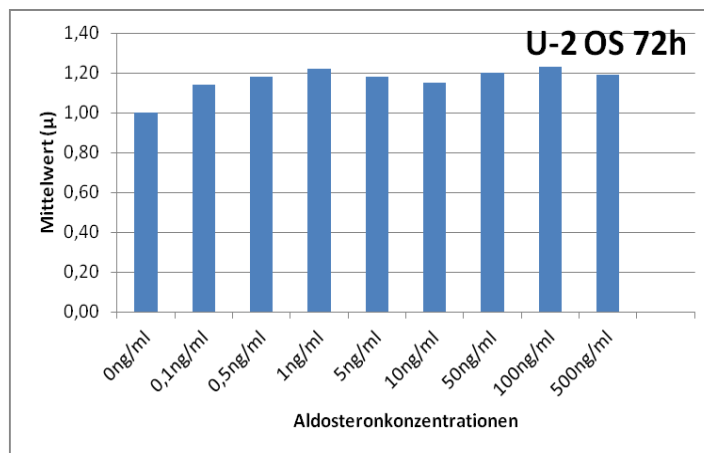


Abbildung 20: WST-1 Viabilitätstest in U-2 OS Zellen 72h nach Aldosterongabe.

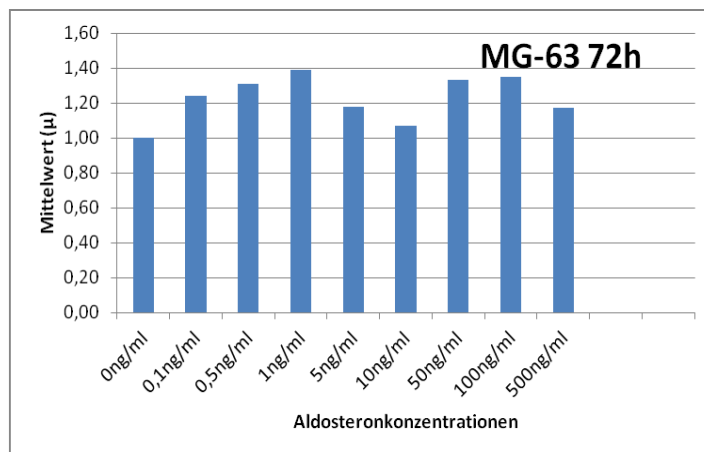


Abbildung 21: WST-1 Viabilitätstest in MG-63 Zellen 72h nach Aldosterongabe

3.3 Ergebnisse Genexpressionsversuche

3.3.1 Baseline-Genexpression

GENE	MG-63		U-2 OS	
	μCt	$d\text{Ct}^4$	μCt	$d\text{Ct}$
Act B	18,11	-	17,38	-
GAPDH	17,62	-0,49	17,74	0,36
ALPL	29,01	10,9	30,87	13,49
NR3C2	34,08	15,97	29,12	11,74
CYP27B1	30,42	12,31	29,68	12,30
AR	29,38	11,27	28,56	11,19
FGF23	n.a	n.a	38,13	20,76
OC	29,81	11,70	34,12	16,75
GPCR6A	n.a	n.a	37,56	20,18
GGCX	25,97	7,86	27,01	9,63
OPG	22,36	4,25	24,26	6,89
MPG	n.g ⁵	n.g	29,81	12,44
HSD11B1	n.g	n.g	39,63	22,25
HSD11B2	n.g	n.g	32,29	14,91
Klotho	36,06	17,95	n.a ⁶	n.a
RUNX2	29,74	11,63	25,56	8,19
OPN	38,05	19,94	28,86	11,48
SPARC	17,72	-0,39	21,24	3,86
ESR1	33,91	15,80	34,86	17,52
PTH1R	31,61	13,50	31,93	14,55
ESR2	33,38	15,27	34,90	17,48
RANKL	35,31	17,20	38,22	20,84
B2M	17,58	-0,53	22,32	4,94
VDR	26,26	8,31	29,62	12,25

Tabelle 8: Baseline Genexpression in MG-63 und U-2 OS Zellen.

⁴ $d\text{CT} = \mu\text{Ct} (\text{Gen}) - \mu\text{Ct} (\text{ActB})$

⁵ Nicht gemacht

⁶ Nicht auswertbar (zu wenig exprimiert)

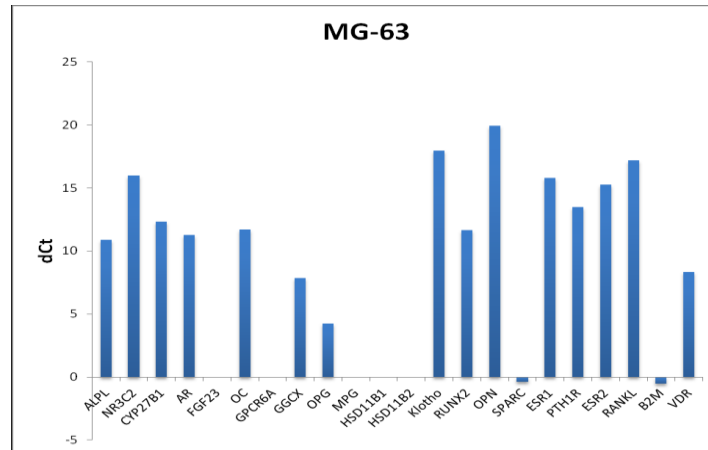


Abbildung 22: Baseline-Genexpression in MG-63 Zellen.

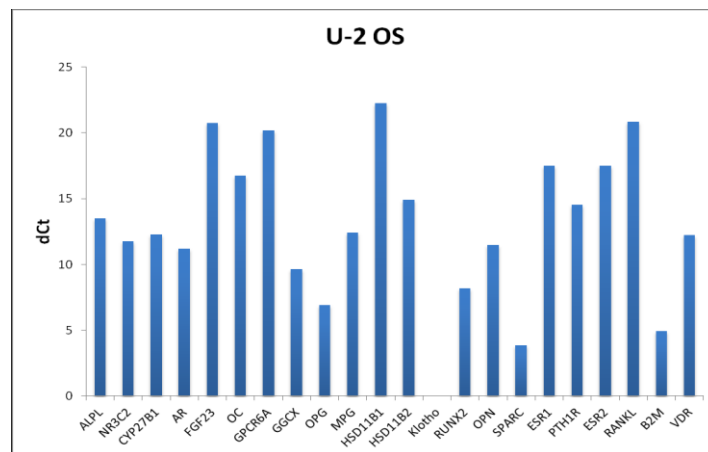


Abbildung 23: Baseline-Genexpression in U-2 OS Zellen.

