

Aus der Universitäts- Kinder- und Jugendklinik Rostock

Direktorin: Frau Prof. Dr. med. Wigger (k.)



Erstellung pädiatrischer Referenzwerte für BAP (bone-specific alkaline phosphatase), TRAP5b (tartrate-resistant acid phosphatase 5b) und Sclerostin

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von

Sabrina Wolf

geboren am 09.09.1986 in Minden

Rostock, 2014

Gutachter

1. Gutachter: Prof. Dr. med. D. Haffner,
Medizinische Hochschule Hannover, Klinik für pädiatrische
Nieren-, Leber- und Stoffwechselerkrankungen
2. Gutachter: Prof. Dr. med. habil. H.-C. Schober,
Klinikum Südstadt Rostock, Klinik für Innere Medizin
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. R. Bader,
Universitätsmedizin Rostock, Klinik für Orthopädie

Datum der Einreichung: 17.01.2014

Datum der Verteidigung: 21.10.2014

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	1
2.	Abbildungsverzeichnis	4
3.	Tabellenverzeichnis	5
4.	Einleitung	6
4.1	Das Skelett	6
4.2	Monitoring des Knochenstoffwechsels	12
4.3	Die knochenspezifische Alkalische Phosphatase (BAP)	14
4.4	Die Tartrat-resistente saure Phosphatase 5b (TRAP5b)	14
4.5	Der Knochenmarker Sclerostin	15
4.6	Bedeutung und Erstellung von Referenzwerten	19
5.	Ziel der Arbeit	20
6.	Material und Methoden	21
6.1	Design der Studie	21
6.2	Probanden	21
6.3	Anthropometrie	22
6.4	Material	23
6.5	Methoden	23
6.5.1	Quantitative Bestimmung der BAP-, TRAP5b-Aktivität und der Sclerostin-Konzentration	24
6.6	Kohortenerstellung	25
6.7	Statistische Auswertung	26

7.	Ergebnisse	28
7.1	Anthropometrie und Basis-Laboruntersuchung	28
7.2	Referenzwerte für BAP und TRAP5b gesunder Probanden	29
7.2.1	Knochenmarker als Funktion von Alter und Geschlecht	29
7.2.2	Perzentilen	30
7.2.3	Grafische Darstellung der Perzentilen	33
7.3	Referenzwerte für Sclerostin gesunder Probanden	34
7.4	Korrelation der Knochenmarker mit den anthropo- metrischen Maßen	37
7.5	Korrelation der Knochenmarker untereinander	39
7.6	Korrelation der Knochenmarker mit dem Mineralstoffwechsel	40
8.	Diskussion	41
8.1	Diskussion der angewandten Methoden und Ergebnisse	41
8.2	Knochenmonitoring mit Knochenmarkern	46
8.3	Fazit und Ausblick	47
9.	Zusammenfassung	49
9.1	Pädiatrische Referenzwerte für BAP und TRAP5b	49
9.2	Pädiatrische Referenzwerte für Sclerostin	50
9.3	Zusammenhänge der untersuchten Parameter	50
10.	Thesen	51
11.	Literaturverzeichnis	52
12.	Danksagung	61
13.	Eidesstattliche Erklärung	62

1. Abkürzungsverzeichnis

1,25(OH) ₂ D ₃	1,25-Hydroxyvitamin D ₃
AP	Alkalische Phosphatase
BAP	knochenspezifische alkalische Phosphatase
BMD	Bone Mineral Density, Knochendichte
BMI	Body-Mass-Index
BMP-2	Bone Morphogenetic Protein 2
BSP	Bone Sialoprotein, knochenspezifisches Sialoprotein
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
c-fms	colony-stimulating factor 1 receptor
CNPP	2-Chlor-4-Nitrophenylphosphat
CRP	C-reaktives Protein
CSF-1	Colony-Stimulating Factor-1
DAN	Differential screening-selected gene Aberrant in Neuroblastoma
DKK-1	Dickkopf-1
DXA	Dual-energy X-ray Absorptiometry
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ELISA	Enzyme - Linked Immunosorbent Assay
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAICEA	Fragment Absorbed Immunocapture Enzyme Assay System
FGFR	FGF-Rezeptoren

FGF	Fibroblast Growth Factor
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3 β
IL	Interleukin
LEF	Lymphoid Enhancer Factor
LRP	Low-density lipoprotein Receptorrelated Protein
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
Mef2	Myocyte enhancer factor 2
Mitf	Mikrophthalmie-assoziiierter Transkriptionsfaktor
MMP	Matrixmetalloproteinasen
NaOH	Natriumhydroxid
NF	Nuclear Factor
OPG	Osteoprotegerin
PGE $_2$	Prostaglandin E $_2$
PICP	C-terminales Propeptid des Typ-1-Prokollagens
PINP	N-terminales Propeptid des Typ-1-Prokollagens
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PTH	Parathormon
PTH1R	PTH-1-Rezeptor
QCT	Quantitative Computertomografie
RANK	Rezeptor für sRANKL
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies

Runx2	Runt-related transcriptionfactor 2
SD	Standardabweichung
SDS	Standard-Deviation-Scores
sRANKL	löslicher (soluble) Rezeptor-Aktivator des NF- κ B Liganden
TAG	Triacylglycerole
TCF	T-Zell Faktor
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TmP/GFR	Tubuläres Transportmaximum
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAP5b	Tartrat-resistente saure Phosphatase 5b
VC	Varationskoeffizient
WG	Wachstumsgeschwindigkeit
Wnt	Kombination der Gene Wingless und Integration 1
ZNS	zentrales Nervensystem

2. **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1:	Darstellung des Osteoklasten in der Howship-Lakune	9
Abb. 2:	Vereinfachte Darstellung des WNT-Signalwegs	16
Abb. 3:	Rolle des Sclerostins im Knochenstoffwechsel	17
Abb. 4:	PTH-Regulation der Sclerostin-Synthese im Osteozyt	18
Abb. 5a:	Die Aktivitäten von BAP und TRAP5b in Abhängigkeit vom Alter	30
Abb. 5b:	Die Aktivitäten von BAP und TRAP5b in Abhängigkeit vom Alter mit Perzentilen	33
Abb. 6:	Daten für Sclerostin in Abhängigkeit vom Alter	34
Abb. 7:	Sclerostinkonzentration in Abhängigkeit von der relativen Häufigkeit	35
Abb. 8:	Daten für Sclerostin in Abhängigkeit vom Alter mit Perzentilen	36
Abb. 9:	BAP und TRAP5b als Funktion des Alters im Vergleich zur Wachstumsgeschwindigkeit als Funktion des Alters	38
Abb. 10:	Korrelation zwischen BAP bzw. TRAP5b und Sclerostin	39
Abb. 11:	Korrelation zwischen absoluten bzw. standardisierten Werten der Marker BAP mit TRAP5b	39

3. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Regulation des Knochenremodellings	12
Tab. 2:	Charakteristika der verwendeten Tests	25
Tab. 3:	Größe, Gewicht und BMI + SDS	28
Tab. 4a:	Altersspezifische LMS-Werte und Perzentilgrenzen für die BAP-Konzentration bei den männlichen Probanden	31
Tab. 4b:	Altersspezifische LMS-Werte und Perzentilgrenzen für die BAP-Konzentration bei den weiblichen Probanden	31
Tab. 5a:	Altersspezifische LMS-Werte und Perzentilgrenzen für die TRAP5b-Konzentration bei den männlichen Probanden	32
Tab. 5b:	Altersspezifische LMS-Werte und Perzentilgrenzen für die TRAP5b-Konzentration bei den weiblichen Probanden	32
Tab. 6:	Perzentilen von Sclerostin	36
Tab. 7:	Korrelationen der anthropometrischen Maße mit BAP und TRAP5b	37
Tab. 8:	Vergleich der veröffentlichten Referenzwerte von BAP und TRAP5b	44
Tab. 9:	Vergleich veröffentlichter pädiatrischer Sclerostinkonzentrationen	45

4. Einleitung

4.1 Das Skelett

Das Skelett besteht als ein komplexes Ganzkörperorgan aus Knorpel- und Knochengewebe [Karsenty, 2003]. Die extrazelluläre Matrix (EZM) des Knochens hat ein organischen Grundgerüst (ca. 10%) mit darin eingelagertem Wasser (ca. 10%) und Hydroxylapatit (ca. 80% der EZM). Der organische Anteil des Knochens setzt sich vorwiegend aus Kollagen-Typ-1, Proteoglycanen, Osteocalzin, Osteonektin, Osteopontin, lysosomalen Enzymen und Fibronectin zusammen [Löffler, 2007]. Während die Matrix die Form definiert, sorgt der Hydroxylapatit für Stabilität und Belastbarkeit. Damit wird maximale Festigkeit bei minimaler Masse gewährleistet und das Skelett gibt dem Organismus sowohl Form als auch Halt, schützt die inneren Organe und das zentrale Nervensystem (ZNS) vor äußeren Einflüssen und stellt den Raum für die Hämatopoese bereit [Boyle et al., 2003; Kronenberg, 2003]. Darüber hinaus ist der Knochen als endokrines Organ aktiv in nahezu alle Stoffwechselprozesse eingebunden, fungiert zugleich als Quelle und Speicher für Calcium und Phosphat und trägt hierdurch wesentlich zur Homöostase dieser Ionen bei [Dallas et al., 2013].

Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten sind in die EZM eingelagert und ihr Zusammenspiel ist für den geregelten Knochenumsatz und damit auch für den kontrollierten Auf- und Abbau der Knochensubstanz verantwortlich. Die Osteoblasten sind als mesenchymale Zellen für den Aufbau und die der hämatopoetischen Zellreihe entstammenden Osteoklasten für den Abbau des Knochens verantwortlich. Die durch terminale Differenzierung der Osteoblasten entstehenden Osteozyten übernehmen mit ihren Dendriten die Funktion eines Mechanosensors [Boyle et al., 2003; Harada and Rodan, 2003; Hartmann, 2009; Kramer et al., 2010; Zaidi, 2007].

Osteoblasten synthetisieren und sezernieren den organischen Anteil der EZM (Osteoid) und regulieren die nachfolgende Mineralisation [Harada and Rodan, 2003; Khosla, 2001; Singer and Eyre, 2008; Zaidi, 2007]. Das primär sezernierte Typ-1-Prokollagen wird durch enzymatische Abspaltung der C- und N-terminalen Propeptide (PICP und PINP) zu reifem Kollagen-Typ-1. Dieses bildet nach entsprechender Reifung und kovalenter Quervernetzung, die Kollagenfibrillen als Grundgerüst der EZM [Löffler, 2007]. Die knochenspezifische alkalische

Phosphatase (BAP) sorgt für die weitere Reifung der EZM und die Bildung des mineralisierbaren Osteoids. Bone Sialoprotein (BSP) – ein Strukturprotein, welches die Bindung der Osteoblasten an Hydroxylapatit vermittelt – sowie Osteonectin und Osteocalcin – als Calcium-bindende Strukturproteine – tragen zur kontrollierten Calcifizierung der EZM bei [Ganss et al., 1999].

Sobald ein Osteoblast von Osteoid eingeschlossen ist, wird er zum enddifferenzierten und nicht mehr teilungsfähigen Osteozyten [Bonewald, 2011; Dallas et al., 2013]. Er ist mit einer durchschnittliche Lebensdauer von 10 Jahren eine der langlebigsten Zellen im menschlichen Körper, hat einen Durchmesser von 9-20 µm und stellt ca. 90% aller Zellen im Knochen [Dallas et al., 2013; Kramer et al., 2010]. Es wird angenommen, dass etwa 20-30% aller Osteoblasten sich zu Osteozyten weiterentwickeln, während die übrigen Zellen sich entweder zu den im Periost vorkommenden „lining cells“ (mit der ähnlichen Funktion wie die Osteozyten) differenzieren oder durch Apoptose untergehen [Bonewald, 2011; Noble, 2008].

Die Kommunikation und der Nährstoffaustausch der Osteozyten sind über ein Netzwerk von Zellfortsätzen (Canaliculi) und Gap Junctions möglich. Jeder Osteozyt hat 40-60 Zellfortsätze an dem in einer 15-20 µm großen Lakune liegenden Zellkörper und der Zell-zu-Zell-Abstand untereinander beträgt durchschnittlich 20-30 µm [Dallas et al., 2013; Kramer et al., 2010; Löffler, 2007; Noble, 2008]. Die Osteozyten sind bezogen auf die Auf- und Umbauprozesse des Knochens relativ inaktiv, haben aber die Aufgabe, über weite Strecken durch die Transmission von Signalen zu kommunizieren. In dieser Hinsicht ist das Netzwerk der Osteozyten mit dem der Neurone vergleichbar, denn beide sind durch Dendriten bzw. Neuriten über weite Strecken verbunden [Noble, 2008]. Der Kommunikationsweg der Osteozyten reicht von der Knochenoberfläche („lining cells“) bis ins Knochenmark und die angrenzenden Gefäße, was die Ernährung des Knochens sicherstellt. Damit ist auch die Basis für die autokrine und endokrine Funktion des Osteozyten als Autoregulator des Knochenremodellings gegeben. Hier ist neben der Regulation der Phosphathomöostase durch Fibroblast Growth Faktor (FGF) 23 insbesondere der Botenstoff Sclerostin zu nennen [Dallas et al., 2013].

Es wird vermutet, dass sich die mechanische Beanspruchung in Flüssigkeitsbewegungen um den osteozytären Dendriten übersetzt und hierdurch

membranständige Mechanosensoren aktiviert werden [Dallas et al., 2013; Weinbaum et al., 1994]. Dieser Mechanismus könnte erklären, wie der Osteozyt auf die Belastung des Knochens reagiert und gegebenenfalls den Knochenumbau zur Stärkung der beanspruchten Stellen initiiert.

Die knochenabbauenden Osteoklasten haben einen Durchmesser von 50-100µm, sind bewegungsfähige, mehrkernige (15-20 Nuklei) Riesenzellen und spezialisierte Makrophagen. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Resorption der Knochenmatrix und damit auch in der Freisetzung von Calcium und Phosphat [Harada and Rodan, 2003]. Osteoklasten sind durch einen Ring aus Osteopontinen an der Knochenoberfläche fixiert und in kleinen, selbst abgetragenen Gruben lokalisiert. Durch diese feste Bindung an den Knochen entsteht ein Resorptionsraum unterhalb des Osteoklasten (Resorptionslakune bzw. Howship-Lakune). Das Cytoplasma der Osteoklasten ist homogen-schaumig, was durch die hohe Anzahl von Vesikeln und die mit lysosomalen Enzymen und endozytierten Abbauprodukten gefüllten Vakuolen bedingt ist. Im Zustand der aktiven Knochenresorption zeichnet sich der Osteoklast durch seinen charakteristischen basalen Faltensaum aus, welcher für eine vergrößerte Kontaktfläche zwischen dem Osteoklasten und der Knochenoberfläche sorgt [Holtrop and King, 1977; Singer and Eyre, 2008].

Der Osteoklast produziert mit Hilfe der Carboanhydrase Protonen und sezerniert sie gegen das Konzentrationsgefälle über den basalen Faltensaum in den subosteoklastären Spalt. Dort baut sich folglich ein saurer pH-Wert (4,5) auf, der für die Demineralisierung der Knochenmatrix verantwortlich ist und für die osteoklastären Proteasen ihr pH-Optimum schafft [Boyle et al., 2003; Everts et al., 2006]. Die vom Osteoklasten synthetisierten lysosomalen Enzyme Cathepsin K, verschiedene Matrixmetalloproteinasen und die Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP5b) sind für den Abbau der organischen und anorganischen Matrix zuständig. Die Abbauprodukte werden von dem Osteoklasten endozytiert und in die Blutbahn abgegeben [Boyle et al., 2003].

