

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin - Zentrallabor
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor Prof. Dr. Wolfgang Herrmann

Auswirkung von B-Vitaminmangel auf die Osteoklasten-Aktivität

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2007

vorgelegt von: Johannes Peter Schmidt

geb. am: 10.03.1981 in Saarbrücken

Inhaltsverzeichnis

<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>III</i>
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	5
2.1. Definition.....	5
2.2. Epidemiologie.....	6
2.3. Ätiologie und Pathophysiologie.....	8
2.4. Risikofaktoren der Osteoporose.....	12
2.5. Homocystein und B-Vitamine	14
2.5.1. Stoffwechsel von Homocystein und B-Vitaminen.....	14
2.5.2. Hyperhomocysteinämie und B-Vitaminmangel.....	18
2.5.3. Klinische und experimentelle Aspekte des B-Vitaminmangel und der Hyperhomocysteinämie.....	20
2.6. Fragestellung	23
3. Material und Methodik	24
3.1. Studiendesign.....	24
3.2. Herstellung der Zellkulturen.....	25
3.3. Messung der Dentin-Resorptionsaktivität.....	28
3.4. Messung der TRAP-Aktivität.....	30
3.5. Messung der Kathepsin K-Aktivität.....	32
3.6. Messung des HCys im Überstand.....	32
3.7. Statistische Analyse.....	33
4. Ergebnisse	34
4.1. Dentin-Resorptionsaktivität.....	34
4.2. TRAP-Aktivität.....	38
4.3. Cathepsin K-Aktivität.....	41

4.4. HCy-Konzentration im Überstand.....	44
5. <i>Diskussion</i>.....	46
6. <i>Literaturverzeichnis</i>.....	60
7. <i>Publikation/Dank</i>.....	81
8. <i>Lebenslauf</i>.....	83

Abkürzungsverzeichnis

ACP	saure Phosphatase-Assay
AFC	Amino-4-Trifluormethyl Coumarin
Ampho B	Amphotericin B
ATP	Adenosintriphosphat
BMD	Knochendichte
BMP	Knochen-morphogenetisches Protein
Cbfa 1	Kern-bindender Faktor α 1
α -MEM	alpha-Minimum essentielles Medium
CBS	Cystathionin- β -Synthase
DEXA	quantitative digitale Radiographie
DHNL	Dehydro-Dihydroxylysinonorleuzin-Crosslink
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPD	Desoxypyridinolin
EMSA	elektrophoretisches Mobilitätswechsellassay
EPOS	Europäische Prospektive Osteoporose Studie
FCS	fetales Kälberserum
5-MTHF	5-Methylentetrahydrofolsäure
GM-CSF	Granulocyten-Makrophagen-Koloniestimulationsfaktor
HCy	Homocystein
HHCy	Hyperhomocysteinämie
HLNL	Dehydro-Hydroxylysinonorleuzin-Crosslink
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IL6	Interleukin 6
IS	interner Standard
LASA	Longitudinale-Alterungs-Studie Amsterdam
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase

M-CSF	Makrophagen-Koloniestimulationsfaktor
MTHFR	Methylentetrahydrofolsäure-Reduktase
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MS	Methioninsynthase
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NMDA	N-Methyl-d-aspartat
NMDAR	N-Methyl-d-aspartat-Rezeptor
OD	optische Dichte
OPG	Osteoprotegerin
Osf 2	Osteoblasten-spezifischer Faktor 2
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat-gepuffertes Salin
PPAR γ 2	Peroxisomenproliferator-aktivierter Rezeptor γ 2
RANKL	Rezeptoraktivator von NF- κ -B Ligand
RFU	relative Fluoreszenzeinheit
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SD	Standardabweichung
TRAP	Tartrat-resistente saure Phosphatase
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1. Zusammenfassung

Die Osteoporose gehört zu den häufigsten Krankheiten des höheren Lebensalters. Jüngste Studien beschreiben die moderate Hyperhomocysteinämie (**HHCy**) als eigenständigen Risikofaktor für osteoporotische Frakturen. Die Osteoporose beruht auf einer Dysbalance zwischen Osteoklasten- und Osteoblasten-Aktivität zu Gunsten der Osteoklasten. Erste Zellkultur-Experimente belegen eine Stimulation humaner Osteoklasten durch **HHCy**. Eine moderate **HHCy** im Erwachsenenalter wird meist durch Mangel an Folsäure, Vitamin B₁₂ und B₆ verursacht. Es kann vermutet werden, dass ein derartiger B-Vitaminmangel ebenfalls zu einer Zunahme der Osteoklasten-Aktivität führen. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, den Effekt abnehmender B-Vitaminskonzentrationen auf die Aktivität primärer humaner Osteoklasten in vitro zu untersuchen.

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) von zehn gesunden, männlichen Probanden wurden über einen Zeitraum von 21 Tagen kultiviert. Das Nährmedium enthielt neben Makrophagen-Koloniestimulationsfaktor (M-CSF) und Rezeptoraktivator von NF-κ-B Ligand (RANK-L) absteigende Konzentrationen von Folsäure, Vitamin B₁₂ und B₆ beziehungsweise steigende Konzentrationen von Homocystein (**HCy**). Am Ende der Kulturdauer hatten sich die meisten PBMCs zu voll ausdifferenzierte Osteoklasten differenziert. Die Osteoklasten-Aktivität wurde durch die Bestimmung der Tartrat-resistenten Sauren Phosphatase- (TRAP), Cathepsin K-, sowie der Resorptionsaktivität auf Standarddentinscheiben analysiert.

Eine synchrone Reduktion von Folsäure, Vitamin B₁₂ und B₆ sowie die Reduktion nur eines dieser Vitamine führte zu einer Erhöhung der Resorptionsaktivität um bis zu 250 Prozent gegenüber den Kontrollkulturen mit maximaler Vitaminskonzentration. Steigende **HCy**-Konzentrationen induzierten eine Erhöhung der Resorptionsleistung um bis zu 395 Prozent. Sowohl für die kombinierte Reduktion aller drei Vitamine als auch für **HCy** konnten diese Befunde durch die Bestimmung von TRAP- und Cathepsin K-Aktivität bestätigt werden. Für den kombinierte B-Vitaminmangel betrug die Aktivitätssteigerung bei TRAP maximal

24 Prozent und bei Cathepsin K maximal 23 Prozent. Bei einer **HCy**-Konzentration von 2500 $\mu\text{mol/l}$ im Kulturmedium zeigten sowohl TRAP als auch Cathepsin K eine Aktivitätssteigerung von 50 Prozent gegenüber Kontrollkulturen. Bei Variation von nur einem Vitamin bestätigten sich die Ergebnisse des Resorptionsassays nur für Folat mittels TRAP (maximal 33 Prozent). Die Messung der **HCy**-Konzentration im Zellkultur-Überstand ergab einen signifikanten Anstieg der **HCy**-Konzentration bei fallenden Vitaminkonzentrationen von bis zu 20 Prozent.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine signifikante Stimulation primärer humaner Osteoklasten durch abnehmende Konzentrationen von Folsäure, Vitamin B₁₂ und B₆, die eine Akkumulation von **HCy** im Kulturmedium verursachen.

Abstract

Osteoporosis is one of the most common diseases in elderly persons, causing considerable morbidity and mortality. Previous studies suggest hyperhomocysteineamia (**HHCy**) as an independent risk-factor of osteoporotic fractures. Osteoporosis is caused by an dysbalance of osteoclast- and osteoblast-activity. Clinical and experimental data showed an stimulating effect of homocysteine (**HCy**) on primary human osteoclasts. Moderate **HHCy** among adults is mainly caused by low plasma-concentrations of folic-acid, vitamin B₁₂ and B₆. According to this, it can be hypothesized that decreasing concentrations of these B-vitamins stimulate osteoclast-activity by accumulation of **HCy**. The present study aimed to prove this hypothesis in a systematic cell-culture approach using primary human osteoclasts.

In the presence of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and receptor-activator of NF- κ -B (RANK-L) osteoclasts were cultured from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of ten healthy male donors for 21 days with decreasing concentrations of folic-acid, vitamin B₁₂ and B₆ or increasing **HCy**-concentrations. At the end of the culture-period osteoclast-activity was quantified by measuring of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), cathepsin K and dentine-resorbing activity on standard dentine discs.

Compared to controls the combined reduction of folic-acid, vitamin B₁₂ and vitamin B₆ and the reduction of only one of these vitamins increased dentin resorption activity by up to 250 percent. Increasing **HCy**-concentrations induced an elevation of resorbing activity by up to 395 percent. The result of combined reduced vitamin-concentrations and increased **HCy**-concentration was confirmed by TRAP and cathepsin K. The complete absence of folate, vitamin B₁₂ and B₆ caused an increased TRAP- and cathepsin K-activity by up to 24 and 23 percent, respectively. A **HCy**-concentration of 2500 $\mu\text{mol/L}$ in the culture medium induced 50 percent higher TRAP- and cathepsin K-activity than controls. However, only for folic-acid this effect could be confirmed by the measurement of TRAP (33 percent increase). The measurement of **HCy** in the supernatant of the cell-

cultures showed a significant increase of **HCy** in the presence of decreasing B-vitamin-concentrations by up to 20 percent.

These results demonstrate a significant stimulatory effect of folic-acid, vitamin B₁₂ and vitamin B₆ on osteoclast-activity by accumulation of **HCy** in the culture medium.

2. Einleitung

2.1. Definition

Die Osteoporose gehört zu den häufigsten Erkrankungen des höheren Lebensalters und stellt aufgrund ihrer hohen Morbidität und Mortalität ein großes sozioökonomisches Problem dar (10,102). Sie ist eine generalisierte Skeletterkrankung, die durch eine verminderte Knochenmasse, -struktur und -funktion mit konsekutiv erhöhtem Frakturrisiko charakterisiert wird (55). Sie manifestiert sich durch Knochenschmerzen, Knochenbrüche ohne adäquates Trauma (Spontanfrakturen) und eine Abnahme der Körpergröße durch Zusammensinterung von Wirbelkörpern. Der pathologische Knochenschwund betrifft sowohl den organischen als auch den mineralischen Anteil des Knochens. Die häufigsten Frakturlokalisationen sind der Femurhals, der distale Radius und die Wirbelsäule (37,55).

Anhand der Ätiologie lässt sich die Osteoporose in eine primäre und eine sekundäre Form einteilen (55). Die wesentlich häufigere primäre Osteoporose entsteht ohne erkennbare Ursache und wird weiter in die postmenopausale (Typ 1), die senile (Typ 2) und die sehr seltene juvenile Form unterteilt. Von der primären Osteoporose unterscheidet man die weitaus seltenere sekundäre Osteoporose deren Ursachen zumeist in endokrinologischen Grunderkrankungen (zum Beispiel Hyperparathyreoidismus) oder Nebenwirkungen von Medikamenten (zum Beispiel Langzeittherapie mit Kortikosteroiden) liegt (117).

Die WHO-Richtlinie (Weltgesundheitsorganisation) der Osteoporose basiert auf der Analyse des Frakturrisikos in Bezug auf die Knochendichte (BMD). Kennzeichnend ist hier ein durch quantitative digitale Radiographie (DEXA) festgestellter T-Score von $-2,5$ (117). Als T-Score wird die Standardabweichung (SD) unterhalb des Mittelwertes der Knochenmasse gesunder Menschen im Alter von 30 Jahren bezeichnet (55). Histopathologisch zeigt sich dieser Knochenschwund in einer Ausdünnung und Perforation des Trabekelwerks der spongiosen Knochen (siehe Bild 1).

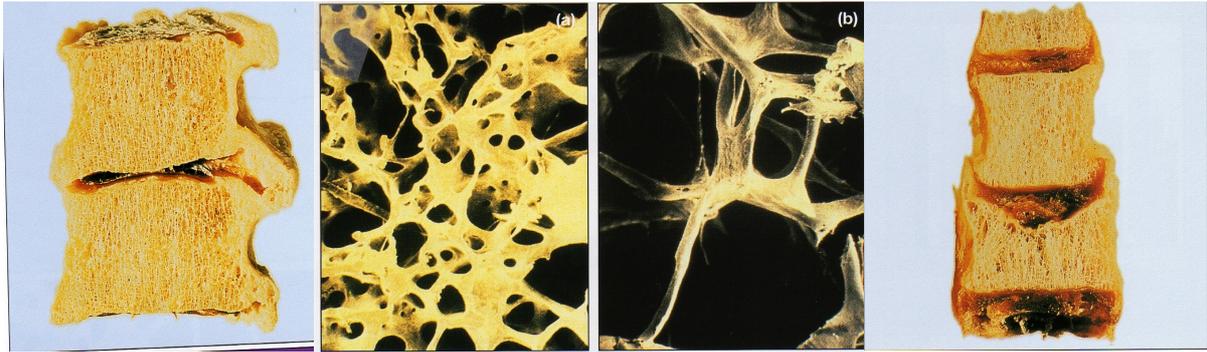


Bild 1: links: normaler Knochen; Mitte: normale und osteoporotische Trabekel;
rechts: Sinterungsfraktur

2.2. Epidemiologie

Die Osteoporose ist die häufigste Knochenerkrankung des höheren Lebensalters und tritt besonders häufig bei Frauen auf (101,117). Laut WHO wird die Zahl von Osteoporose-bedingten Hüftfrakturen bis zur Mitte dieses Jahrhunderts weltweit von jährlich 1,7 Millionen im Jahre 1990 auf 6,3 Millionen im Jahre 2050 steigen . Die Behandlungskosten werden von derzeit \$2,3 Milliarden auf \$27 Milliarden jährlich ansteigen. Nach Angaben der International Osteoporosis Foundation ereignet sich in Europa alle 30 Sekunden eine Osteoporose-bedingte Fraktur (117).

Mehrere epidemiologische Studien zeigen klar eine Zunahme der Frakturrate mit steigendem Lebensalter (38,48,117). Diese Zunahme geht einher mit einer kontinuierlichen Abnahme der BMD (Abbildung 1).

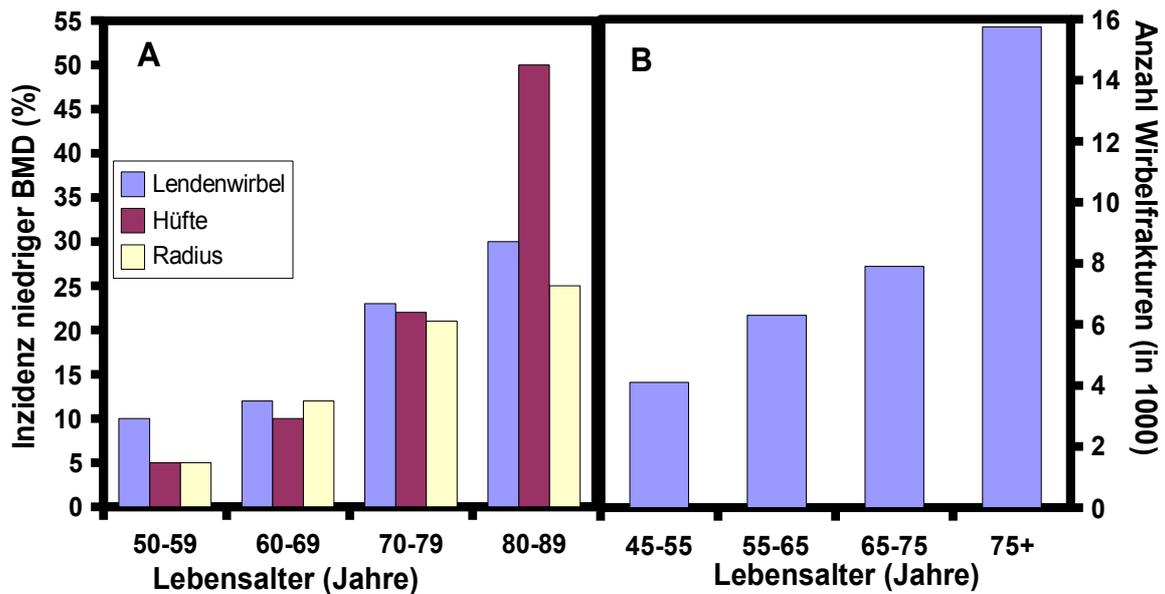


Abbildung 1: Plot A: Zusammenhang zwischen niedriger BMD (T-Score < -2) und Lebensalter bei postmenopausalen Frauen ; Plot B: Inzidenz von Wirbelfrakturen in Relation zu Lebensalter

In der "Europäischen Prospektiven Osteoporose Studie (EPOS)" ergab sich eine Inzidenz osteoporotischer Frakturen bei Frauen von 5,8 bezogen auf 1000 Personenjahre in der Gruppe der 50 – 54jährigen (117). Dieser Wert stieg auf 29,3 bei Frauen im Alter von 75 – 79 Jahren. Bei Männern ergab sich eine Zunahme von 3,3 auf 13,6 in den oben genannten Altersgruppen. Diese Entwicklung führt zu einer jährlichen Neuerkrankungsrate von einem Prozent bei Frauen und einem halben Prozent bei Männern bezogen auf die gesamte europäische Bevölkerung (117). In Deutschland wird die Zahl der an Osteoporose leidenden Menschen auf acht bis zehn Millionen geschätzt (117). Die Behandlung der hieraus resultierenden Oberschenkelhalsbrüche verursacht höhere Kosten als die für Herzinfarkt und Schlaganfall zusammen (117).

Die hohe Frakturrate bei Osteoporose-Patienten geht mit einer hohen Invalidisierungsrate und einer hohen Mortalität einher (71,73). So wurde bei Hüftfrakturen ein Anstieg der Sterberate zwischen 12 und 35 Prozent innerhalb eines Jahres beobachtet (80).

Auf Grund der demographischen Bevölkerungsentwicklung mit einer zunehmenden Überalterung der Gesellschaft entwickelt sich diese Erkrankung mehr und mehr zu einem ernst zunehmenden Kostenfaktor im Gesundheitswesen (102,120). Laut einer Studie von Chrischilles et al. werden innerhalb der nächsten zehn Jahre allein in den USA 5,2 Millionen postmenopausale Frauen eine Osteoporose-bedingte Fraktur erleiden (22). Hieraus ergibt sich insgesamt eine Ausfallquote an Arbeitszeit von ca. zwei Millionen Jahren und Kosten in Höhe von \$ 45 Milliarden (22). Eine ähnliche Entwicklung zeichnet sich auch in Europa ab (78,151).

Die angeführten epidemiologischen Daten belegen eindeutig das Ausmaß und die Konsequenzen der Osteoporose in der alternden Bevölkerung westlicher Industrienationen. Deshalb ist eine wirksame Behandlung dieser Erkrankung aus medizinischen und volkswirtschaftlichen Gründen von großer Bedeutung.

2.3. Ätiologie und Pathophysiologie

Es wird angenommen, dass der altersabhängige Knochenschwund bei Männern und Frauen im Alter von 50 Jahren beginnt (124). Dieser Prozess beschleunigt sich bei Frauen ab der Menopause für einen Zeitraum von fünf bis zehn Jahren. Nach Einsetzen des Knochenschwundes persistiert dieser Abbauvorgang für den Rest des Lebens (124).

Tabelle 1: Typen und Stadien der Osteoporose

Merkmal	Typ1-Osteoporose	Typ2-Osteoporose
Alter (Jahre)	50 – 70	>70
Geschlecht (m:w)	m<<<w	2:1
Knochenverlust	hauptsächlich Trabekulär	Trabekulär = Kortikal
häufigste Frakturen	Wirbelkörper	Schenkelhals, Arm, Wirbelkörper
ätiologische Faktoren	Östrogenmangel	Alterungsprozess, Immobilität

Klinisches Stadium	Kriterien (DEXA-Messung)
0 - Osteopenie (präklinische Osteoporose)	T-Score: -1,0 bis -2,5 SD; keine Fraktur
1 - Osteoporose (ohne Fraktur)	T-Score < -2,5 SD; keine Fraktur
2 - manifeste Osteoporose (mit Fraktur)	BMD erniedrigt; 1 – 3 Wirbelfrakturen
3 - fortgeschrittene Osteoporose	multiple Wirbelfrakturen; auch extraspinal

(modifiziert nach (124))

Die Ursache für den pathologischen Knochenschwund liegt in einer Störung des Gleichgewichts zwischen den zellulären Knochenresorptions- und -regenerationsvorgängen des menschlichen Skeletts (94,95). Dieser Vorgang wird auch als Remodelling bezeichnet. Das Remodelling wird durch Knochensubstanz aufbauende Osteoblasten und -abbauende Osteoklasten vermittelt (125,141). Osteoblasten sind mesenchymaler Herkunft, wohingegen die Osteoklasten der hämatopoetischen Zellreihe entstammen. Beide Zelltypen werden in ihrer Funktion durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone beeinflusst (siehe Abbildung 2) (65,95). Sie stehen in permanenter Kommunikation über endo- und parakrine Mechanismen, und können sich gegenseitig stimulieren sowie inhibieren (95).

Zu den wichtigsten Wachstumsfaktoren des Knochenstoffwechsels zählen die Knochen-morphogenetischen-Proteine (BMPs) (126). Diese erhöhen die Transkriptionsrate des Osteoblasten-spezifischen-Faktors 2 (Osf2) und von Kern-bindendem-Faktor $\alpha 1$ (Cbfa1), zwei Osteoblasten-spezifische Transkriptionsfaktoren (1). Diese führen zu einer gesteigerten Produktion von Proteinen wie Kollagen Typ 1 oder Osteocalzin (45). Antagonisiert wird diese Reaktionskette durch die Wirkung von Noggin, einem Protein der Osteoblasten, welches sowohl die Funktion von Osteoblasten als auch Osteoklasten hemmt (1). Aufgrund ihrer Entstehung aus hämatopoetischen Stammzellen ist eine Beteiligung der Zytokine bei der Aktivierung von Osteoklasten nahe liegend. Interleukin 6 (IL6) spielt dabei eine besondere Rolle (95). Über seinen Rezeptor (IL6R α) aktiviert IL6 die Gentranskription in Osteoklasten mittels einer Phosphorylierungskaskade (95). Zusätzlich stimuliert IL6 die Osteoblasten (95). Diese aktivieren nun durch direkte Zell-Zell-Wechselwirkung Osteoklasten. Darüber hinaus spielen für die Entstehung und Aktivierung von Osteoklasten noch Interleukin 1, 3, 11, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie Stimulationsfaktor (GM-CSF) und Makrophagen-Kolonie Stimulationsfaktor (M-CSF) eine wichtige Rolle (96). Hemmend wirken Interleukin 4, 10 und 18 (145).