Hoch exprimierte Gene waren in beiden Zelllinien Osteoprotegerin (OPG), der Vitamin D Rezeptor (VDR), Osteonectin (SPARC), die Gamma Glutamyl carboxylase (GGCX), sowie die Housekeeping Gene B-Actin, Beta-Microglobulin (B2M) und die Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Bei beiden Zelllinien kaum exprimiert waren das RANKL-Gen (activator of nuclear factor kappa-B ligand), der G-Protein Coupled Receptor 6A (GPCR6A), das Klotho-Gen und das Fibroblast Growth Hormon (FGF 23).

Das Osteopontin (OPN)-Gen und das Mineralkortikoidrezeptor (NR3C2)-Gen war bei U-2 OS deutlich höher reguliert, als bei MG-63.

Das Osteocalcin-Gen war bei MG-63 deutlich höher exprimiert als bei U-2 OS.

Alle weiteren Gene und deren Baseline-Expression sind in Tabelle 8 und in den Abbildungen 12 und 13 zusammengefasst,

3.3.2 Genexpression nach Aldosteronbehandlung

Für die Auswertung der gemessenen qPCR-Werte wurde die Methode nach Pfaffl ausgewählt. Die bei der qPCR in jeder Aldosteronkonzentration gemessenen Triplets wurden wie bei der Baseline-Genexpression gemittelt (μCt). Diesem Wert wird der μCt Wert des Housekeeping-Gens GAPDH in der gleichen Aldosteronkonzentration subtrahiert. Dem ermittelten $d\text{Ct}$ Wert wurde anschließend der $d\text{CT}$ Wert der Negativkontrolle subtrahiert und so der $dd\text{CT}$ Wert ermittelt. Aus dem $dd\text{CT}$ Wert konnte mittels der folgenden Formel der Fold Change berechnet werden.

$$\text{Fold Change} = 2^{-dd\text{CT}}$$

Die Fold Change Werte derselben Aldosteronkonzentrationen in den 3 Ansätzen konnten gemittelt werden und aus diesem Wert wurde der 2er Logarithmus berechnet. Der „LOG2 (Fold Change)“ gab anschauliche Auskünfte über die Beeinflussung der Genexpression durch Aldosteron.

Die Genexpression von Genen des Knochenstoffwechsels, wie *OPG*, *OPN*, *SPARC* und *OC* wurde in beiden Zelllinien durch Aldosteron kaum beeinflusst. Die in den Graphiken 24 und 25 angeführten negativen und positiven Werte sind in Relation zur Genexpression bei Zugabe einer Negativkontrolle (EtOH) zu verstehen.

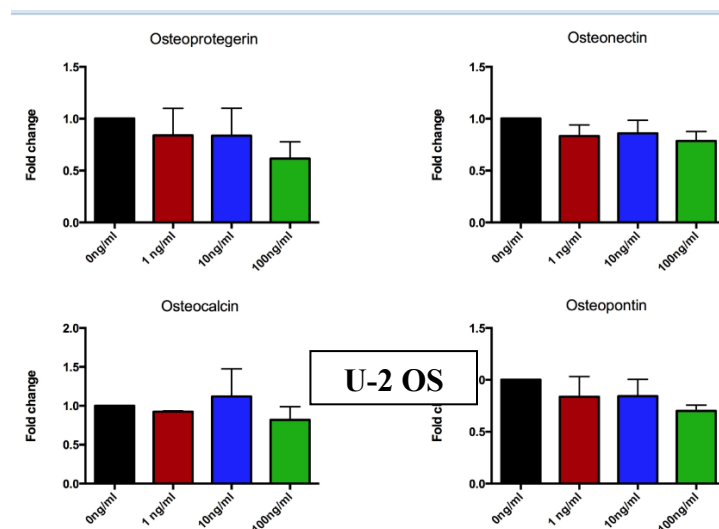


Abbildung 24: Genexpression von Knochen relevanten Genen in U-2 OS Zellen.

