

Katrin Wolf
Dr. sc. hum.

Quantitative Extraktion von Transforming Growth Factor beta, Insulin-like Growth Factor-I und Osteocalcin aus der Knochenmatrix

geboren am 8. 6. 1962 in Mannheim

Abitur am 22.5.1981

Studiengang der Fachrichtung Chemie vom SS 1982 bis WS 90/91

Vordiplom am 20.06.1985 an der Universität Heidelberg

Diplomprüfung am 15. 06. 1990 an der Universität Heidelberg

Doktorvater: Priv. Doz. Dr. med. J. Pfeilschifter

Die Knochenmatrix ist das größte Speicherorgan des Körpers für die Wachstumsfaktoren TGF- β und IGF-I sowie für das Matrixprotein Osteocalcin. Diese von den Osteoblasten produzierten Proteine werden bei der Knochenneubildung eingebaut und bei der Knochenresorption durch die Osteoklasten möglicherweise in aktiver Form wieder freigesetzt. Man vermutet daher, daß sie bei der nachfolgenden Knochenneubildung eine wichtige Rolle spielen. In-vitro-Daten und die osteoanabole Wirkung von TGF- β in Versuchstieren lassen vermuten, daß TGF- β dabei die Funktion der Osteoblasten mit der der Osteoklasten zu koppeln scheint. Bisher lagen jedoch noch keine humanen in-vivo-Daten vor, die diese Hypothese stützen können. Die quantitative Extraktion von TGF- β , IGF-I und Osteocalcin aus der humanen Knochenmatrix ermöglicht daher einen wichtigen Einblick in die Stoffwechselfvorgänge des Knochens und liefert ebenfalls wichtige Hinweise für ihre Bedeutung bei der Regulation der Umbauvorgänge.

Mit einer wäßrigen 4 M Guanidinhydrochlorid/10 % EDTA-Lösung können TGF- β , IGF-I und II und Osteocalcin aus Probenmengen zwischen 5 und 20 mg, wie sie beispielsweise bei einer Jamshidi-Biopsie anfallen, quantitativ in Mikrozentrifugenröhrchen mit einer Dialysemembran innerhalb von 24 Stunden bei 4 °C extrahiert werden. Nach dieser Extraktion konnten in dem mit diesen Reagentien erhaltenen Kollagenrückstand selbst nach einer Aufarbeitung mit hochgereinigter Kollagenase allenfalls Spuren der untersuchten Proteine nachgewiesen werden, wobei gezeigt werden konnte, daß diese Proteine nicht von der verwendeten Kollagenase angegriffen werden. Verluste durch unspezifische Bindungen an die Extraktionsgefäße und die Dialysemembran können durch einen Zusatz von 1 mg Albumin/mL zur Extraktionslösung fast vollständig ausgeschlossen werden. Nach der Extraktion müssen die Proben drei Tage bei 4 °C gegen PBS oder 0,01 M Essigsäure dialysiert werden, um die Proteine zu renaturieren. Ein vorheriges Abzentrifugieren des Extraktionsrückstandes ist dazu nicht erforderlich. Während der Extraktion und der nachfolgenden Dialyse wurde keine Degradation der gemessenen Proteine beobachtet. Die Wiederfindungsrate der extrahierten Proteine (in % \pm Standardabweichung) lag nach dieser Zeit bei 94,54 % \pm 8,43 % für TGF- β , 91,71 % \pm 5,48 % für IGF-I und bei 99,54 + 4,14 % für Osteocalcin, wie durch einen Zusatz definierter Mengen dieser Proteine zu Proben, die anschließend extrahiert wurden, mittels RIA oder Bioassay gezeigt werden konnte. Vor der Extraktion müssen die Proben mechanisch mit Skalpell oder biologisch mit Käferlarven von anhängenden Weichteilen gereinigt, anschließend mit Wasser zellfrei gewaschen und mit Diisopropylether entfettet werden. Bei diesen Reinigungsschritten treten keine Probenverluste auf. Die unzerkleinerten Knochen können dabei bis zu sieben Tage bei 37 °C