Im Bereich der Hormone greifen vor allem die Hormone des Kalziumstoffwechsels regulatorisch in den Prozess des Remodellings ein. Vitamin D₃ und Parathormon stimulieren Osteoklasten über eine Aktivierung von IL6 (125). IL6 führt zu einer erhöhten Expression des Rezeptor-Aktivator von NF- κ -B (RANK) Liganden (RANKL). Zusammen mit M-CSF ist RANKL essentieller Faktor für die suffiziente Osteoklastogenese (114). Im Gegensatz hierzu führt Calcitonin zu einer Hemmung der Osteoklasten-Aktivität und darüber hinaus zu einer höheren Apoptoserate der Osteoklasten. Ebenfalls hemmend wirken die Geschlechtshormone (7). Diese vermindern die Produktion von IL6 und dessen Rezeptor IL6R α . Zusätzlich führt Östrogen zu einer Zunahme der Bildung von Osteoprotegerin (OPG), einem potenten Aktivator von Osteoblasten und Hemmer der Osteoklasten-Aktivität (65,66).

Im Bezug auf die gesamte Bevölkerung stehen für die Entstehung der Osteoporose drei pathophysiologische Mechanismen im Vordergrund: der

postmenopausale Geschlechtshormonmangel, höheres Lebensalter und der Glucocorticoidexzess (95,97).

Durch einen Mangel an Östrogen wird die IL6-Produktion nicht mehr ausreichend unterdrückt (66). Neben einer verstärkten Aktivität der Osteoklasten verlängert sich auch ihre Lebensdauer, was zu einer tieferen Erosion in den Knochen führt (10,35). Zusätzlich erhöht sich die Apoptoserate der Osteoblasten aufgrund einer verminderten Produktion von OPG (66). Da IL6 auch in Assoziation mit multiplen Myelomen, Morbus Paget, Rheumatoider Arthritis und Hyperparathyreoidismus zu stehen scheint, birgt der postmenopausale Östrogenmangel auch für diese Erkrankungen ein erhöhtes Risiko (87,135,142).

Während des Alterungsprozesses verändert sich die Zellzusammensetzung des Knochenmarks (111). Die Bildungsrate von Osteoblasten nimmt zugunsten der Adipozyten, die ebenfalls der mesenchymalen Zellreihe entstammen ab. Eine Erklärung hierfür ist die Akkumulation von oxydierten Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL) (89). Diese bewirken eine verstärkte Bildung von Peroxysomenproliferator-aktivierter Rezeptor γ 2 (PPAR γ 2), einem Transkriptionsfaktor, der die Produktion von Cbfa1 vermindert. Dieser Signalweg führt zu einer möglichen Erklärung des häufigen gleichzeitigen Auftretens von Osteoporose und Atherosklerose (88).

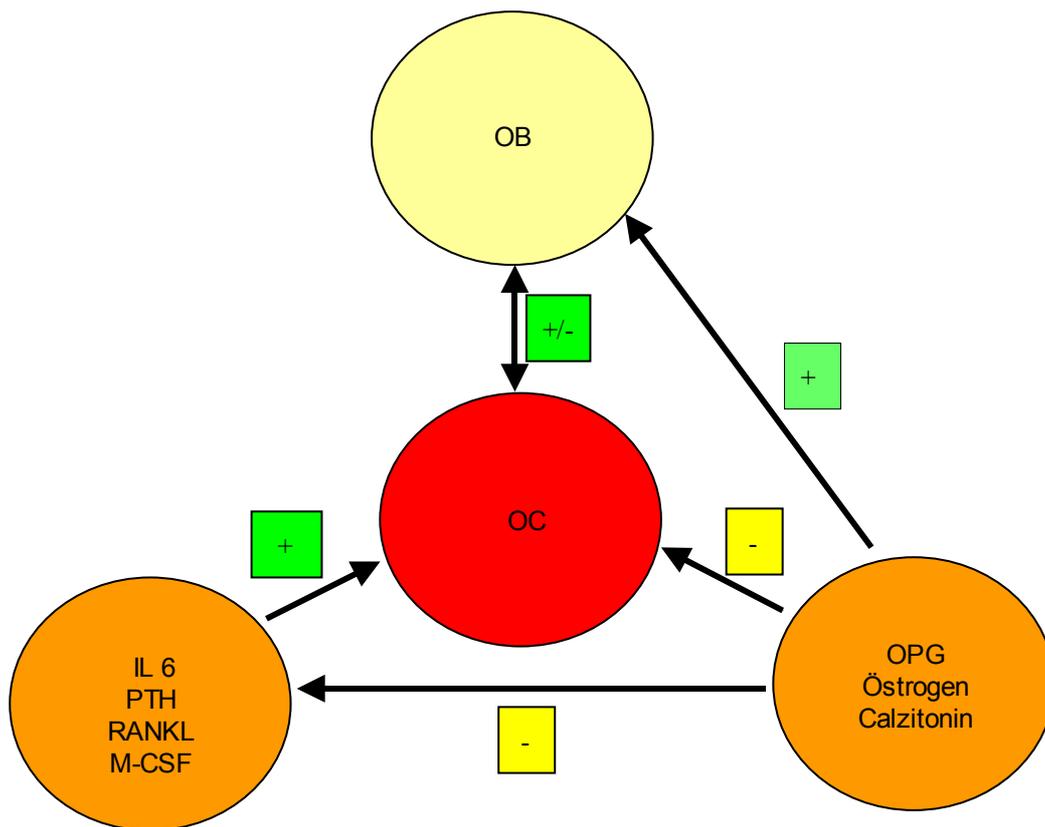


Abbildung 2: Regelkreis des Remodelling; OB – Osteoblasten, OC - Osteoklasten

2.4. Risikofaktoren der Osteoporose

Aufgrund der hohen Prävalenz der Osteoporose und den damit verbundenen Konsequenzen kommt der Prävention durch Erkennung und Modifikation von Risikofaktoren eine große Bedeutung zu. Für die primäre Osteoporose werden zahlreiche Risikofaktoren diskutiert. In einem Review von Geusens et al., das zahlreiche Kohorten- und Fallkontrollstudien einschloß, konnten insgesamt über 80 Einflussgrößen identifiziert werden (47). Die Hauptrisikofaktoren sowie eine kleine Auswahl weniger bedeutsamer Risikofaktoren sind in Tabelle 2 dargestellt. Die kanadische Osteoporose-Gesellschaft definierte in ihrer Richtlinie aus dem Jahre 2004 vier Schlüsselfaktoren als Zeichen eines erhöhten Frakturrisikos. Hier ist zunächst die erniedrigte BMD zu nennen. Für jede SD der BMD unter einen Basiswert verdoppelt sich das Frakturrisiko (117). Bei vorliegen eines Haupt- oder

zweier untergeordneter Risikofaktoren aus Tabelle 2 ist eine Messung der BMD sinnvoll.

Tabelle 2: Risikofaktoren von Osteoporose

Haupttrisikofaktoren	untergeordnete Risikofaktoren
Röntgenologisch diagnostizierte Osteopenie	Rauchen
Alter > 65 Jahre	starker Alkoholkonsum
frühe Menopause	Gewicht < 57 kg
positive Familienanamnese für Osteoporose	niedrige Kalziumaufnahme
primärer Hyperparathyreoidismus	rheumatoide Arthritis
Malabsorptionssyndrom	Langzeittherapie mit Antikonvulsiva
Langzeitglukokortikoidtherapie	Langzeittherapie mit Heparin

(modifiziert nach (14))

Neben der erniedrigten BMD sind noch das höhere Lebensalter (77), vorausgegangene Frakturen in der Eigenanamnese aufgrund verminderter Knochenstabilität (27,43,84,152) und eine positiven Familienanamnese für Osteoporose Haupttrisikofaktoren für die Entstehung von Osteoporose (25,116, 117,143).

Neben diesen seit langem bekannten Risikofaktoren wird seit kurzem auch eine erhöhte Homocystein-Konzentration im Blut als Risikofaktor der Osteoporose und osteoporotischer Frakturen diskutiert (18,100,129). Die besondere Bedeutung der Hyperhomocysteinämie (**HHCy**) liegt in ihrer Prävalenz und der einfachen sowie sicheren Behandlungsmöglichkeit mittels B-Vitaminsupplementation (138).

Erste Erkenntnisse bezüglich des Zusammenhangs zwischen **HHCy** und Knochenerkrankungen wurden bereits vor über 50 Jahren gewonnen (18,115). Doch erst im Jahre 2004 erschienen zwei große epidemiologische Studien, die eine Verbindung zwischen der moderaten **HHCy** und osteoporotischen Frakturen belegten (100,129,149). In der Framingham-Studie zeigte sich eine Erhöhung des Frakturrisikos um den Faktor vier bei Männern in der höchsten Quartile der Plasma-**HHCy**-Konzentration gegenüber der niedrigsten Quartile (100).

Vergleichbare Befunde konnten in der zeitgleich veröffentlichten Rotterdam-Studie erhoben werden (149). Darüber hinaus konnten Sato et al. eine positive Auswirkung einer B-Vitaminsubstitutionstherapie auf das Frakturrisiko zeigen (129). Aufgrund dieser drei Arbeiten lässt sich vermuten, dass **HCy** einen neuen unabhängigen Risikofaktor der Osteoporose darstellt.

2.5. Homocystein und B-Vitamine

2.5.1. Stoffwechsel von Homocystein und B-Vitaminen

HCy ist eine schwefelhaltige nicht proteinbildende Aminosäure, welche im Stoffwechsel der essentiellen Aminosäure Methionin entsteht (Abbildung 3) (39, 40,41,42). Methionin stellt in Form von S-Adenosylmethionin (SAM) einen wichtigen Methylgruppendonator für die Methylierung von Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribonukleinsäure (RNA), sowie der Biosynthese von Epinephrin, Melatonin, Kreatinin und vieler weiterer Substanzen dar (39,40). Der erste Schritt im Metabolismus des Methionin ist dessen Aktivierung zu SAM durch Kopplung an den Adenosylrest eines Adenosyltriphosphat-Moleküls (ATP). SAM ist eine energiereiche Verbindung, die ihre Methylgruppe leicht abgeben kann. Diese Transmethylierung erfolgt mittels Methyltransferasen (zum Beispiel Glycin-N-Methyltransferase, EC 2.1.1.20) auf Sauerstoff- oder Stickstoffatome der potentiellen Akzeptoren. Das bei dieser Reaktion entstehende S-Adenosylhomocystein (SAH) wird durch Hydrolyse mittels SAH-Hydrolase in Adenosin und **HCy** aufgespalten.

Da das entstehende **HCy** zytotoxisch ist, muss es schnell und effektiv aus dem zellulären Stoffwechsel entfernt werden (41). Für die Elimination stehen der Zelle mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Neben dem aktiven Export aus der Zelle existieren zwei B-Vitamin-abhängige Metabolisierungswege: die Remethylierung zu Methionin und die irreversible Transsulfurierung zu Cystein und α -Ketobutyrat (39).

Die Remethylierung erfolgt durch das Vitamin B₁₂-abhängige Enzym Methioninsynthase (MS, EC 2.1.1.13). Diese verwendet eine von der 5-Methyltetrahydrofolsäure (5-MTHF) bereitgestellte Methylgruppe.

Bei der Transsulfurierung erfolgt eine Kondensation des **HCy** mit Serin zu Cystathionin. Diese Reaktion wird durch die Cystathionin-β-Synthase (CBS, EC 4.4.1.1) katalysiert. Anschließend wird das Cystathionin mittels γ-Cystathionase (CS, EC 4.4.1.1) zu Cystein und α-Ketobutyrat irreversibel abgebaut. Sowohl die CBS, als auch die CS sind Vitamin B₆-abhängig.

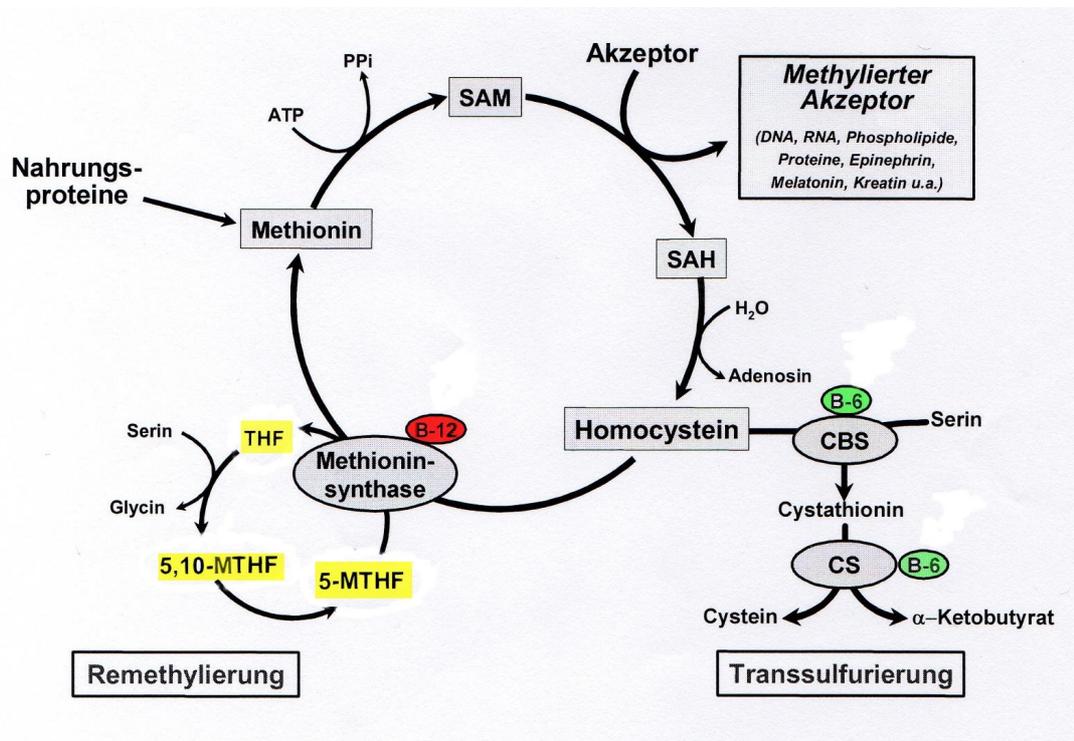


Abbildung 3: Schema des Methionin- und Homocysteinestoffwechsels. ATP- Adenosyltriphosphat, B-6- Vitamin B₆, B-12 – Vitamin B₁₂, CBS – Cystathionin-β-Synthase, CS – Cystathionase, PPi – Pyrophosphat, SAH – S-Adosylhomocystein, SAM – S-Adosylmethionin, THF – Tetrahydrofolat, 5-MTHF – 5-Methyltetrahydrofolat, 5,10-MTHF – 5,10-Methyltetrahydrofolat, DNA – Desoxyribonukleinsäure, RNA – Ribonukleinsäure

Aus dem zuvor Gesagten ergibt sich, dass für die Aufrechterhaltung einer niedrigen intrazellulären **HCy**-Konzentration eine ausreichende Versorgung mit Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆ essentiell ist. Der Zusammenhang zwischen **HCy** und diesen Vitaminen konnte in zahlreichen Studien belegt werden (53,75, 112,130). Im Konsensuspapier der D.A.CH.-Liga Homocystein e.V. (Deutschland, Österreich, Schweiz) wurde der B-Vitaminmangel als wichtigster Auslöser einer **HHCy** definiert (136).

Die Metabolisierung des extrazellulären **HCy** erfolgt hauptsächlich (etwa 70 Prozent) in der Niere (63). Deshalb führen bereits geringe Einschränkungen der renalen Funktion zu einer Akkumulation von **HCy** im Plasma, welche auch ohne eine eingeschränkte Verfügbarkeit von Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆ auftritt (44,63).

2.5.2. Hyperhomocysteinämie und B-Vitaminmangel

Die **HHCy** lässt sich anhand der Plasmaspiegel in eine moderate (12 – 30 µmol/l), eine intermediäre (30 – 100µmol/l) und eine schwere Form (>100 µmol/l) unterteilen (136). Während die besonders im Kindes- und Jugendalter im Zusammenhang mit genetischen Defekten wie der Homocysteinurie beobachtete schwere **HHCy** im Vordergrund steht (105,121), findet man im Erwachsenenalter überwiegend moderate beziehungsweise intermediäre Erhöhungen des **HCy**-Plasmaspiegels (9,122,130,146). Die Prävalenz der **HHCy** in der Allgemeinbevölkerung liegt bei zehn bis 20 Prozent, bei Patienten mit Gefäßerkrankungen sogar bei 40 Prozent, steigend mit zunehmendem Lebensalter (61,130,144). Als Hauptursache steht die Folatehypovitaminose im Vordergrund, welche durch eine Unterversorgung mit frischem Obst und Gemüse begünstigt wird (133). Zusätzlich führt unsachgemäße Verarbeitung und Lagerung (Hitze- und Lichtempfindlichkeit) zu einem Verlust von bis zu 90 Prozent der in der Nahrung enthaltenen Folsäure (28). Die empfohlene Zufuhr von Folsäureäquivalenten liegt bei etwa 0,4 mg/d. Mit einer durchschnittlichen Aufnahme von weniger als 0,3 mg/d in Deutschland, Österreich und der Schweiz wird dieser Wert deutlich unterschritten. Der Folatmangel gilt deshalb als häufigster Vitaminmangel in Mitteleuropa (28).

Ein Mangel an Vitamin B₁₂ wird weniger durch unzureichende Aufnahme als vielmehr durch eine gestörte Resorption bedingt. Die Gründe hierfür liegen in einer alterungsbedingten pH-Erhöhung des Magensaftes und einem Mangel an Intrinsic Faktor. Dieser Prozess betrifft bis zu 40 Prozent der älteren Bevölkerung (16). Neben diesen Verdauungsprozessen spielen auch Ernährungsgewohnheiten eine Rolle. Tierische Nahrungsmittel sind für den Menschen die essentielle Vitamin B₁₂-Quelle (54). Daher weisen Vegetarier häufig eine Cobalaminhypovitaminose auf. Neben diesen therapeutisch beeinflussbaren Faktoren führt auch höheres Lebensalter zu gesteigerten **HCy**-Werten (29). Bis zur Mitte des siebten Lebensjahrzehnts verläuft dieser Prozess weitgehend linear (Zunahme um circa zehn Prozent beziehungsweise 1 µmol//Dekade), anschließend deutlich schneller (29). Ursächlich hierfür ist unter anderem die altersbedingte Abnahme der Nierenfunktion (64,131). Neben B-Vitaminmängeln als häufigste Ursache der **HHCy** im Erwachsenenalter existiert ein weit verbreiteter Polymorphismus im Gen der Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR, EC 1.5.1.20) (2,6,15,49,150). Dabei kommt es in Position 677 des Gens zu einem Austausch des Nukleotids Cytosin durch Thymin. Durch diesen Austausch verändert sich die Aminosäuresequenz, was zu einer herabgesetzten Hitzestabilität des entsprechenden Proteins führt. Da Folsäure einen stabilisierenden Einfluss auf die MTHFR ausübt, ist bei hohen Folsäurekonzentrationen im Serum keine Reduktion der Enzymaktivität feststellbar. Bei Folsäuremangel nimmt die Enzymaktivität bei homozygoten Trägern des mutierten MTHFR-Gens allerdings um bis zu 70 Prozent ab. Die betroffenen Patienten reagieren besonders empfindlich auf einen Folatmangel und weisen eine um etwa 25 Prozent höhere **HCy**-Konzentration im Blut auf (72). Ebenso können Medikamente (z.B. Methotrexat, Theophyllin etc.), Erkrankungen (Leukämien, Hyperthyreose etc.) und Lebensstilfaktoren (Zigaretten rauchen, Koffein, Vegetarismus etc.) zu einem erhöhten **HCy**-Plasmaspiegel führen (136). Beeinflusst werden in diesem Zusammenhang hauptsächlich Enzyme beziehungsweise deren Kofaktoren durch direkten oder indirekten Antagonismus (136). Des Weiteren spielen Enzyminduktion, Aufnahmestörungen und Disulfidaustausch-Reaktionen eine Rolle. Neben den oben genannten Gründen

können ebenso Schwangerschaft, Nierenerkrankungen, Alkoholabhängigkeit, Tumorleiden und die Einnahme bestimmter Medikamente (Methotrexat, Theophyllin, Tamoxifen etc) zu B-Vitaminmangel führen (136).

2.5.3. Klinische und experimentelle Aspekte des B-Vitaminmangel und der Hyperhomocysteinämie

Bereits in den 60er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurden die koronare Herzkrankheit (KHK) und neurologische Erkrankungen (zum Beispiel Demenz) mit erhöhten **HCy**-Konzentrationen im Serum in Verbindung gebracht (18).

Mittlerweile existiert insbesondere für die kardiovaskulären Erkrankungen eine umfangreiche Datenlage, die die Bedeutung der **HHCy** als unabhängigen Risikofaktor für KHK, Apoplex, periphere arterio-venöse Verschlusskrankheit (pAVK) und venöse Thrombosen klar belegt (3,12,19,20,30,68,85,93,134,154). Neben kardiovaskulären Erkrankungen sind auch Zusammenhänge zwischen **HHCy** und neurodegenerativen Erkrankungen (8,31,34,76,91,108,118,119,132,136,140,153), sowie schwangerschafts-assoziierten Erkrankungen (23,26,61,139) seit langem bekannt. Zusätzlich zu diesen klassischen klinischen Aspekten der **HHCy** und des B-Vitaminmangels werden seit kurzem auch Zusammenhänge mit der Herzinsuffizienz und der Osteoporose diskutiert. Hier ist die Datenlage aber noch unzureichender, im Vergleich zu den zuvor besprochenen klinischen Aspekten. Ein Zusammenhang zwischen **HHCy** und Erkrankungen des Skelettsystems wurde erstmals vor über 50 Jahren beschrieben (18). Doch erst in den letzten Jahren wurde diese Assoziation Gegenstand systematischer Untersuchungen.