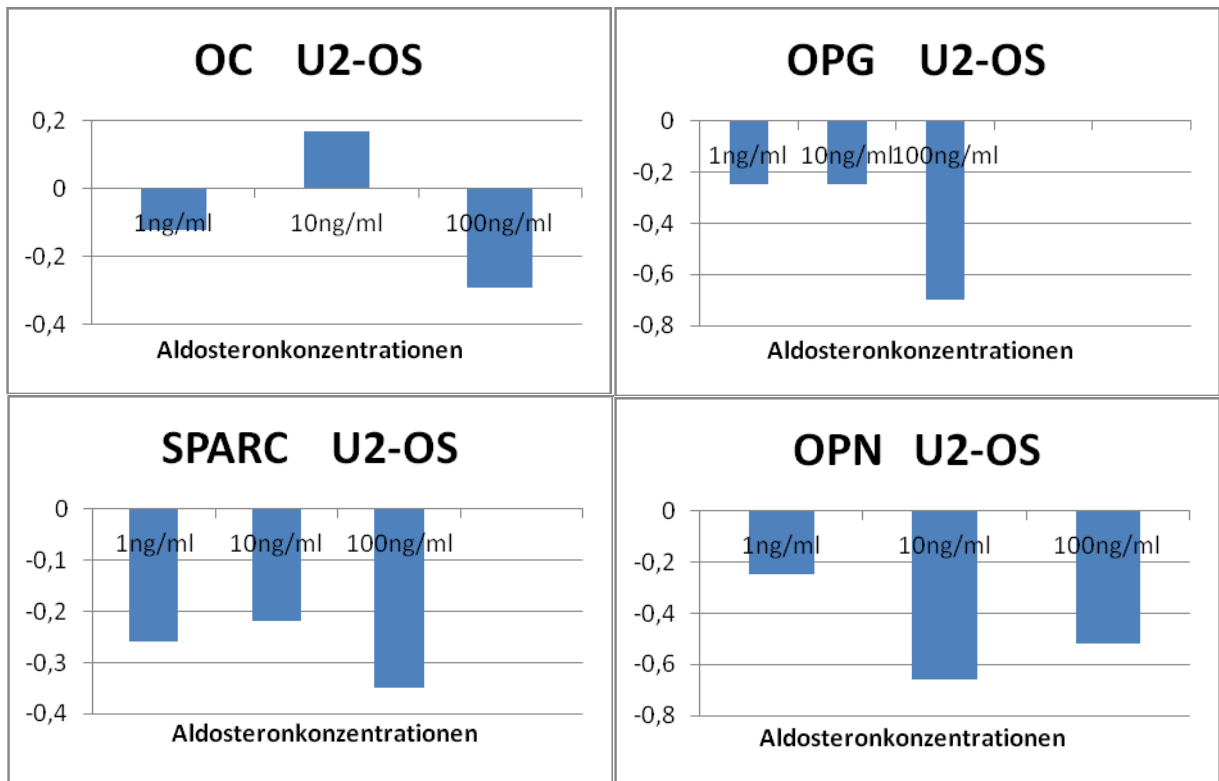


Abbildung 25: Genexpression von Knochen relevanten Genen in U-2 OS Zellen unter Aldosterongabe.

Aldosteron tendierte jedoch in U-2 OS Zellen, die oben genannten Knochen relevanten Gene leicht herunter zu regulieren.

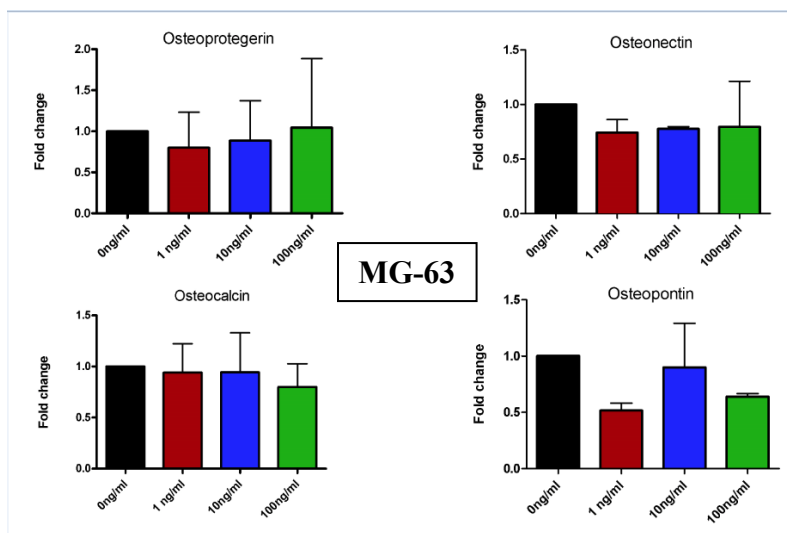


Abbildung 26: Genexpression von Knochen relevanten Genen in MG-63 Zellen anhand des Fold Change.

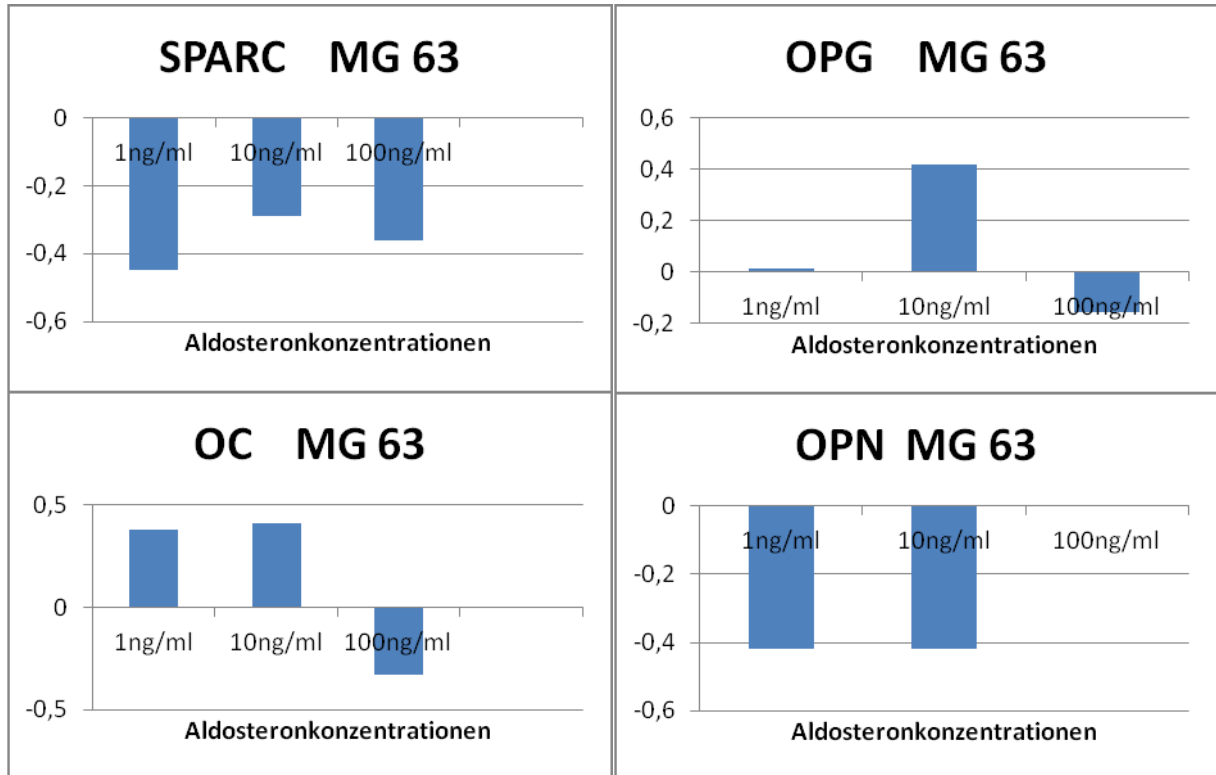


Abbildung 27: Genexpression von Knochen relevanten Genen in MG-63 Zellen unter Aldosterongabe

Bei der MG-63 Zelllinie wurden das OPN-Gen und das SPARC-Gen in jeder Aldosteronkonzentration leicht herunterreguliert, während das OC-Gen und das OPG-Gen bei Aldosteronkonzentrationen von 1 ng/ml und 10 ng/ml leicht hochreguliert wurden. Eine Aussage über die Hoch- bzw. Herunterregulierung eines Gens konnte gemacht werden, wenn die Werte grösser 1 bzw. kleiner -1 waren.