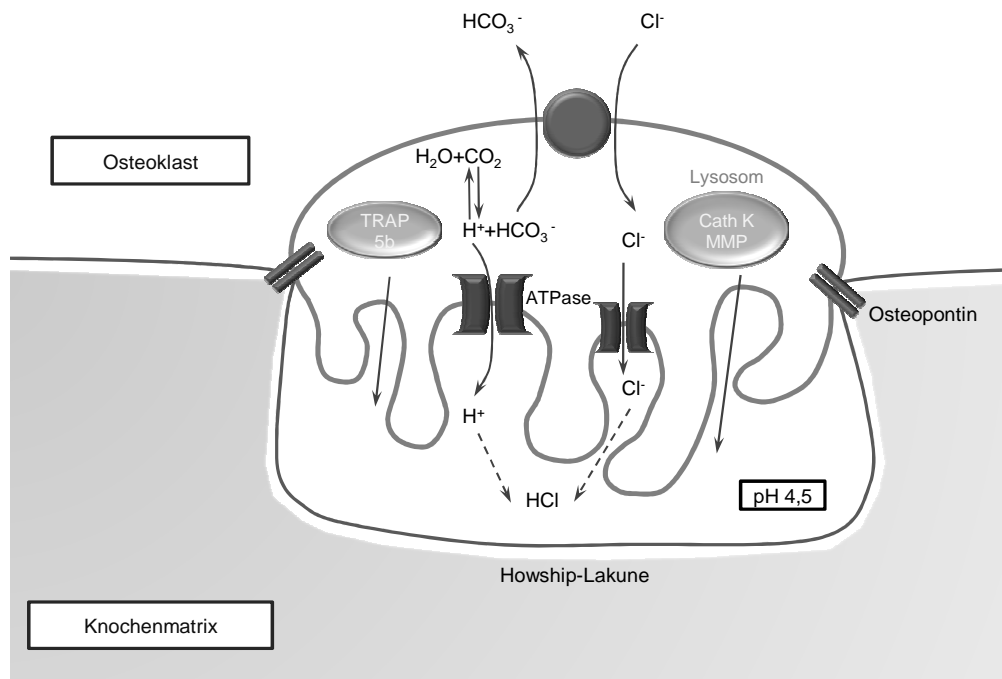


Abb. 1: Darstellung des Osteoklasten in der Howship-Lakune.

Der Osteoklast synthetisiert HCl (Salzsäure) und lysosomale Enzyme (β -Catherin, MMP, TRAP5b). Osteopontin befestigt den Osteoklasten am Knochen.

(Modifiziert nach Löffler et al. 2007)

Die Reifung der Osteoblasten und Osteoklasten aus mesenchymalen und hämatopoetischen Stammzellen erfolgt in einem abgestimmten Prozess. Nach Induktion der Osteoblastogenese durch den Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF), steht die durch die Proteine sRANKL (löslicher Rezeptor-Aktivator des Nuklearen Transkriptionsfaktors κB (NF- κB) Liganden), RANK (Rezeptor für sRANKL) und Osteoprotegerin (OPG) vermittelte Interaktion von Osteoblasten und Osteoklasten für die weitere Reifung der Osteoklasten im Mittelpunkt [Harada and Rodan, 2003; Khosla, 2001; Kramer et al., 2010; Kronenberg, 2003; Malyankar et al., 2000; Singer and Eyre, 2008; Zaidi, 2007].

OPG und sRANKL sind Mitglieder der Tumornekrosefaktor-(TNF)-Familie und werden von Osteoblasten synthetisiert. Die Osteoklastendifferenzierung wird durch die Bindung von sRANKL und RANK, welcher auf der Oberfläche der Preosteoklasten exprimiert ist, initiiert. Durch diese Bindung wird die Reifung der Osteoklasten und schließlich auch die Freisetzung von u.a. TRAP5b, CathepsinK,

Calcitoninrezeptoren und Integrinen induziert und zusätzlich die Apoptose der Zelle verhindert [Boyle et al., 2003; Fuller et al., 1998]. Die Osteoklastendifferenzierung wird durch die OPG-Synthese der Osteoblasten gehemmt. OPG dient sowohl als löslicher und hemmender Rezeptor für sRANKL, als auch als direkter Inhibitor des osteoklastenständigen RANKs [Boyle et al., 2003; Khosla, 2001]. Dieses komplexe und voneinander abhängige System verhindert einen unkontrollierten Knochenumsatz.

Die Osteoblastogenese, die Osteoblastenproliferation und die Mineralisation der Knochenmatrix werden vom Wnt-Signalweg kontrolliert, indem über die Wnt-induzierte Genexpression von RANK (Osteoklast) und sRANKL (Osteoblast) und die verminderte Expression von OPG (Osteoblast) auch die Reifung der Osteoklasten beeinflusst wird [Chung et al., 2012; Kramer et al., 2010; Kubota et al., 2009].

Die Wnt-induzierte Aktivierung des cysteinreichen Proteins LRP5/6 (low-density lipoprotein receptorrelated protein) und des Frizzled-Rezeptors hemmt die Glykogen Synthase Kinase 3β (GSK 3β). Damit kommt es zur Akkumulation von β -Catherin, welches in den Zellkern diffundiert und an der Enhancerregion des Transkriptionsfaktors TCF/LEF (T-Zell Faktor/ lymphoid enhancer factor) bindet. Dies führt dann zu der Induktion des Knochenaufbaus [Kubota et al., 2009].

Das Skelett ist aktiv an unterschiedlichen Stoffwechselprozessen im ganzen Organismus beteiligt und befindet sich durch das kontinuierliche Wechselspiel von Osteoblasten und Osteoklasten auch nach der Vollendung des Wachstums in einem ständigen Auf- und Umbauprozess. Dieser wird sowohl von außen hormonell gesteuert, als auch vom Knochen selbst über die Ausschüttung von Regulationsproteinen beeinflusst [Boyle et al., 2003; Harada and Rodan, 2003; Zelzer and Olsen, 2003]. Systemische Faktoren, wie Wachstumshormone, Schilddrüsenhormone, Sexualhormone und Glucocorticoide haben Einfluss auf den Knochenstoffwechsel [Kronenberg, 2003].

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht die Regulation des Calcium- und Phosphathaushalts durch Parathormon (PTH), 1,25-Hydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃, Calcitriol), Calcitonin, FGF23 und Klotho.

PTH, ein von der Glandula parathyreoidea ausgeschüttetes Hormon, steigert die Aktivität und Proliferation der Osteoblasten. Damit steigt sekundär auch die Proliferation und Aktivität der Osteoklasten und letztlich die Freisetzung von

Calcium und Phosphat aus dem Knochen [Kubota et al., 2009; van Bezooijen et al., 2005]. PTH wird ausgeschüttet, wenn der calciumsensitive Rezeptor der Nebenschilddrüse durch einen Abfall der Calciumkonzentration aktiviert ist. Zudem stimuliert PTH die renale 1α -Hydroxylase und damit die Synthese von Calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$). Calcitriol und PTH wirken auf die Ausreifung der Osteoklasten synergistisch. In den Mukosazellen des Dünndarms stimuliert Calcitriol die Synthese calciumbindender Proteine (Calbindin) und damit auch die Calciumresorption. Zudem fördert es die Phosphatresorption durch die intestinale Mukosa, steigert die PTH-abhängige Calciumrückresorption in der Niere und fördert bei erhöhtem Phosphatspiegel dessen Ausscheidung über die Niere [Dusso et al., 2004; Quarles, 2008].

Steigt der Calciumspiegel über den gegebenen Normalwert von 2,65 mmol/L (bei Erwachsenen) an, so wird Calcitonin aus den C-Zellen der Schilddrüse ausgeschüttet, um die Calciumfreisetzung aus dem Knochen zu hemmen. Parallel stimuliert Calcitonin die Calciumausscheidung über Darm und Niere. Zudem hemmt Calcitonin die Rückresorption von Phosphat im proximalen Tubulus. Calcitonin ist somit der Gegenspieler von PTH [Harada and Rodan, 2003; Karsenty, 2003].

FGF23 wird in Perizyten-ähnlichen Zellen der venösen Gefäße des Knochenmarks, der ventrolateralen Thalamuskern, des Thymus und der Lymphknoten, vor allem aber von Osteoblasten und Osteozyten sezerniert und ist ein wichtiger Regulator des Phosphat-, Vitamin D- und PTH-Haushalts [Noble, 2008; Quarles, 2008]. Das 23. Mitglied der FGF-Familie bindet mit dem Cofaktor Klotho an den FGF-Rezeptoren 1, 3 und 4 der Targetzellen und stimuliert die renale Phosphatausscheidung, hemmt die renale 1α -Hydroxylase und die PTH-Freisetzung aus der Nebenschilddrüse [Dallas et al., 2013; Gutierrez et al., 2008; Nakai et al., 2010; Quarles, 2008]. FGF23 selbst wirkt hemmend auf die Klotho-Synthese, sodass bei steigenden Serumspiegeln die Aktivierbarkeit der FGF-Rezeptoren sinkt und stellt somit einen vom Knochengewebe ausgehenden Regulator des Knochenstoffwechsels dar [Quarles, 2008].

Durch mechanische Beanspruchung, die gerade im Kindesalter einen der wichtigsten Regulatoren des Knochenstoffwechsels darstellt, werden Osteozyten aktiviert, die daraufhin die strukturelle Verstärkung physikalisch beanspruchter Stellen durch Erhöhung der Knochendichte vermitteln [Harada and Rodan, 2003].

Weitere Einflussgrößen auf den Knochenstoffwechsel sind in *Tabelle 1* zusammengefasst.

Tabelle 1: Regulation des Knochenremodellings (nach Harada et al. 2003)

Knochenformation	
	aktivierend: BMP, LRP5/Wnt, β -Blocker, PTH, mechan. Belastung, Androgene, Calcitriol hemmend: Sclerostin, Leptin, Immobilisation, (Alter)
Knochenresorption	
	aktivierend: Östrogendefizit, Immobilisation, Hypocalcämie hemmend: Östrogene, Testosteron, SERMs, Bisphosphonate, Calcitonin, Hypercalcämie, TNF, IL-1, IL-6 Calcitriol

4.2 Monitoring des Knochenstoffwechsels

Die Aktivität des Knochenumbaus variiert in Abhängigkeit vom Alter. Während der Wachstumsphasen im Kindes- und Jugendalter überwiegt der Knochenaufbau. Im Alter von 30 Jahren ist die größte Knochenmasse („peak bone mass“) und ein Gleichgewicht von Knochenauf- und -abbau erreicht. 10% der Knochenmasse werden in diesem Lebensabschnitt pro Jahr durch den ständigen Umbau ausgetauscht. Mit zunehmendem Alter und den damit verbundenen hormonellen Veränderungen überwiegt der Knochenabbau.

Der Knochenstoffwechsel wird sowohl endokrin, als auch durch Wechselwirkungen zwischen Zellen und EZM reguliert. Daher ist dieses System auf vielfältige Weise aus dem Gleichgewicht zu bringen und langanhaltende Störungen können die Funktion des Skeletts nachhaltig beeinträchtigen.

Sowohl primäre Erkrankungen des Knochens, wie z.B. Rachitis, akute oder chronische Entzündungen des Knochens, als auch Erkrankungen von Schilddrüse, Nebenschilddrüse oder Niere können den Knochenstoffwechsel sekundär beeinflussen und damit insbesondere bei Kindern und Jugendlichen das Wachstum hemmen. Daher sollten Knochenerkrankungen gerade bei Kindern frühzeitig diagnostiziert und therapiert werden.

Das Monitoring des Knochenstoffwechsels ist wünschenswert, bleibt aber weiterhin eine diagnostische Herausforderung. Das liegt zum Teil daran, dass

bislang nur einige „Knochenmarker“ identifiziert wurden, deren Aktivität und/oder Konzentration den Zustand des Skeletts widerspiegeln. Andererseits wurde und wird Knochengesundheit häufig auf Grundlage des Mineralgehalts (Bone Mineral Density, BMD) festgelegt. Mineralgehalt und Mikrostruktur des Knochens können recht zuverlässig mit röntgenbasierten Techniken (dual-energy x-ray absorptiometry, Dual-Röntgen-Absorptiometrie, DXA und periphere quantitative Computertomographie, pQCT) erfasst werden, allerdings verbietet die Strahlenbelastung häufige Wiederholungen. Außerdem liefert die DXA keine physikalische Knochendichte, sondern gibt lediglich Informationen über die Flächendichte und die Parameter ändern sich nur langsam. Daher sind in den letzten Jahren zunehmend „Knochenmarker“ in den Blickpunkt gerückt, auf Grundlage derer zusätzlich eine differenzierte Aussage über Knochenauf- und Abbau getroffen werden kann [Garnero, 2009; Seibel et al., 2001; Singer and Eyre, 2008]. Hier sind neben den bei der Synthese und Reifung des Kollagens freigesetzten Abbauprodukten vor allem BAP, TRAP5b, Sclerostin und FGF23 zu nennen [Fischer et al., 2012]. Ähnlich wie bei klinischen Tests zur Leberfunktion wird auch hier versucht, durch Kombination verschiedener Marker eine Beschreibung der Organfunktion zu erreichen [Kleerekoper, 2001].

An einen idealen Marker werden Ansprüche wie leichte Zugänglichkeit des Probenmaterials, Praktikabilität, Preisgünstigkeit, geringe biologische Varianz, Standardisierbarkeit, hohe Spezifität, hohe Sensitivität, gute Stabilität und hohe Prädikativität gestellt [Havmoller and Chugh, 2012; Schmitz et al., 2008].

4.3 Die knochenspezifische Alkalische Phosphatase (BAP)

Die alkalische Phosphatase (AP) spaltet Phosphorsäureester und kommt in gewebsspezifischen, sich in der Glykosylierung unterscheidenden Isoformen vor. Eine dieser Isoformen ist die von *Osteoblasten* synthetisierte knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP) [Singer and Eyre, 2008]. Die BAP-Serumkonzentration ist unabhängig von circadianer Rhythmik und Nahrungsaufnahme und repräsentiert die Osteoblastenaktivität [Dresner-Pollak et al., 1996; Ginty et al., 1998; Mora et al., 2009; Singer and Eyre, 2008; Swaminathan, 2001; Tobiume et al., 1997]. Zudem konnte gezeigt werden, dass erhöhte Konzentrationen von BAP auf einen erhöhten Knochenumsatz hinweisen [Ross and Knowlton, 1998; Seibel et al., 2001].

4.4 Die Tartrat-resistente saure Phosphatase 5b (TRAP5b)

Die Tartrat-resistente saure Phosphatase 5b (TRAP5b) ist ein 35-37 kDa schweres, von den Osteoklasten synthetisiertes Glykoprotein. *Osteoklasten* endozytieren die Abbauprodukte aus der Howship-Lakune und fusionieren diese Resorptionsvesikel mit TRAP5b enthaltenden Vesikeln, um einen vollständigen Abbau der Matrixfragmente zu erreichen [Hößling, 2008; Salo et al., 1997]. Die TRAP5b spaltet zum einen Phosphatgruppen bei saurem pH, zum anderen generiert sie bei neutralem pH-Wert reaktive Sauerstoffspezies (ROS).

Neben TRAP5b existiert das in Makrophagen und dendritischen Zellen gebildete Isoenzym TRAP5a. Beide Phosphatasen bilden einen Komplex mit Calcium im Serum, unterscheiden sich jedoch im pH-Optimum (TRAP5a: pH 5,2; TRAP5b: pH 5,8) und in ihrer Zusammensetzung. TRAP5a enthält zusätzlich Sialinsäure und hat eine deutlich niedrigere Enzymaktivität [Halleen et al., 2000; Hößling, 2008].

Auch hohe Serumkonzentrationen von TRAP5b weisen auf aktives Knochenremodelling hin [Halleen et al., 2001; Nishizawa et al., 2008; Terpos et al., 2003]. Dieser Knochenmarker ist hochspezifisch für Osteoklasten und unabhängig vom Abbau des Kollagen-Typ-1. Seine Konzentration ist proportional zur Osteoklastenanzahl, da er auch sezerniert wird, wenn der Osteoklast nicht aktiv Knochenmatrix abbaut [Hannon et al., 2004; Shidara et al., 2008]. Der Abbau von TRAP5b erfolgt ausschließlich über die Leber, sodass eine Niereninsuffizienz keinerlei Auswirkung

auf die Konzentration des aktiven Enzyms im Blut hat [Woitge et al., 1999; Yamada et al., 2008]. Die zirkadiane Rhythmik und die Nahrungsaufnahme zeigen kaum Einfluss auf die TRAP5b-Serumkonzentration [Hannon and Eastell, 2000; Hannon et al., 2004; Shidara et al., 2008].

4.5 Der Knochenmarker Sclerostin

Sclerostin ist ein Glykoprotein der DAN-Familie (Differential screening-selected gene Aberrant in Neuroblastoma) [ten Dijke et al., 2008; van Bezooijen et al., 2004]. Es wird von enddifferenzierten *Osteozyten* sezerniert, wirkt hemmend auf den Knochenstoffwechsel und verhindert die Autolyse der Osteozyten [Kramer et al., 2010].