Im Jahr 2004 erschienen zeitgleich zwei große epidemiologische Studien, die übereinstimmend einen Zusammenhang zwischen dem **HCy**-Spiegel und dem Risiko für osteoporotische Frakturen beschreiben (100,149). In der Rotterdam-Studie wurden 2406 Probanden mit einem Mindestalter von 55 Jahren über insgesamt 11.253 Personenjahre beobachtet (149). Das relative Frakturrisiko betrug 1,4 für jede Zunahme der **HCy**-Konzentration um eine Standardabweichung, in der höchsten **HCy**-Quartile sogar 1,9. Es wurden weder

geschlechtsspezifische Unterschiede noch Zusammenhänge des Frakturrisikos mit der Knochendichte festgestellt (149). Vergleichbare Ergebnisse konnten in der Framingham-Studie gewonnen werden (100).

Da erhöhte **HCy**-Spiegel im fortgeschrittenen Erwachsenenalter meist Folge eines reduzierten B-Vitamin-Status sind, stellt sich die Frage, ob auch B-Vitamine mit Osteoporose und osteoporotischen Frakturen in Zusammenhang stehen. Erste diesbezügliche Daten stammen bereits aus den frühen 90er Jahren des vergangenen Jahrhunderts von Patienten mit perniziöser Anämie (48,103,123). Goerss et al. untersuchten 131 postmenopausale Frauen über einen Zeitraum von 1550 Personenjahren (48). Die Frakturrate war im Durchschnitt bei Frauen mit Vitamin B₁₂-Mangel gegenüber Kontrollen mehr als verdoppelt (Oberschenkelhals 1,9; Wirbelkörper 1,8; Unterarm 2,9).

Im Bezug auf die BMD ist die Sachlage weitaus weniger eindeutig und wird kontrovers diskutiert (15,56,109,150). Die großen Studien zeigen keinen oder allenfalls einen schwachen Zusammenhang zwischen **HHCy** und niedriger BMD (15,150). Dieser Umstand ist jedoch nicht weiter verwunderlich, da die BMD, laut einer Studie von Herrmann et al., keine Informationen über den Knochenstoffwechsel oder die trabekuläre Mikroarchitektur liefert (56). Insgesamt trägt die BMD nur ungefähr 20 Prozent zur Prädiktion des Frakturrisikos bei (56). Im Gegensatz zu **HCy** zeigt die Datenlage im Bereich des B-Vitaminmangels einen Zusammenhang zwischen BMD und osteoporotischen Frakturen auf (15, 103,106,137). Melton et al. zeigten einen positiven Einfluss einer Cobalamin-Substitutionstherapie auf die BMD (103). In einem Zeitraum von zwei Jahren nahm die BMD in der Oberschenkelhalsregion um 79 Prozent zu. Darüber hinaus traten keine neuen Osteoporose-assoziierten Frakturen in der Untersuchungsgruppe in diesem Zeitraum auf.

Deutlich umfangreicher ist die Datenlage in Bezug auf biochemische Knochenmarker, die eine Art Echtzeit-Monitoring des Knochenstoffwechsels ermöglichen (11,32,56,106). Herrmann et al. konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen erhöhten **HCy**-Werten und dem Auftreten von hohen Desoxypyridinolin-Konzentrationen (DPD) im Urin, einem Marker für Knochenabbauvorgänge, zeigen (56). DPD ist für die Verknüpfung der

Kollagenfibrillen der Knochenmatrix verantwortlich. Darüber hinaus ist DPD ein ausschließlicher Bestandteil des gereiften Kollagengerüsts des Knochens sowie des Dentins. In der "Longitudinalen-Alterungs-Studie Amsterdam (LASA)" hingegen konnten die Ergebnisse von Herrmann et al. nur in Verbindung mit niedrigen Vitamin B₁₂-Spiegeln bestätigt werden (32). Der Zusammenhang zwischen B-Vitaminmangel und Markern des Knochenstoffwechsels wurde bis jetzt kaum untersucht (17). Einen ersten Anhaltspunkt in dieser Richtung liefert die ungefähr 20 Jahre alte Studie von Carmel et al (17). Hier zeigte sich eine Abnahme der alkalischen Phosphatase, einem Enzym der Osteoblasten, bei 12 Patienten mit niedrigen Cobalamin-Spiegeln ($3,89 \pm 2,19$ U/l gegenüber $7,55 \pm 3,99$ U/l). Darüber hinaus wiesen die Vitamin B₁₂-defizienten Probanden eine signifikant erniedrigte Osteocalzin-Konzentration im Serum auf ($1,11 \pm 0,77$ nmol/l gegenüber $1,84 \pm 0,49$ nmol/l). Erste experimentelle Studien weisen auf eine starke Stimulation der Osteoklasten-Aktivität durch **HCy** hin (60,86). Sowohl bei Herrmann et al. (ausdifferenzierte Osteoklasten menschlicher Probanden) als auch bei Koh et al. (Knochenmarkzellen von Mäusen) führten zunehmende **HCy**-Konzentrationen im Nährmedium zu einer gesteigerten Aktivität der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP) (Herrmann et al: 15 bis 42 Prozent; Koh et al: 150 Prozent) sowie zu einer Zunahme der Resorptionsaktivität der Osteoklasten auf Dentinscheiben. Ursächlich für die erhöhte Osteoklasten-Aktivität ist wahrscheinlich von **HCy** verursachter oxidativer Stress (86). Osteoblasten hingegen scheinen durch **HCy** nur eine milde Stimulation ihrer Aktivität zu erfahren (59). Experimentelle Daten bezüglich Knochenstoffwechsel und B-Vitaminmangel sind bisher nicht verfügbar.

2.6. Fragestellung

Aktuelle klinische Studien belegen einen starken Zusammenhang zwischen **HCy**-Plasmakonzentrationen und osteoporotischen Frakturen. Ob dieser Zusammenhang kausaler Natur ist oder nicht, wurde bislang nur unzureichend untersucht. Erste experimentelle Studien belegen eine starke Stimulation der Osteoklasten durch **HCy**, während Osteoblasten nur schwach beeinflusst werden. Da erhöhte **HCy**-Plasmakonzentrationen bei Erwachsenen überwiegend durch Mangel an Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆ verursacht sind, resultiert daraus die Vermutung, dass die häufigen Mangelzustände dieser Vitamine ebenfalls zu einer Osteoklasten-Stimulation durch erhöhte intrazelluläre **HCy**-Konzentrationen führen. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss abnehmender Konzentrationen von Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆ auf die Aktivität primärer humaner Osteoklasten systematisch in vitro zu untersuchen. Dabei wurden die drei Vitamine einzeln und in Kombination variiert. Als positiv-Kontrolle wurden Experimente mit zunehmender **HCy**-Konzentration durchgeführt.

3. Material und Methodik

3.1. Studiendesign

Von zehn gesunden, männlichen Versuchspersonen wurde je 100 ml venöses Blut in EDTA-Röhrchen (Sarstedt, Deutschland) entnommen. Die Probanden hatten ein Durchschnittsalter von 34 (\pm 5) Jahren, ein Durchschnittsgewicht von 81 (\pm 12) Kilogramm und eine Durchschnittskörpergröße von 181 (\pm 7) Zentimeter. Darüber hinaus waren die Blutwerte der Spender für Folsäure 9,5 (\pm 5,7) $\mu\text{g/l}$, Vitamin B₁₂ 372 (\pm 126) ng/l, Vitamin B₆ 15,3 (\pm 7,3) $\mu\text{g/l}$, **HCy** 10,3 (\pm 0,9) $\mu\text{mol/l}$ und Kreatinin 83,6 (\pm 4,8) $\mu\text{mol/l}$ im Normbereich. Keiner der Probanden nahm Medikamente oder Vitaminpräparate ein.

Tabelle 3: Charakterisierung der Probanden der mononukleären Blutzellen

Proband	Alter (Jahre)	Größe (cm)	Gewicht (kg)	Vit.B₆ ($\mu\text{g/l}$)	Vit.B₁₂ (ng/l)	Folsr. ($\mu\text{g/l}$)	HCy ($\mu\text{mol/l}$)	Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)
1	34	186	86	15	345	10,2	11,6	81
2	25	183	82	7,8	333	8,1	10,4	77
3	33	178	80	9,4	345	7,6	9,9	90
4	35	178	71	16,2	680	2,9	8,9	82
5	27	195	110	19,5	197	7,7	11,9	90
6	41	171	71	13,1	345	5,7	9,6	79
7	40	180	85	8,1	297	6,9	10,1	81
8	36	183	83	13,9	327	5,5	9,6	81
9	32	172	62	16,8	402	19,0	10,4	85
10	41	182	82	32,9	449	20,6	10,6	90
Mittelwert	34	180	81	15,2	372	9,5	10,3	83,6
SD	5	7	12	7,3	126	5,7	0,9	4,8

Das EDTA-Blut wurde benutzt, um daraus periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) zu isolieren. Diese PBMCs wurden unter Zusatz von Wachstumsfaktoren über 21 Tage kultiviert. Dabei differenzierten sich die in den

PBMCs enthaltenen Monozyten zu ausgereiften, voll funktionsfähigen Osteoklasten. Um den Einfluss von Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆ zu untersuchen, wurden die Zellen Nährmedien, welche verschiedene Vitamin-Konzentrationen enthielten, ausgesetzt. Als Positiv-Kontrolle und zur Bestätigung der bisher erschienen Arbeiten (siehe Kapitel 2.3.3.) wurden Zellen von drei Probanden in Gegenwart ansteigender **HCy**-Konzentrationen kultiviert (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Bedingungen Zellkulturen

Bedingung	Einzelversuche:			Kombinierter Mangel:			HCy
	FS	B6	B12	FS	B6	B12	
1	0	0	0	0	0	0	0
2	1	2	25	1	2	25	100
3	2,5	4	50	2,5	4	100	500
4	5	5	100	5	6	250	1000
5	100	35	250	15	30	500	2500
6			500				

FS – Folsäure (µg/l); B6 – Vitamin B₆ (µg/l); B12 – Vitamin B₁₂ (ng/l); **HCy** (µmol/l)

Nach drei Wochen Kulturdauer wurde die Osteoklasten-Aktivität durch die Messung der Resorptionsaktivität auf Dentinscheiben, der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase-Aktivität (TRAP) und der Cathepsin K-Aktivität quantifiziert. Diese Messverfahren erfassen drei unterschiedliche Aspekte der Osteoklasten-Funktion und liefern somit komplementäre Informationen.

3.2. Herstellung der Zellkulturen

Zur Herstellung einer Zellkultur mussten zunächst die PBMCs aus dem EDTA-Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation bei 250 G und einer Laufzeit von 25 Minuten isoliert werden. Zu diesem Zweck wurden sterile 50ml-Reaktionsgefäße (Sarstedt, Deutschland) mit 25 ml Ficoll-Paque™ Plus-Zuckerlösung (Amersham

Biosciences AB, Holland) gefüllt und anschließend mit EDTA-Vollblut langsam überschichtet. Nach Ende der Laufzeit lief die Zentrifuge ohne Bremse aus. Die PBMCs waren nach der Zentrifugation als weiße Schicht zwischen dem Plasma und der Ficoll-Lösung zu erkennen. Nach dem Gewinnen dieser Trennschicht wurden die Zellen zwei Mal mit Phosphat-gepuffertem Salin (PBS; PAA Laboratories GmbH, Österreich) gewaschen und bei 300 G für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit Trypan Blau 0,4% (Life Technologies, Island) im Verhältnis 1:1 angefärbt. Lebendige Zellen zeigten bei der Betrachtung im Durchlichtmikroskop keine Farbstoffaufnahme. Die Zählung der PBMCs erfolgte in einer Zählkammer nach Neubauer (Assistant, Deutschland). Anschließend wurde eine Zellsuspension von 3,25 Millionen Zellen/ml mittels α -Minimum Essentiellem Medium (α -MEM) (Gibco, Großbritannien), dem zuvor 10 Prozent fetales Kälberserum (FCS) (Gibco, Großbritannien), 100 IU/ml Penizillin (Amphotericin B, AmphoB, Gibco, Großbritannien) und 100 μ g/ml Streptomycin (Gibco, Großbritannien) zugefügt wurden, hergestellt. Das für die Versuche mit variierenden Vitaminkonzentrationen benutzte α -MEM war eine Sonderanfertigung, die frei von Folsäure, Vitamin B₆ und Vitamin B₁₂ (Biochrom, Deutschland) war. Die übrigen Bestandteile waren unverändert. Mittels dieser Spezialherstellung konnten die Vitaminkonzentrationen im Kulturmedium frei variiert werden. Den Nährmedien wurde Folsäure, Cyanocobalamin, Pyridoxin-Hydrochlorid und DL-Homocystein (alles von Sigma, Deutschland) entsprechend den in Tabelle 4 angegebenen Konzentrationen zugegeben. Für die Experimente, bei denen nur ein Vitamin variiert wurde, entsprachen die Konzentrationen der beiden anderen Vitamine denen des nicht-modifizierten α -MEM.

Um voll ausdifferenzierte Osteoklasten zu erhalten, wurden dem Kulturmedium 25 ng/ml rekombinanter humaner Makrophagen-Kolonie-Stimulationsfaktor (MCSF; R&D Systems, USA) von Tag 1 bis 4 beziehungsweise 10 ng/ml MCSF von Tag 5 bis 20 und ab Tag 4 20 ng/ml Rezeptor-Aktivator-von-NF- κ -B-Ligand (rhTRANS; R&D Systems, USA) beigefügt. Die Mediumwechsel erfolgen nach 4, 7, 12 und 17 Tagen. Bei den ersten beiden Wechseln wurde nur die Hälfte des Mediums ausgetauscht. Deshalb wurde dem Medium die doppelte Konzentration an

Wachstumsfaktoren zugegeben. Nach 21 Tagen zeigten sich die Osteoklasten als TRAP-positive, mehrkernige Riesenzellen (siehe Bild 2).

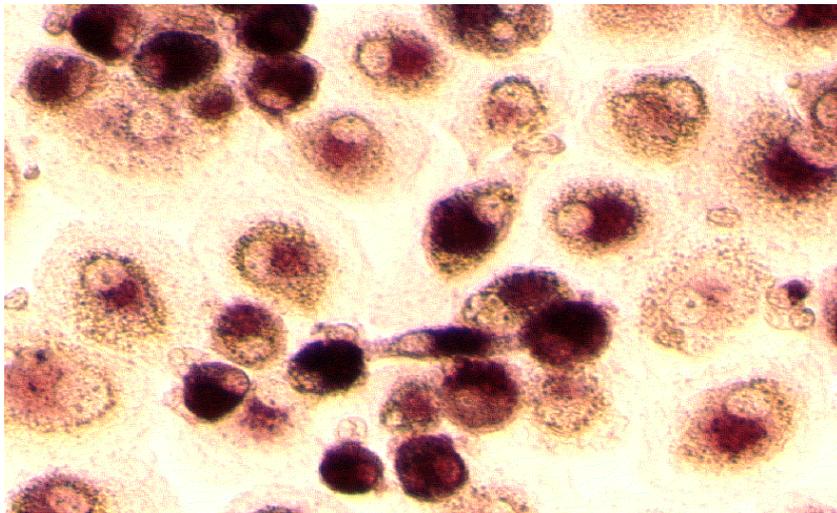


Bild 2: mehrkernige Osteoklasten

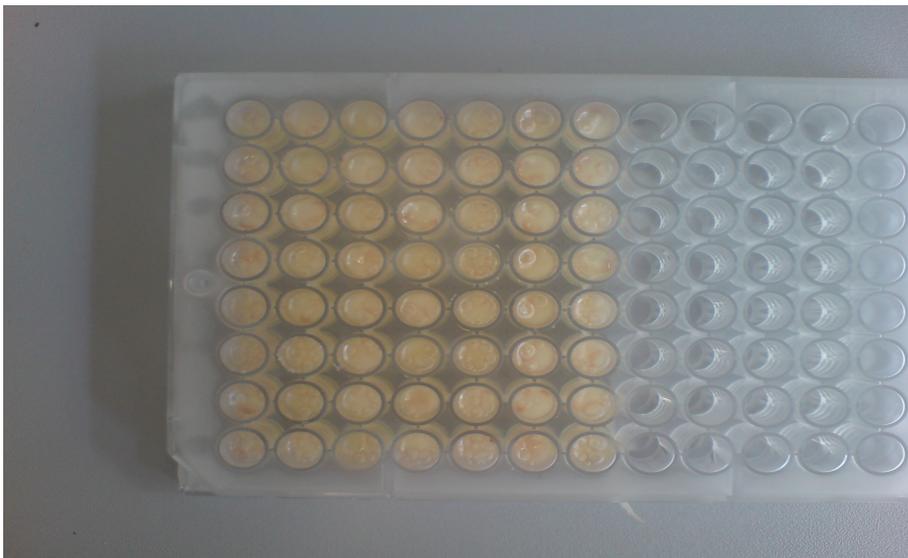


Bild 3: Zellkultur

3.3. Messung der Dentin-Resorptionsaktivität

Die Hauptfunktion von Osteoklasten im menschlichen Körper ist die Resorption von Knochen. In Zellkulturen konnte diese funktionelle Leistung durch die quantitative Analyse der Resorptionsaktivität von Osteoklasten auf standardisierten Dentinscheiben gemessen werden. Die dazu verwendeten Dentinscheiben hatten einen Durchmesser von 14 mm und eine Dicke von 0,7 mm. Aufgrund der Eigenart der Osteoklasten immer an den Rand der Kulturschale zu wandern, wiesen die Scheiben einen zwei Millimeter breiten und 0,7 mm hohen Randwall auf, der die Osteoklasten auf der Testfläche fixierte. Die zentrale, plane Vertiefung besaß eine Oberfläche von 0,785 cm². Die Kultur wurde in 24-Multiwell-Platten (Nunc, Dänemark) durchgeführt. In jede Vertiefung mussten 1,1 ml der oben beschriebenen Zellsuspension pipettiert werden, was einer Zelldichte von 1 Million Zellen/cm² entsprach. Bei einer Oberfläche von 3,5 cm² ergab sich somit eine Gesamtzahl von 3,5 Millionen Zellen pro Vertiefung. Aufgrund der manuellen, sehr zeitaufwendigen Analytik konnten für diesen Test nicht alle zehn Probanden herangezogen werden. Jede B-Vitamin- und **HCy**-Konzentration wurde mit Zellen von zwei Spendern getestet und vier mal wiederholt. Nach 21 Tagen wurde die Kultur beendet und das Nährmedium komplett entfernt. Anschließend wurden die Dentinscheiben für 30 Sekunden in 1 M Natriumhypochlorit-Lösung (PAA Laboratories GmbH, Österreich) gebadet, um sämtlich Zellreste zu entfernen. Da Natriumhypochlorit das Färbeverhalten beeinflusst, mussten die Scheiben vor der weiteren Bearbeitung drei Mal für jeweils 30 Sekunden in PBS gewaschen werden. Die Färbung erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden die Scheiben für zwei Minuten in einer 0,001 prozentigen Toluidin Blau-Lösung (Sigma Aldrich, Deutschland) gebadet (Grundfärbung). Nach dreimaligem Waschen wurde dieser Vorgang mit 0,01 prozentiger Toluidin Blau-Lösung für 30 Sekunden wiederholt. Die Scheiben wurden anschließend drei mal mit PBS gewaschen und mit einem weichen Tuch trocken gerieben. Dadurch konnten Färbeartefakte auf ein Minimum reduziert werden. Nach dem Trocknen wurden die erodierten, gefärbten Resorptionslakunen histomorphometrisch unter einem Lichtmikroskop (Zeiss Axiovert 40CFL; Carl Zeiss GmbH, Deutschland) bei zehnfacher Vergrößerung

untersucht. Die Auswertung erfolgte auf einem mit Axiovision 4.4 Software ausgerüsteten Computer. Die Resorptionslakunen mussten aufgrund der unvermeidbaren Hintergrundfärbung und der nicht vollständig entfernbaren Färbeartefakte einzeln per Hand markiert werden. Da sich hieraus die Gefahr der subjektiven Verfälschung ergab, wurden die Dentinscheiben vor der Auswertung verblindet. Das Messprogramm errechnete die Anzahl aller Pixel in den markierten Resorptionslakunen. Aufgrund der Standardisierung des Innendurchmessers der Scheiben waren die erodierten Flächen direkt miteinander vergleichbar.