Bei beiden Zelllinien wurde auch die Expression des ESR 1 analysiert wie in Abbildung 28 dargestellt.

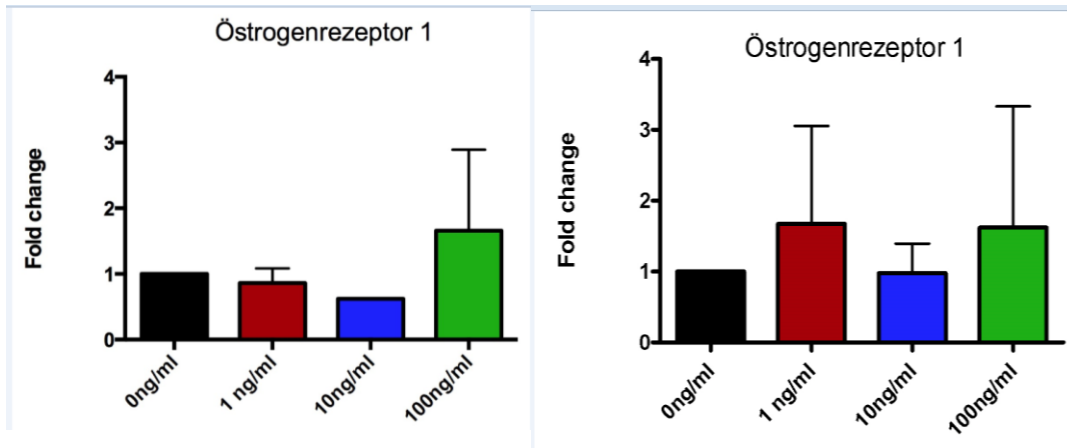


Abbildung 28: Genexpression des ESR-1 Gen in U-2 OS (links) und MG-63 (rechts) Zellen anhand des Fold Change.

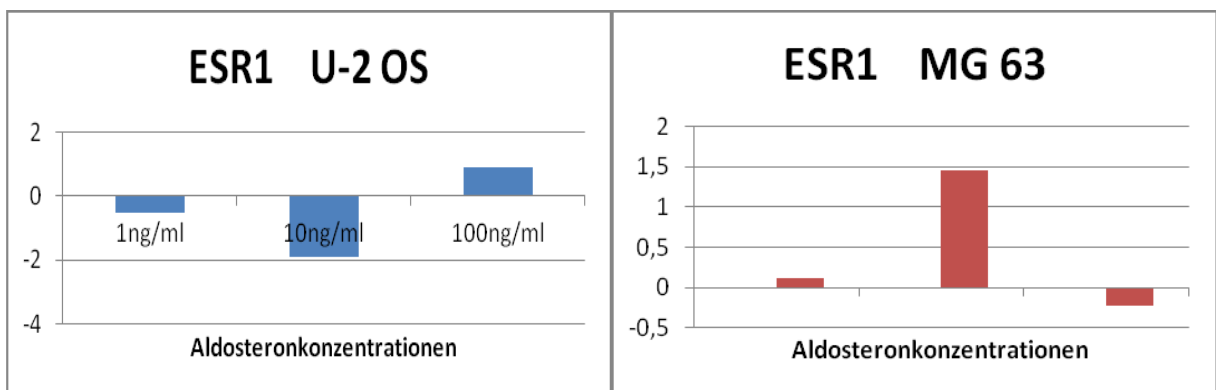


Abbildung 29: Genexpression von ESR 1 unter Aldosterongabe bei U-2 OS und MG-63

Aldosteron scheint in einer Konzentration von 10 ng/ml das ESR1-Gen bei der U-2 OS Zelllinie deutlich herunter zu regulieren. Bei der MG-63 Zelllinie war der Effekt genau umgekehrt, hier wurde das ESR1 Gen deutlich hochreguliert.

3.4 Ergebnisse Osteocalcin- ELISA

Unter Zuhilfenahme von definierten Osteocalcin-Verdünnungen wurde eine Standardkurve erstellt. Anhand der Standardkurve konnten die spektroskopisch gemessenen Werte unserer Samples analysiert werden.

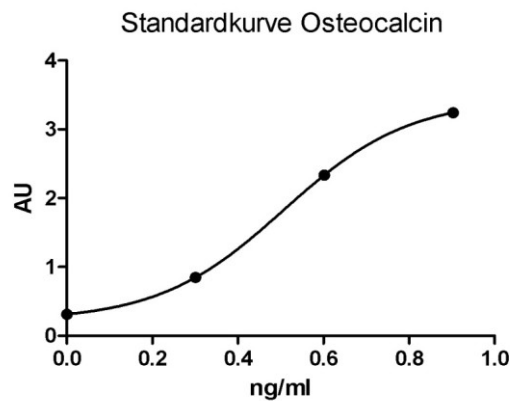


Abbildung 30: Interpolierte Osteocalcin-Standardkurve

Standard Osteocalcinlösungen	Spektroskopisch ermittelte Mittelwerte
0 ng/ml	0,236
0,125 ng/ml	0,310
0,250 ng/ml	0,272
0,5 ng/ml	0,355
1 ng/ml	0,312
2 ng/ml	0,848
4 ng/ml	2,336
8 ng/ml	3,243

Tabelle 9: Spektroskopische Werte der OC-Standardreihe

Bei der MG-63 Zelllinie führte die Aldosteronzugabe von 1 ng/ml Aldosteron zu einem Anstieg der Osteocalcin-Sekretion. Dieser Effekt war jedoch nicht mehr so stark ausgeprägt bei einer Zugabe von 10 ng/ml. Bei Zugabe von 100 ng/ml Aldosteron war die Osteocalcin-Sekretion sogar herabgesetzt verglichen zur Negativkontrolle.