Defekte des SOST-Gens (Sclerostingen: 17q12-21) sind Ursache des Van-Buchem-Syndroms und der Sclerostose [Wergedal et al., 2003]. Diese seltenen Krankheitsbilder zeichnen sich vor allem durch eine Hyperostose im Kiefer- und Schädelbereich aus und führen im Verlauf zu einem erhöhten intrakraniellen Druck. Im Bereich des Nervus Facialis, Nervus Vestibulocochlearis und des Nervus Olfactorius kann es dadurch zu neurologischen Ausfällen kommen [van Bezooijen et al., 2005]. Die Symptomatik ist bei dem Van-Buchem-Syndrom weniger stark ausgeprägt als bei der Sclerostose [Kramer et al., 2010; Moester et al., 2010].

Sclerostin hemmt den Wnt-Signalweg über einen noch nicht vollständig geklärten Mechanismus [Klaus and Birchmeier, 2008]. Wahrscheinlich ist eine kompetitive Bindung von Sclerostin alleine oder in Gegenwart bislang noch nicht identifizierter Co-Faktoren an den LRP5/6 Rezeptor, wodurch β -Catherin nicht mehr von der GSK3 β phosphoryliert und proteosomal degradiert würde (vgl. *Abbildung 2*) [Garcia-Martin et al., 2012].

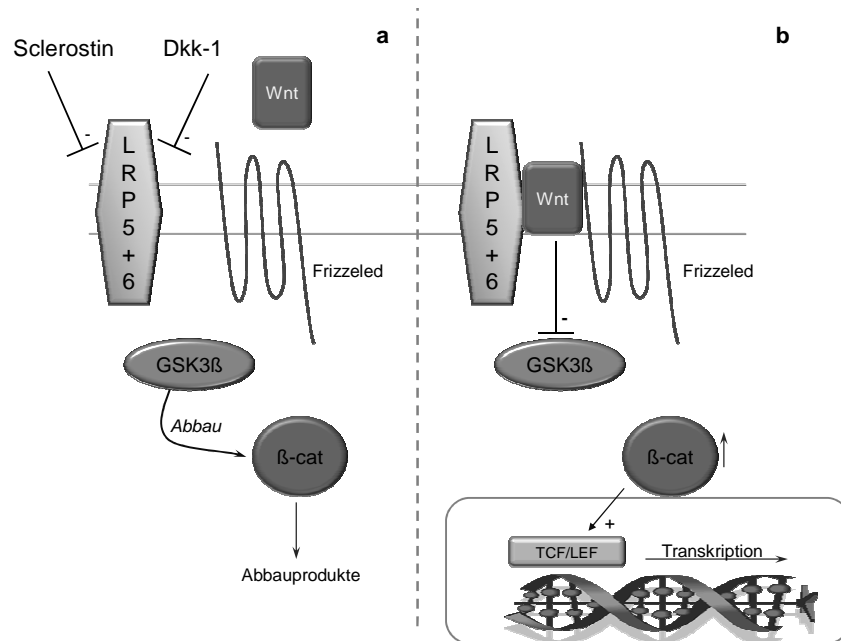


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung des WNT-Signalwegs.

a) In der Abwesenheit von Wnt oder durch zusätzliche Bindung von Sclerostin oder Dkk-1 wird β -Catherin von GSK3 β phosphoryliert und im Proteasom abgebaut. b) Bindet Wnt an LRP5/6 und dem CoRezeptor Frizzeled, wird GSK3 β gehemmt, β -Cat reichert sich an und über Bindung am TCF/LEF-Enhancer werden Gene transkribiert. (Modifiziert nach Kubota et al. 2009)

Die Auswirkungen von Sclerostin auf den Knochenstoffwechsel sind in *Abbildung 3* zusammengefasst [Galli et al., 2010; Kubota et al., 2009; Li et al., 2005; Semenov et al., 2005; ten Dijke et al., 2008].

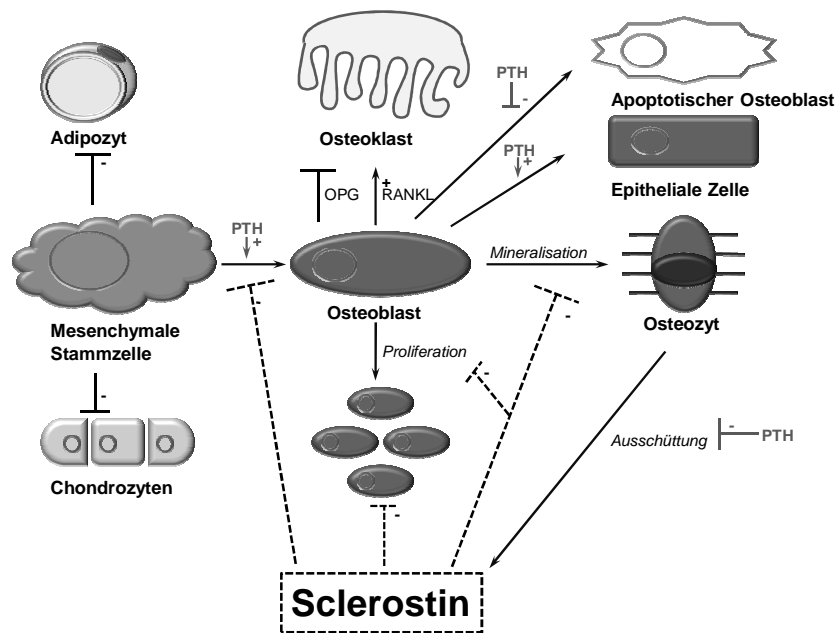


Abb. 3: Rolle des Sclerostins im Knochenstoffwechsel.

Sclerostin (Funktion in gestrichelter Linie dargestellt) hemmt die Osteoblastendifferenzierung aus mesenchymalen Stammzellen, wodurch diese sich vermehrt in Adipozyten und Chondrozyten differenzieren. Sclerostin hemmt die Osteoblastenproliferation und Mineralisation und damit auch die Entstehung von Osteozyten, hemmt die Entstehung der epithelialen Zellen und fördert die Apoptose der Osteoblasten. Es aktiviert die Osteoklastendifferenzierung durch Senkung der OPG/RANKL Ratio. PTH wirkt antagonistisch zum Sclerostin. (Modifiziert nach Kubota et al. 2009)

Anders als ursprünglich vermutet, antagonisiert Sclerostin kaum den BMP-Signalweg. Vielmehr wird davon ausgegangen, dass über einen noch nicht bekannten Mechanismus eine Interaktion mit dem Wnt-Signalweg besteht und hierüber die Hemmung des Knochenremodellings entsteht [Kramer et al., 2010; Moester et al., 2010; ten Dijke et al., 2008; van Bezooijen et al., 2005].

Sclerostin ist ein Marker des ruhenden Knochens. Registrieren die Osteozyten eine vermehrte mechanische Beanspruchung, wird die Expression von Sclerostin reduziert und das Knochenremodelling kann stattfinden [Galli et al., 2010; Kramer et al., 2010; Moester et al., 2010].

Auch die Sclerostinsekretion wird von PTH, als Induktor des Knochenstoffwechsels reguliert. Die Bindung zwischen PTH und dem PTH-1-

Rezeptor (PTH1R) des Osteozyten aktiviert über einen G_s -Protein-Komplex die Adenylatcyclase mit nachfolgender Hemmung der SOST-Genexpression und Senkung der Sclerostinkonzentration (Vgl. *Abbildung 4*) [Bellido et al., 2005; Keller and Kneissel, 2005; Kramer et al., 2010].

Umgekehrt stimuliert Calcitriol die Sclerostinfreisetzung am Knochen [Moester et al., 2010; Sutherland et al., 2004].

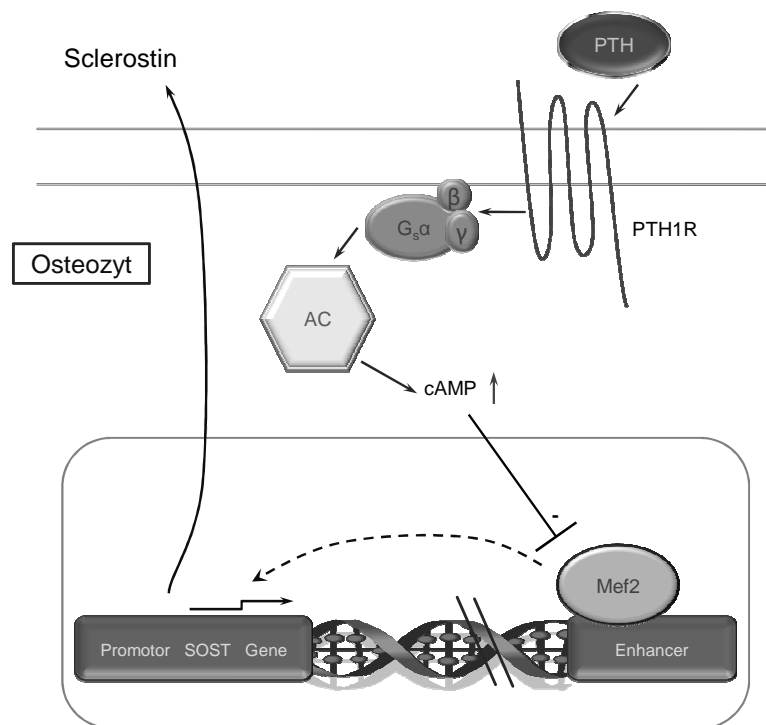


Abb. 4: PTH-Regulation der Sclerostin-Synthese im Osteozyt.

PTH bindet am PTH1R und aktiviert den cAMP-Signalweg. Der Transkriptionsfaktor Mef2 wird inhibiert, die Verstärkung des Ablesens der SOST-Gen-Region gehemmt. (Modifiziert nach Kramer et al. 2010)

4.6 Bedeutung und Erstellung von Referenzwerten

Biomarker des Knochenstoffwechsels sollen Rückschlüsse auf den Knochenstoffwechsel erlauben, dazu beitragen, pathologische Veränderungen möglichst frühzeitig zu erkennen und den Therapieerfolg zu überprüfen. Dazu sind Referenzwerte notwendig. An ein stabiles Referenzkollektiv sind besondere Ansprüche zu stellen, um eine gute Vergleichsgrundlage zu bilden. Es ist wichtig ein möglichst großes und breites Kollektiv zu untersuchen, das den Querschnitt der zu betrachtenden Bevölkerungsgruppe repräsentiert. Es müssen für alle Probanden die gleichen Voraussetzungen gelten (Ein- und Ausschlusskriterien) und die Biomarker müssen mit gleichen Methoden und unter gleichen Umständen, die für die spätere Anwendung in der Patientenversorgung gelten, bestimmt werden.

Wurde eine ausreichend große Zahl von Messungen durchgeführt, können Grenzbereiche erfasst werden [Solberg, 1987]. Zusätzlich generierte Perzentilen sortieren den Normbereich weiter entsprechend der Häufigkeitsverteilung der Messwerte und helfen somit den Bezug der Werte untereinander herzustellen und sie einzuordnen [Cole and Green, 1992]. In einem weiteren Schritt müssen mögliche physiologische Co-Variaten identifiziert werden.

Erst dann kann festgestellt werden, ob der Marker signifikant von der jeweils betrachteten Erkrankung beeinflusst wird und ab wann es sich um pathologische Veränderungen handelt. Referenzwerte bilden eine einheitliche Vergleichsbasis für den klinischen Alltag. Darüber hinaus können mit Hilfe der Normwerte die erstellten Z-Scores (bzw. die Perzentilen) im Rahmen von klinischen Studien als Zielvariable eingesetzt werden. Ohne Verwendung von Z-Scores ist aufgrund der Altersabhängigkeit keine Evaluierung von Studiendaten möglich.

5. Ziel der Arbeit

Die im Serum messbare Konzentration oder Aktivität knochenspezifischer Proteine (Knochenmarker) sind für den klinischen Alltag insbesondere deshalb interessant, weil sie möglicherweise ein Monitoring des Knochenremodellings ermöglichen. Eine wichtige Voraussetzung für diese Anwendung sind Referenzwerte gesunder Probanden.

Im Rahmen dieser Studie sollen pädiatrische Referenzwerte für

BAP als spezifischer Knochenmarker des Knochenaufbaus und Repräsentant der Osteoblasten,

TRAP5b als spezifischer Knochenmarker des Knochenabbaus und Repräsentant der Osteoklasten, und

Sclerostin als spezifischer Knochenmarker des ruhenden Knochens und Repräsentant der Osteozyten erstellt werden.

Das umfasst auch die Frage nach dem Einfluss des Geschlechts, der Beeinflussung durch das Wachstum und möglichen Assoziationen zwischen den Markern

6. Material und Methoden

6.1 Design der Studie

Die prospektive Querschnittstudie diente dem Aufbau einer pseudonymisierten Serumbank gesunder Kinder und Jugendlicher für die Erstellung pädiatrischer Referenzwerte. Das Studienprotokoll wurde im Januar 2008 der Ethikkommission vorgelegt und unter dem Geschäftszeichen HV-2009-003 genehmigt.

Der Zeitraum der Datensammlung und Auswertung betrug zweieinhalb Jahre.

6.2 Probanden

Es konnten insgesamt 424 Kinder, Jugendliche und junge Erwachsene (davon 221 männlich) im Alter zwischen 0,1 – 21 Jahren (mittleres Alter: 11,2 Jahre) in die Studie eingeschlossen werden. 338 Probanden konnten in der Ambulanz der Universitäts- Kinder- und Jugendklinik in Rostock bei elektiver Vorstellung zur Abklärung von epileptischen Anfällen, orthostatischen Problemen, Enuresis oder vor kleineren operativen Eingriffen (z.B. Hernienchirurgie oder Zirkumzision) rekrutiert werden. Zusätzlich konnten in der Christophorus-Schule in Rostock 86 gesunde Probanden im Alter zwischen 7 und 18 Jahren gewonnen werden.

Vor der Teilnahme wurde jeder Proband altersgerecht und ausführlich über Nutzen, Risiken und Durchführung der Studie aufgeklärt. Eine Einverständniserklärung wurde sowohl von den Teilnehmern selbst, als auch von dem Erziehungs- und / oder Sorgeberechtigten bei minderjährigen Probanden unterzeichnet. Es gab für die Probanden – neben den mit einer Blutentnahme verbundenen Risiken, wie die erhöhte Infektionsgefahr und Verletzung der umgebenden Gewebe – keine zusätzlichen Risiken oder Kosten durch die Studienteilnahme.

- Einschlusskriterien:

- Alter von 0 – 21 Jahre

- Ausschlusskriterien:
 - akute oder chronische entzündliche oder infektiöse Erkrankungen
 - Leber-, Nieren- oder Herzinsuffizienz
 - große Proteinurie (>300 mg/l)
 - Zystische Fibrose
 - kardiovaskuläre Fehlbildungen
 - Diabetes mellitus und andere Stoffwechselstörungen
 - Tumorerkrankungen
 - Wachstumsstörungen oder eine frische Fraktur
 - Schwangerschaft
 - keine Einwilligung in die Studie

Die Entnahme der Blutproben (Serum und EDTA-Plasma) erfolgte mindestens drei Stunden nach der letzten Mahlzeit. Anschließend wurden sie im Forschungslabor der Universitäts- Kinder- und Jugendklinik in Rostock zentrifugiert (4°C, 15 Minuten, 980g), aliquotiert und zur weiteren Analyse in Polypropylenröhrchen bei -80°C gelagert.

Für die Bestimmung von BAP standen 352, für TRAP5b 338 und für Sclerostin 264 Proben zur Verfügung. Dabei stammten 184, 178 und 146 Proben von männlichen Probanden. Zusätzlich wurden die Konzentrationen von Protein, Albumin, C-reaktivem Protein (CRP), Kreatinin, Glukose, Triacylglycerol (TAG) und Cholesterin bestimmt und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) nach Schwarz berechnet (Basis-Laboruntersuchung) [Schmitt, 2004]. Die Konzentrationen von PTH und 25-Hydroxyvitamin D₃ konnten in 78 bzw. 133 Proben bestimmt werden.

6.3 Anthropometrie

Von jedem Studienteilnehmer wurden zum Zeitpunkt der Blutentnahme Größe und Gewicht erfasst. Bei 107 Probanden war eine neuerliche Größenbestimmung nach sechs oder mehr Monaten möglich, sodass eine Wachstumsgeschwindigkeit berechnet werden konnte.