Bild 4: Axiovert 40CFI und Axiovision 4.4

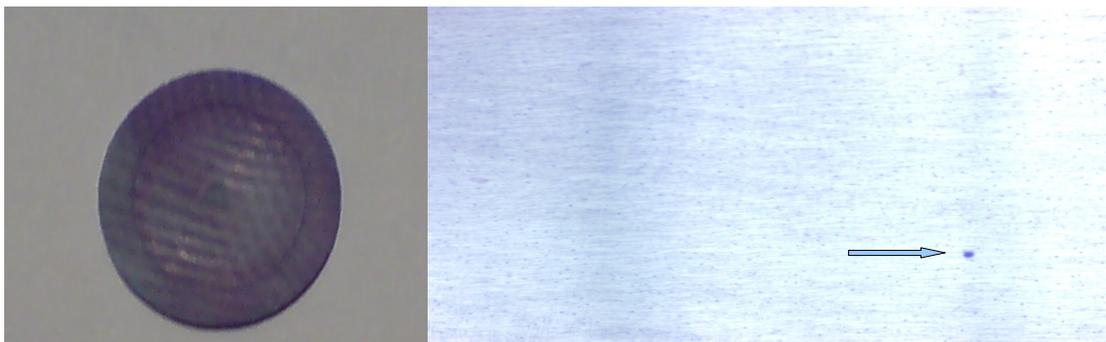
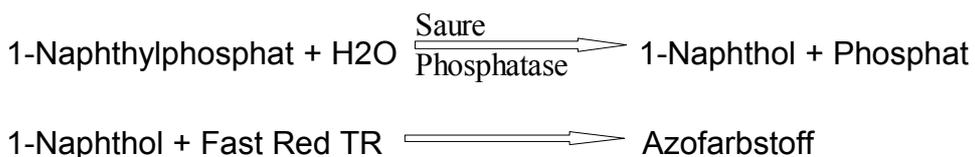


Bild 5: links: Gefärbte Dentinscheibe; rechts: Resorptionslakune 10x vergrößert

3.4. Messung der TRAP-Aktivität

Um die Ergebnisse der Resorptionsaktivität zu bestätigen erfolgte die Messung der TRAP-Aktivität, einem Osteoklasten-spezifischen biochemischen Aktivitätsmarker. Dafür wurden die Zellen in 96-Multiwell Platten (Nunc, Dänemark) kultiviert. In jede Vertiefung wurden 200 µl der oben genannten Zellsuspension eingefüllt. Daraus ergab sich eine Zellkonzentration von 650000 Zellen pro Vertiefung, was einer Zelldichte von 1 Million Zellen/cm² entspricht. Jede B-Vitaminmangelbedingung wurde mit den Zellen aller zehn Probanden und acht Wiederholungen pro Proband durchgeführt. Die **HCy**-Versuche erfolgten mit Zellen von drei Probanden und acht Wiederholungen pro Bedingung. Die TRAP-Aktivität wurde mit dem saure Phosphatase-Assay der Firma Roche (ACP, Roche Diagnostics, Deutschland) quantitativ analysiert, welches an die speziellen Gegebenheiten der 96-Multiwell Platte angepasst wurde. Hierfür wurde zunächst das Nährmedium vollständig entfernt und die Zellen mittels Azeton und Ethanol 99% (1:1) für 60 Sekunden fixiert. Die fixierten Zellen wurden anschließend für zehn Minuten getrocknet. Nachfolgend wurden 100 µl chromogene Substratlösung in jede Vertiefung pipettiert. Das chromogene Substrat bestand aus Natriumtartrat und 2-Amino-5-Chlortoluol (Fast Red TR) und wird durch TRAP nach folgender Reaktionsgleichung in einen stabilen Azofarbstoff umgewandelt:



Der Azofarbstoff färbt die Lösung rot-braun. Diese Farbreaktion kann in einem Photometer (Polarstar, BMG Labtech, Deutschland) mittels Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen werden. Die Messungen erfolgten nach 0, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 und 25 Minuten. Die lineare Phase der Reaktion lag zwischen der 10. und 20. Minute. Bei jedem Versuch wurde jeweils eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle mit gemessen.

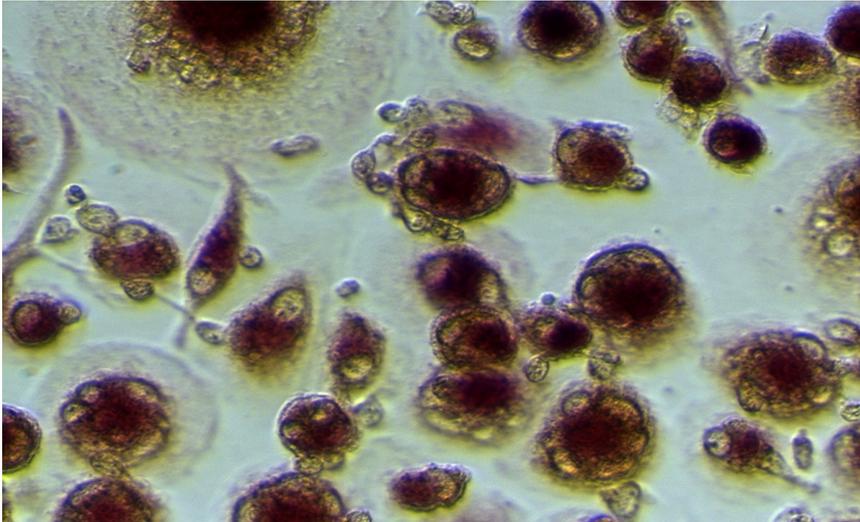


Bild 6: TRAP-positive Osteoklasten

3.5. Messung der Cathepsin K-Aktivität

Um die Ergebnisse weiter abzusichern, erfolgt die Messung von Cathepsin K, einem Enzym das von Osteoklasten zur Verdauung der organischen Knochenmatrix sezerniert wird. Die Herstellung der Zellkulturen erfolgte analog zu den Kulturen der TRAP-Analyse. Aus finanziellen Gründen musste die Cathepsin K-Analyse auf drei Probanden (Vitaminversuche) beziehungsweise zwei Probanden (**HCy**-Versuche) limitiert werden. Die Cathepsin K-Aktivität wurde mit einem enzymatischen Fluoreszenz-Assay (Biovision, USA) durchgeführt. Das Prinzip dieses Messverfahrens ist die Spaltung von Amino-4-Trifluormethyl Coumarin (AFC), welches als Z-Leuzin-Arginin-Substrat bezeichnet wird. Dieses ist das bevorzugte Substrat von Cathepsin K. Das gespaltene AFC wurde quantitativ mit einem Fluormeter bei einer Exzitationswellenlänge von 400 nm und einer Emissionswellenlänge von 505 nm gemessen. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei 37°C.

3.6. Messung des HCys im Überstand

Da B-Vitaminmangel in vivo zu einer moderaten Erhöhung der **HCy**-Konzentration führt, wurde die **HCy**-Konzentration im Überstand der einzelnen Zellkulturen gemessen. Diese Messung wurde mittels einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) auf einem Agilent-HPLC 1100-Serie (Agilent, Deutschland) durchgeführt. Die Methode basiert auf einer Trennung der Probe in einem isokratischen Verfahren auf einer „reversed phase“ Säule (Protonsil, Bischoff, Deutschland) mit Fluoreszenz-Detektion. Hierbei wird das **HCy** reduziert und anschließend derivatisiert. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Kits (Immundiagnosics, Deutschland). Der Variationskoeffizient für die Präzision in der Serie betrug 5,9 Prozent.

Vor der eigentlichen Messung war eine Probenvorbereitung erforderlich. Dazu wurden zunächst jeweils 150 µl Kalibrator, Kontrolle und Probenmaterial mit 100 µl Interner Standard (IS) gemischt. Dieser Mischung wurde anschließend 20 µl Reduktionslösung zugegeben, gemischt und für zehn Minuten bei 4°C inkubiert. Nun wurde den einzelnen Ansätzen 100 µl Fällungsreagenz zugefügt und zehn Minuten bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung der Proteine wurden die einzelnen Ansätze anschließend bei 1500 G zentrifugiert. Je 100 µl vom Überstand der einzelnen Ansätze wurden mit 200 µl Reaktionspuffer und 100 µl Derivatisierungslösung vermischt und für 20 Minuten bei 60°C inkubiert. Die so vorbereiteten Proben wurden nun in die HPLC-Analytik eingesetzt. Die Messung erfolgte bei einer Flussrate von 1,2 ml/min und einer Säulentemperatur von 35°C. Der Fluoreszenzdetektor war auf 385 nm Extinktion und 515 nm Emission eingestellt. Die Laufzeit betrug 14 Minuten bei einer Retentionszeit für **HCy** von 4,5 Minuten und 10,6 Minuten für IS. Die Konzentrationen der einzelnen Analyten errechneten sich nach der Formel:

$$\text{Konz. Probe} = F \times (\text{Peakhöhe Probe} \times \text{Konz. Kalibrator}) / (\text{Peakhöhe IS Probe})$$

$$F = (\text{Peakhöhe IS Kalibratorprobe}) / (\text{Peakhöhe Reinsubstanz in Kalibratorprobe})$$

F = Faktor; Konz. = Konzentration

3.7. Statistische Analyse

Die Ergebnisse der deskriptiven Statistik sind als Mittelwerte (SD) angegeben. Die Resultate der verschiedenen Versuche wurden mittels One-Way ANOVA und anschließendem LSD post-hoc Test verglichen. Die Einzelwerte eines jeden Experiments sind als Prozente des Mittelwerts der Ergebnisse bei maximaler Vitaminkonzentration beziehungsweise minimaler **HCy**-Konzentration wiedergegeben. Dadurch konnten die Ergebnisse aller Probanden zusammengefasst und miteinander verglichen werden, was der statistischen Analytik eine wesentlich höhere Aussagekraft verleiht. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant angesehen. Die statistische Analyse wurde mit dem Softwarepaket SPSS 11.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt.

4. Ergebnisse

Nach einer Kulturzeit von 20 Tagen waren die meisten PBMCs in voll ausdifferenzierte Osteoklasten transformiert. Zellen wurden nur als Osteoklasten charakterisiert, wenn sie folgende Kriterien erfüllten:

- (a) große, multinukleäre Zellen mit mehr als drei Zellkernen
- (b) TRAP+ (rot-braune Färbung).

4.1. Dentin-Resorptionsaktivität

Unbehandelte Dentinscheiben weisen eine sehr homogene Oberfläche auf. Osteoklasten lösen diese Oberfläche mit Hilfe von Säure und Enzymen auf. Dies führt zur Bildung von Resorptionslakunen. Nach der Färbung mit Toluidin können die Resorptionslakunen aufgrund ihrer blauen Farbe leicht erkannt werden. Der kombinierte Mangel von Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆ zeigte eine starke Zunahme der erodierten Flächen (siehe Abbildung 4). Ähnliche Ergebnisse konnten bei ansteigenden **HCy**-Konzentrationen im Kulturmedium beobachtet werden (siehe Abbildung 4). Im Vergleich zu physiologischen Konzentrationen führte ein kombinierter Vitaminmangel von Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆ beziehungsweise das vollständige fehlen aller drei Vitamine zu einer Zunahme der Resorptionsaktivität um bis zu 211 Prozent (siehe Abbildung 4). Vergleichbare Effekte konnten bei der Reduktion von nur einem Vitamin beobachtet werden (Abbildung 5). Hier betrug die mittlere Zunahme maximal ungefähr 250 Prozent gegenüber der Kontrolle. Die stärkste Zunahme der Resorptionsaktivität überhaupt zeigte sich mit 395 Prozent bei einer **HCy**-Konzentration von 2500 µmol/l (siehe Abbildung 4).

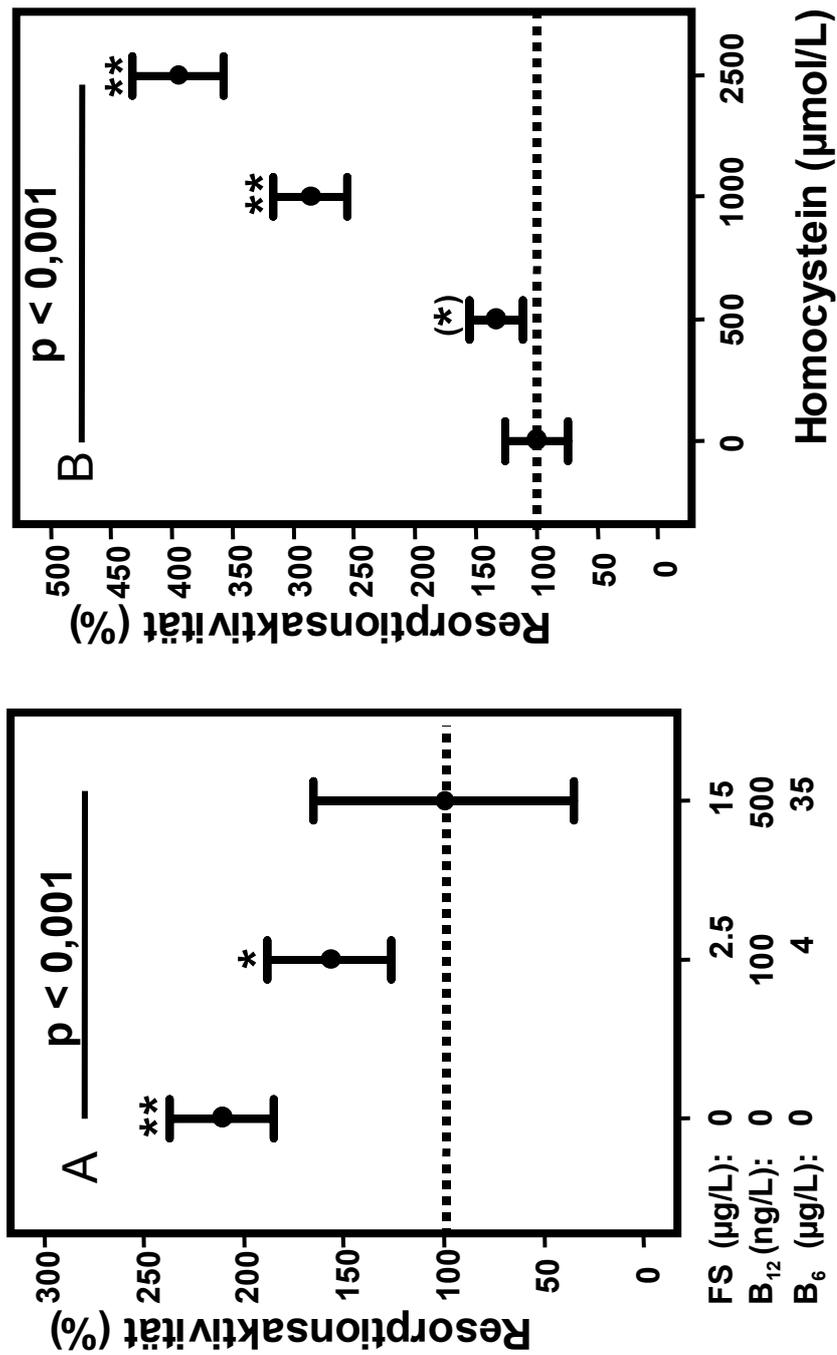


Abbildung 4: Resorptionsaktivität primärer humaner Osteoklasten bei abnehmenden Konzentrationen von Vitamin B₁₂, Vitamin B₆ und Folsäure (Plot A) beziehungsweise steigenden **HCy**-Konzentrationen (Plot B)

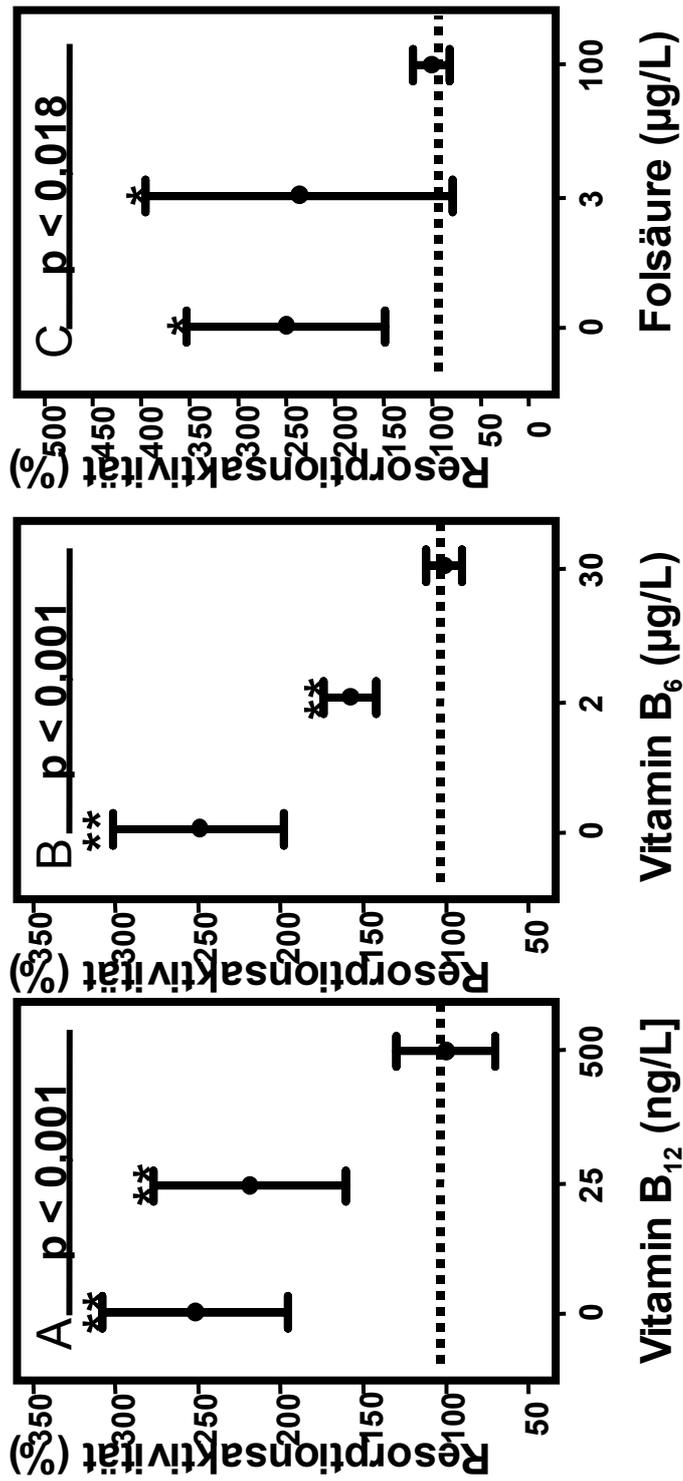
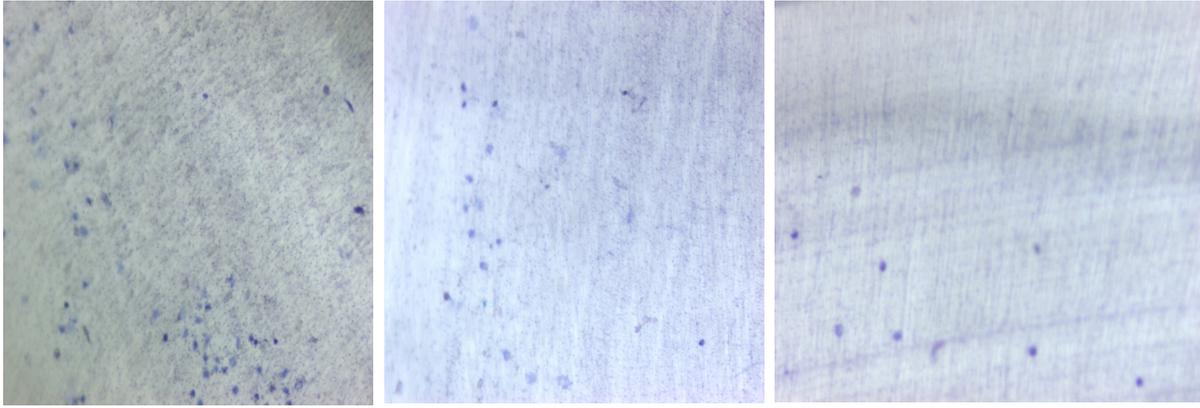


Abbildung 5: Resorptionsaktivität primärer humaner Osteoklasten bei abnehmenden Konzentrationen von Vitamin B₁₂ (Plot A), Vitamin B₆ (Plot B) und Folsäure (Plot C)



Folsäure:	0	2,5	15
Vitamin B₁₂:	0	100	500
Vitamin B₆:	0	4	35

Abbildung 6: Resorptionslakunen primärer humaner Osteoklasten bei kombiniertem Vitaminmangel

4.2. TRAP-Aktivität

Die absolute TRAP-Aktivität wies erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden auf. Diese lassen sich auf individuelle Unterschiede im Zellwachstum zurückführen. Der Mittelwert der Absorptionsveränderung zwischen der 10. und 20. Minute schwankten zwischen 0,049 und 0,166 optische Dichte (OD) in Kulturen mit physiologischen Konzentrationen von Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆ im Kulturmedium. Mit der oben beschriebenen Berechnung von Prozentwerten konnten die Resultate aller Probanden zusammengefasst und miteinander verglichen werden (zehn Probanden x acht Wiederholungen, n= 80). Die TRAP-Aktivität stieg konzentrationsabhängig bei Vitaminkonzentrationen unterhalb des physiologischen Niveaus signifikant an (siehe Abbildung 7). Eine Kombination aus 1 µg/l Folsäure, 25 ng/l Vitamin B12 und 2 µg/l Vitamin B6 führte zu einem Anstieg der TRAP-Aktivität um 13 Prozent (p = 0,009). Das vollständige fehlen der drei getesteten Vitamine ergab eine Zunahme um 24 Prozent

gegenüber den Kontrollkulturen ($p < 0,001$). Ähnliche Ergebnisse konnten auch bei alleinigem Mangel von Folsäure beobachtet werden (Abbildung 8). Unterhalb des für Menschen angegebenen Referenzwertes für Folsäure im Blut von $5 \mu\text{g/l}$ zeigte die TRAP-Aktivität einen Anstieg um bis zu 33 Prozent gegenüber den Kontrollkulturen. Bei alleinigem Mangel von Vitamin B_{12} beziehungsweise Vitamin B_6 führte ein vollständiges Fehlen zu einer Steigerung der TRAP-Aktivität um bis zu 170 Prozent (siehe Abbildung 8).

Erhöhte **HCy**-Werte im Kulturmedium führten ebenfalls zu einer Aktivitätssteigerung der TRAP ($p < 0,001$) (siehe Abbildung 7). Eine **HCy**-Konzentration von $1000 \mu\text{mol/l}$ erhöhte die TRAP-Aktivität um 30 Prozent gegenüber der Kontrolle ($p < 0,001$). Eine Konzentration von $2500 \mu\text{mol/l}$ **HCy** ergab sogar eine Steigerung um 50 Prozent ($p < 0,001$).