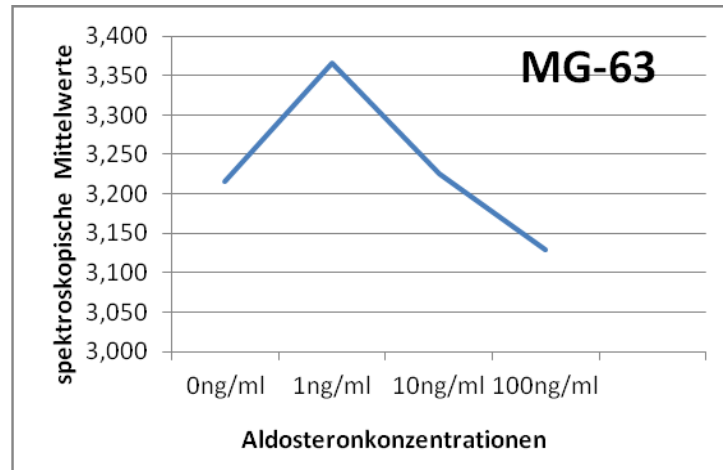


Abbildung 31: Spektroskopische Messwerte nach Durchführung des OC-ELISAs in MG-63 Zellen.

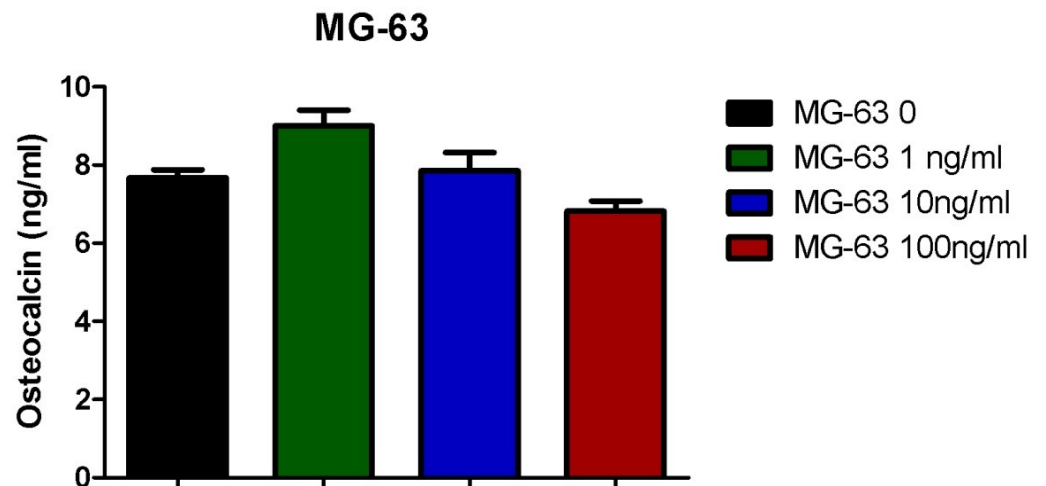


Abbildung 32: Osteocalcin-Mengen bei verschiedenen Aldosteronkonzentrationen in MG-63 Zellen.

Aldosteron – konzentration	Spektroskopischer Mittelwert	Osteocalcinmenge (ng/ml)
0 ng/ml	3,216	7,94 ng/ml
1 ng/ml	3,366	8,30 ng/ml
10 ng/ml	3,226	8,06 ng/ml
100 ng/ml	3,128	7,72 ng/ml

Tabelle 10: spektroskopische Werte und OC-Mengen bei der MG-63 Zelllinie

Bei der U2-OS Zelllinie führte die Zugabe von Aldosteron im Allgemeinen zu einer Verminderung der Osteocalcin-Sekretion verglichen zur Negativkontrolle. Alle ermittelten Aldosteronkonzentrationen führten zu verminderten Osteocalcin-Konzentrationen. Die physiologische Aldosteron-Konzentration (1 ng/ml) schien, im Gegensatz zu MG-63 Zellen, die Osteocalcin-Produktion in U-2 OS Zellen am stärksten herabzusetzen.

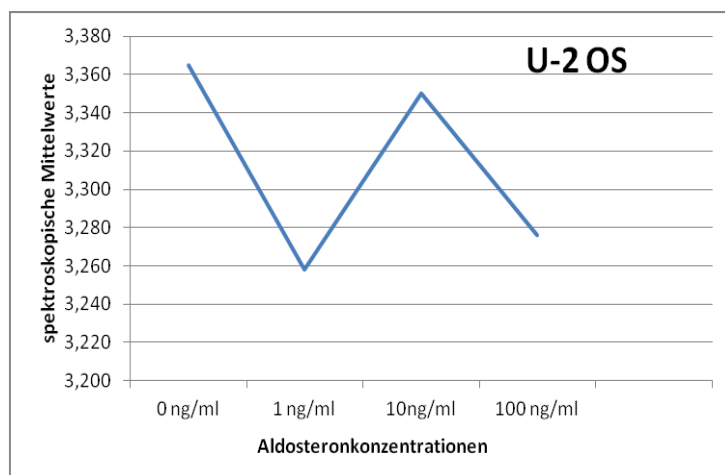


Abbildung 33: Spektroskopische Messwerte nach Durchführung des OC-ELISAs in U-2 OS Zellen.

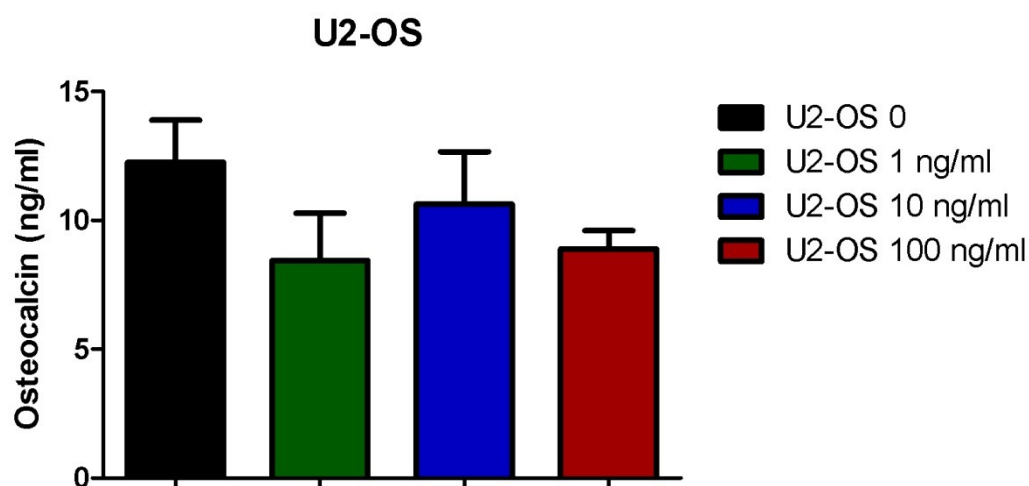


Abbildung 34: Osteocalcin-Mengen bei verschiedenen Aldosteronkonzentrationen in U-2 OS Zellen.