Mit der von Cole beschriebenen Methode wurden alters- und geschlechts-spezifische Standard-Deviation-Scores (SDS) für die anthropometrischen Maße

berechnet [Cole and Green, 1992]. Dabei dienen die Daten von Kromeyer-Hauschild et al. als Basis [Kromeyer-Hauschild et al., 2001].

$$\text{SDS}_{\text{LMS}} = \frac{\left[\frac{Y(t)}{M(t)} \right] L(t) - 1}{L(t) * S(t)}$$

Y: Wert der zum Zeitpunkt t gemessenen Größe

L: Box-Cox-power-Transformation als Funktion von t

M: Median der Messwerte als Funktion von t

S: Variationskoeffizient als Funktion von t

6.4 Material

TECOmedical, Sissach, Schweiz

Sclerostin ELISA Kit

Quidel, San Diego, CA, USA

Micro Vue™ BAP Enzym-Immunoassay

Metra TRAP5b Enzym-Immunoassay

Tecan Group , Crailsheim, Deutschland

Microtiterplattenreader Infinite M200 aus dem Jahr 2006

Magellan™ Standard Data Analysis Software Version 6.6

6.5 Methoden

Die Konzentrationen von Protein, Albumin, CRP, Glukose, TAG, Cholesterin, Calcium, Kreatinin und Phosphat im Serum, bzw. von Kreatinin und Phosphat im Urin, wurden im Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universität Rostock mit etablierten Routineverfahren analysiert. Die Bestimmung der Konzentrationen von PTH und 25-Hydroxyvitamin D₃ erfolgte mit einem automatisierten Chemilumineszenz-Immunoassay.

Einige der oben genannten Laboruntersuchungen konnten nicht gleich am Tag der Studienaufnahme durchgeführt werden, sondern erfolgten später aus einem der bei -80°C asservierten Aliquoten.

Das tubuläre Transportmaximum (TmP/GFR) für Phosphat wurde mit den Urin- und Serumkonzentrationen von Phosphat und Kreatinin nach Brodehl berechnet [Barth et al., 2000; Brodehl et al., 1982]:

$$\frac{TmP}{GFR} = P_s - \frac{P_u * K_s}{K_u}$$

P_S: Phosphatkonzentration im Serum

P_U: Phosphatkonzentration im Urin

K_S: Kreatininkonzentration im Serum

K_U: Kreatininkonzentration im Urin

6.5.1 Quantitative Bestimmung der BAP-, TRAP5b-Aktivität und der Sclerostin-Konzentration im Serum

Alle Bestimmungen wurden im Forschungslabor der Universitäts- Kinder- und Jugendklinik in Rostock durchgeführt. Keines der untersuchten und bei -80°C asservierten Aliquoten durchlief mehr als einen Einfrier-/Auftauzyklus.

Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit wurden Inter- und Intraassay-Variationskoeffizienten ermittelt. Diese und weitere Assaycharakteristika sind der *Tabelle 2* zu entnehmen.

Tabelle 2: Charakteristika der verwendeten Tests

Parameter (benötigte Probenmenge)	Untere Nachweisgrenze	Kalibrierbereich	Intra- und Interassay- Variations- koeffizient (VC)
Sclerostin (50 µl Serum)	0,13 µg/l	0-4 µg/l	9,3% / 5,9%
BAP (40 µl Serum)	0,7 U/l	0-140 U/l	5,5% / 5,0%
TRAP5b (100 µl Serum)	0,2 U/l	0-15 U/l	4,2% / 2,8%

Kalibrierungsmodi: linear skaliert, quadratisch angepasst

Die Bestimmung der Aktivitäten (BAP und TRAP5b) bzw. der Konzentration von Sclerostin im Serum erfolgte jeweils mit spezifischen Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) entsprechend der Herstellerangaben und als Doppelbestimmung.

Bei stark divergierenden Ergebnissen (Abweichung der Doppelbestimmung um $\geq 7\%$ (Sclerostin) bzw. $\geq 5\%$ Abweichung (BAP, TRAP5b)) wurden die Resultate verworfen und eine erneute Messung aus frisch aufgetauten Aliquoten durchgeführt.

6.6 Kohortenerstellung

Es wurden 18 geschlechtsspezifische Kohorten entsprechend ihrem Lebensalter in Jahren (t) erstellt (*Kohorte*: $t_{-1} < t \leq t_{+1}$). Zusätzlich wurde eine 19. Kohorte als Referenzgruppe der jungen Erwachsenen aus allen Patienten im Alter von 19 bis 21 Jahren gebildet. Um zu prüfen, ob die für 19-21 Jährige bestimmten Werte tatsächlich für junge Erwachsene gültig sind, wurden zusätzlich 35 Probanden im Alter zwischen 21 und 31 Jahren eingeschlossen.

6.7 Statistische Auswertung

Verwendete Software:

Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim

Excel

Systat Software Inc., San Jose, CA, USA

SigmaPlot Version 10.0

SPSS Version Inc. Chicago, IL, USA

SPSS statistics Version 19.0

Harlow Printing Limited, Tyne & Wear, UK

LMS chartmaker Pro Version 2.54

Erstellung alters- und geschlechtsspezifischer Referenzwerte

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit „SPSS“ (Version 19.0) und die grafische Darstellung mit „Sigma Plot“ (Version 10.0).

Bei altersabhängigen und/oder geschlechtsabhängigen Knochenmarkern wurden entsprechende Referenzwerte und Perzentilen mit der LMS-Methode nach Cole mit dem Programm „LMS chartmaker“ (Pro Version 2.54) erstellt [Cole and Green, 1992].

Zur Erstellung der Perzentilen wurden alle Kinder, die unter einem Jahr und alle jungen Erwachsenen, die älter oder genau 19 Jahre alt waren in jeweils einer separaten Gruppe zusammengefasst.

Bei fehlender Altersabhängigkeit wurden bei Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) direkt arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichungen und Perzentilen berechnet. Bei nicht-normalverteilten Daten erfolgte eine geeignete Transformation der Messwerte um eine Normalverteilung zu erreichen. Aus diesen transformierten Daten wurden Perzentilen berechnet, die im Anschluss rücktransformiert wurden [Solberg, 1987].

Gruppenvergleiche erfolgten mit dem t-Test bei normalverteilten Parametern und mit dem Mann-Whitney-U-Test bei nicht-normalverteilten Parametern. Eine Varianzanalyse wurde mit ANOVA (analysis of variance) durchgeführt.

Um Zusammenhänge zwischen den Parametern zu erfassen, wurde der Spearman Test verwendet. Die Korrelationen beruhen auf einer bivariaten linearen Regressionsanalyse.

Es wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ($p < 0,05$) als statistisch signifikant gewertet.

7. Ergebnisse

7.1 Anthropometrie und Basis-Laboruntersuchung

Von allen Studienteilnehmern waren Körpergewicht und Körpergröße bekannt und der BMI konnte berechnet werden.

Alle Serumproben wiesen physiologische Konzentrationen von Protein, Albumin, CRP, Kreatinin, Glukose, TAG, Cholesterin, Calcium und Phosphat auf und die GFR war in allen Fällen normal.

Tabelle 3: Größe, Gewicht und BMI + SDS (Mittelwert \pm Standardabweichung)

männliche Probanden

Alter [yrs]	n	Größe [cm]	Größe- SDS	Gewicht [kg]	Gewicht- SDS	BMI [kg/m ²]	BMI-SDS
0- 2,99	29	76,3 \pm 14,38	-0,27 \pm 1,54	10,47 \pm 3,07	0,30 \pm 1,64	18,24 \pm 5,29	0,76 \pm 2,13
3- 4,99	19	104,2 \pm 6,10	0,02 \pm 1,44	16,79 \pm 2,42	-0,53 \pm 2,41	15,42 \pm 1,30	-0,14 \pm 0,96
5- 6,99	23	117,1 \pm 6,45	0,08 \pm 1,13	22,47 \pm 5,08	0,61 \pm 2,02	16,23 \pm 2,50	0,26 \pm 1,02
7- 8,99	29	130,0 \pm 6,11	0,16 \pm 1,10	27,17 \pm 4,39	-0,43 \pm 2,64	16,19 \pm 1,58	0,02 \pm 0,77
9-10,99	21	142,8 \pm 5,39	0,12 \pm 0,73	35,35 \pm 7,27	0,30 \pm 1,69	17,25 \pm 3,01	-0,17 \pm 1,30
11-12,99	27	150,0 \pm 9,11	0,16 \pm 1,22	41,81 \pm 10,5	0,22 \pm 1,94	18,11 \pm 3,24	-0,22 \pm 1,33
13-14,99	18	166,9 \pm 6,46	0,22 \pm 0,78	56,02 \pm 16,2	-0,16 \pm 2,43	20,73 \pm 4,44	0,19 \pm 1,17
15-16,99	23	178,1 \pm 10,6	0,22 \pm 1,47	67,70 \pm 13,5	0,05 \pm 2,40	21,28 \pm 3,75	0,04 \pm 1,14
\geq 17	32	180,8 \pm 8,00	0,10 \pm 1,22	72,90 \pm 13,3	0,45 \pm 1,93	21,67 \pm 5,30	0,07 \pm 1,27
ges.	221		0,04 \pm 1,20		0,11 \pm 2,14		0,08 \pm 1,28

weibliche Probanden

Alter [yrs]	n	Größe [cm]	Größe- SDS	Gewicht [kg]	Gewicht- SDS	BMI [kg/m ²]	BMI-SDS
0- 2,99	20	80,5±12,99	-0,73±1,48	10,14±3,16	-1,76±3,51	15,64±2,25	-0,37±1,73
3- 4,99	12	106,8± 6,03	0,74±1,29	17,65±2,82	0,62±1,30	15,40±1,13	-0,05±0,83
5- 6,99	20	116,8± 5,21	-0,16±1,36	22,45±4,98	0,15±2,09	16,29±2,75	0,23±1,38
7- 8,99	19	128,1± 7,19	-0,09±1,01	26,95±7,15	0,17±2,10	16,22±2,83	-0,11±1,17
9-10,99	16	141,4± 6,22	0,07±0,94	35,17±8,39	-0,17±2,52	17,54±3,74	-0,07±1,37
11-12,99	22	157,6± 8,57	0,53±0,96	44,75±8,58	0,24±1,30	18,19±2,43	-0,16±0,95
13-14,99	35	163,1± 8,64	-0,09±1,29	55,35±9,40	0,23±1,51	20,82±3,58	-0,16±1,15
15-16,99	34	168,6± 5,65	0,36±0,90	60,19±7,75	0,42±1,18	21,22±2,99	0,07±1,02
≥ 17	25	170,0± 5,78	0,32±0,96	62,30±8,92	0,56±1,43	21,57±3,00	0,00±1,08
ges.	203		0,12±1,15		0,13±1,97		0,00±1,16

7.2 Referenzwerte für BAP und TRAP5b gesunder Probanden**7.2.1 Knochenmarker als Funktion von Alter und Geschlecht**

In *Abbildung 5a* sind die Messwerte geschlechtsspezifisch als Funktion des Alters dargestellt. Die BAP Aktivitäten variieren von 0 bis 300 U/L, die von TRAP5b von 0 bis 30 U/L.

Die Aktivitäten von BAP und TRAP5b korrelierten signifikant mit dem Alter ($r_{\text{BAP}}=0,248$; $r_{\text{TRAP5b}}=0,214$; p jeweils $<0,01$) und unterschieden sich zwischen den Geschlechtern. Die Aktivität beider Phosphatasen nahm bei den männlichen Probanden nach dem 15. Lebensjahr und bei den weiblichen Probanden nach dem 13. Lebensjahr ab. Insgesamt zeigten sich im Kindesalter und in der Adoleszenz deutlich höhere Enzymaktivitäten als bei jungen Erwachsenen (ab dem 16. Lebensjahr).

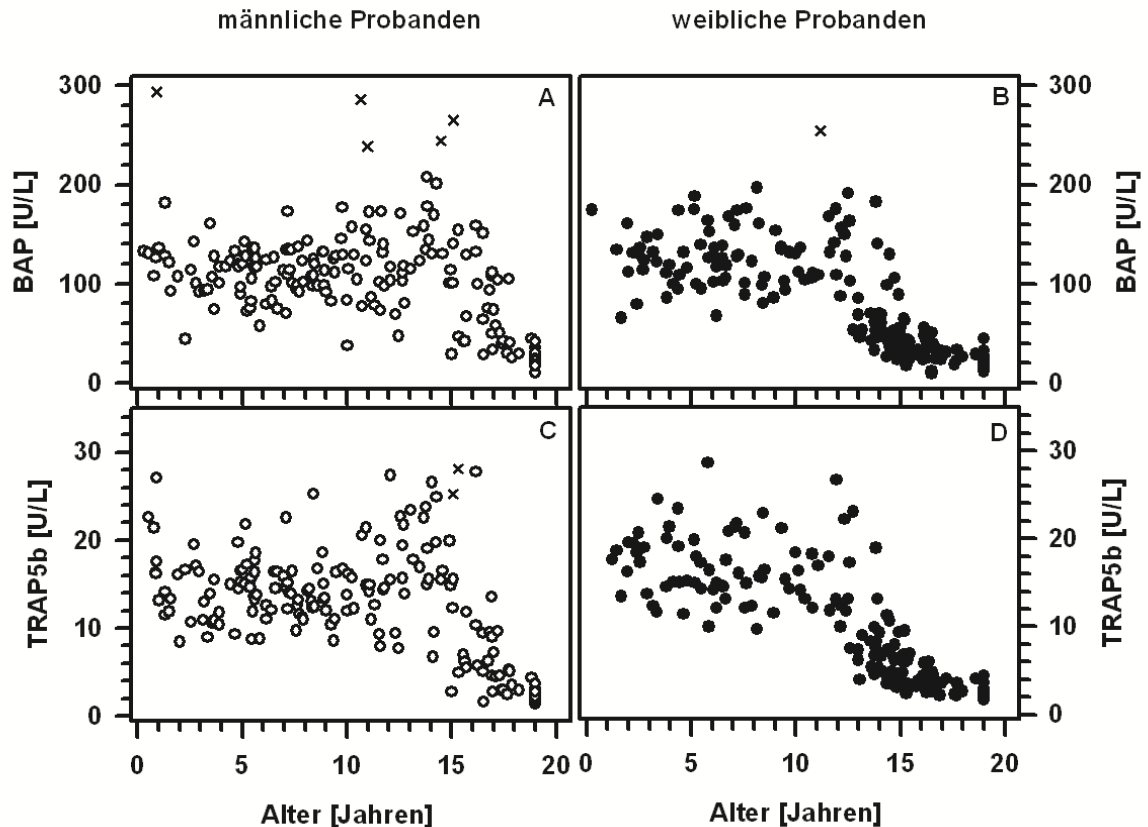


Abb. 5a: Die Aktivitäten von BAP (A, B) und TRAP5b (C, D) in Abhängigkeit vom Alter.

Offene Symbole stehen für die Daten von männlichen, gefüllte Symbole für die Messwerte von weiblichen Probanden. Kreuze symbolisieren Ausreißer. A-D: $p < 0,01$

Für beide Knochenmarker sind offensichtliche Ausreißer in die Berechnung der Perzentilen nicht mit einbezogen worden (5% bzw. 4% aller Werte).

7.2.2 Perzentilen

Da die Aktivitäten von BAP und TRAP5b vom Alter und Geschlecht abhängen, wurde die LMS-Methode für die Berechnung von Perzentilen angewendet. Hierfür wurde das Alter der Probanden jeweils mathematisch korrekt auf ganze Jahre gerundet.