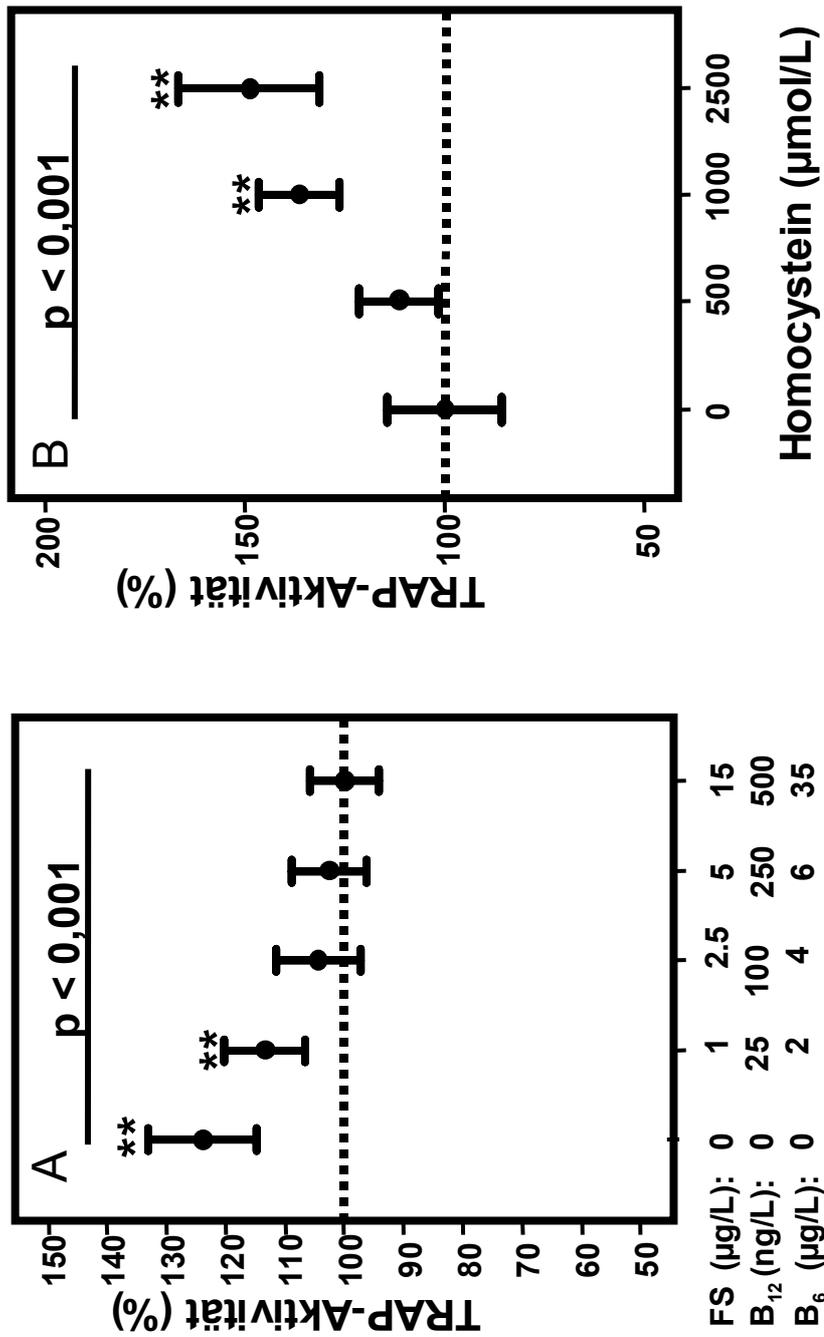


Abbildung 7: TRAP-Aktivität primärer humaner Osteoklasten bei abnehmenden Konzentrationen von Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆ (Plot A) beziehungsweise ansteigenden HCy-Konzentrationen (Plot B)

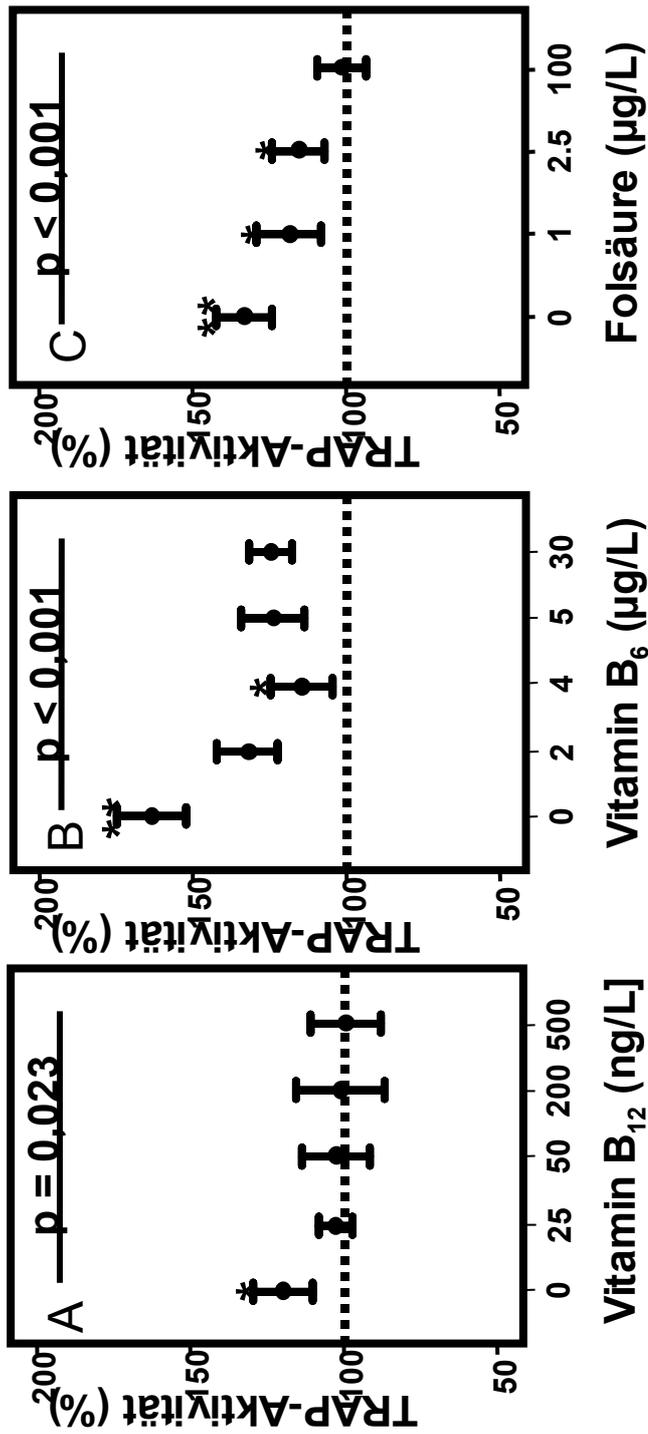


Abbildung 8: TRAP-Aktivität primärer humaner Osteoklasten bei absteigenden Konzentrationen von Vitamin B₁₂ (Plot A), Vitamin B₆ (Plot B) oder Folsäure (Plot C)

4.3. Cathepsin K-Aktivität

Vergleichbar zur TRAP-Aktivität zeigte auch die Cathepsin K-Aktivität erhebliche interindividuelle Schwankungen. Der Mittelwert der Fluoreszenz in Kulturen mit physiologischen Konzentrationen der drei Vitamine Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆ bewegte sich in einem Messbereich zwischen 42629 und 63256 relativer Fluoreszenzeinheiten (RFU). Die Messergebnisse der einzelnen Kulturen wurden deshalb wiederum als Prozentsatz der jeweiligen Kontrollen angegeben, was das Zusammenfassen aller Versuche ermöglichte (drei Probanden x acht Wiederholungen, n = 24).

In Zellkulturen mit kombiniertem Mangel von Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆ zeigte sich ein Anstieg der Cathepsin K-Aktivität bei vollständigem Fehlen der Vitamine um 23 Prozent gegenüber der Kontrolle ($p < 0,001$) (siehe Abbildung 9). Ein alleiniger Mangel von Folsäure, Vitamin B₁₂ oder Vitamin B₆ konnte im Gegensatz zu den TRAP-Experimenten und der Dentin-Resorptionsaktivität keine Steigerung der Cathepsin K-Aktivität induzieren (siehe Abbildung 10). Einzig in vollständiger Abwesenheit von Vitamin B₆ zeigte sich ein Anstieg der Cathepsin K-Aktivität um lediglich sieben Prozent (siehe Abbildung 10). **HCy** hingegen verursachte einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Cathepsin K-Aktivität (siehe Abbildung 9). Bei 500 $\mu\text{mol/l}$ **HCy** im Kulturmedium konnte ein Aktivitätsanstieg um 17 Prozent gegenüber den Kontrollen ohne **HCy** im Nährmedium beobachtet werden ($p < 0,001$). Bei 1000 $\mu\text{mol/l}$ **HCy** betrug die Aktivitätssteigerung 31 Prozent beziehungsweise 50 Prozent bei 2500 $\mu\text{mol/l}$ **HCy** ($p < 0,001$). Jede getestete **HCy**-Konzentration wies einen signifikanten Unterschied gegenüber den beiden anderen Testbedingungen auf.

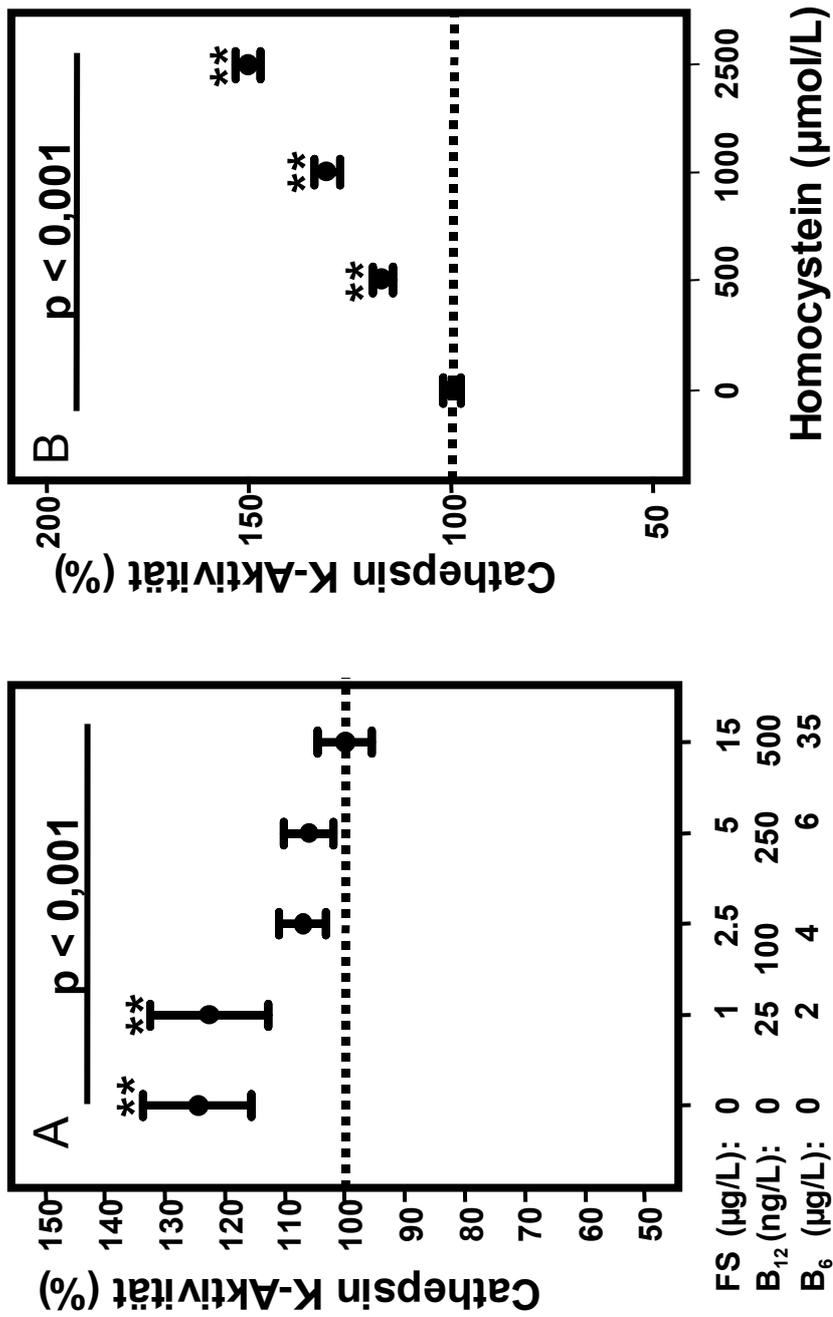


Abbildung 9: Cathepsin K-Aktivität primärer humaner Osteoklasten bei absteigenden Konzentrationen von Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆ (Plot A) beziehungsweise steigenden HCy-Konzentrationen (Plot B)

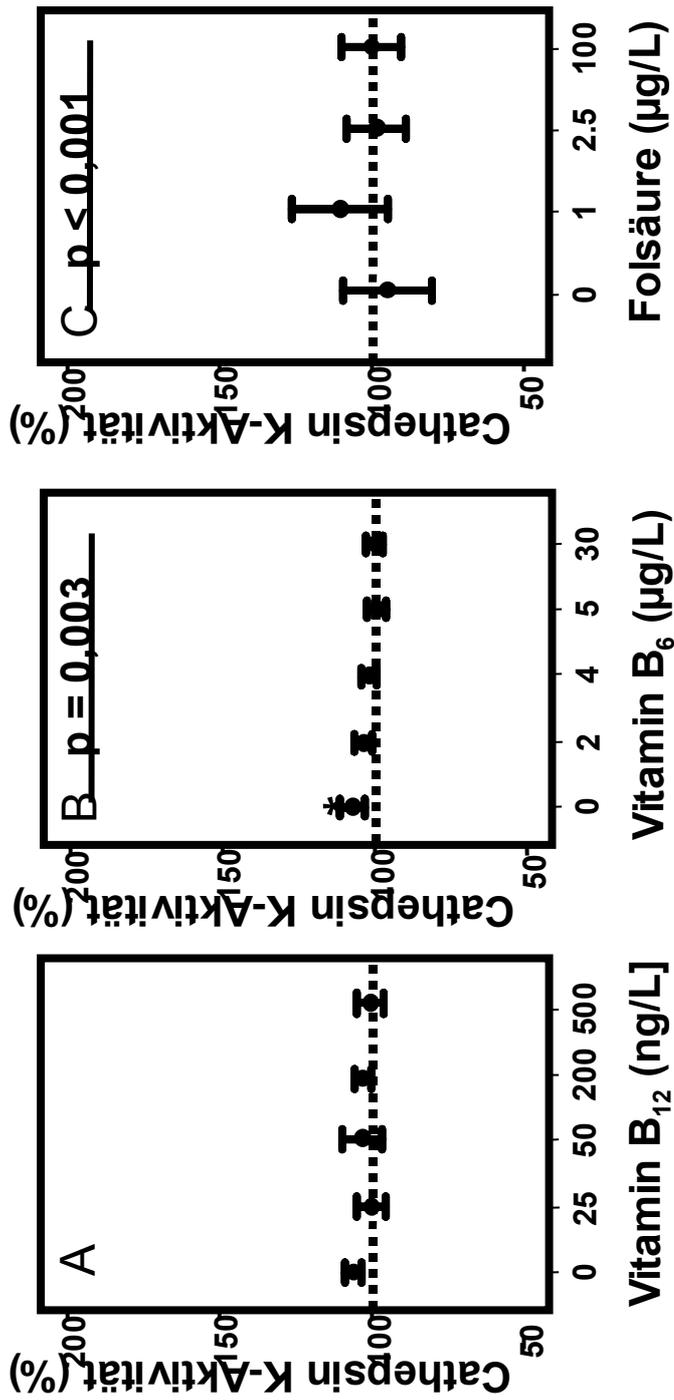


Abbildung 10: Cathepsin K-Aktivität primärer humaner Osteoklasten bei absteigenden Konzentrationen von Vitamin B₁₂ (Plot A), Vitamin B₆ (Plot B) oder Folsäure (Plot C)

4.4. H_{Cy}-Konzentration im Überstand

Abnehmende Konzentrationen von Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆ führte zu einer signifikanten Erhöhung der **H_{Cy}**-Konzentration im Kulturmedium gegenüber den Kontrollen ($p < 0,01$) (siehe Abbildung 11). Bei absolutem Vitaminmangel betrug der Mittelwert $4,57 (\pm 0,37) \mu\text{mol/l}$. Dies entspricht einer Steigerung der Konzentration von ungefähr 20 Prozent gegenüber der Kontrolle mit $3,79 (\pm 0,45) \mu\text{mol/l}$. Bei einer Konzentration von $1 \mu\text{g/l}$ Folsäure, 25 ng/l Vitamin B₁₂ und $2 \mu\text{g/l}$ Vitamin B₆ betrug der Unterschied allerdings nur noch sieben Prozent ($4,01 \pm 0,46 \mu\text{mol/l H_{Cy}}$). Darüber hinaus konnte im Bereich von supraphysiologischen Vitaminkonzentrationen (Folsäure $100 \mu\text{g/l}$, Vitamin B₁₂ 750 ng/l , Vitamin B₆ $100 \mu\text{g/l}$) ein deutlicher, signifikanter Abfall der **H_{Cy}**-Konzentration um 15 Prozent ($3,2 \pm 0,32 \mu\text{mol/l}$) ($p < 0,01$) beobachtet werden.

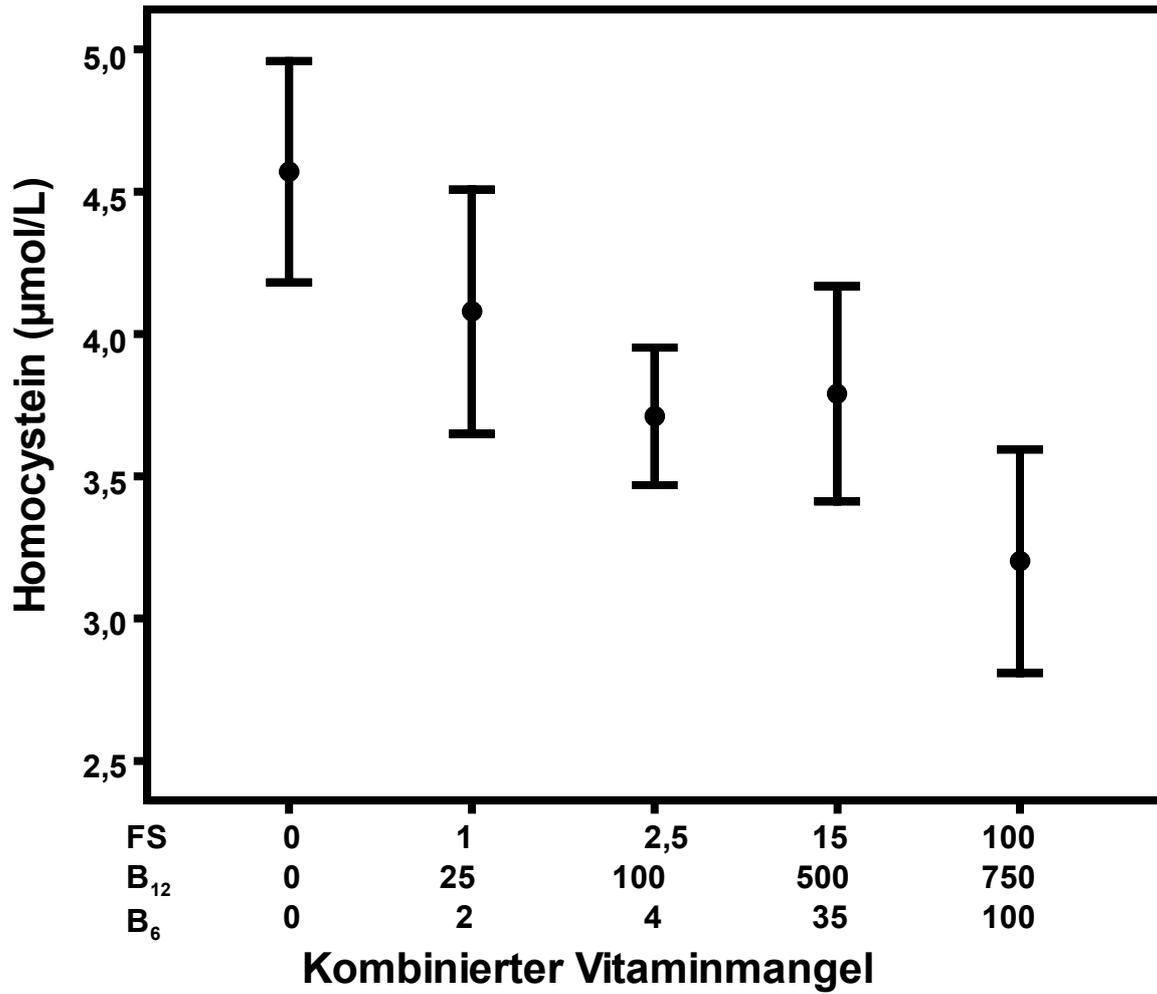


Abbildung 11: HCy-Konzentrationen im Überstand der Zellkulturen kultivierter Osteoklasten unter abnehmenden Konzentrationen von Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆

5. Diskussion

Das Hauptergebnis dieser Arbeit ist der Nachweis eines signifikanten Anstiegs der Aktivität humaner Osteoklasten in Gegenwart fallender Konzentrationen von Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆. Der kombinierte Mangel dieser drei Vitamine führte zu einer Steigerung der Dentin-Resorptionsleistung, der TRAP- und der Cathepsin K-Aktivität. Die Abnahme der Vitaminkonzentration ging mit einer Zunahme der **HCy**-Konzentration im Überstand einher. Darüber hinaus induzierte die Zugabe von **HCy** zum Nährmedium ebenfalls eine Stimulation der Osteoklasten-Aktivität. Diese Befunde unterstützen die in der Aufgabenstellung formulierte Hypothese, dass abnehmende B-Vitaminkonzentrationen primäre humane Osteoklasten durch eine Akkumulation von **HCy** stimulieren.