Aldosteron – konzentration	Spektroskopischer Mittelwert	Osteocalcinmenge (ng)
0 ng/ml	3,365	8,30 ng/ml
1 ng/ml	3,258	7,75 ng/ml
10 ng/ml	3,350	8,26 ng/ml
100 ng/ml	3,276	7,78 ng/ml

Tabelle 11: Spektroskopische Werte und OC-Mengen bei der U-2 OS Zelllinie.

4 Diskussion

In meiner Arbeit konnte ich erstmals einen antiproliferativen Effekt von supraphysiologischen Aldosteronkonzentrationen auf die Proliferation von MG-63 und

U-2 OS, zweier Osteosarkomzelllinien, nachweisen.

Der Steroidstoffwechsel von ossären Zellen scheint durch Aldosteron beeinflusst zu werden, was weitere Studien zu dieser Thematik notwendig macht.

Im konkreten Fall konnte ich eine signifikante Veränderung der Genexpression des ESR-1 nach 24 h unter Aldosteronzugabe in MG-63 und U-2 OS Zellen detektieren.

Bei der U-2 OS Zelllinie wurde der ESR-1 bei einer Aldosteronzugabe von 1 ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml herunterreguliert, während bei MG-63 eine Hochregulierung bei den selben Konzentrationen beobachtet werden konnte. Eine Assoziation zwischen der Zellproliferation und der Genexpression von ESR-1 könnte durchaus bestehen, da bei den oben genannten Aldosteronkonzentrationen ebenso eine vermehrte Proliferation bei der MG-63 Zelllinie und eine verminderte Zellproliferation bei der U-2 OS Zelllinie im Vergleich zur Negativkontrolle zu beobachten war.

Dieser gegensätzliche Effekt von Aldosteron auf die Genexpression von ESR-1 in beiden Osteosarkomzelllinien könnte mehrere Gründe haben. Erstens weisen die Tumore unterschiedliche Morphologien und Strukturen auf (epithelial vs. fibroblastoid) und somit unterschiedliche Reaktionen auf denselben Stimulus. Weiters stammen die Tumore von zwei unterschiedlichen Geschlechtern. ESR-1 beeinflusst die Östrogenwirkung im Körper und besitzt somit eine entscheidende Rolle bei Frauen und weniger bei Männern, obwohl letztere auch Östrogene in geringerem Maße produzieren können. Es wäre somit eine geschlechtsspezifische Trennung bei der Auswertung der Resultate notwendig.

Die Studie weist einige Confounding-Faktoren auf. Die Tatsache, dass die Versuche mit Osteosarkomzelllinien durchgeführt wurden, ist alleine nicht ausreichend, um eine globale Aussage über ESR-1 und Hyperaldosteronismus zu treffen. Es bedarf geeigneterer Studienmodelle bzw. klinischer Studien, die ein

umfassenderes Bild, auch unter Berücksichtigung von in vivo Prozessen (z.B. Vitamin D Status, PTH), erfassen können. Per definitionem weisen Tumorzellen sehr große Resistenzen auf Veränderungen auf und limitieren somit die Aussagekraft dieser Studie.

Östrogenmangel ist eine häufige Ursache für Osteoporose und betrifft vorwiegend Frauen im postmenopausalem Alter. Dabei wird aber vor allem kortikaler Knochen durch den Östrogenmangel abgebaut. Der trabekuläre Knochen wird bei beiden Geschlechtern schon vor Eintritt des menopausalen Alters durch das Veralten von zellulären autonomen Prozessen in die Wege geleitet (64). In der Praxis können Röntgenbilder oder Knochendichtemessungen und Knochenstoffwechselwerte in dieser Hinsicht genauere Informationen über die Umbau-Prozesse am Knochen und deren Lokalisation geben und müssen somit beim Entwurf eines klinischen Studienmodelles miteinbezogen werden.

In zukünftigen Studien sollte die Genexpression von Steroidstoffwechsel-relevanten Genen wie ESR-2, die CYP-Enzymreihe, HSD11B1, HSD11B2 und natürlich der Mineralkortikoidrezeptor (MR) untersucht werden.

Die Ergebnisse veranschaulichen, dass Knochen-relevante Gene wie OPG, OPN, SPARC und OC kaum durch die von uns zugegebenen Aldosteron-Dosen in ihrer Genexpression verändert wurden. Da diese Gene vor allem bei der Zusammensetzung der Knochenmatrix, sowie im Knochenaufbau involviert sind und Aldosteron ein Steroidhormon ist, das auch andere zelluläre Prozesse regelt, sind diese Ergebnisse nicht überraschend.

Eine wichtige Erkenntnis ist sicherlich, dass Aldosteron die Osteocalcin-Genexpression in den gewählten Konzentrationen nicht signifikant veränderte und dass die Messdaten des Glu-OC ELISAs aus Zellkulturüberständen unauffällig waren.

Osteocalcin ist weiterhin ein Marker für gesteigerten Knochenumsatz. Dieser Effekt, summiert mit jenen von PTH, hätte die hohe Prävalenz von Osteoporose bei PatientInnen mit Hyperaldosteronismus erklären können. Weitere Untersuchungen werden daher zusätzliche Informationen zur Wechselwirkung von Aldosteron- und Knochenstoffwechsel liefern.