Tabelle 4a: Altersspezifische LMS-Werte und Perzentilgrenzen für die BAP-Konzentration bei den männlichen Probanden

Alter (Jahren)	N	L	M	S	P3	P10	P25	P50	P75	P90	P97
≤ 1	9	1,37	125,5	0,19	77	93	109	126	141	155	168
2	4	1,34	119,0	0,20	71	87	103	119	134	148	161
3	7	1,32	114,9	0,20	68	84	99	115	130	143	156
4	7	1,29	112,0	0,21	66	81	96	112	127	141	153
5	12	1,26	110,3	0,21	64	79	94	110	126	139	152
6	12	1,22	109,8	0,22	62	78	93	110	126	140	153
7	12	1,18	110,6	0,23	61	77	93	111	127	142	157
8	12	1,14	112,4	0,24	60	77	94	112	130	146	162
9	9	1,09	114,8	0,26	58	77	95	115	134	152	169
10	10	1,04	117,5	0,27	56	76	96	117	139	158	177
11	7	0,98	119,5	0,29	54	75	96	120	143	165	186
12	10	0,91	120,1	0,32	51	73	95	120	146	169	193
13	8	0,84	118,5	0,34	48	69	92	118	146	171	197
14	8	0,75	113,1	0,36	44	64	87	113	141	168	195
15	8	0,66	102,7	0,38	39	57	78	103	130	157	184
16	7	0,56	87,6	0,40	33	48	65	88	113	137	164
17	15	0,46	68,7	0,42	26	37	51	69	89	111	134
18	5	0,36	47,3	0,43	18	25	35	47	62	78	97
≥ 19	17	0,25	25,1	0,45	10	13	18	25	34	43	54

Tabelle 4b: Altersspezifische LMS-Werte und Perzentilgrenzen für die BAP-Konzentration bei den weiblichen Probanden

Alter (Jahren)	N	L	M	S	P3	P10	P25	P50	P75	P90	P97
≤ 1	3	1,68	135,0	0,19	79	99	117	135	152	165	178
2	5	1,33	131,0	0,20	78	96	113	131	148	163	178
3	8	1,08	128,9	0,21	77	94	110	129	147	163	179
4	7	0,83	127,6	0,22	77	92	109	128	147	165	182
5	6	0,59	127,0	0,23	76	91	108	127	148	167	187
6	10	0,38	126,2	0,25	76	90	106	126	148	170	193
7	9	0,18	124,7	0,26	75	88	104	125	148	172	199
8	8	0,00	121,9	0,28	72	86	101	122	147	174	205
9	6	-0,14	117,3	0,29	69	81	96	117	143	173	208
10	6	-0,26	110,4	0,31	64	76	90	110	137	168	208
11	3	-0,34	100,9	0,33	58	68	81	101	127	159	202
12	9	-0,38	88,7	0,35	49	59	71	89	113	144	188
13	8	-0,36	74,2	0,37	40	48	59	74	96	124	163
14	17	-0,28	59,1	0,38	31	37	46	59	77	100	132
15	24	-0,15	45,2	0,40	22	28	35	45	59	77	100
16	11	0,01	34,4	0,41	16	20	26	34	45	58	75
17	9	0,16	27,2	0,42	12	15	20	27	36	46	58
18	4	0,30	23,0	0,44	9	12	17	23	31	39	48
≥ 19	14	0,43	20,5	0,45	7	11	15	21	27	34	42

Tabelle 5a: Altersspezifische LMS-Werte und Perzentilgrenzen für die TRAP5b-Konzentration bei den männlichen Probanden

Alter (Jahren)	N	L	M	S	P3	P10	P25	P50	P75	P90	P97
≤ 1	9	-0,04	15,5	0,25	9,8	11,3	13,1	15,5	18,3	21,2	24,6
2	5	0,00	14,6	0,24	9,3	10,7	12,4	14,6	17,1	19,8	22,8
3	8	0,02	14,0	0,24	9,0	10,4	12,0	14,0	16,5	19,0	21,8
4	6	0,04	13,8	0,23	8,9	10,2	11,8	13,8	16,2	18,6	21,3
5	12	0,05	13,8	0,23	8,9	10,2	11,8	13,8	16,2	18,6	21,3
6	11	0,06	13,9	0,24	8,9	10,2	11,8	13,9	16,2	18,7	21,5
7	11	0,06	13,9	0,24	8,8	10,2	11,8	13,9	16,4	19,0	21,8
8	13	0,07	14,1	0,25	8,7	10,1	11,8	14,1	16,7	19,4	22,5
9	9	0,08	14,3	0,27	8,5	10,1	11,9	14,3	17,1	20,1	23,5
10	7	0,11	14,6	0,29	8,3	10,0	12,0	14,6	17,7	21,0	24,8
11	7	0,14	14,8	0,32	8,0	9,8	11,9	14,8	18,3	22,0	26,3
12	10	0,16	14,8	0,34	7,5	9,4	11,7	14,8	18,6	22,7	27,4
13	8	0,19	14,3	0,37	6,8	8,7	11,1	14,3	18,3	22,7	27,7
14	10	0,21	13,2	0,40	5,8	7,7	10,0	13,2	17,2	21,6	26,7
15	8	0,23	11,5	0,43	4,7	6,4	8,5	11,5	15,2	19,2	24,0
16	7	0,25	9,3	0,45	3,6	5,0	6,8	9,3	12,4	15,9	20,0
17	15	0,28	6,8	0,47	2,5	3,5	4,9	6,8	9,3	11,9	15,0
18	5	0,33	4,4	0,49	1,5	2,2	3,1	4,4	6,1	7,8	9,9
≥ 19	17	0,38	2,2	0,51	0,7	1,0	1,5	2,2	3,0	3,9	4,9

Tabelle 5b: Altersspezifische LMS-Werte und Perzentilgrenzen für die TRAP5b-Konzentration bei den weiblichen Probanden

Alter (Jahren)	N	L	M	S	P3	P10	P25	P50	P75	P90	P97
≤ 1	2	0,55	17,5	0,15	13,0	14,4	15,8	17,5	19,3	21,0	22,7
2	5	0,46	17,4	0,17	12,4	13,9	15,5	17,4	19,4	21,3	23,2
3	7	0,35	17,2	0,19	11,8	13,4	15,1	17,2	19,5	21,7	24,0
4	7	0,24	17,0	0,21	11,2	12,9	14,7	17,0	19,6	22,1	24,8
5	6	0,14	16,8	0,23	10,7	12,4	14,3	16,8	19,6	22,5	25,6
6	7	0,05	16,5	0,25	10,2	11,9	13,9	16,5	19,6	22,7	26,4
7	8	-0,03	16,2	0,27	9,8	11,4	13,5	16,2	19,4	22,9	27,0
8	8	-0,10	15,7	0,29	9,2	10,9	12,9	15,7	19,1	22,8	27,4
9	4	-0,16	14,9	0,31	8,6	10,2	12,2	14,9	18,4	22,4	27,3
10	6	-0,20	13,9	0,32	7,8	9,3	11,2	13,9	18,4	21,4	26,6
11	3	-0,24	12,5	0,34	6,9	8,3	10,0	12,5	18,4	19,8	25,0
12	8	-0,26	10,8	0,35	5,9	7,1	8,6	10,8	18,4	17,5	22,3
13	8	-0,27	8,9	0,36	4,8	5,7	7,0	8,9	18,4	14,5	18,7
14	17	-0,25	6,9	0,36	3,7	4,5	5,5	6,9	18,4	11,4	14,7
15	24	-0,23	5,3	0,36	2,8	3,4	4,2	5,3	18,4	8,7	11,2
16	11	-0,22	4,1	0,36	2,2	2,6	3,2	4,1	18,4	6,7	8,6
17	9	-0,22	3,3	0,36	1,8	2,1	2,6	3,3	18,4	5,3	6,8
18	4	-0,22	2,8	0,35	1,5	1,8	2,2	2,8	18,4	4,4	5,6
≥ 19	14	-0,23	2,3	0,34	1,3	1,5	1,9	2,3	18,4	3,7	4,7

N: Anzahl der Probanden in der jeweiligen Kohorte, L: Box-Cox-power-Transformation als Funktion von t, M: Median der entsprechenden Altersgruppe, S: Variationskoeffizient als Funktion von t, P: Perzentile

7.2.3 Grafische Darstellung der Perzentilen

In *Abbildung 5b* sind geschlechtsspezifische Perzentilen der Knochenmarker BAP und TRAP5b in Abhängigkeit vom Alter dargestellt.

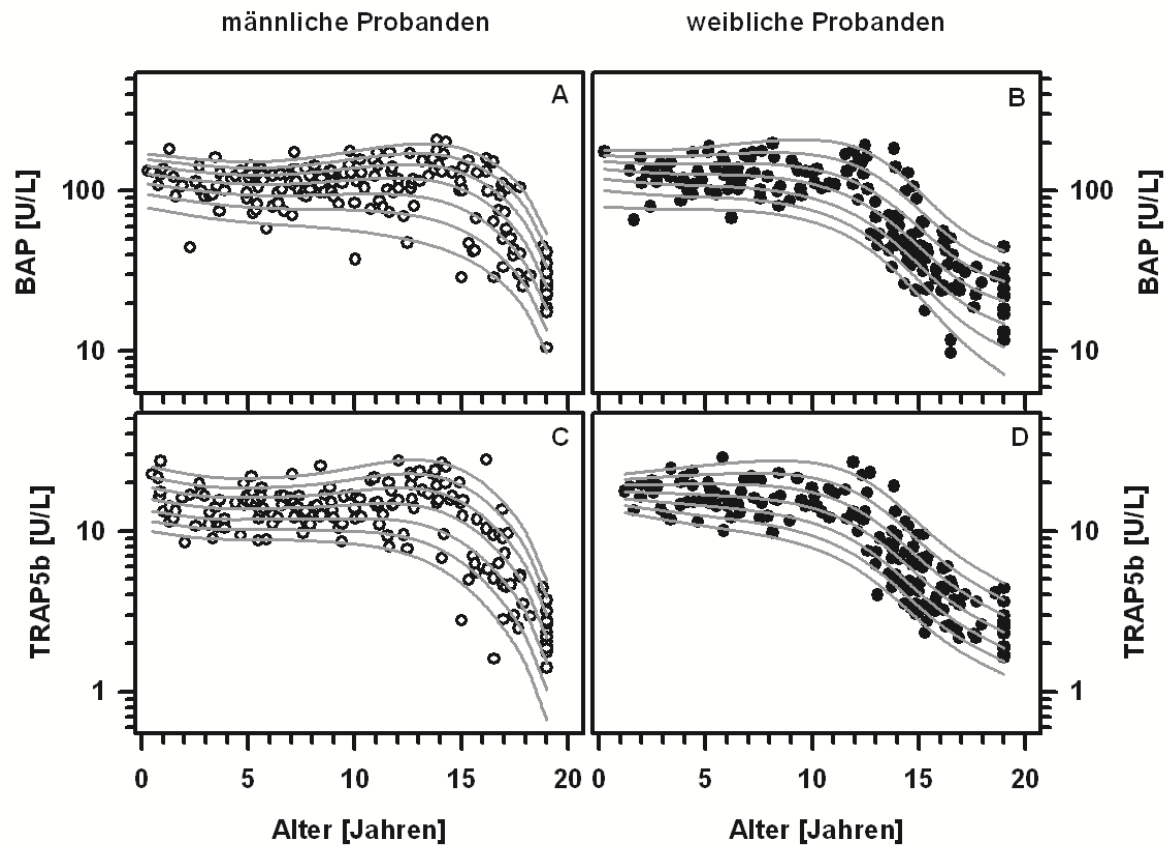


Abb. 5b: Die Aktivitäten von BAP (A, B) und TRAP5b (C, D) in Abhängigkeit vom Alter mit Perzentilen.

Offene Symbole stehen für die Daten männlicher, gefüllte Symbole für die Messwerte weiblicher Probanden. Die 3., 10., 25., 50., 75., 90. und 97. Perzentile sind für BAP und TRAP5b dargestellt.

7.3 Referenzwerte für Sclerostin gesunder Probanden

Sclerostin unterschied sich weder zwischen den Geschlechtern noch konnte eine Korrelation mit dem Alter festgestellt werden ($p > 0,5$) (vgl. *Abbildung 6*). Dennoch waren die Messwerte deutlich nicht-normalverteilt (Kolmogorov-Smirnov-Test: p -Wert $< 0,001$; Schiefe: 2,24).

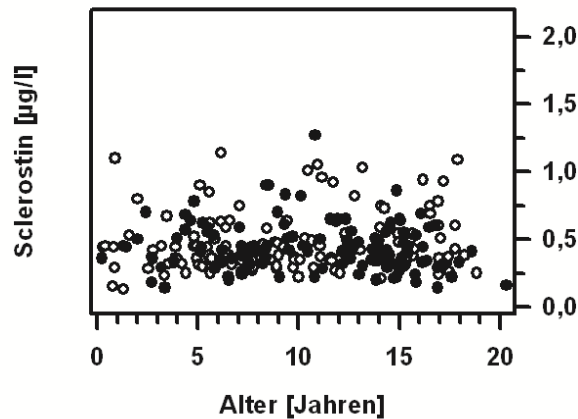


Abb. 6: Daten für Sclerostin in Abhängigkeit vom Alter.

Offene Symbole stehen für die Daten männlicher, gefüllte Symbole für die Messwerte weiblicher Probanden.

Um eine Normalverteilung der Sclerostinkonzentrationen zu erzwingen, wurde eine Power-Transformation mit der reziproken Quadratwurzel durchgeführt (p -Wert: 0,28; Schiefeverteilung: 0,46). Schwächere Transformationen, wie z.B. die Logarithmierung oder Potenzierung waren nicht ausreichend, um eine Normalverteilung zu erzeugen.

Abbildung 7 verdeutlicht wie durch die Power-Transformation eine Normalverteilung erreicht werden konnte. Sowohl der nach links verschobene Gipfel, als auch die Ausprägung des Gipfels änderten sich.

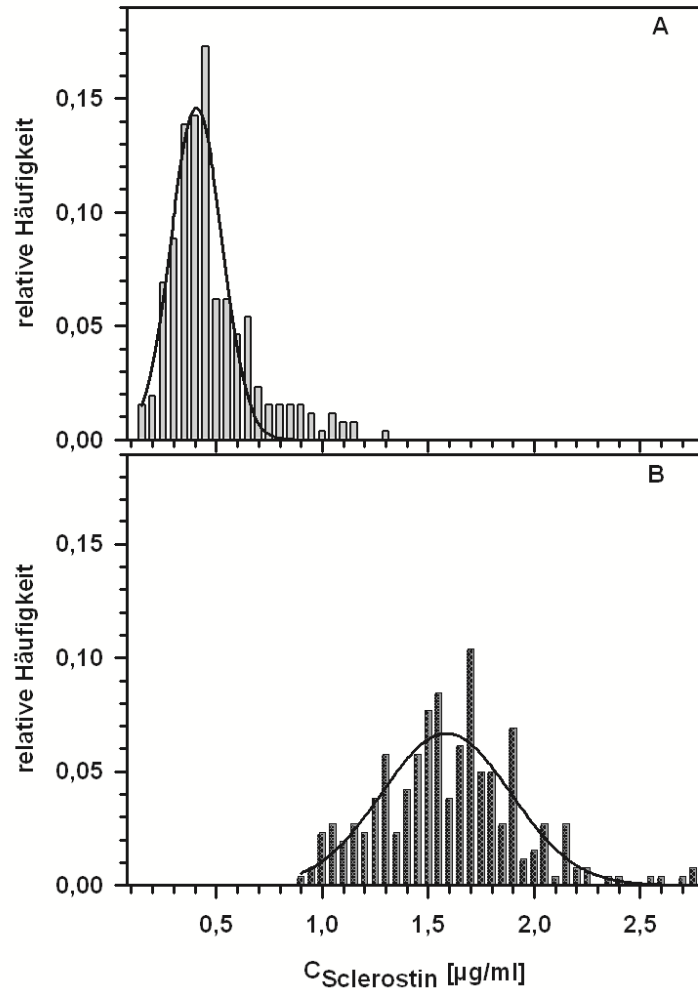


Abb. 7: Sclerostinkonzentration in Abhängigkeit von der relativen Häufigkeit.

A: Hellgraue Balken entsprechen der Sclerostinkonzentration vor der Power-Transformation.

B: Dunkelgraue, schraffierte Balken stehen für die mit $1/\sqrt{x}$ transformierten Konzentrationen. Die Schwarze Linie verdeutlicht den Verlauf der Gaußschen Verteilung.

Aus diesen transformierten Daten konnten mit Hilfe des berechneten Mittelwerts (1,58 µg/L) mit Standardabweichung ($\pm 0,33$) Perzentilen für Sclerostin wie folgt berechnet werden:

$$Z_{\text{Sclerostin}} = \frac{C_{\text{Sclerostin}}^{-0,5} - 1,58}{0,33}$$

Aus den transformierten Daten wurden so Perzentilen erzeugt und in die in *Tabelle 5* abgebildeten Werte zurücktransformiert. 2,3% aller Werte wurden als offensichtliche Ausreißer in die Berechnung nicht mit einbezogen.

Tabelle 6: Perzentilen von Sclerostin

Perzentilen	P3	P10	P25	P50	P75	P90	P97
Sclerostinkonzentration [µg/L]	0,20	0,26	0,33	0,42	0,54	0,76	1,00

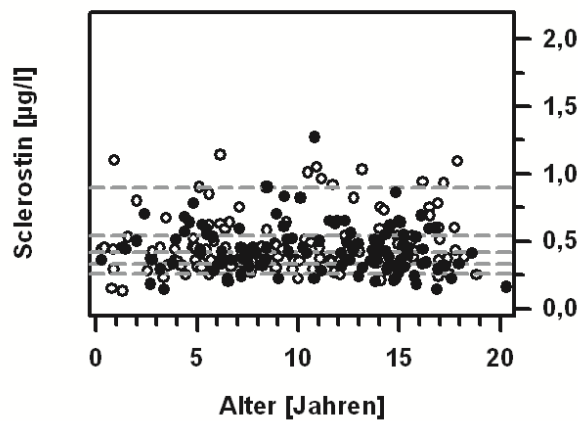


Abb. 8: Daten für Sclerostin in Abhängigkeit vom Alter mit Perzentilen.