aufbewahrt werden. Danach müssen die mit einer Knochenschere zerkleinerten Proben mit einer stickstoffgekühlten Pulvermühle zermahlen werden und sollten bis zur Extraktion bei -80°C gelagert werden, bei einer Lagertemperatur über -80°C treten dagegen deutliche Verluste auf. Nach der Extraktion können TGF- β , IGF-I und Osteocalcin direkt aus den Extraktionsüberständen bestimmt werden. TGF- β muß dabei direkt vor der Messung auf pH 2,8 angesäuert und wieder neutralisiert werden, um eine Dissoziation von seinen ebenfalls mitextrahierten Bindungsproteinen zu erzielen. Für die IGF-Bestimmung können die mitextrahierten Bindungsproteine mit einem Überschuß an IGF-II (für die IGF-I-Bestimmung) abgesättigt werden. Weitere Interferenzen mit anderen Komponenten aus der extrahierten Knochenmatrix wurden nicht beobachtet. Die Ergebnisse können entweder auf die Einwaage, die den mineralisierten Anteil des Knochens reflektiert, oder den Kollagengehalt der Proben, der durch das Abwiegen des entsalzten getrockneten Extraktionsrückstandes oder die Bestimmung des Hydroxyprolinegehalts aus dem Rückstand, bezogen werden. Die Variabilität der Messungen lag bei 14,5 % für TGF- β , bei 12,8 % für IGF-I und bei 17,8 % für Osteocalcin. Diese Werte liegen im Bereich der von den Herstellern der verwendeten Radioimmunoassays beziehungsweise ELISAs angegebenen Variationskoeffizienten.

Bei der Untersuchung der Knochenmatrix von 386 knochengesunden Frauen wurde eine altersabhängige Abnahme der TGF- β -Konzentration vor der Menopause beobachtet, die mit einer altersabhängigen Abnahme des Knochenumbaus assoziiert war. Nach der Menopause kam es zu einer 30 %igen Zunahme der TGF- β -Konzentration in der Knochenmatrix, die mit der zu diesem Zeitpunkt gesteigerten Knochenumbauaktivität korrelierte. Dagegen fand sich keine Korrelation der TGF- β -Konzentration der Knochenmasse. Diese Ergebnisse passen zu der postulierten Rolle von TGF- β als Coupling-Faktor, das heißt einem Faktor, dessen Aktivität im Knochen parallel zum Ausmaß des Knochenabbaus reguliert wird und der Knochenanbau und Knochenabbau miteinander verknüpft und damit unabhängig vom Ausmaß des Knochenumbaus eine neutrale Knochenbilanz gewährleistet. Die TGF- β -Konzentration korreliert nicht mit dem Knochenmassenverlust, der nach der Menopause einsetzt. Das heißt, die altersabhängige Verringerung der Knochenmasse kann nicht auf eine Veränderung der TGF- β -Konzentration zurückgeführt werden, sondern ist die Folge anderer systemischer und lokaler Alterserscheinungen. Darüber hinaus hat diese Untersuchung gezeigt, daß Messungen der TGF- β -Konzentration in der Knochenmatrix zur Aufklärung von Knochenstoffwechselerkrankungen nur dann sinnvoll sind, wenn gleichzeitig der Status des Knochenumbaus bekannt ist, der durch histomorphometrische Untersuchungen und Messungen der Osteocalcinerumwerte oder andere biochemische Parameter des Knochenumbaus, z.B. die Pyridinolin-Crosslinks im Urin, bestimmt werden kann. Die in dieser Arbeit gemessenen TGF- β -in-vivo-Werte knochengesunder Frauen können dabei als Referenzwerte dienen, um Veränderungen bei Knochenerkrankungen aufzuspüren und so neue Informationen zu deren Pathogenese zu gewinnen.