5 Literaturverzeichnis

1. HORN, Florian (2009): Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium. Georg Thieme Verlag, München, 335
2. HORN, Florian (2009): Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium. München: Georg Thieme Verlag, 2009: 383-388
3. Wikipedia (nb). Aldosteron. In: Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Bearbeitungsstand: 06.Februar.2015, 9.45 UTC. URL:<http://de.wikipedia.org/wiki/Aldosteron>
4. HEROLD, Gerd (2015): Innere Medizin: eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Herold, Köln, 778-779
5. Tomaschitz, A., Kienreich K., Fahrleitner-Pammer A., and Pilz S. (2012). „Die Rolle Von Aldosteron Im Knochenstoffwechse“l. *Journal für Mineralstoffwechsel*, 19(3), 108-14
6. Wikipedia (nb). AT-1 Antagonist. In: Wikipedia, Die freie Enyklopedie. Bearbeitungsstand: 09.Januar.2015, 13.50 UTC. URL: <http://de.wikipedia.org/wiki/AT1-Antagonist> (Abgerufen:16.März.2015,17:20 UTC)
7. Wikipedia (nb). ACE-Hemmer. In: Wikipedia, Die freie Enyklopedie. Bearbeitungsstand: 13.März.2015, 13.00 UTC. URL: <http://de.wikipedia.org/wiki/ACE-Hemmer> (Abgerufen:16.März.2015,17:20 UTC)
8. Salcuni, A. S., Palmieri, S., Carnevale, V., Morelli, V., Battista, C., Guarnieri, V., Chiodini, I. (2012). Bone involvement in aldosteronism. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27(10), 2217–2222.
9. Petramala, L., Zinamosca, L., Settevendemmie, A., Marinelli, C., Nardi, M., Concistrè, A. Letizia, C. (2014). Bone and Mineral Metabolism in Patients with Primary Aldosteronism. *International Journal of Endocrinology*, 1–6.
10. Tomaschitz, A., Ritz, E., Pieske, B., Rus-Machan, J., Kienreich, K., Verheyen, N., Pilz, S. (2014). Aldosterone and parathyroid hormone interactions as mediators of metabolic and cardiovascular disease. *Metabolism*, 63(1), 20–31.
11. Ceccoli, L., Ronconi, V., Giovannini, L., Marcheggiani, M., Turchi, F., Boscaro, M., & Giacchetti, G. (2013). Bone health and aldosterone excess. *Osteoporosis International*, 24(11), 2801–2807.
12. Pacifici, R., Perry, H. M., Shieber, W., Biglieri, E., Droke, D. M., & Avioli, L. V. (1987). Adrenal responses to subtotal parathyroidectomy for primary hyperparathyroidism. *Calcified Tissue International*, 41(3), 119–123.

13. Li, Y. C., Kong, J., Wei, M., Chen, Z.-F., Liu, S. Q., & Cao, L.-P. (2002). 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(2), 229–238.
14. De Borst, M. H., Vervloet, M. G., ter Wee, P. M., & Navis, G. (2011). Cross talk between the renin-angiotensin-aldosterone system and vitamin D-FGF-23-klotho in chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 22(9), 1603–1609.
15. Kurosu, H., Yamamoto, M., Clark, J. D., Pastor, J. V., Nandi, A., Gurnani, P., ... Kuro-o, M. (2005). Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5742), 1829–1833.
16. Lang, F., Ritz, E., Voelkl, J., & Alesutan, I. (2013). Vascular calcification--is aldosterone a culprit? *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 28(5), 1080–1084.
17. Kong, J., & Li, Y. C. (2003). Effect of ANG II type I receptor antagonist and ACE inhibitor on vitamin D receptor-null mice. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 285(1), R255–261.
18. Pilz, S., Gaksch, M., O'Hartaigh, B., Tomaschitz, A., & März, W. (2013). The role of vitamin D deficiency in cardiovascular disease: where do we stand in 2013? *Archives of Toxicology*, 87(12), 2083–2103.
19. Chhokar, V. S. (2004). Loss of bone minerals and strength in rats with aldosteronism. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 287(5), H2023–H2026.
20. Fiebeler, A., Schmidt, F., Müller, D. N., Park, J. K., Dechend, R., Bieringer, M., Luft, F. C. (2001). Mineralocorticoid receptor affects AP-1 and nuclear factor-kappaB activation in angiotensin II-induced cardiac injury. *Hypertension*, 37(2 Pt 2), 787–793.
21. Rocha, R., Rudolph, A. E., Friedrich, G. E., Nachowiak, D. A., Kekec, B. K., Blomme, E. A. G., Delyani, J. A. (2002). Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 283(5), H1802–H1810.
22. Queisser, N., Oteiza, P. I., Stopper, H., Oli, R. G., & Schupp, N. (2011). Aldosterone induces oxidative stress, oxidative DNA damage and NF-κB-activation in kidney tubule cells. *Molecular Carcinogenesis*, 50(2), 123–135.
23. Karsenty, G., & Ferron, M. (2012). The contribution of bone to whole-organism physiology. *Nature*, 481(7381), 314–320.
24. Harada, S., & Rodan, G. A. (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*, 423(6937), 349–355.

25. Teitelbaum, S. L. (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5484), 1504–1508.
26. Ducy, P., Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, A. F., Beil, F. T., ... Karsenty, G. (2000). Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*, 100(2), 197–207.
27. Horn, Florian (2009): Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium. Georg Thieme Verlag, München, 380
28. Takeda, S., Elefteriou, F., Levasseur, R., Liu, X., Zhao, L., Parker, K. L., ... Karsenty, G. (2002). Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*, 111(3), 305–31
29. Asnicar, M.A., Smith, D.P., Yang, D.D., Heiman, M.L., Fox, N., Chen, Y.F., Hsiung, H.M., and Koster, A. (2001). Absence of cocaine- and amphetamine-regulated transcript results in obesity in mice fed a high caloric diet. *Endocrinology* 142, 4394–4400.
30. Karsenty, G. (2006). Convergence between bone and energy homeostases: Leptin regulation of bone mass. *Cell Metabolism*, 4(5), 341–348.
31. Elefteriou, F., Takeda, S., Ebihara, K., Magre, J., Patano, N., Kim, C. A., ... Karsenty, G. (2004). Serum leptin level is a regulator of bone mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 3258–3263.
32. Yadav, V. K., Oury, F., Suda, N., Liu, Z.-W., Gao, X.-B., Confavreux, C., ... Karsenty, G. (2009). A Serotonin-Dependent Mechanism Explains the Leptin Regulation of Bone Mass, Appetite, and Energy Expenditure. *Cell*, 138(5), 976–989.
33. Quinn, P. J., & Kagan, V. E. (1998). *Fat-soluble vitamins*. New York: Plenum Press.
34. Hauschka, P. V., Lian, J. B., & Gallop, P. M. (1975). Direct identification of the calcium-binding amino acid, gamma-carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(10), 3925–3929.
35. Price, P. A., Otsuka, A. A., Poser, J. W., Kristaponis, J., & Raman, N. (1976). Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(5), 1447–1451.
36. Wikipedia (nb). Gla Domain. In: Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Bearbeitungsstand: 23.November.2014, 7.57 UTC. URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Gla_domain (Abgerufen:17.März.2015, 17:50 UTC)