Offene Symbole stehen für die Daten männlicher, gefüllte Symbole für die Messwerte weiblicher Probanden. Die 10., 25., 50., 75., und 90. Perzentile wurde für Sclerostin nach der Rücktransformation erstellt.

7.4 Korrelation der Knochenmarker mit den anthropometrischen Maßen

In der Korrelationsanalyse nach Spearman korrelierten die Knochenmarker BAP und TRAP5b signifikant mit Größe, Gewicht, BMI und Wachstumsgeschwindigkeit.

Tabelle 7: Korrelationen der anthropometrischen Maße mit BAP und TRAP5b

	BAP [U/l]		TRAP5b [U/l]	
	r	p	r	p
Größe [cm]	-0,534	< 0,001	-0,613	< 0,001
Gewicht[kg]	-0,535	< 0,001	-0,609	< 0,001
BMI [kg/cm ²]	-0,366	< 0,001	-0,463	< 0,001
Wachstumsgeschwindigkeit [cm/Jahr]	0,591	< 0,001	0,653	< 0,001

In *Abbildung 9* sind die Knochenmarker BAP und TRAP5b als Funktion des Alters den geschlechtsspezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten als Funktion des Alters gegenübergestellt.

Wachstumsschübe zeigten sich im Kindesalter und während der Adoleszenz, wobei das pubertäre Wachstum bei den weiblichen Probanden, wie zu erwarten, eher als bei den männlichen Probanden einsetzte. Im Vergleich zu den männlichen Teilnehmern war der Wachstumsschub während des Jugendalters bei den weiblichen Probanden weniger deutlich ausgeprägt. Zum Ende der Adoleszenz sistierte das Wachstum bei beiden Geschlechtern.

Beim Vergleich der gemittelten Aktivitäten der Knochenmarker BAP und TRAP5b mit den durchschnittlichen Wachstumsgeschwindigkeiten der Kohorten zeigte sich ein deutlicher positiver Zusammenhang. Es war eine höhere Aktivität der Knochenmarker zum Zeitpunkt der größten Wachstumsgeschwindigkeiten messbar und es zeigte sich eine geringere Aktivität nach dem Ende des Wachstums. Die Kurvenverläufe der männlichen Probanden wiesen eine stärkere Parallelität auf, als die der weiblichen Probanden.

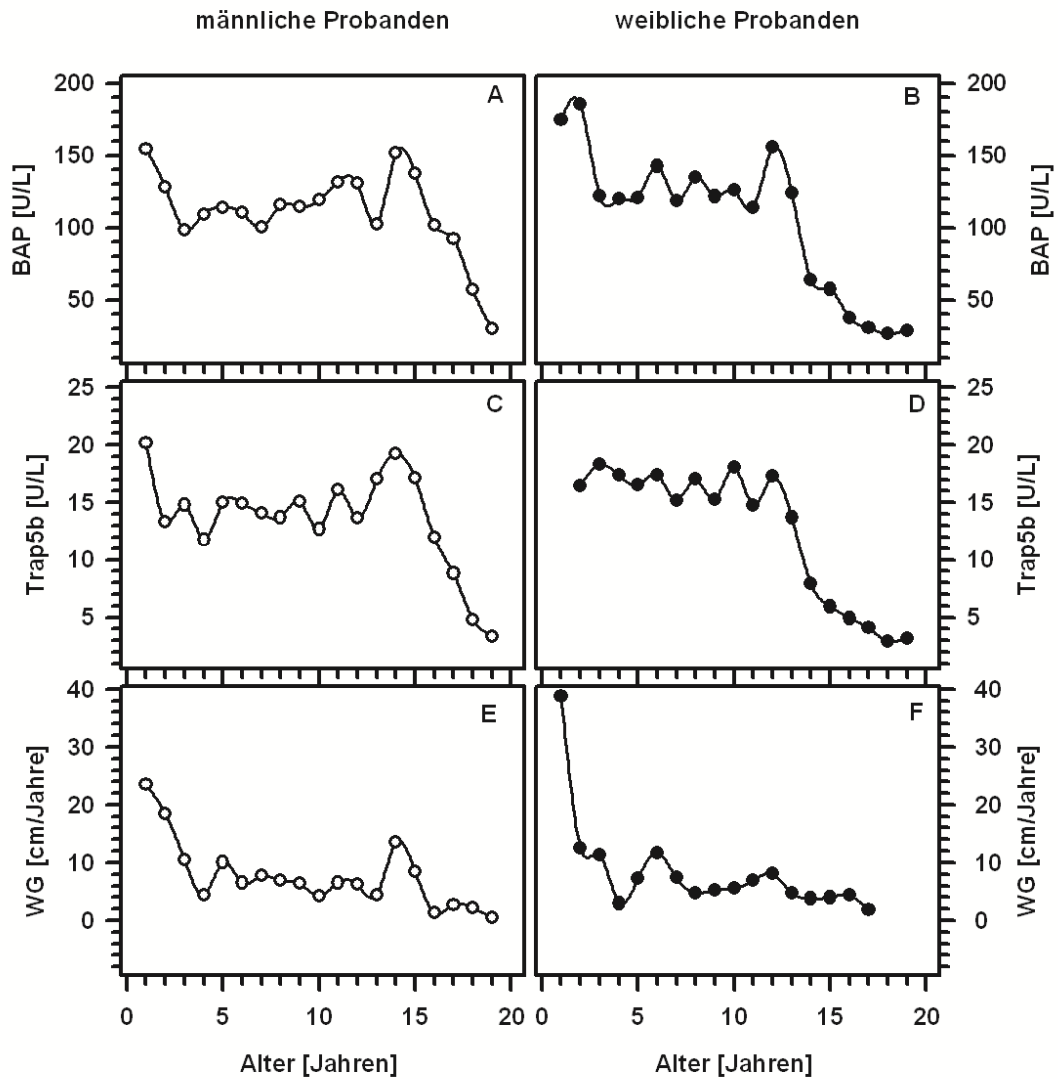


Abb. 9: BAP und TRAP5b als Funktion des Alters im Vergleich zur Wachstumsgeschwindigkeit (WG) als Funktion des Alters.

Offene Symbole stehen für die Daten männlicher, gefüllte Symbole für die Messwerte weiblicher Probanden. Es wurden Alterskohorten für die einzelnen Parameter erzeugt für die ein Mittelwert des jeweiligen Parameters berechnet wurde.

7.5 Korrelation der Knochenmarker untereinander

Sclerostin hatte einen signifikanten Zusammenhang mit BAP bzw. TRAP5b (Abbildung 10). Ebenso zeigten die absoluten bzw. standardisierten Aktivitäten der Letzteren eine deutlich lineare Korrelation (Abbildung 11).

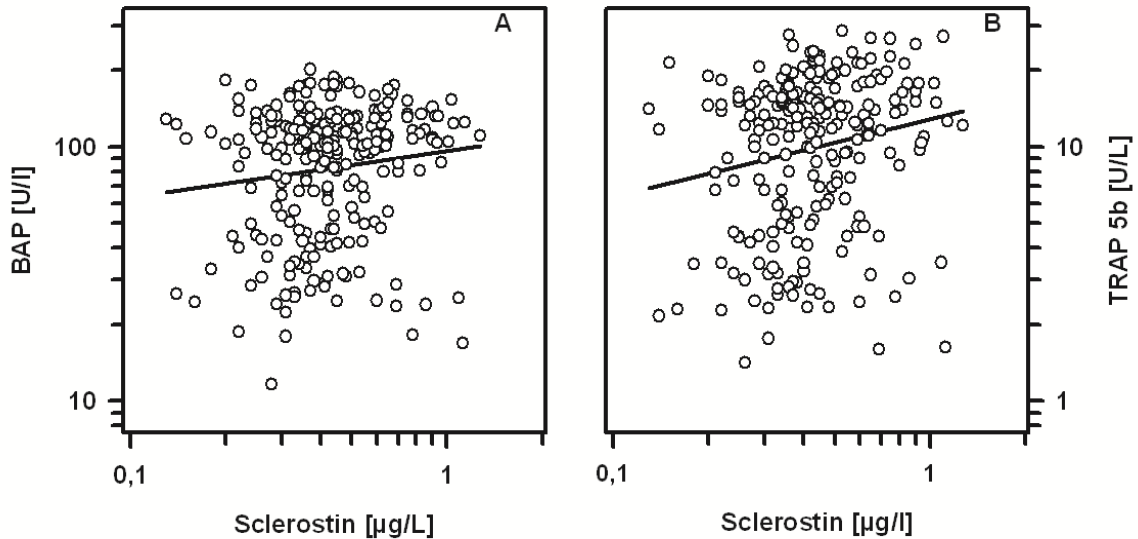


Abb. 10: Korrelation zwischen BAP bzw. TRAP5b und Sclerostin.

A: $r=0,136$; $p<0,05$ und B: $r=0,19$; $p<0,01$

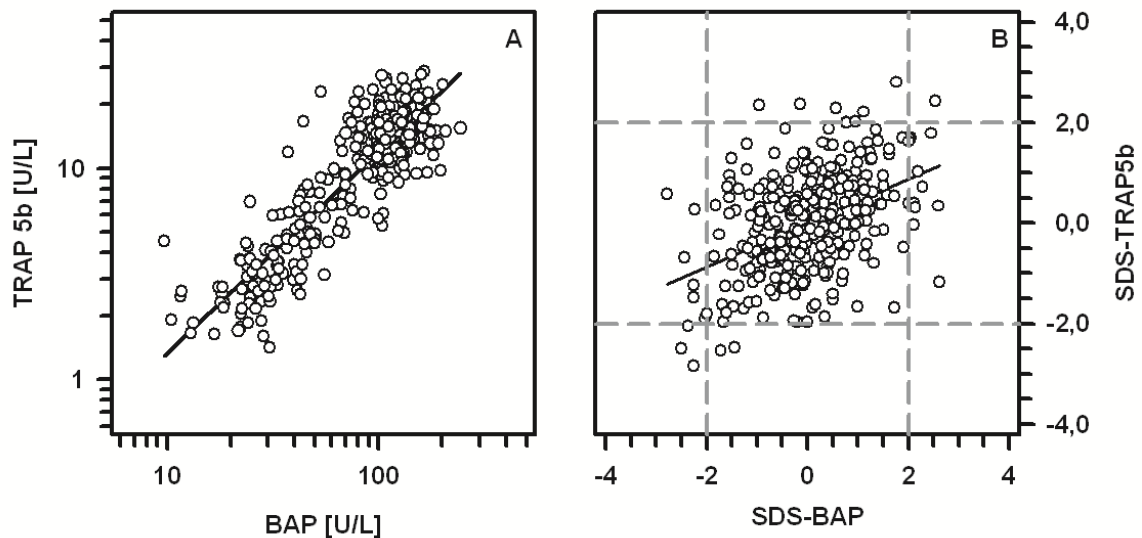


Abb. 11: Korrelation zwischen absoluten (A) bzw. standardisierten (B) Werten der Marker BAP mit TRAP5b.

A: $r=0,776$; $p<0,001$ und B: $r=0,441$; $p<0,001$

7.6 Korrelation der Knochenmarker mit dem Mineralstoffwechsel

Des Weiteren zeigte sich in der bivariaten Regressionsanalyse eine schwache Korrelation von Sclerostin mit Calcium ($r=0,136$; $p<0,05$) und ein etwas stärkerer negativer Zusammenhang mit der tubulären Phosphatschwelle (TmP/GFR) ($r=-0,247$; $p<0,05$). Weder BAP noch TRAP5b korrelierten mit den Serumkonzentrationen von 1-25-Hydroxyvitamin D₃, PTH und Calcium. Auch bei Sclerostin konnte keine signifikante Korrelation mit 1-25-Hydroxyvitamin D₃ und PTH nachgewiesen werden.

8. Diskussion

In dieser Querschnittstudie wurden alters- und geschlechtsspezifische Referenzwerte mit Perzentilen für die Knochenmarker BAP, TRAP5b und Sclerostin bestimmt. Zudem wurde gezeigt, dass Größe, Gewicht, BMI und Wachstumsgeschwindigkeit die Aktivität dieser Knochenmarker beeinflussen. BAP und TRAP5b korrelierten sowohl miteinander, als auch mit der Sclerostinkonzentration. Weiterhin wurden eine schwach-positive Korrelation zwischen Sclerostin und Calcium, sowie ein negativer Zusammenhang zwischen Sclerostin und der renalen Phosphatschwelle festgestellt. 1,25-Hydroxyvitamin D₃ und PTH korrelierten mit keinem der untersuchten Knochenmarker.

8.1 Diskussion der angewandten Methoden und Ergebnisse

Die ELISA-Methode wurde erstmals 1971 von Engvall und Perlmann zum Nachweis von Antikörpern beschrieben und ist heute eine gängige Methode der quantitativen, biochemischen Analytik [Engvall and Perlmann, 1971]. Das Prinzip des ELISA beruht auf der Bindung zwischen einem spezifischen Antigen und dem entsprechenden Antikörper, wobei eines der beiden an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebunden ist. Der Nachweis des Antigens bzw. des Antikörpers erfolgt nach Zugabe eines weiteren, an ein Enzym gekoppelten Antikörpers, der nach anschließender Substratzugabe die photometrische Enzymaktivitätsmessung ermöglicht [Voller et al., 1978].

Ein generelles Problem immunologischer und immunchemischer Verfahren ist die Spezifität und Sensitivität der Antigen-Antikörper-Reaktion. Einerseits ist diese Interaktion zwar sehr spezifisch, andererseits liegen die untersuchten Marker in den seltensten Fällen in reiner Form vor. Vielmehr handelt es sich im Falle des Antigens in der Regel um ein heterogenes Proteingemisch (z.B. Serum), das neben dem Zielanalyten auch Isoformen (z.B. Glykosylierungs-varianten) und Abbauprodukte enthält.

Monoklonale Antikörper erkennen hochspezifisch ein Epitop, während polyklonale Antikörper verschiedene Epitope binden. Damit erfordert die Etablierung eines spezifischen ELISA eine sorgfältige Auswahl der Antikörper – in der Regel

polyklonale Fängerantikörper und monoklonale Detektionsantikörper – und genaue Kenntnisse über die Prozessierung aller Zielanalyten unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen. Darüber hinaus ist die Kalibrierung der Assays eine besondere Herausforderung. Da die Zielanalyten in der Regel nicht als hochreine Einzelsubstanzen vorliegen, ist eine absolute Kalibrierung nicht möglich und für jeden ELISA Typ (ELISA Hersteller) und Analyten (Serum, Plasma, Urin) sind eigene Referenzbereiche erforderlich.

Eine Besonderheit stellen die ELISAs für die Bestimmung von BAP und TRAP5b dar. Hier erfolgt zunächst die antikörpervermittelte, gezielte Immobilisierung des Analyten an der Mikrotiterplatte und anschließend die Messung der Enzymaktivität durch Umsatz mit einem geeigneten Substrat. Das Antigen ist in diesem Fall selbst ein Enzym, sodass der photometrische Nachweis nach Zugabe des entsprechenden Substrats (bei BAP: p-Nitrophenylphosphat (pNPP); bei TRAP5b: 2-Chlor-4-Nitrophenylphosphat (CNPP)) erfolgt. Da nun beide Analyten in der gleichen Einheit (Enzymaktivität pro Volumen) gemessen werden, können die Befunde einfach in Relation zueinander gesetzt und interpretiert werden. Gleichzeitig bedeutet das aber auch, dass die bisher in der Literatur veröffentlichten Referenzwerte, die sich auf die Konzentrationen von BAP und TRAP5b beziehen, nicht verglichen werden können. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie reflektieren die aktive, physiologische Form dieser Knochenmarker und das Verhältnis der Phosphatasen ist folglich unmittelbares Spiegelbild des Knochenumsatzes.

Der Sclerostin ELISA verwendet rekombinantes Protein zur Standardisierung und unterscheidet sich damit ebenfalls von anderen, in der Literatur beschriebenen Assays. Die mit dem hier verwendeten Assay ermittelten Sclerostinkonzentrationen waren von Alter, Geschlecht und anthropometrischen Maßen unabhängig. Allerdings waren die Werte nicht-normalverteilt, sodass vor der Berechnung der Perzentilen eine Power-Transformation (Potenzierung mit -0,5) erforderlich war. Sclerostin, ein relativ neuer Marker, wurde anhand seiner Konzentration im Serum quantifiziert. Viele der beschriebenen, physiologischen Sclerostinwirkungen sind bisher nur im Tiermodell erforscht. Die Standardisierung der Messung diverser humaner Assays ist noch nicht erfolgt und Versuche einer Vereinheitlichung gestalten sich schwierig [Garcia-Martin et al., 2012].