Erhöhte **HCy**-Konzentrationen im Blut sind bei Erwachsenen im höheren Lebensalter häufig anzutreffen und in der Lage, die Aktivität humaner Osteoklasten zu steigern (60,127). Die häufigste Ursache für **HHCy** im Erwachsenenalter ist ein Mangel an B-Vitaminen. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine Steigerung der Aktivität primärer humaner Osteoklasten aufgrund von B-Vitaminmangel verbunden mit einer Akkumulation von **HCy** im Kulturmedium gezeigt werden. Bei der Analyse der Osteoklasten-Aktivität ist die Wahl der geeigneten Parameter zur Quantifizierung der Aktivität von besonderer Wichtigkeit. Osteoklasten lösen die Knochenoberfläche mittels Säure und proteolytischem Verdau auf (67,86,95). Dieser Metabolismus führt zur Bildung von Resorptionslakunen. Diese Resorptionslakunen wurden in dem Dentin-Resorptionsassay nachgewiesen. Sie repräsentieren damit einen direkten Nachweis der Osteoklasten-Aktivität. Aufgrund der Verblindung der einzelnen Dentinscheiben, der guten Standardisierung der Auswertung (siehe Kapitel 3.7.) und der guten Reproduzierbarkeit der einzelnen Experimente besitzt diese Messmethode eine hohe Aussagekraft. Um die Ergebnisse des Resorptionsassays zu bestätigen, wurden zusätzlich noch die zelluläre TRAP- und Cathepsin K-Aktivität bestimmt. Die TRAP ist an der intrazellulären Verdauung der

Abbauprodukte der organischen Knochenmatrix in den Osteoklasten beteiligt (113,147,148). Zahlreiche Studien identifizierten die TRAP als spezifischen und sensitiven zytochemischen Indikator für die Resorption von Knochengewebe (24, 51,52,74). Als intrazelluläres Enzym stellt die TRAP allerdings nur einen indirekten Marker der Knochenresorption dar (113,147,148). Ebenso ist die TRAP im Serum kein spezifischer Parameter für den Knochenstoffwechsel, da sie auch in Erythrozyten und Thrombozyten nachgewiesen werden kann (61). Chu et al konnten in ihrer Studie einen signifikanten Anstieg der TRAP im Serum von Dialysepatienten mit osteoporotischen Krankheitsbildern gegenüber der Kontrollgruppe zeigen ($11,97 \pm 8,92$ U/l gegenüber $3,25 \pm 0,59$ U/l) (24). Die Knochenresorption durch Osteoklasten erfolgt hauptsächlich durch saure (anorganische Matrix) und lysosomale Proteasen (organische Matrix), welche in den Spalt zwischen der apikalen „ruffled border“ (sägezahnartige Ausstülpungen der Zellmembran von Osteoklasten) und der extrazellulären Knochenmatrix sezerniert werden (Resorptionslakune). Cathepsin K stellt eine der wichtigsten Proteasen dar, die an diesem Verdauungsprozess beteiligt ist (113,147,148).

Die Aussagekraft dieser Arbeit beruht auf der systematischen Methodik, der hohen Anzahl an Wiederholungen für jede einzelne Testbedingung (zum Beispiel für die TRAP-Messung: $n = 80$; zehn Probanden x acht Wiederholungen) und die gute Standardisierung der verwendeten Messmethoden.

Ein Mangel an Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆ im Nährmedium sowie steigende Konzentrationen von **HCy** führten gleichermaßen zu einem Anstieg aller drei oben genannter Marker der Osteoklasten-Aktivität. Die stärkste Steigerung der Dentin-Resorptionsaktivität zeigte sich bei einer **HCy**-Konzentration von 2500 µmol/l im Nährmedium. Die Aktivitätssteigerung betrug 395 Prozent gegenüber der Kontrolle ohne **HCy**. Diese sehr hohen Messwerte lassen sich durch die extrem hohen **HCy**-Konzentrationen im Nährmedium erklären, wohingegen die **HCy**-Konzentration im Überstand der Vitaminmangelversuche sich im Bereich von 4 bis 5 µmol/l bewegten. Entscheidender Parameter für die Osteoklasten-Aktivität ist allerdings nicht die extrazelluläre, sondern die intrazelluläre **HCy**-Konzentration. Da diese weder in den Vitaminmangel- noch in den **HCy**-

Experimenten bestimmt wurde, könne diese Werte nicht statistisch miteinander in Relation gesetzt werden. Dieser konzentrationsabhängige Anstieg unterstreicht die Rolle des **HCy** als sehr potenten Stimulator der Osteoklasten-Aktivität (11,60, 86). Der kombinierte Mangel von Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆ führte ebenfalls zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Resorptionsaktivität der Osteoklasten. Dieser betrug bis zu 211 Prozent. Vergleichbar zu den **HCy**-Experimenten konnten die Messung der TRAP- und Cathepsin K-Aktivität die Ergebnisse der Resorptionsaktivität bestätigen, was auf die Rolle des erniedrigten B-Vitaminstatus als einen potenten Stimulator der Osteoklasten-Aktivität schließen lässt. Die Reduktion nur eines der drei B-Vitamine führte nicht zu vergleichbar homogenen Daten. Die Einzelversuche mit Folsäure, Vitamin B₁₂ beziehungsweise Vitamin B₆ zeigten alle einen konstanten, signifikanten Anstieg der Dentin-Resorptionsleistung der Osteoklasten. Dieser Effekt konnte im Bezug auf die TRAP-Messergebnisse nur für Folsäure bestätigt werden (33 Prozent bei 0 µg/l beziehungsweise 25 Prozent bei 1 µg/l Folsäure). Die Cathepsin K-Aktivität zeigte jedoch keinen entsprechenden Anstieg. Bei Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆ ergab die TRAP-Aktivität nur in völliger Abwesenheit dieser Vitamine eine signifikante Zunahme gegenüber der Kontrollbedingung (170 Prozent). Wie bei Folsäure konnte auch für abnehmende Vitamin B₁₂- beziehungsweise Vitamin B₆-Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede der Cathepsin K-Aktivität zwischen den einzelnen Messbedingungen beobachtet werden. Bei genauerer Betrachtung des **HCy**-Stoffwechsels sind diese Resultate jedoch durchaus plausibel. Ein alleiniger Mangel von Folsäure oder Vitamin B₁₂ kann durch eine gesteigerte Transsulfurierung durch die Vitamin B₆-abhängigen Enzyme CBS und CS kompensiert werden. Eine Messung der Konzentrationen von Cystein und α-Ketobutyrat im Überstand der jeweiligen Zellkulturen hätte diesen Sachverhalt belegen können. Diese erfolgten allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht. Ebenso kann ein Mangel an Vitamin B₆ durch vermehrte Remethylierung der Folsäure- und Vitamin B₁₂-abhängigen MS ausgeglichen werden. Eine erhöhte Cystathionin-Konzentration im Überstand der Zellkulturen wären ein Indiz für diese Hypothese. Dieser potentielle Anstieg ist durch die geringere Abhängigkeit der CBS im Vergleich zur CS von Vitamin B₆ zu erklären. Darüber hinaus ist **HCy**

ein intrazellulärer Metabolit aller Zellen im menschlichen Organismus. Ebenso ist die **HCy**-Konzentration im Serum abhängig von der Exkretionsleistung der Zellen. Die limitierte Zellzahl in der Kultur reichte somit nicht aus, um einen messbaren starken Anstieg der **HCy**-Konzentration in den Überständen der Einzelversuchen zu verursachen. Die **HHCy** stellt ein sich über Jahre bis Jahrzehnte entwickelndes Krankheitsbild dar. Aufgrund der Kürze der Intervalle zwischen den Mediumwechseln unter den artifiziellen Bedingungen der Zellkultur war ein deutlicherer Anstieg der **HCy**-Konzentration im Kulturmedium nicht möglich.

Ein Vergleich der in dieser Arbeit erhobenen Messdaten mit anderen Studien ist schwierig, da es nur wenige experimentelle Untersuchungen im Bezug auf B-Vitaminmangel in Verbindung mit der Osteoklasten-Aktivität gibt. In einer tierexperimentellen Arbeit wiesen Masse et al. im Jahre 2003 ein verstärktes Auftreten von reduzierbaren Dehydro-Dihydroxylysinonorleuzin- (DHLNL) und ebenso reduzierbaren Dehydro-Hydroxylysinonorleuzin-Crosslinks (HLNL) und Kollagen in der Tibia von Hühnern mit Vitamin B₆-Mangel nach (98). Dies deutet auf eine gesteigerte Knochenresorption hin. Die gemessenen Kollagenwerte waren in der Untersuchungsgruppe gegenüber der Kontrolle um das doppelte erhöht (20 ± 2 Prozent gegenüber 10 ± 3 Prozent der Kontrollgruppe; $p < 0,001$). Die Messwerte für DHLNL zeigten eine signifikante Steigerung gegenüber der Kontrollgruppe auf ($1,03 \pm 0,07$ U/L vs $0,84 \pm 0,13$ U/l). Darüber hinaus war die Knochenfestigkeit der Hühner mit Vitamin B₆-Mangel ebenfalls erniedrigt. In einer weiteren tierexperimentellen Studie zeigten Dodds et al. eine Störung der Frakturheilung bei Vitamin B₆-deffizienten Ratten (33). Dieser Effekt wurde durch eine Abnahme der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase-Aktivität erklärt. Der dadurch entstandene Mangel an Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) führte zu einer erhöhten Konzentration von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS). Ein schädlicher Einfluss von oxidativem Stress auf die Knochenintegrität konnte in mehreren klinischen (5,92,110) und experimentellen (4,46,107) Studien nachgewiesen werden. Die Studie von Dodds et al. bezieht sich zwar nicht direkt

auf Osteoporose oder osteoporotische Frakturen, zeigt aber einen möglichen Wirkmechanismus des **HCys** auf.

Während tierexperimentelle Studien derzeit noch rar sind, werden die Resultate der vorliegenden Arbeit durch mehrere humane Studien gestärkt (32,62,129,131). In der großen, epidemiologischen LASA-Studie zeigten sich höhere Konzentrationen des Knochenresorptionsmarkers Desoxypyridinolin-Crosslinks (DPD) bei Frauen mit einer niedrigen Vitamin B₁₂-Konzentration im Plasma (32). Darüber hinaus konnten Sato et al. in einer doppelblinden, placebo-kontrollierten Interventionsstudie über zwei Jahre eine Reduktion der Hüftfrakturrate um 75 Prozent bei Patienten mit niedriger BMD durch eine Substitutionstherapie mittels 5 mg Folsäure und 1,5 mg Mecobalamin pro Tag nachweisen (129). Bedauerlicherweise wurden in dieser Studie keine biochemischen Marker des Knochenstoffwechsels bestimmt. Beide Arbeiten weisen aber einen signifikanten Zusammenhang zwischen Folsäure beziehungsweise Vitamin B₁₂ und der Knochenresorptionsaktivität nach. Im Gegensatz hierzu stehen zwei kürzlich veröffentlichte Interventionsstudien, die bei einer Reduktion des **HCy**-Plasmaspiegels durch eine Monotherapie mittels Substitution von Folsäure (57) beziehungsweise eine Kombination von Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆ (50) bei gesunden Probanden keinen Effekt auf biochemische Marker des Knochenstoffwechsels feststellen konnten. Beide Studien weisen aber erhebliche Limitationen auf, die die Ursache für die negativen Ergebnisse sein könnten. Sowohl Herrmann et al. als auch Green et al. untersuchten gesunde Probanden. Von solchen Untersuchungsgruppen auf die Auswirkung einer B-Vitamintherapie auf Patienten mit Osteoporose und **HHCy** zu schließen, ist nicht möglich. Darüber hinaus war bei Herrmann et al. der Beobachtungszeitraum mit zwei Monaten unzureichend. Der Zusammenhang zwischen **HCy**, B-Vitaminmangel und dem Knochenresorptionsmarker Desoxypyridonolin-Crosslinks (DPD) im Urin wurde in der Vergangenheit bereits durch mehrere Studien belegt (32,56,106). Miyao et al. konnten in diesem Zusammenhang einen Anstieg der DPD im Urin um 15 Prozent bei Patientinnen mit einem MTHFR-Polymorphismus (Nukleotidaustausch Alanin zu Valin), einem bekannten Risikofaktor für **HHCy**, gegenüber der

Kontrollgruppe nachweisen (106). Dieser Knochenmarker wurde in den beiden erwähnten Interventionstudien nicht untersucht. Gegen die Ergebnisse von Herrmann et al. und Green et al. spricht auch eine Arbeit von Katunuma et al., in welcher eine inhibierende Wirkung von ansteigenden Vitamin B₆-Konzentrationen im Kulturmedium auf Cathepsin K in Osteoklasten von Ratten gezeigt werden konnte (79). Andere Cathepsin-Typen wurden hingegen nicht beeinflusst. Dies spricht für eine besondere Wirkung von Vitamin B₆ auf Osteoklasten. Die Ergebnisse von Katunuma et al. konnten in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht bestätigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ebenfalls eine Steigerung der Osteoklasten-Aktivität durch **HCy** nachgewiesen werden. Diese Resultate stehen im Einklang mit früheren Veröffentlichungen (60,86). Koh et al. beobachteten in Osteoklasten-Zellkulturen aus Mäuseknochenmark eine TRAP-Aktivitätssteigerung um 150 Prozent gegenüber der Kontrolle (86). Neben der erhöhten Enzymaktivität zeigte sich auch ein vermehrtes Zellwachstum und ein Konzentrationsanstieg von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies, welche durch Markierung mit der Fluoreszenzsonde Dichlordihydrofluorescein Diacetat bestimmt wurden. Ebenso konnten Koh et al. eine Erhöhung der Zellkernzahl pro Zelle, sowie eine Zunahme von Aktin-Ringformationen, die sich in der Prophase der Mitose bilden, beobachten. Darüber hinaus ließ sich eine Steigerung der Mitogen-aktivierten Protein Kinase p38 (p38 MAPK) beobachten (siehe Abbildung 12). Diese ist an der Signaltransduktion durch IL 6 beteiligt und stellt somit eine direkte Verbindung zum Östrogenstoffwechsel dar (siehe Kapitel 2.2). Diese Erkenntnisse konnten in einer Studie von Kim et al. untermauert werden (83). Hier zeigte die antioxidativ wirkende α -Liponsäure einen hemmenden Effekt auf die Differenzierung der Osteoklasten-Vorläuferzellen. Ein weiterer Mechanismus der Osteoklasten-Aktivierung durch **HCy** könnte die Stimulation des N-methyl-D-aspartat (NMDA) Glutamat-Rezeptors (NMDAR) darstellen (siehe Abbildung 12). Dieser Rezeptor wurde bereits mehrfach auf reifen, humanen Osteoklasten nachgewiesen (21,36, 69,70,104). Brown et al. konnten in ihrer Studie eine konzentrationsabhängige

Expressionssteigerung des NMDAR durch **HCy** in glatten Muskelzellen der Gefäße von Ratten nachweisen (13). Die NMDAR vermittelte Stimulation der Zellen erfolgt wahrscheinlich über den NF-κ-B Signaltransduktionsweg (siehe Abbildung 12). Ein direkter Nachweis der Aktivierung der Osteoklasten durch **HCy** über den NMDAR wurde allerdings bisher noch nicht erbracht. Der Beweis dieser Hypothese muss somit noch in zukünftigen Studien belegt werden.

In einer tierexperimentellen Studie konnten Herrmann et al. die Wirkung von **HCy** auf den Knochen von Ratten nachweisen (58). Methionin beziehungsweise **HCy** angereicherte Diäten führten zu **HHCy** von 27,3 bis 54 µmol/l, die mit einer Abnahme der Knochenlänge, des Knochengewichts, der Knochendicke und der biomechanischen Qualität einhergingen. Im Gegensatz hierzu steht eine Arbeit von Masse et al., die Hühner in den ersten acht Wochen ihres Lebens mit **HCy** fütterten (99). Hier zeigte sich eine Vergrößerung des Knochendurchmessers und -länge, welche normalerweise Anhaltspunkte für einen verstärkten Knochenaufbau sind. Überraschenderweise zeigte die veränderte Knochengometrie keine Auswirkung auf die biomechanischen Eigenschaften (99). Darüber hinaus ist die Aussagekraft der Studie von Masse et al. (99) durchaus fraglich. Die **HCy**-Plasmakonzentration der Kontrollgruppe betrug mehr als 40 µmol/l. Die der behandelten Tiere betrug sogar mehr als 300 µmol/l. Darüber hinaus ist unklar, inwiefern ein Tiermodell mit schnell wachsenden jungen Hühnern mit der Stoffwechsellage von älteren Menschen verglichen werden kann. Es ist ebenso fraglich, ob ein solcher Fütterungsversuch mit **HCy** auf die Situation der durch B-Vitaminmangel hervorgerufenen **HHCy** übertragbar ist.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten unterstützen die Befunde mehrerer vorausgegangener klinischer Studien (11,32,56,106). Bei genauerer Betrachtung der Messbereiche, in denen Ergebnisse erzielt werden konnten, fallen jedoch erhebliche Unterschiede auf. Eine moderate **HHCy** liegt bei Plasmawerten zwischen 12 und 30 µmol/l vor. In Zellkulturexperimenten konnten verwertbare Ergebnisse nur durch Verwendung von Kulturmedien mit **HCy**-Konzentrationen von 10 µmol/l (86) beziehungsweise von über 50 µmol/l (60) erzielt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeiten beruhen also auf einer Hemmung des **HCy**-Exports

aus der Zelle, aufgrund einer Veränderung des Konzentrationsgefälles extrazellulär zu intrazellulär. Dieser Mechanismus liefert keine Rückschlüsse auf die Pathophysiologie der **HHCy** im menschlichen Organismus. Darüber hinaus wurden in diesen Arbeiten nur Aussagen über extrazelluläres **HCy** im Kulturmedium gemacht. Für die Aktivierung der Osteoklasten ist allerdings das intrazelluläre **HCy** verantwortlich. Die **HHCy** entsteht durch einen vermehrten Export von **HCy** aus allen Körperzellen. Ob die Relation zwischen Zellzahl und Medium beziehungsweise Blut in Zellkulturen und menschlichem Organismus vergleichbar ist, kann nicht belegt werden. Darüber hinaus beruht die Entstehung der Osteoporose auf mehreren Faktoren, wie zum Beispiel einer erhöhten IL6-Konzentration (siehe Kapitel 2.2.). Diese Gegebenheiten können unter den artifiziellen Bedingungen der Zellkultur ebenfalls nicht berücksichtigt werden. Eine direkte Übertragbarkeit der Daten von Zellkultur auf tatsächliche Klinik bleibt somit unmöglich.

Aufgrund der existierenden Daten kann eine Osteoklasten-Stimulation durch **HCy** als wahrscheinlich angesehen werden. Da der B-Vitaminmangel die häufigste Ursache für **HHCy** in vivo ist, ergibt sich die Frage, ob auch abnehmende Konzentrationen von Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆ die Osteoklasten-Aktivität stimuliert, und wenn ja, ob diese Stimulation von einem **HCy**-Konzentrationsanstieg begleitet wird. Durch Messungen der **HCy**-Konzentrationen im Überstand der einzelnen Zellkulturen konnte diese Hypothese bestätigt werden. Das vollständige Fehlen von Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆ führte zu einer signifikanten Konzentrationssteigerung von 20 Prozent gegenüber der Kontrolle. Die Messwerte bewegten sich allerdings im Bereich von 5 µmol/l und darunter. Da **HCy** ein intrazellulärer Stoffwechselmetabolit ist, repräsentiert die extrazelluläre **HCy**-Konzentration im Überstand des Zellkulturmediums nur die intrazelluläre Situation und hängt im Wesentlichen von der Exportleistung der Zellen ab. Bei in-vitro Zellkulturen ist die Zellzahl im Vergleich zum gesunden Organismus limitiert. Das Verhältnis zwischen Zellzahl und extrazellulärem Volumen ist nicht mit der Situation in vivo vergleichbar. In einer Studie an 61 Patienten mit pAVK (Untersuchungsgruppe) und 50 gesunden Kontrollprobanden

(Kontrollgruppe) konnten Loehrer et al. einen deutlichen Zusammenhang zwischen intra- und extrazellulärer **HCy**-Konzentration in Erythrozyten beobachten (90). Die **HCy**-Konzentration lag bei der Untersuchungsgruppe im Blutplasma um etwa 50 Prozent (Untersuchungsgruppe: 15,5 µmol/l; Kontrollgruppe: 10,4 µmol/l) über den Werten der Kontrollgruppe. Im Zytoplasma der Erythrozyten konnten Loehrer et al. eine um über 100 Prozent höhere **HCy**-Konzentration in der Untersuchungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe nachweisen (Untersuchungsgruppe: 55,0 nmol/l; Kontrollgruppe: 23,1 nmol/l). Ebenso war der Quotient zwischen intra- und extrazellulärem **HCy** bei Patienten mit pAVK, im Vergleich zu gesunden Probanden, signifikant höher (Untersuchungsgruppe: 3,5 Promille; Kontrollgruppe: 2,2 Promille).

Darüber hinaus finden regelmäßige Wechsel des Kulturmediums statt. Die Messung von intrazellulären **HCy**-Konzentrationen wäre somit wahrscheinlich aussagekräftiger gewesen. Interessant ist auch der deutliche Abfall der **HCy**-Konzentration im Bereich von supraphysiologischen Vitaminwerten um 15 Prozent. Diese Beobachtung belegt erneut den Einfluss von Folsäure, Vitamin B₁₂ und B₆ auf den **HCy**-Spiegel. Die **HCy**-Messungen im Überstand sind ein klares Indiz für die Hypothese dieser Arbeit, dass die Stimulation von Osteoklasten durch B-Vitaminmängel mit einer Akkumulation von **HCy** vergesellschaftet ist.