37. Karsenty, G., & Oury, F. (2012). Biology Without Walls: The Novel Endocrinology of Bone. *Annual Review of Physiology*, 74(1), 87–105.
38. Bronckers, A. L., Gay, S., Dimuzio, M. T., & Butler, W. T. (1985). Immunolocalization of gamma-carboxyglutamic acid containing proteins in developing rat bones. *Collagen and Related Research*, 5(3), 273–281.
39. Price, P. A., Fraser, J. D., & Metz-Virca, G. (1987). Molecular cloning of matrix Gla protein: implications for substrate recognition by the vitamin K-dependent gamma-carboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(23), 8335–8339.
40. Fulzele, K., Riddle, R. C., DiGirolamo, D. J., Cao, X., Wan, C., Chen, D., ... Clemens, T. L. (2010). Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. *Cell*, 142(2), 309–319.
41. Blüher, M., Michael, M. D., Peroni, O. D., Ueki, K., Carter, N., Kahn, B. B., & Kahn, C. R. (2002). Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Developmental Cell*, 3(1), 25–38.
42. Silver, I. A., Murrills, R. J., & Etherington, D. J. (1988). Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Experimental Cell Research*, 175(2), 266–276.
43. Ferron, M., Wei, J., Yoshizawa, T., Del Fattore, A., DePinho, R. A., Teti, A., ... Karsenty, G. (2010). Insulin Signaling in Osteoblasts Integrates Bone Remodeling and Energy Metabolism. *Cell*, 142(2), 296–308.
44. Ferron, M., McKee, M. D., Levine, R. L., Ducy, P., & Karsenty, G. (2012). Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice. *Bone*, 50(2), 568–575.
45. Oury, F., Sumara, G., Sumara, O., Ferron, M., Chang, H., Smith, C. E., ... Karsenty, G. (2011). Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell*, 144(5), 796–809.
46. Oury, F., Ferron, M., Huizhen, W., Confavreux, C., Xu, L., Lacombe, J., ... Karsenty, G. (2013). Osteocalcin regulates murine and human fertility through a pancreas-bone-testis axis. *Journal of Clinical Investigation*, 123(6), 2421–2433.
47. Kumar, T. R. (2007). Functional analysis of LH β knockout mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 269(1-2), 81–84.
48. Karsenty, G., & Oury, F. (2014). Regulation of male fertility by the bone-derived hormone osteocalcin. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), 521–526.
49. Pi, M., Chen, L., Huang, M.-Z., Zhu, W., Ringhofer, B., Luo, J., ... Quarles, L. D. (2008). GPRC6A Null Mice Exhibit Osteopenia, Feminization and Metabolic Syndrome. *PLoS ONE*, 3(12), e3858.

50. Pi, M., Wu, Y., & Quarles, L. D. (2011). GPRC6A mediates responses to osteocalcin in β -cells in vitro and pancreas in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(7), 1680–168.
51. Jürimäe, J., Lätt, E., Mäestu, J., Saar, M., Purge, P., Maasalu, K., & Jürimäe, T. (2015). Osteocalcin is inversely associated with adiposity and leptin in adolescent boys. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism: JPEM*.
52. Dalskov, S.-M., Ritz, C., Larnkjær, A., Damsgaard, C. T., Petersen, R. A., Sørensen, L. B., ... Michaelsen, K. F. (2015). The role of leptin and other hormones related to bone metabolism and appetite regulation as determinants of gain in body fat and fat-free mass in 8-11-year-old children. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 100(3),
53. ATCC, in partnership with LGC Standards: U-2 OS (ATCC® 96™) 2014; URL: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-96.aspx?geo_country=it, 18.03.2015, 16.42
54. ATCC, in partnership with LGC Standards: MG-63 (ATCC® CRL-1427™) 2014; URL: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1427.aspx?geo_country=it, 18.03.2015, 16.44
55. Wikipedia (nb). Kryokonservierung. In: Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Bearbeitungsstand: 16. Oktober. 2014, 23.28 UTC. URL: <http://de.wikipedia.org/wiki/Kryokonservierung> (Abgerufen: 21. März. 2015, 22:24 UTC)
56. Biochrom AG: FAQ zum Einfrieren und Auftauen von Zellkulturen in TPP-Kryoröhrchen, 23.05.2011; URL: http://www.biochrom.de/fileadmin/user_upload/service/FAQ/110616_biochrom_fa_q_kryoroehrchen.pdf, 18.03.2015, 17.21
57. Doc Check Flexicon (nb). Zellkultur. In: Doc check Flexicon, das Medizinlexicon zum Medmachen. Bearbeitungsstand: 28.09.2012. URL: <http://flexikon.doccheck.com/de/Zellkultur>, 18.03.2014, 17.16
58. Lexicon Chemie.de: Zellviabilität, 2015; URL: <http://www.chemie.de/lexikon/Zellviabilit%C3%A4t.html> 18.03.2015, 17.06
59. Wikipedia (nb). Zählkammer. In: Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Bearbeitungsstand: 15. Februar. 2015, 18.46 UTC. URL: <http://de.wikipedia.org/wiki/Z%C3%A4hlkammer> (Abgerufen: 18. März. 2015, 17:07 UTC)
60. Falco, Nicholas. Determining the Viability of a Cell culture, kein Datum. URL: <http://www40.homepage.villanova.edu/nicholas.falco/pd2.htm>, 18.03.2015, 18.56

61. Sigma-Aldrich. Cell Viability and Proliferation, 2015. URL: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/cell-viability-and-proliferation.html>, 18.03.2015, 19.12 UTC
62. Doc Check Flexicon (nb). Polymerase Kettenreaktion. In: Doc check Flexicon, das Medizinlexicon zum Medmachen. Bearbeitungsstand: 02.04.2014, 17.59 UTC. URL: <http://flexikon.doccheck.com/de/Polymerase-Kettenreaktion>, 22.03.2014, 16.27 UTC
63. Doc Check Flexicon (nb). ELISA. In: Doc check Flexicon, das Medizinlexicon zum Medmachen. Bearbeitungsstand: 09.04.2013, 11.07 UTC. URL: <http://flexikon.doccheck.com/de/ELISA>, 22.03.2014, 16.23 UTC
64. Khosla, S., Melton, L. J., & Riggs, B. L. (2011). The unitary model for estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis: is a revision needed? *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 26(3), 441–451.