Es wurden bereits Referenzwerte von BAP und TRAP5b für Kinder, Jugendliche und junge Erwachsene veröffentlicht (vgl. *Tabelle 7*), die sowohl in Bezug auf die Verteilung nach Altersgruppen (v.a. während der Pubertät), als auch hinsichtlich der Geschlechtsabhängigkeit, mit den hier gezeigten Ergebnissen vergleichbar sind [Alberti et al., 2011; Chailurkit et al., 2005; Chen et al., 2005; Hogler et al., 2003; Leger et al., 2007; Mora et al., 2009; Rauchenzauner et al., 2007]. Geringe Abweichungen der Altersabhängigkeit oder Verteilung erklären sich durch die unterschiedliche Kalibrierung der Assays, die Anzahl und Kategorisierung der Probanden sowie ethnologische Unterschiede.

Physiologische Sclerostinkonzentrationen wurden bislang lediglich im Rahmen von Vergleichsstudien zu spezifischen Erkrankungen Erwachsener bestimmt (z.B. Osteoporose, renale Osteodystrophie und Diabetes Mellitus Typ 2 mit Mobilitätseinschränkungen) [Amrein et al., 2012; Ardawi et al., 2011; Cejka et al., 2012; Chung et al., 2012; Garcia-Martin et al., 2012; Kirmani et al., 2012].

Abgesehen davon, dass die absoluten Sclerostinkonzentrationen nicht vergleichbar sind, zeigte sich bei Erwachsenen jenseits des 80. Lebensjahrs eine deutliche Alters- und Geschlechtsabhängigkeit (vgl. *Tabelle 8*). Die Stichprobenauswahl unterschied sich zudem, da die Kontrollgruppen der Vergleichsstudien unter den Randbedingungen des erkrankten Kollektivs gesucht wurden. Im Gegensatz dazu wurde das Kollektiv der vorliegenden Studie aus einem Querschnitt der Gesamtbevölkerung gebildet. Zudem können unterschiedliche Größen des Kollektivs die Ergebnisse signifikant beeinflussen [Shroff et al., 2008; Wigger et al., 2009]. Die Verwendung von Assays unterschiedlicher Firmen können nachweislich zu abweichenden Ergebnissen führen [McNulty et al., 2011]. *McNulty et al.* verglichen bereits zwei handelsübliche ELISAs der Firmen Biomedica (Vienna, Australien) und Teco (Sissach, Schweiz; in dieser Studie verwendeter ELISA) und stellten signifikante Unterschiede heraus. Unter anderem waren die mit dem ELISA der Firma Teco gemessenen Sclerostinkonzentrationen signifikant niedriger, als die der Firma Biomedica [McNulty et al., 2011].

Tabelle 8: Vergleich der veröffentlichten Referenzwerte von BAP & TRAP5b

BAP								
Autor	Jahr	n	Untersucher Altersbereich [Jahre]	Assay der Firma	Untersucht: Konzentration (K) Aktivität (A)	Altersabhängigkeit	Geschlechtsabhängigkeit	Sonstiges
Alberti <i>et al.</i>	2011	1119	6,5 - 19,5	IRMAs Tandem-R-Ostase, Beckman Coulter, France	K	ja	ja	
Léger <i>et al.</i>	2007	1119	6 - 20		K	ja	ja	
Holger <i>et al.</i>	2003	69	reife Neonaten	Tandem-R-Ostase; EIA, Hybritech Inc, San Diego, CA, U.S.A.	K	ein Alter getestet	nicht getestet	anderer Fokus (Umstände d. Geburt)
Rauchenzauner <i>et al.</i>	2007	572	0,2 - 18		K	ja	ja	nicht normalverteilt
Mora <i>et al.</i>	2009	239	4,5 - 20,9	MetraTM BAP EIA kit, Quidel Corp., San Diego	K	ja	nein	nicht normalverteilt
Chailurkit <i>et al.</i>	2005	548	9 - 18	EIA, Metra Biosystems, Inc., Mountain View, CA, USA	A	ja	ja	thailändische Probanden
Diese Studie: Fischer <i>et al.</i>	2012	352	0,1 - 21	Microvue BAP EIA kit, Quidel Cor.San Diego,CA	A	ja	ja	normalverteilt
TRAP5b								
Autor	Jahr	n	Untersucher Altersbereich [Jahre]	Assay der Firma	Untersucht: Konzentration (K) Aktivität (A)	Altersabhängigkeit	Geschlechtsabhängigkeit	Sonstiges
Chen <i>et al.</i>	2005	404	0 - 17	Medac, Hamburg, Germany	K	ja	nein	chinesische Probanden
Rauchenzauner <i>et al.</i>	2007	147	0,16- 18		A	ja	ja	
Diese Studie: Fischer <i>et al.</i>	2012	338	0,1 - 21	EIA, Metra TRAP5b, Quidel, San Diego, CA	A	ja	ja	

Tabelle 9: Vergleich veröffentlichter pädiatrischer Sclerostinkonzentrationen

Autor	Jahr	n (Kontrolle)	untersuchter Altersbereich [Jahre]	Assay der Firma	Alters- abhängig- keit	Geschlechts- abhängig- keit
Amrein <i>et al.</i>	2012	161	19 - 64	ELISA Biomedica	ja	ja
Kirmani <i>et al.</i>	2012	140	6 - 21		ja	ja
Diese Studie: Fischer <i>et al.</i>	2012	264	0,1 - 21	TECO medical Sissach, Schweiz	nein	nein

Die von uns beschriebenen Korrelationen zwischen BAP, TRAP5b und Sclerostin wurden auch in anderen Studien bestätigt [Amrein et al., 2012; Garcia-Martin et al., 2012; Gaudio et al., 2010; Rauchenzauner et al., 2007; Shidara et al., 2008]. Der lineare Zusammenhang von BAP und TRAP5b erklärt sich durch ihre ausgewogene Beteiligung am Knochenumbau. Die signifikante Korrelation von Sclerostin mit BAP und TRAP5b ergibt sich aus der Regulatorfunktion Sclerostins über die Knochenhomöostase. [Chung et al., 2012; Gaudio et al., 2010; Kirmani et al., 2012]. *Chung et al.* und *Reichel et al.* konnten weder eine Korrelation der Knochenmarker mit PTH oder Vitamin D₃ nachweisen, noch konnte ein Zusammenhang von BAP oder TRAP5b mit der Calciumkonzentration gefunden werden [Chung et al., 2012; Reichel et al., 2003]. Die hier vorliegenden Ergebnisse bekräftigen diese Erkenntnisse.

Die Korrelation zwischen BAP bzw. TRAP5b und den anthropometrischen Maßen wie Größe, Gewicht und BMI wurden ebenfalls von anderen Arbeitsgruppen bestätigt [Alberti et al., 2011; Mora et al., 2009; Rauchenzauner et al., 2007]. *Mora et al.* untersuchten zudem die Abhängigkeit der Knochenmarker BAP und TRAP5b von der Wachstumsgeschwindigkeit ihrer Probanden. Sowohl hinsichtlich des alters- und geschlechtsspezifischen Wachstumsvorkommens, als auch bezüglich des Zusammenhangs zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und Knochenmarkerlevel, wurden ähnliche Ergebnisse berichtet [Mora et al., 2009].

Die in der vorliegenden Studie gezeigte negative Korrelation zwischen Sclerostin und Tmp/GFR sowie die positive Assoziation von Sclerostin mit dem Serumcalciumspiegel verdeutlichen den engen Zusammenhang zwischen der Sclerostinsekretion, dem Mineralstoffwechsel und der Knochenmineralisation.

8.2 Knochenmonitoring mit Knochenmarkern

Mit den hier definierten Referenzwerten ist die Grundlage geschaffen, um den diagnostischen Nutzen dieser Knochenmarker im klinischen Alltag zu evaluieren. Es gibt eine Reihe von Erkrankungen, bei denen ein engmaschiges Monitoring des Knochenstoffwechsels wünschenswert ist. Hierzu gehören physiologische Veränderungen während der Wachstumsphase und Menopause, aber auch pathologische Veränderungen, wie Osteoporose, Rachitis, Osteomalazie, renale Osteodystrophie, Veränderung des Skeletts bei primärem und sekundärem Hyperparathyreoidismus könnten anhand der Knochenmarker kontrolliert werden [Bianchi et al., 2010]. Außerdem bedürfen Erkrankungen, die direkt im Zusammenhang mit den Knochenmarkern stehen, wie Van-Buchem-Syndrom und Sclerostose, einer Progressions- und Therapiekontrolle [Cremers and Garnero, 2006; Garnero et al., 1999; Karsenty, 2003; Singer and Eyre, 2008]

Bislang werden die Veränderungen nur symptomatisch (Knochenschmerz, Verzögerungen des Längenwachstums bei Kindern bzw. Abnahme der Körperhöhe bei Erwachsenen) erfasst und gegebenenfalls durch Röntgenuntersuchungen begleitet. Eine regelmäßige DXA-Kontrollmessung verbietet sich aufgrund der Strahlenbelastung und zeigt zudem nur verzögert (nach Monaten) Veränderungen des Knochenstoffwechsels auf [Caulfield and Reitz, 2004].

Obwohl der Knochen einem permanenten Umbau unterliegt und neben BAP, TRAP5b und Sclerostin auch eine Reihe anderer knochenspezifischer Proteine oder Peptide beschrieben und als Knochenmarker eingesetzt werden, erfassen diese Parameter den Zustand des Skeletts nur unzureichend. Gerade der Kombination von BAP und TRAP5b kann ein großes diagnostische Potential zukommen, da sie Knochenauf- und -abbau repräsentieren und durch mehrmalige Messungen Änderungen des Knochenstoffwechsels dynamisch dargestellt werden können [Rauchenzauner et al., 2007]. Aufgrund der ausschließlich hepatischen Elimination ist der Einsatz auch bei chronischer Niereninsuffizienz möglich [Allen et al., 2000; Shidara et al., 2008; Ueda et al., 2005; Urena and De Vernejoul, 1999].

Zu guter Letzt erlauben die vorliegenden Normwerte die Berechnung von SD-Scores und ermöglichen damit altersabhängige Variablen des Knochenstoffwechsels in prospektiven Therapiestudien zu evaluieren.

8.3 Fazit und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Studie ist es erstmals gelungen, anhand eines großen Kollektivs gesunder Probanden (0–21 Jähriger), Referenzwerte für die Knochenmarker BAP, TRAP5b und Sclerostin zu erstellen.

Die Rekrutierung von Säuglingen ist in der Regel sehr schwierig, da Eltern meist eine elektive Blutentnahme ablehnen. Dennoch ist es vorwiegend durch Geschwisterrekrutierung gelungen, 13 Säuglinge in die Studie einzuschließen. Obgleich die Anzahl nicht ausreichend ist, um die großen und schnellen physiologischen Anpassungs- und Wachstumsvorgänge während des ersten Lebensjahrs detailliert zu erfassen, so geben uns diese Werte dennoch Hinweise auf die zu erwartenden Veränderungen. Ein weiterer großer Vorteil dieser Studie ist der breite, analysierte Altersbereich. Hierdurch konnten unter Anwendung gleicher Untersuchungstechniken, nicht nur Referenzwerte für den pädiatrischen Bereich, sondern auch für Erwachsene erstellt werden.

Zusätzlich wäre eine Betrachtung der Knochenmarker im Bezug zu den jeweiligen Pubertätsstadien (Tannerstadien) wünschenswert gewesen, da teilweise eine Abhängigkeit der Knochenparameter vom Sexualhormonstatus besteht (vgl. [Rauchenzauner et al., 2007] [Tuchman et al., 2008] [Kleerekoper, 2001] [Mora et al., 2009] [Mora et al., 1998] [Chailurkit et al., 2005] [Leger et al., 2007]). Im klinischen Alltag nimmt jedoch die Bedeutung der Tannerstadien ab und auf deren Erhebung wird zunehmend verzichtet, da die zur Einteilung benötigten Untersuchungen, wie beispielsweise die Hodenvolumenmessung, relativ zeitaufwändig sind und die Intimsphäre der Probanden verletzen können. Die quantitative Bestimmung von Testosteron, Östrogen, FSH und GH hätte zwar den Einfluss der pubertären Hormonumstellung verdeutlichen können, war allerdings aus Kostengründen nicht durchführbar [Amrein et al., 2012; Kirmani et al., 2012; McNulty et al., 2011]. Anhand der bestimmten Wachstumsgeschwindigkeit konnte jedoch das Entwicklungsstadium der Probanden abgeschätzt werden.

Die zusätzliche Bestimmung der DKK1-Konzentration im Zusammenhang mit Sclerostin wäre ebenfalls denkbar gewesen, da beide Proteine den gleichen Wirkort und einen ähnlichen Wirkmechanismus aufweisen. Allerdings wurde in vorangegangenen Studien bereits nachgewiesen, dass DKK1 die Knochenbelastung weniger sensibel widerspiegelt als Sclerostin [Garcia-Martin et al., 2012; Gaudio et al., 2010].

In der vorliegenden Studie wurden in der Regel Nüchternblutproben entnommen, trotzdem kann gerade bei Säuglingen und Kleinkindern aufgrund der nächtlichen Fütterung ein Einfluss der Nahrungsaufnahme auf die Serumspiegel nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Bisläng gelten die betrachteten Knochenmarker jedoch als nahrungsunabhängig (vgl. [Rauchenzauner et al., 2007]).

Weitere Präzisierungen der Ergebnisse in Nachfolgestudien, bspw. durch Untersuchungen zu belastungsabhängigen Konzentrationsänderungen im juvenilen Alter, versprechen interessante Ergebnisse. Hinweise auf entsprechende Beeinflussungen von Sclerostin bei Erwachsenen wurden bereits von *Amrein et al.* aufgezeigt [Amrein et al., 2012]. Ebenfalls wären weitere Vergleiche der Assays unterschiedlicher Firmen wünschenswert, damit zukünftig eine einheitliche Standardmessung entwickelt werden kann.

9. Zusammenfassung

Die Aktivität des Knochenbaus variiert mit dem Alter und daher sind altersabhängige Veränderungen von Knochenmarkerspiegeln zu erwarten.

Die knochenspezifische AP (BAP) ist an der Calcifizierung der Knochenmatrix beteiligt und wird von den Osteoblasten synthetisiert. Die im Serum messbare Aktivität der BAP reflektiert den Knochenaufbau. TRAP5b ist ein von den Osteoklasten gebildetes Enzym, welches die endozytierten Abbaufragmente des Knochens weiter degradiert und damit den Knochenabbau widerspiegelt. Soll die Aktivität des Knochenstoffwechsels reduziert werden, sei es durch Sistieren des Wachstums oder durch verminderte mechanische Beanspruchung, synthetisieren die Osteozyten Sclerostin, durch dessen anti-anabole und anti-katabole Wirkung das Knochenremodelling gehemmt wird. Diese drei Marker sind Repräsentanten der unterschiedlichen Funktionszustände des Knochenstoffwechsels.

Ziel dieser Arbeit war es, die physiologischen Aktivitäten bzw. Konzentrationen von BAP, TRAP5b und Sclerostin bei Probanden im Alter von 0 - 21 Jahren zu ermitteln und pädiatrische Referenzwerte für die verwendeten Assays zu erstellen.

9.1 Pädiatrische Referenzwerte für BAP und TRAP5b

Zur Erstellung der Perzentilen von BAP und TRAP5b wurden 352 (davon 184 männlich) bzw. 338 (davon 180 männlich) Probanden im Alter von 0 bis 21 Jahren untersucht.

Bei beiden Markern wurde die Enzymaktivität bestimmt und es zeigte sich über einen Konzentrationsbereich von 0-300 U/L bzw. 0-30 U/L ein sich ähnelndes Verteilungsmuster. Der Serumspiegel fiel deutlich im Kindesalter ab, verzeichnete dann in der Pubertät einen Anstieg mit einem Maximum im 15. Lebensjahr bei den männlichen bzw. im 13. Lebensjahr bei den weiblichen Probanden, um dann im jungen Erwachsenenalter auf einen konstanten Basiswert zu fallen (BAP / TRAP5b: männliche Probanden: 25,1 U/L / 2,2 U/L; weibliche Probanden: 20,5 U/L / 2,3 U/L). Sowohl BAP als auch TRAP5b korrelierten signifikant mit dem Alter ($r_{\text{BAP}}=0,248$; $r_{\text{TRAP5b}}=0,214$; p jeweils $<0,01$) und waren zwischen den

Geschlechtern unterschiedlich (männliche Probanden hatten höhere Spiegel als weibliche).