In vivo stellen die Osteoblasten als knochenbauende Zellen den funktionellen Gegenspieler der Osteoklasten dar. Es stellt sich die Frage, ob auch Osteoblasten durch erhöhte **HCy**-Konzentrationen beeinflusst werden. Wie im Bereich der Osteoklasten existieren bis zum jetzigen Zeitpunkt nur wenige Studien zu diesem Thema. Im Bereich der klinischen Studien konnten Carmel et al. bereits 1988 negative Effekte eines Vitamin B₁₂-Mangels auf die Osteoblasten-Aktivität zeigen (siehe Abbildung 12) (17). Die Plasmakonzentrationen der alkalischen Phosphatase, einem Osteoblasten-spezifischen Enzym, waren in der Untersuchungsgruppe mit erhöhten **HCy**-Werten um ungefähr 50 Prozent geringer als in der Kontrollgruppe (3,89 ± 2,10 U/l gegenüber 7,55 ± 3,99 U/l). Ähnliche

Werte konnte auch für Osteocalzin, einem anderen für die Osteoblastenaktivierung spezifischem Enzym, nachgewiesen werden ($1,11 \pm 0,77$ nmol/l gegenüber $1,84 \pm 0,49$ nmol/l). Die im Rahmen dieser Studie ebenfalls durchgeführten Tierexperimente konnten die klinischen Beobachtungen bestätigen. Darüber hinaus führte eine Substitutionstherapie mit Vitamin B₁₂ zu einem Anstieg der Plasmakonzentration für Osteocalzin und alkalischer Phosphatase in der Untersuchungsgruppe auf physiologische Werte, nicht aber bei der Kontrollgruppe. Kim et al. konnten diese Effekte auch bei Osteoblasten-Vorläuferzellen feststellen (82). Allerdings wurden in dieser Studie Zelllinien und keine humanen Osteoblasten verwendet. Darüber hinaus erfolgte die Messung teilweise bereits nach zwei bis drei Tagen. Aufgrund von Stress für die Zellen während der vorausgegangenen Passage könnten die Ergebnisse beeinflusst sein. Es werden ebenfalls keine Angaben über die Anzahl der Wiederholungen gemacht.

Bezüglich der Auswirkung von **HHCy** auf die Osteoblastenfunktion wurden in den letzten Jahren einige wenige experimentelle Arbeiten veröffentlicht. Sakamoto et al. beobachteten in Zellkulturen einen Abfall der Osteocalzin-Werte bei einer **HCy**-Konzentration im Nährmedium von 500 µmol/l um 61 Prozent gegenüber der Kontrolle (128). Ebenso spricht der gleichzeitige Anstieg von Osteopontin um 134 bis 209 Prozent bei 500 µmol/l **HCy** gegenüber der Kontrolle, als Zeichen eines Gegenregulationsversuchs der Zelle auf die **HCy**-Wirkung, für einen hemmenden Einfluss des **HCy** auf die Osteoblastenfunktion. Dieses Ergebnis konnte durch spätere Osteopontin mRNA-Expressionsanalysen bestätigt werden und liefert somit erste Erkenntnisse über die Rolle der Osteoblasten bei der Entstehung von Osteoporose. In ihrer Studie konnten Herrmann et al. eine moderate Zunahme der Osteoblasten-Aktivität um 20 bis 25 Prozent bei einer **HCy**-Konzentrationen zwischen 100 und 500 µmol/l nachweisen (59). Eine Abnahme von Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆ in Kombination oder allein zeigte, jedoch, keinerlei messbare Auswirkung auf die Osteoblasten-Aktivität. Kim et al. wiesen in ihrer Arbeit eine vermehrte Apoptoserate durch **HCy** nach (81). In Kaspase-Aktivitätsassays zeigte sich eine vermehrte Aktivität von Kaspase 3 und 9, nicht

jedoch von Kaspase 8. Dies deutet auf eine Initiierung des Zelltods durch **HHCy** über den mitochondrialen Pfad hin. Darüber hinaus ließ sich in Western Blots und elektrophoretischen Mobilitätswechsellassays (EMSA) eine Aktivierung des NF- κ -B Weges durch **HCy** nachweisen. Diese Ergebnisse deutet auf eine Aktivierung des durch Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) vermittelten Apoptosewegs hin. Ein solcher Effekt trat sowohl bei primären humanen Osteoblasten als auch bei Zellen der HS-5 Zelllinie auf. Die Resultate der Studie von Kim et al. zeigen die mögliche Beeinflussung der Knochenneubildung durch **HCy** durch ein vermehrtes Absterben von Osteoblasten auf. Zusammen mit bereits existierenden Daten deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die Stimulation der Osteoklasten durch **HCy** einer der Hauptmechanismen der schädlichen Wirkung von B-Vitaminmangel für den Knochen darstellt.

Eine Zusammenfassung der potentiellen Wirkungen von **HCy** und B-Vitaminmangel auf die Aktivität von Osteoklasten und Osteoblasten ist in Abbildung 12 dargestellt. Eine Stimulation der Osteoklasten erfolgt sowohl durch extrazelluläres (exogenes) **HCy** als auch aufgrund von B-Vitaminmangel akkumuliertes endogenes **HCy**. Die Aktivierung durch exogenes **HCy** könnte möglicherweise auf einer Bindung des **HCy** an den NMDAR beruhen. Über die Signalkaskade des Transkriptionsfaktors Nukleärer Faktor kappa B (NF- κ -B) aktiviert der NMDAR Osteoklasten. Diese Hypothese wird durch den Nachweis des NMDAR auf der Oberfläche von Osteoklasten gestützt (13,21,36,69,70,104). Darüber hinaus konnten Brown et al. eine Bindung von **HCy** am NMDAR beobachten (13). Neben dem NMDAR konnten Koh et al eine Aktivierung der Osteoklasten durch **HCy**-induzierten oxidativen Stress über eine p38 MAPK-Aktivierung belegen (86). Die Rolle der Osteoblasten ist zur Zeit noch nicht vollständig verstanden. Kim et al. beobachteten eine gesteigerte Apoptose (81), wohingegen Herrmann et al nur einen leichten stimulatorischen Effekt des **HCy** auf die Osteoblasten feststellten (59). B-Vitaminmangel und damit endogen akkumuliertes **HCy** zeigten allerdings keine Auswirkung.

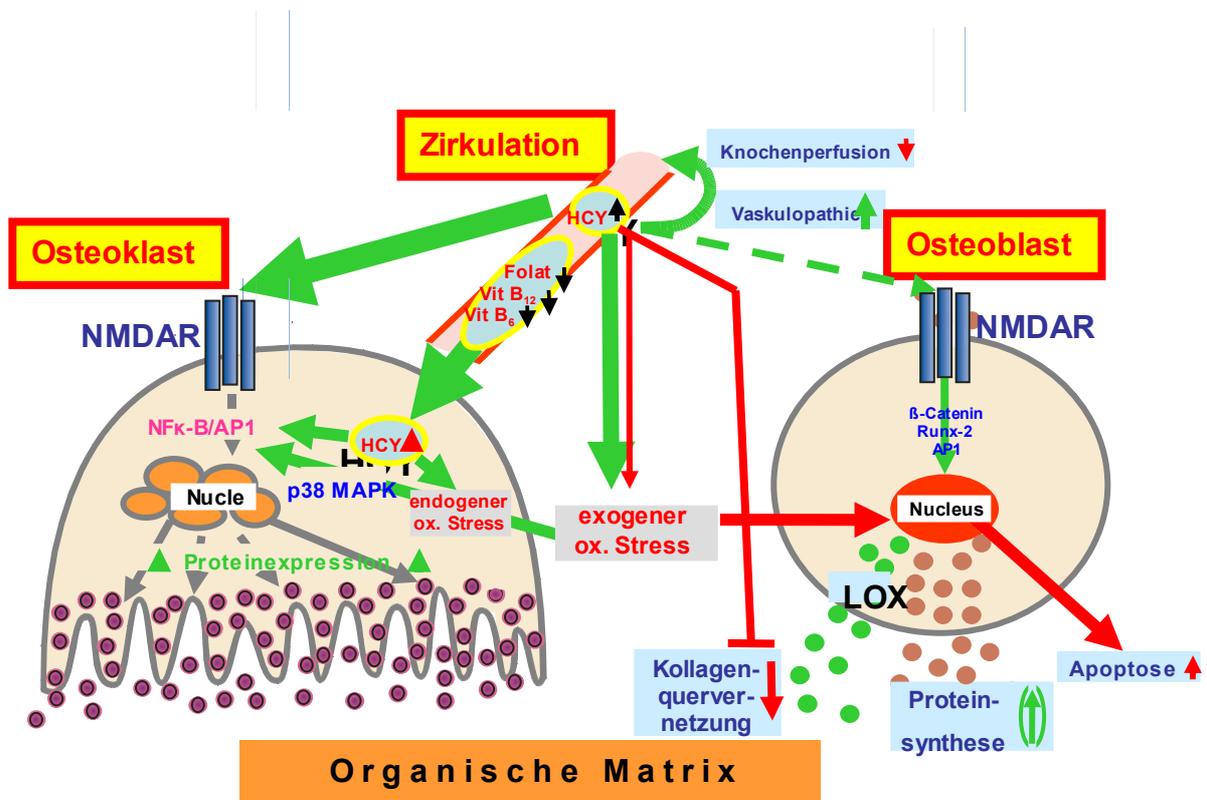


Abbildung 12: Potentielle Mechanismen der Wirkung von HHCy und B-Vitaminmängeln auf den Knochen. AP1 – Aktivatorprotein 1, LOX – Lysyloxidase, Nfk-B – Nukleärer Faktor kappa B, NMDAR – N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor, p38 MAPK – p38 mitogenaktivierte Proteinkinase, Runx2 – Runt-related transcription factor 2.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die vorliegende Arbeit zum ersten Mal einen starken stimulatorischen Effekt von Folsäure, Vitamin B₁₂ und B₆ auf die Aktivität primärer humaner Osteoklasten nachweisen konnte. Diese Ergebnisse sind ein klares Indiz für eine kausale Rolle des B-Vitaminmangels bei der Entstehung der Osteoporose beziehungsweise Zerstörung von Knochengewebe. Die Osteoklasten-Aktivität wird dabei über eine Akkumulation von **HCy** vermittelt. In Anbetracht aller bisher verfügbaren Studien kann spekuliert werden, dass die Aktivität von Osteoklasten wahrscheinlich ein Hauptmechanismus bei der Entstehung der Osteoporose beziehungsweise osteoporotischer Frakturen bei älteren Menschen ist. Für die Praxis zeigt diese Arbeit eine einfache und kostengünstige Option zur Prävention der Osteoporose durch B-Vitaminsubstitution auf, deren Effektivität allerdings noch in zukünftigen Interventionsstudien belegt werden muss. Ein B-Vitaminmangel beziehungsweise die **HHCy** lassen sich durch eine Substitutionstherapie mit Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆ problemlos behandeln.

6. Literaturverzeichnis

1. Abe E, Yamamoto M, Taguchi Y, Lecka-Czernik B, Economides AN, Stahl N, Jilka RL, Manolagas SC (2000) Essential requirement of BMPs 2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. *J Bone Miner Res* 15: 663-73
2. Abrahamsen B, Madsen JS, Tofteng CL, Stilgren C, Bladbjerg EM, Kristensen SR, et al. (2003) A common methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) polymorphism is associated with low BMD and increased fracture incidence after menopause: longitudinal data from Danish osteoporosis prevention study. *J Bone Miner Res* 18: 723-9
3. American Heart Association. Heart and Stroke Statistics - 2004 Update. www.americanheart.org/downloadable/heart1079736729696HDSStats2004UpdateREV3-19-04.pdf 2007
4. Bai XC, Lu D, Bai J, Zheng H, Ke ZY, Li XM, Luo SQ (2004) Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 197-207
5. Basu S, Michaelsson K, Olofsson H, Johansson S, Melhus H (2001) Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun* 19: 288:275-9
6. Bathum L, von Bornemann HJ, Christiansen L, Madsen JS, Skythe A, Christensen K (2004) Evidence for association of methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism C677T and an increased risk of fractures: results from a population-based Danish twin study. *Osteoporos Int* 15: 659-64

7. Bellido T, Jilka RL, Boyce BF, Girasole G, Broxmeyer H, Dalrymple SA, Murray R, Manolagas SC (1995) Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis and bone mass by androgens: the role of the androgen receptor. *J Clin Invest* 95: 1886-95
8. Bjelland I, Tell GS, Vollset SE, Refsum H, Ueland PM (2003) Folate, vitamin B12, homocysteine, and the methylenetetrahydrofolate reductase 677 C->T polymorphism in anxiety and depression: the Hordaland Homocysteine Study. *Arch Gen Psychiatry* 60: 618-26
9. Bjorke Monsen AL, Ueland PM (2003) Homocysteine and methylmalonic acid in diagnosis and risk assessment from infancy to adolescence. *Am J Clin Nutr* 78: 7-21
10. Black DM, Arden NK, Palarmo L, Pearson J, Cummings SR (1999) Prevalent vertebral deformities predict hip fractures and new vertebral deformities but not wrist fractures. *J Bone Miner Res* 14: 821-8
11. Bode MK, Laitinen P, Risteli J, uusimaa P, Juvonen T (2000) Atherosclerosis, type 1 collagen cross-linking and homocysteine. *Atherosclerosis* 152: 531-2
12. Bonna KH, Njolstad I, Ueland PM, Schirmer H, Tverdal A, Steigen T, et al. (2006) Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Eng J Med* 2006
13. Brown AT, Chen H, Zhang X, Mousri MM (2005) Homocysteine induces NADPH oxidase expression in rat vascular smooth muscle cells: role of NMDA receptor and PKC-epsilon. *Clin Chem Lab Med* 43: Ref Type: Journal (Full)

14. Brown JP, Josse RG (2002) 2002 clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada. CMAJ 167: S1-34
15. Cagnacci A, Baldassari F, Rivolta G, Arangio S, Volpe A (2003) Relation of homocysteine, folate, and vitamin B12 to bone mineral density of postmenopausal women. Bone 33: 956-9
16. Carmel R (2000) Current concepts in cobalamin deficiency. Annu Rev Med 51: 357-75
17. Carmel R, Lau KH, Baylink DJ, Saxena S, Singer FR (1988) Cobalamin and osteoblast-specific proteins. N Eng J Med 319: 70-5
18. Carson NA, Neill DW (1962) Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. Arch Dis Child 37: 505-13
19. Cavalca V, Cighetti G, Bamonti F, Loaldi A, Bortone L, Novembrino C, et al. (2001) Oxidative stress and homocysteine in coronary artery disease. Clin Chem 47: 887-92
20. Center of Disease Control. Mortality from coronary heart disease and acute myocardial infarction. 1998, www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5006a2.htm 2006
21. Chenu C, Serre CM, Raynal C, Burt-Pichat B, Delmas PD (1998) Glutamate receptors are expressed by bone cells and are involved in bone resorption. Bone 22: 295-9
22. Chrischilles E, Shireman T, Wallace R (1994) Costs and health effects of osteoporotic fractures. Bone 15: 377-86

23. Christensen B, Arbour L, Tran P, Leclerc D, Sabbaghian N, Platt R, et al. (1999) Genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. *Am J Med Genet* 84: 151-7
24. Chu P, Chao TY, Lin YF, Janckila AJ, Yam LT (2003) Correlation between histomorphometric parameters of bone resorption and serum type 5b tartrate-resistant acid phosphatase in uremic patients on maintenance hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 41: 1052-9
25. Cummings SR, Nevitt MC, Browner WS, Stone K, Fox KM, Esrund KE, et al. (1995) Risk factors for hip fracture in white women. Study of osteoporotic fractures research Group. *N Eng J Med* 332: 767-73
26. Czeizel AE, Dudas I (1992) Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Eng J Med* 327: 1832-5
27. Davis JW, Grove JS, Wasnich RD, Ross PD (1999) Spatial relationships between prevalent and incident spine fractures. *Bone* 24: 261-4
28. de Bree A, van Dusseldorp M, Brouwer IA, het Hof KH, Steegers-Theunissen RP (1997) Folate intake in Europe: recommended, actual and desired intake. *Eur J Clin Nutr* 51: 643-60
29. de Bree A, Verschuren WM, Kromhout D, Kluijtmans LA, Blom HJ (2002) Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. *Pharmacol Rev* 54: 599-618
30. de Bree A, Verschuren WM, Kromhout D, Mennen LI, Blom HJ (2002) Homocysteine and coronary heart disease: the importance of a distinction between low and high risk subjects. *Inz J Epidemiol* 31: 1268-72

31. den Heijer T, Vermeer SE, Clarke R, Oudkerk M, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MM (2003) Homocysteine and brain atrophy on MRI of non-demented elderly. *Brain* 126: 170-5
32. Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, de Groot LC, Lips P, Smit JH, van Staveren WA (2005) Homocysteine and vitamin B12 status relate to bone turnover markers, broadband ultrasound attenuation, and fractures in healthy elderly people. *J Bone Miner Res* 20: 921-9
33. Dodds RA, Cateral A, Bitensky L, Chayen J (1986) Abnormalities in fracture healing induced by vitamin B6-deficiency in rats. *Bone* 7: 489-95
34. Dominguez RO, Marschoff ER, Guareschi EM, Famular AL, Pagano MA, Serra JA (2005) Homocysteine, vitamin B12 and folate in Alzheimer`s disease and vascular dementias: the paradoxical effect of superimposed type II diabetes mellitus condition. *Clin Chem Acta* 359: 163-70
35. Eriksen EF, Langdahl B, Vesterby A, Rungby J, Kassem M (1999) Hormone replacement therapy prevents osteoclastic hyperactivity: a histomorphometric study in early postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 14: 1217-21
36. Espinosa L, Itzstein C, Cheynel H, Delmas PD, Chenu C (1999) Active NMDA glutamate receptors are expressed on mammalian osteoclasts. *J Physiol* 518: 47-53
37. Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK, et al. (1999) Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. *JAMA* 282: 637-45

38. Felsenberg D, Wieland E, Hammermeister C, Armbrecht G, Gowin W, Raspe H (1998) Prävalenz der vertebrealen Wirbelkörperdeformation bei Frauen und Männern in Deutschland. *Med Klin* 93: 31-4
39. Finkelstein JD (1990) Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* : 228-37
40. Finkelstein JD (1998) The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 157 Suppl 2: 40-4
41. Finkelstein JD, Kyle WE, Harris BJ (1974) Methionine metabolism in mammals: regulatory effects of S-adenosylhomocysteine. *Arch Biochem Biophys* 165: 774-9
42. Finkelstein JD, Martin JJ (1984) Methionine metabolism in mammals. Disturbution of homocysteine between competing pathways. *J Biol Cem* 259: 9508-13
43. Fox KM, Cummings SR, Williams E, Stone K (2000) Study of Osteoporotic Fractures. femoral neck and intertrochanteric fractures have different risk factors, a prospective study. *Osteoporos Int* 11: 1018-23
44. Friedman AN, Bostom AG, Selhub J, Levey AS, Rosenberg IH (2001) The kidney and homocysteine metabolism. *J Am Soc Nephrol* 12: 2181-9
45. Gao YH, Shinki T, Yuasa T, Ktaoka-Enomoto H, Komori T, Suda T, Yamaguchi A (1998) Potential role of Cbfa 1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF). *Biochem Biophys Res Commun* 252: 697-702

46. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR (1990) Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 85: 632-9
47. Geusens P, Hochberg MC, van der Voort DJ, Pols H, Van der Klift M, Siris E, et al. (2002) Performance of risk indices identifying low bone mineral density in postmenopausal women. *Mayo Clin Proc* 77: 629-37
48. Goerss JB, Kim CH, Atkinson EJ, Eastell R, O'Fallen WM, Melton LJ 3rd (1992) Risk of fractures in patients with pernicious anemia. *J Bone Miner Res* 7(5): 573-9
49. Golbahar J, Hamidi A, Aminzadeh MA, Omrani GR (2003) Association of plasma folate, plasma total homocysteine, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, with bone mineral density in postmenopausal Iranian women. *Bone* 33: 234-42
50. Green TJ, McMahon JA, Akeaff CM, Williams SM, Whiting SJ (2007) Lowering homocysteine with B vitamins has no effect on biomarkers of bone turnover in older persons: a 2-y randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 85: 460-4
51. Halleen JM (2003) Tartrate-resistant acid phosphatase 5B is a specific and sensitive marker of bone resorption. *Anticancer Res* 23: 1027-9
52. Halleen JM, Ranta R (2001) Tartrate-resistant phosphatase as a serum marker of bone resorption. *Am Clin Lab* 20: 29-30
53. Henning BF, Zidek W, Riezler R, Graefe U, et al. (2001) Homocysteine metabolism in hemodialysis patients treated with vitamins B6, B12 and folate. *Res Exp Med (Berl)* 200: 155-68

54. Herbert V (1998) Vitamin B-12: plant sources, requirements, and assay.
Am J Clin Nutr 48: 852-8
55. Herold G. Innere Medizin. (2007) Dr. med Gerd Herold, Köln
56. Herrmann M, Kraenzlin M, Pape G, Sand-Hill M, Herrmann W (2005) Relation between homocysteine and biochemical bone turnover markers and bone mineral density in peri- and postmenopausal women.
Clin Chem Lab Med 43: 1118-23
57. Herrmann M, Stanger O, Paulweber B, Hufnagl C, Herrmann W (2006) Folate supplementation does not affect biochemical markers of bone turnover.
Clin Lab 52: 131-6
58. Herrmann M, Taban-Shoma O, Hübner U, Pexa A, Kilter H, Umanskaya N, Hans Staub R, Böhm M, Herrmann W (2007) Hyperhomocysteinemia and myocardial expression of brain natriuretic peptide in rats.
Clin Chem 53(4): 773-80
59. Herrmann M, Umanskaya N, Wildemann B, Colaianni G, Schmidt J, Widmann T, Zallone A, Herrmann W (2007) Accumulation of homocysteine by decreasing concentrations of folate, vitamin B(12) and B(6) does not influence the activity of human osteoblasts in vitro.
Clin Chem Acta 384(1-2): 129-34. Epub 2007 Jul 4
60. Herrmann M, Wiedmann T, Colaianni G, Colucci S, Zalone A, and Herrmann W (2005) Increased Osteoclast Activity in the presence of increased Homocysteine concentrations. Clin Chem 12: 2348-53
61. Herrmann W. Hyperhomocysteinämie, B-Vitamin-Mangel und Gefäß- sowie neurodegenerative Erkrankungen. In: Thomas L (ed) Labor und Diagnose (2005) TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main, 2005

62. Herrmann W, Isber S, Obeid R, Herrmann M, and Jouma M (2005)
Concentrations of homocysteine, related metabolites and asymmetric dimethylarginine in preeclamptic women with poor nutritional status.
Clin Chem Lab med 43(3): A7
63. Herrmann W, Schorr H, Geisel J, Riegel W (2001) Homocysteine, cysthionine, methylmalonic acid and B-vitamins in patients with renal disease.
Clin Chem Lab Med 39: 739-46
64. Herrmann W, Schorr H, Obeid R, Makowski J, Fowler B, Kuhlmann MK (2005)
Disturbed homocysteine and methionine cycle intermediates s-adenosylhomocysteine and SAM and methionine are related to degree of renal insufficiency in type II diabetes. Clin Chem 51: 891-7
65. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S (1999) Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis.
Endocrinology 140: 4382-89
66. Hofbauer LC, Khosla S, Dunston CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL (1999) Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. Endocrinology 140: 4367-70
67. Hofbauer LC, Schoppet M (2004) Clinical implications of osteoprotegerin/RankL/the Rank-system for bone and vascular-diseases.
JAMA 292: 490-5
68. Ionn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, et al. (2006)
Homocysteine lowering with folic acid and B-vitamins in vascular disease.
N Eng J Med 354: 1567-77

69. Itzstein C, Cheynel H, Burt-Pichat B, Merle B, Espinosa L, Delmas PD, Chenu C (2001) Molecular identification of NMDA glutamate receptors expressed in bone cells. *J Cell Biochem* 82: 134-44
70. Itzstein C, Espinosa L, Delmas PD, Chenu C (2000) Specific antagonists of NMDA receptors prevent osteoclast sealing zone formation required for bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* 268: 201-9
71. Jacobson SJ, Goldberg J, Miles TP, Brody JA, Stiers W, Rimm AA (1992) Race and sex differences in mortality following fracture of the hip. *Am J Public Health* 82: 1147-50
72. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R (1996) Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 93: 7-9
73. Jalovaara P, Virkkunen H (1991) Quality of life after hemiarthroplasty for femoral neck fracture. *Acta Orthop Scand* 62: 208-17
74. Janckila AJ, Takahashi K, Sun SZ, Yam LT (2001) Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as a serum marker for osteoclastic activity. *Clin Chem* 47: 74-80
75. Joosten E, van den Berg, Riezler R, Naurath HJ, et al. (1993) Metabolic evidence that deficiencies of vitamin B-12 (cobalamin), folate, and B-6 occur commonly in elderly people. *Am J Clin Nutr* 58: 468-76
76. Kado DM, Karlamangla AS, Huang MH, Troen A, Rowe JW, Selhub J, Seeman TE (2005) Homocysteine versus the vitamins folate, B6, and B12 as predictors of cognitive function and decline in older high-functioning adults: MacArthur Studies of successful aging. *Am J Med* 118: 161-7

77. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Dawson A, De Laet C, Johnsson B (2001) Ten year probabilities of osteoporotic fractures according to bone mineral density diagnostic thresholds. *Osteoporos Int* 12: 989-95
78. Kanis JA, Jonsson B (2002) Economic evaluation of interventions for osteoporosis. *Osteoporos Int* 13: 765-7
79. Katunuma N, Matsui A, Inubushi T, Murata E, Kakegawa H, Ohba Y, Turk D, Turk V, Tada Y, Asao T (2000) Structure-based development of pyridoxal propionate derivatives as specific inhibitors of cathepsin K in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 267(3): 850-4
80. Keene GS, Parker MJ, Pryor GA (1993) Morbidity and mortality after hip fractures. *BMJ* 307: 1248-50
81. Kim DJ, Koh JM, Lee O, Kim NJ, Lee YS, Kim YS, Park JY, Lee KU, Kim GS (2006) Homocysteine enhances apoptosis in human bone marrow stromal cells. *Bone* 39(3): 582-90
82. Kim GS, Kim CH, Park JY, Lee KU, Park CS (1996) Effects of vitamin B12 on cell proliferation and cellular alkaline phosphatase activity in human bone marrow stromal osteoprogenitor cells and UMR 106 osteoblastic cells. *Metabolism* 45(12): 1443-6
83. Kim HJ, Chang EJ, Kim HM, Lee SB, Kim HD, Su Kim G, Kim HH (2006) Antioxidant alpha-lipoic acid inhibits osteoclast differentiation by reducing nuclear factor-kappaB DNA binding and prevents in vivo bone resorption induced by receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha. *Free Radical Biol Med* 49(9): 1483-93

84. Klotzbuecher CM, Ross PD, Landsman P, Abbott TAI, Berger M (2000) Patients with prior fractures have increased risk of future fractures: a summery of the literature and statistical synthesis.
J Bone Miner Res 15: 721-39
85. Knekt P, Reunanen A, Alfthan G, Heliovaara M, Risanen H, Marniemi J, Aromaa A (2001) Hyperhomocysteinemia: a risk factor or a consequence of coronary heart disease?. Arch Intern Med 161: 1589-94
86. Koh JM, Lee YS, Kim YS, Kim DJ, Kim HH, Park JY, Lee KU, and Kim GS (2006) Homocysteine enhances bone resorption by stimulation of osteoclast formation and activity through increased intercellular ROS generation.
J Bone Miner Res 21: 1003-11
87. Kotake S, Sato K, Kim KJ, Takahashi N, Udagawa N, Nakamura I, Yamaguchi A, Kishimoto T, Suda T, Kashiwazaki S (1996) Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation.
J Bone Miner Res 11: 88-95
88. Laroche M, Pouilles JM, Ribot C, Bendayan P, Bernard J, Boccalon H, Mazzaferro S (1994) Comparison if the bone mineral content of lower limbs in men with ischaemic atherosclerotic disease. Clin Rheumatol 13: 611-14
89. Lecka-Czernik B, Gubriji I, Moerman E, Kajkenova O, Lipschitz D, Manolagas SC, Jilka RL (1999) Inhibition of Osf2/Cbfa1 expression and terminal osteoblast differentiation by PPARgamma2.
J Cell Biochem 74: 357-71

90. Loehrer FM, Tschöpl M, Angst CP, Litynski P, Jäger K, Fowler B, Haefeli WE (2001) Disturbed ratio of erythrocyte and plasma S-adenosylmethionin/S-adenosylhomocysteine in peripheral arterial occlusive disease. *Atherosclerosis* 154(1): 147-54
91. MacCaddon A (2006) Homocysteine and cognitive impairment; a case series in a General Practice setting. *Nutr J* 5: 6
92. Maggio D, Barabani M, Pierandrei M, Polidori MC, Catani M, Mecocci P, et al. (2003) Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of an cross-sectional study. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 1523-7
93. Malinow MR, Ducimetiere P, Luc G, Evans AE, Arveiler D, Combien F, Upson BM (1996) Plasma homocysteine levels and graded risk for myocardial infarction: findings in two populations at contrasting risk for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 126: 27-34
94. Manolagas SC (1999) Cell number vs cell vigor - what really matters to a regenerating skeleton?. *Endocrinology* 140: 4377-81
95. Manolagas SC (2000) Birth and death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanism and Implications for Pathogenesis and treatment of Osteoporosis.. *Endocr Rev* 21(2): 115-37
96. Manolagas SC, Jilka RL, Bellido T, O'Brien CA, Parfitt AM: Interleukin-6-type cytokines and their receptors. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (eds) *Principles of Bone Biology* . (1996) Academic Press, San Diego, CA

97. Manolagas SC, Weinstein RS (1999) New developments in the pathogenesis and treatment of steroid-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res* 14: 1061-6
98. Masse PG, Boskey AL, Ziv I, Hauschka P, Donovan SM, Howell DS, Cole DE (2003) Chemical and biochemical characterization of hyperhomocysteinemic bone disease in an animal model. *BMC Musculoskelet Disord* 20: 4:2
99. Masse PG, Rimnac CM, Yamauchi M, Coburn SP, Rucker RB, Howell DS, Boskey AL (1996) Pyridoxine deficiency affects biomechanical properties of chick tibial bone. *Bone* 18: 567-74
100. McLean RR, Jacques PF, Selhub J, Tucker KL, Samelson EJ, Broe KE, et al. (2004) Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons. *N Eng J Med* 350: 2042-9
101. Melton LJ 3rd (1995) How many women have osteoporosis now. *J Bone Miner Res* 10: 175-7
102. Melton LJ 3rd (2003) Adverse outcomes of osteoporotic fractures in general population. *J Bone Miner Res* 18: 1139-41
103. Melton ME, Kochman ML (1994) Reversal of severe osteoporosis with vitamin B12 and etidronate therapy in a patient with pernicious anemia. *Metabolism* 43(4): 468-9
104. Merle B, Itzstein C, Delmas PD, Chenu C (2003) NMDA glutamate receptors are expressed by osteoclast precursors and involved in the regulation of osteoclastogenesis. *J Cell Biochem* 90: 424-36
105. Minet JC, Bisse E, Aebischer CP, Beil A, et al. (2000) Assessment of vitamin B12, folate and vitamin B6 status and relation to sulfur amino acid metabolism in neonates. *Am J Clin Nutr* 72: 751-7

106. Miyao M, Morita H, Hosoi T, Kurihara H, Inoue S, Hoshino S, et al. (2000) Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MHTFR) polymorphism with bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Calcif Tissue Int* 66: 190-4
107. Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL (2001) Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med* 31: 509-19
108. Moojaart SP, Gussekloo J, Frolich M, Jolles J, Stott DJ, Westendorp RG, de Craen AJ (2005) Homocysteine, vitamin B12, and folic acid and the risk of cognitive decline in old age: the Leiden 85-Plus study. *Am J Clin Nutr* 82: 866-71
109. Morris MS, Jacques PF, Selhub J (2005) Relation between homocysteine and B-vitamin status indicators and bone mineral density in older Americans. *Bone* 37: 234-42
110. Morton DJ, Barrett-Connor EL, Schneider DL (2001) Vitamin C supplement use and bone mineral density in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 16: 135-40
111. Mueller S, Glowacki J (1999) The effect of age on the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 14: 354(Abstract)
112. Naurath HJ, Joosten E, Riezler R, Stabler SP, et al. (1995) Effects of vitamin B12, folate and vitamin B6 supplements in elderly people with normal serum vitamin concentrations. *Lancet* 346: 85-9
113. Nesbitt SA, Horton MA (1997) Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts. *Science* 276: 266-9

114. O'Brien CA, Gubrij I, Lin S-C, Saylor RL, Manolagas SC (1999) STAT3 in stromal/osteoblastic cells is required for induction receptor activator NF kappaB ligand and stimulation of osteoclastogenesis by gp 130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1,25-dihydroxyvitamin D3 or parathyroid hormone. *J Biol Chem* 274: 19301-8
115. Parrot F, Redonnet-vernhet I, Lacombe D, Gin H (2000) Osteoporosis in late-diagnosed adult homocystinuric patients. *J Inher Metab Dis* 23: 338-40
116. Patel MS, Rubin LA, Cole DEC: Genetic determinants of osteoporosis. In: Henderson JE, Glotzman D (eds). *The osteoporosis primer* . (2000) Cambridge University Press
117. Pfeilschneider J, et al. Evidenzbasierte Konsensus-Leitlinie zur Osteoporose. Dachverband der deutschsprachigen wissenschaftlichen Gesellschaft für Osteologie DVO eK . (2006) Schattauer GmbH, Verlag für Medizin und Naturwissenschaften, 70174 Stuttgart
118. Quadri P, Fragiaco C, Pezzati R, Zanda E, Tettamanti M, Lucca U (2005) Homocysteine and B-vitamins in mild cognitive impairment and dementia. *Clin Chem Lab Med* 43: 1096-100
119. Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Martelli M, Servadei L, Brunetti N, et al. (2005) Homocysteine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 82: 636-43
120. Ray NF, Chan JK, Thamer M, Melton LJ 3rd (1997) medical expenditures for the treatment of osteoporotic fractures in the USA in 1995: report from the National Osteoporosis Foundation. *J Bone Miner Res* 12: 24-5

121. Refsum H, Grinelflek AW, Ueland PM, Fredriksen A, et al. (2004) Screening for serum total homocysteine in newborn children. *Clin Chem* 50: 1769-84
122. Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, MacPartlin J, et al. (2004) Facts and recommendations about total serum homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem* 50: 3-32
123. Reynolds TM, Marshall PD, Brain AM (1992) Hip fracture patients may be vitamin B6 deficient. Controlled study of serum pyridoxal-5'-phosphate. *Acta Orthop Scand* 63(6): 635-8
124. Rizzoli R. Atlas of postmenopausal osteoporosis . (2004) Science Press
125. Roodman GD (1996) Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev* 17: 308-32
126. Rosen V, Cox K, Hattersley G: Bone morphogenetic proteins. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (EDS) *Principles of Bone Biology* . (1996) Academic Press, San Diego, CA
127. Saito M, Fujii K, Marumo K (2006) Degree of mineralization-related collagen crosslinking in the femoral neck cancellous bone in cases of hip fracture and controls. *Calcif Tissue Int* 79: 160-8
128. Sakamoto W, Isomura H, Fujie K, Deyama Y, Kato A, Nishihira J, Izumi H (2005) Homocysteine attenuates the expression of osteocalcin but enhances osteopontin in MC3T3-E1 preosteoblastic cells. *Biochem Biophys Acta* 1740(1): 12-6

129. Sato Y, Honda Y, Iwamoto J, Kanoko T, Satoh K (2005) Effect of folate and mecobalamin on hip fractures in patients with stroke: a rondomised controlled trial. *JAMA* 293: 1082-8
130. Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, Rogers G, Browman BA, Gunter EW, et al., Serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey (1991-94): population reference ranges and contribution of vitamin status to high serum concentrations, 1999
131. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH (1993) Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population (see comments). *JAMA* 270: 2693-8
132. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D`Agostino RB, et al. (2002) Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer`s disease. *N Eng J Med* 346: 476-83
133. Shane B, Stokstad EL (1985) Vitamin B12 - folate interrelationsships. *Anna Rev Nutr* 5: 115-41
134. Shimizu H, Kiyohara Y, Kato I, Tanzaki Y, Ueno H, Kimura Y, et al. (2002) Plasma homocysteine concentrations and the risk of subtypes of cerebral infarction. The Hisayama study. *Cerebrovasc Dis* 359: 747-52
135. Sidiqi A, Monson JP, Wood DF, Besser GM, Burrin JM (1999) Serum cytokines in thyrotoxicosis. *J Endocrinol Metab* 84: 435-9
136. Spence JD, Bang H, Chambless LE, Stampfer MJ (2005) Vitamin intervention for stroke prevention trial: an efficacy analysis. *Stroke* 36: 2404-9

137. Stanger O (2002) Physiology of folic acid in health and disease.
Curr Drug Metab 3: 211-23
138. Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, Fowler B, Geisel J, Dierkes J, Weger M (2003) DACH-Liga Homocystein (German, Austrian and Swiss Homocysteine Society): Consensus Paper on the Rational Clinical Use of Homocysteine, Folic Acid and B Vitamins in Cardiovascular and Thrombotic Diseases: Guidelines and Recommendations.
Clin Chem Lab Med 41: 1392-403
139. Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Trijbels FJ, Finkelstein JD, Blom HJ, Thoams CM, et al. (1994) Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neuraltubes defects?. Metabolism 43: 1475-80
140. Streck EL, Delwing D, Tayliar B, Matte C, Wannmacher CM, Wajner M, Wyse AT (2003) Brain energy metabolism is compromised by the metabolites accumulating in homocystinuria. Neurichem 43: 597-602
141. Suda T, Takahashi N, Martin TJ (1992) Modulation of osteoclast differentiation. Endocr Rev 13: 66-80
142. Takayanagi H, Juji T, Miyazaki T, Izuka H, Takahashi T, Isshiki M, Okada M, Tanaka Y, Koshihara Y, Oda H, Kurokawa T, Nakamura K, Tanaka S (1999) Suspression of arthritic bone destruction by adenovirus-mediated csk gene transfer to synoviocytes and octeoclasts. J Clin Invest 104: 147-46
143. Torgenson DJ, Campbell MK, Thomas RE, Reid DM (1996) prediction of perimenopausal fractures by bone mineral density and other risk factors.
J Bone Miner Res 11: 293-7

144. Tucker KL, Selhub J, Wilson PW, Rosenberg IH (1996) Dietary intake pattern relates to plasma folate and homocysteine concentrations in the Framingham Heart Study. *J Nutr* 126: 3025-31
145. Udugawa N, Horwood NJ, Elliot J, Mackay A, Owens J, Okamura H, Kurimoto M, Chambers TJ, Martin TJ, Gillespie MT (1997) Interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon-gamma to inhibit osteoclast formation. *J Exp Med* 185: 1005-12
146. Ueland PM, Monsen AL (2003) Hyperhomocysteinemia and B-vitamin deficiencies in infants and children. *Clin Chem Lab Med* 41: 1418-26
147. Vaananen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM (2000) The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 113: 377-81
148. Vaaraniemi J, Halleen JM, Kaarlonen K, et al. (2004) Intracellular machinery for matrix degradation in bone-resorbing osteoclasts. *J Bone Miner Res* 19: 1432-40
149. van Meurs JB, Dhounkshe-Rutten RA, Pluijm SM, van der Klift M, de Jonge R, Lindemans J, et al. (2004) Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *N Eng J Med* 350: 2033-41
150. Villadsen MM, Bunger MH, Carstens M, Stenkjaer L, Langdahl BL (2005) Methylenetetrahydrofolate reductase (MHTFR) C677T-polymorphism is associated with osteoporotic vertebral fractures, but is a weak predictor of BMD. *Osteoporos Int* 16: 411-6
151. Walker- Bone K, Walter G, Cooper C (2002) Recent developments in the epidemiology of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 14: 411-5

152. Wasnich RD, Davis JW, Ross PD (1994) Spine fracture risk is predicted by non-spine fractures. *Osteoporos Int* 4: 1-5

153. Yang Q, Bott LD, Erickson JD, Berry RJ, Sambell C, Johansen H, Freidman JM (2006) Improvement in stroke mortality in Canada and United States, 1990 to 2002. *Circulation* 113: 1335-43

154. Yoo JH, Lee SC (2001) Elevated levels of plasma homocyst(e)ine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke. *Atherosclerosis* 158: 425-30

7. Publikation/Dank

Publikationen

- 1: Herrmann M, Schmidt J, Umanskaya N, Colaianni, Al-Marrawi, Widmann T, Zallone A, Wildemann B, Herrmann W (2007) Stimulation of Osteoclast Activity by low B-Vitamin Concentrations. Bone 21.06.2007 [Epub ahead of print]
- 2: Herrmann M, Umanskaya N, Wildemann B, Colaianni G, Schmidt J, Widmann T, Zallone A, Herrmann W (2007) Accumulation of homocysteine by decreasing concentrations of folate, vitamin B(12) and B(6) does not influence the activity of human osteoblasts in vitro. Clin Chem Acta 384(1-2): 129- 34. Epub 2007 Jul 4

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von September 2005 bis Juni 2007 in der Universitätsklinik Homburg in der Abteilung klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin unter der Leitung von Prof. Dr. Wolfgang Herrmann angefertigt. Für die Auswahl und Überlassung des Themas, die Bereitstellung von Geräten und Material, sowie die Korrektur gilt Ihm mein spezieller Dank.

An dieser Stelle möchte ich mich auch recht herzlich bei Dr. Markus Herrmann für die stets umfassende und freundliche Betreuung, sowie die Korrektur dieser Arbeit bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Natalia Umanskaya für die fachlichen Ratschläge, besonders im Bereich der Resorptionsanalytik, und ihre Unterstützung.

Für die Unterstützung bei der HCy-Messung im Überstand und Korrektur des Methodikkapitels möchte ich mich bei Frau Dr. Heike Schorr und den Mitarbeitern des HPLC-Labors bedanken.

Bei den Mitarbeitern des Zentrallabors, die ich hier nicht alle namentlich nennen kann, bedanke ich mich für die Überlassung der Arbeitsgeräte.

Mein besonderer Dank gilt allen Probanden, da ohne sie und ihre großzügige Blutspendebereitschaft diese Arbeit nicht durchführbar gewesen wäre.

Ich danke herzlich meinen lieben Eltern und meinem Bruder für ihre Unterstützung und ihr Verständnis während der gesamten Zeit. Mein Vater hat durch lebhaftes Interesse an den Ergebnissen meine eigene Motivation lebendig gehalten.

8. Lebenslauf

Name:	Johannes Peter Schmidt
geboren:	10.03.1981 als jüngster Sohn von Eva Margarethe Schmidt, geborene Fischer, und Dr. med Paul Michael Schmidt.
09.1986 – 06.1991:	Grundschule Schafbrücke in Saarbrücken
08.1991 – 06.2000:	Gymnasium am Schloss in Saarbrücken
09.2000 – 06.2001:	Wehrdienst im Beobachtungspanzerartillerielehrbattalion 52 Idar-Oberstein
08.2001:	Pflegedienstpraktikum im Evangelischen Krankenhaus Saarbrücken in der Abteilung Chirurgie
09.2001 – 04.2004:	Studium der Chemie an der Universität des Saarlandes
02.2002 – 03.2002:	Pflegedienstpraktikum im Evangelischen Krankenhaus Saarbrücken in der Abteilung Chirurgie
04.2004 – 03.2005:	Studium der Humanmedizin an der Albert-Ludwig Universität Freiburg
03.2005	Physikum an der Albert-Ludwig Universität Freiburg
seit 04.2005:	Studium der Humanmedizin an der Universitätsklinik des Saarlandes/Homburg
07.2005:	Famulatur im Evangelischen Krankenhaus Saarbrücken Abteilung Chirurgie/Unfallchirurgie
seit 09.2005:	Doktorrand an der Universitätsklinik des Saarlandes/Homburg in der Abteilung klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
09.2006:	Famulatur im DRK Saarbrücken Abteilung Gynäkologie

03.2007: Famulatur in der anästhesiologischen
Gemeinschaftspraxis Frau Dr. med Frederique
Hanselmann/ Frau Barbara Müller-Mattern

08./09.2007: Famulatur in der Klinik für Neurologie der
Universitätsklinik des Saarlandes/ Homburg