9.2 Pädiatrische Referenzwerte für Sclerostin

Für die Erstellung der Referenzwerte für Sclerostin wurde das Blut von 264 Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen (davon 146 männlich) untersucht. Die Konzentration von Sclerostin war nicht-normalverteilt, sodass eine Power-Transformation mit der reziproken Quadratwurzel durchgeführt werden musste um Perzentilen zu erzeugen. Aufgrund der Rücktransformation der Daten sind die Perzentilen nicht äquidistant. Weder eine Altersabhängigkeit noch eine Geschlechtsabhängigkeit konnten für Sclerostin nachgewiesen werden ($p > 0,5$).

9.3 Zusammenhänge der untersuchten Parameter

BAP und TRAP5b zeigten einen starken linearen Zusammenhang ($r=0,776$) und Sclerostin korrelierte mit der Aktivität von BAP ($r=0,136$) und TRAP5b ($r=0,136$). Es stellte sich ein signifikanter Zusammenhang von BAP und TRAP5b mit den anthropometrischen Maßen und der Wachstumsgeschwindigkeit heraus. Sclerostin korrelierte schwach mit dem Serumcalciumspiegel und der Phosphatschwelle (TmP/GFR).

10. Thesen

Das Monitoring des Knochenstoffwechsels anhand von Knochenmarkern ist noch kein klinisch etabliertes Verfahren, da die Bestimmung der Proteine im Serum noch relativ aufwendig und kostenintensiv ist. Für eine zukünftige Weiterentwicklung und Ökonomisierung der Knochenmarkermessungen ist es essentiell Basisgrundlagen zu schaffen.

1. BAP und TRAP5b sind geschlechts- und altersabhängig (jeweils $p < 0,01$).
2. Sowohl die BAP- als auch die TRAP5b-Aktivität ist während des Wachstums erhöht und sinkt im jungen Erwachsenenalter auf einen Basiswert.
3. Die Perzentilen der BAP und TRAP5b-Aktivität sind assayspezifisch.
4. Sclerostin ist weder geschlechts- noch altersabhängig ($p > 0,5$).
5. BAP und TRAP5b zeigen einen starken linearen Zusammenhang ($r = 0,776$) und Sclerostin korreliert mit der Aktivität von BAP ($r = 0,136$) und TRAP5b ($r = 0,136$).
6. Sclerostin korreliert schwach mit der Calciumkonzentration und der Phosphatschwelle.
7. BAP und TRAP5b sind signifikant abhängig von den anthropometrischen Maßen (BMI, Größe, Gewicht) und der Wachstumsgeschwindigkeit.

11. Literaturverzeichnis

Alberti C, Chevenne D, Mercat I, Josserand E, Armoogum-Boizeau P, Tichet J *et al.* (2011). Serum concentrations of insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein-3 (IGFBP-3), IGF-1/IGFBP-3 ratio, and markers of bone turnover: reference values for French children and adolescents and z-score comparability with other references. *Clinical chemistry* 57(10):1424-1435.

Allen LC, Allen MJ, Breur GJ, Hoffmann WE, Richardson DC (2000). A comparison of two techniques for the determination of serum bone-specific alkaline phosphatase activity in dogs. *Research in veterinary science* 68(3):231-235.

Amrein K, Amrein S, Drexler C, Dimai HP, Dobnig H, Pfeifer K *et al.* (2012). Sclerostin and its association with physical activity, age, gender, body composition, and bone mineral content in healthy adults. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97(1):148-154.

Ardawi MS, Al-Kadi HA, Rouzi AA, Qari MH (2011). Determinants of serum sclerostin in healthy pre- and postmenopausal women. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 26(12):2812-2822.

Barth JH, Jones RG, Payne RB (2000). Calculation of renal tubular reabsorption of phosphate: the algorithm performs better than the nomogram. *Annals of clinical biochemistry* 37 (1):79-81.

Bellido T, Ali AA, Gubrij I, Plotkin LI, Fu Q, O'Brien CA *et al.* (2005). Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology* 146(11):4577-4583.

Bianchi ML, Baim S, Bishop NJ, Gordon CM, Hans DB, Langman CB *et al.* (2010). Official positions of the International Society for Clinical Densitometry (ISCD) on DXA evaluation in children and adolescents. *Pediatr Nephrol* 25(1):37-47.

Bonewald LF (2011). The amazing osteocyte. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 26(2):229-238.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423(6937):337-342.

Brodehl J, Gellissen K, Weber HP (1982). Postnatal development of tubular phosphate reabsorption. *Clinical nephrology* 17(4):163-171.

Caulfield MP, Reitz RE (2004). Biochemical markers of bone turnover and their utility in osteoporosis. *MLO: medical laboratory observer* 36(4):34-37.

Cejka D, Jager-Lansky A, Kieweg H, Weber M, Bieglmayer C, Haider DG *et al.* (2012). Sclerostin serum levels correlate positively with bone mineral density and microarchitecture in haemodialysis patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 27(1):226-230.

Chailurkit LO, Suthutvoravut U, Mahachoklertwattana P, Charoenkiatkul S, Rajatanavin R (2005). Biochemical markers of bone formation in Thai children and adolescents. *Endocrine research* 31(3):159-169.

Chen CJ, Chao TY, Janckila AJ, Cheng SN, Ku CH, Chu DM (2005). Evaluation of the activity of tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b in normal Chinese children--a novel marker for bone growth. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 18(1):55-62.

Chung YE, Lee SH, Lee SY, Kim SY, Kim HH, Mirza FS *et al.* (2012). Long-term treatment with raloxifene, but not bisphosphonates, reduces circulating sclerostin levels in postmenopausal women. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 23(4):1235-1243.

Cole TJ, Green PJ (1992). Smoothing reference centile curves: the LMS method and penalized likelihood. *Statistics in medicine* 11(10):1305-1319.

Cremers S, Garnero P (2006). Biochemical markers of bone turnover in the clinical development of drugs for osteoporosis and metastatic bone disease: potential uses and pitfalls. *Drugs* 66(16):2031-2058.

Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF (2013). The Osteocyte: An Endocrine Cell and More. *Endocr Rev, The Endocrine Society* 34(5):658-690.

Dresner-Pollak R, Parker RA, Poku M, Thompson J, Seibel MJ, Greenspan SL (1996). Biochemical markers of bone turnover reflect femoral bone loss in elderly women. *Calcified tissue international* 59(5):328-333.

Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E (2004). Vitamin D. *American Physiological Society* 289(1):8-28.

Engvall E, Perlmann P (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8(9):871-874.

Everts V, Korper W, Hoeben KA, Jansen ID, Bromme D, Cleutjens KB *et al.* (2006). Osteoclastic bone degradation and the role of different cysteine proteinases and matrix metalloproteinases: differences between calvaria and long bone. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 21(9):1399-1408.

Fischer DC, Mischek A, Wolf S, Rahn A, Salweski B, Kundt G *et al.* (2012). Paediatric reference values for the C-terminal fragment of fibroblast-growth factor-23, sclerostin, bone-specific alkaline phosphatase and isoform 5b of tartrate-resistant acid phosphatase. *Annals of clinical biochemistry* 49(Pt 6):546-553.

Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ (1998). TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *The Journal of experimental medicine* 188(5):997-1001.

Galli C, Passeri G, Macaluso GM (2010). Osteocytes and WNT: the mechanical control of bone formation. *Journal of dental research* 89(4):331-343.

Ganss B, Kim RH, Sodek J (1999). Bone sialoprotein. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 10(1):79-98.

Garcia-Martin A, Rozas-Moreno P, Reyes-Garcia R, Morales-Santana S, Garcia-Fontana B, Garcia-Salcedo JA *et al.* (2012). Circulating levels of sclerostin are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97(1):234-241.

Garnero P, Darte C, Delmas PD (1999). A model to monitor the efficacy of alendronate treatment in women with osteoporosis using a biochemical marker of bone turnover. *Bone* 24(6):603-609.

Garnero P (2009). Bone markers in osteoporosis. *Current osteoporosis reports* 7(3):84-90.

Gaudio A, Pennisi P, Bratengeier C, Torrisi V, Lindner B, Mangiafico RA *et al.* (2010). Increased sclerostin serum levels associated with bone formation and resorption markers in patients with immobilization-induced bone loss. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95(5):2248-2253.

Ginty F, Flynn A, Cashman KD (1998). The effect of dietary sodium intake on biochemical markers of bone metabolism in young women. *The British journal of nutrition* 79(4):343-350.

Gutierrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A *et al.* (2008). Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *The New England journal of medicine* 359(6):584-592.

Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, Cheng S, Janckila AJ, Vaananen HK (2000). Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 15(7):1337-1345.

Halleen JM, Alatalo SL, Janckila AJ, Woitge HW, Seibel MJ, Vaananen HK (2001). Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a specific and sensitive marker of bone resorption. *Clinical chemistry* 47(3):597-600.

Hannon R, Eastell R (2000). Preanalytical variability of biochemical markers of bone turnover. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 11 (6):S30-44.

Hannon RA, Clowes JA, Eagleton AC, Al Hadari A, Eastell R, Blumsohn A (2004). Clinical performance of immunoreactive tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as a marker of bone resorption. *Bone* 34(1):187-194.

Harada S, Rodan GA (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423(6937):349-355.

Hartmann C (2009). Transcriptional networks controlling skeletal development. *Current opinion in genetics & development* 19(5):437-443.

Havmoller R, Chugh SS (2012). Plasma biomarkers for prediction of sudden cardiac death: another piece of the risk stratification puzzle? *Circulation Arrhythmia and electrophysiology* 5(1):237-243.

Hogler W, Schmid A, Raber G, Solder E, Eibl G, Heinz-Erian P *et al.* (2003). Perinatal bone turnover in term human neonates and the influence of maternal smoking. *Pediatric research* 53(5):817-822.

Holtrop ME, King GJ (1977). The ultrastructure of the osteoclast and its functional implications. *Clinical orthopaedics and related research* 123):177-196.

Höβling K (2008). Osteopontin im Serum als Indikator der Knochenmetastasierung bei Postatakarzinom- ein Vergleich der diagnostischen Validität mit konventionellen Knochenmarkern. *Promotionsarbeit der Charité-Universitätsmedizin Berlin.*

Karsenty G (2003). The complexities of skeletal biology. *Nature* 423(6937):316-318.

Keller H, Kneissel M (2005). SOST is a target gene for PTH in bone. *Bone* 37(2):148-158.

Khosla S (2001). Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 142(12):5050-5055.

Kirmani S, Amin S, McCreedy LK, Atkinson EJ, Melton LJ, 3rd, Muller R *et al.* (2012). Sclerostin levels during growth in children. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 23(3):1123-1130.

Klaus A, Birchmeier W (2008). Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nature reviews Cancer* 8(5):387-398.

Kleerekoper M (2001). Biochemical markers of bone turnover: why theory, research, and clinical practice are still in conflict. *Clinical chemistry* 47(8):1347-1349.

Kramer I, Keller H, Leupin O, Kneissel M (2010). Does osteocytic SOST suppression mediate PTH bone anabolism? *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 21(4):237-244.

Kromeyer-Hauschild K, Wabitsch M, Kunze D, Geller F, Geiß HC, Hesse V *et al.* (2001). Perzentile für den Body-mass-Index für das Kindes- und Jugendalter unter Heranziehung verschiedener deutscher Stichproben. *Monatsschrift für Kinderheilkunde*:11.

Kronenberg HM (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423(6937):332-336.

Kubota T, Michigami T, Ozono K (2009). Wnt signaling in bone metabolism. *Journal of bone and mineral metabolism* 27(3):265-271.

Leger J, Mercat I, Alberti C, Chevenne D, Armoogum P, Tichet J *et al.* (2007). The relationship between the GH/IGF-I axis and serum markers of bone turnover metabolism in healthy children. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 157(5):685-692.

Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J *et al.* (2005). Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *The Journal of biological chemistry* 280(20):19883-19887.

Löffler G, P.E. Petrides und P. C. Heinrich (2007). Biochemie und Pathobiochemie 8. Auflage. Heidelberg, Springer Verlag.

Malyankar UM, Scatena M, Suchland KL, Yun TJ, Clark EA, Giachelli CM (2000). Osteoprotegerin is an alpha vbeta 3-induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 275(28):20959-20962.

McNulty M, Singh RJ, Li X, Bergstralh EJ, Kumar R (2011). Determination of serum and plasma sclerostin concentrations by enzyme-linked immunoassays. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96(7):E1159-1162.

Moester MJ, Papapoulos SE, Lowik CW, van Bezooijen RL (2010). Sclerostin: current knowledge and future perspectives. *Calcif Tissue Int, Springer* 87(2):99-107.

Mora S, Prinster C, Proverbio MC, Bellini A, de Poli SC, Weber G *et al.* (1998). Urinary markers of bone turnover in healthy children and adolescents: age-related changes and effect of puberty. *Calcified tissue international* 63(5):369-374.

Mora S, Cafarelli L, Erba P, Puzzovio M, Zamproni I, Giacomet V *et al.* (2009). Differential effect of age, gender and puberty on bone formation rate assessed by measurement of bone-specific alkaline phosphatase in healthy Italian children and adolescents. *Journal of bone and mineral metabolism* 27(6):721-726.

Nakai K, Komaba H, Fukagawa M (2010). New insights into the role of fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease. *Journal of nephrology* 23(6):619-625.

Nishizawa Y, Inaba M, Ishii M, Yamashita H, Miki T, Goto H *et al.* (2008). Reference intervals of serum tartrate-resistant acid phosphatase type 5b activity measured with a novel assay in Japanese subjects. *Journal of bone and mineral metabolism* 26(3):265-270.

Noble BS (2008). The osteocyte lineage. *Archives of biochemistry and biophysics* 473(2):106-111.

Quarles LD (2008). Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *The Journal of clinical investigation* 118(12):3820-3828.

Rauchenzauner M, Schmid A, Heinz-Erian P, Kapelari K, Falkensammer G, Griesmacher A *et al.* (2007). Sex- and age-specific reference curves for serum markers of bone turnover in healthy children from 2 months to 18 years. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92(2):443-449.

Reichel H, Esser A, Roth HJ, Schmidt-Gayk H (2003). Influence of PTH assay methodology on differential diagnosis of renal bone disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 18(4):759-768.

Ross PD, Knowlton W (1998). Rapid bone loss is associated with increased levels of biochemical markers. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 13(2):297-302.

Salo J, Lehenkari P, Mulari M, Metsikko K, Vaananen HK (1997). Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. *Science* 276(5310):270-273.

Schmitt J (2004). Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate bei Kindern und Jugendlichen: Alternative Methode zur Inulin-Clearance und der Einfluss der Laborchemischen Untersuchungsmethoden.127.

Schmitz G, Endres S, Götte D (2008). Biomarker-Bedeutung für medizinischen Fortschritt und Nutzenbewertung. *Schattauer*.

Seibel MJ, Lang M, Geilenkeuser WJ (2001). Interlaboratory variation of biochemical markers of bone turnover. *Clinical chemistry* 47(8):1443-1450.

Semenov M, Tamai K, He X (2005). SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *The Journal of biological chemistry* 280(29):26770-26775.

Shidara K, Inaba M, Okuno S, Yamada S, Kumeda Y, Imanishi Y *et al.* (2008). Serum levels of TRAP5b, a new bone resorption marker unaffected by renal dysfunction, as a useful marker of cortical bone loss in hemodialysis patients. *Calcified tissue international* 82(4):278-287.

Shroff RC, Shah V, Hiorns MP, Schoppet M, Hofbauer LC, Hawa G *et al.* (2008). The circulating calcification inhibitors, fetuin-A and osteoprotegerin, but not matrix Gla protein, are associated with vascular stiffness and calcification in children on dialysis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 23(10):3263-3271.

Singer FR, Eyre DR (2008). Using biochemical markers of bone turnover in clinical practice. *Cleveland Clinic journal of medicine* 75(10):739-750.

Solberg HE (1987). The theory of reference values Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry Zeitschrift für klinische Chemie und klinische Biochemie* 21(11):749-760.

Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Winkler DG, Latham JA (2004). Unique regulation of SOST, the sclerosteosis gene, by BMPs and steroid hormones in human osteoblasts. *Bone* 35(2):448-454.

Swaminathan R (2001). Biochemical markers of bone turnover. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 313(1-2):95-105.

ten Dijke P, Krause C, de Gorter DJ, Lowik CW, van Bezooijen RL (2008). Osteocyte-derived sclerostin inhibits bone formation: its role in bone morphogenetic protein and Wnt signaling. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 90(1):31-35.

Terpos E, de la Fuente J, Szydlo R, Hatjiharissi E, Viniou N, Meletis J *et al.* (2003). Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b: a novel serum marker for monitoring bone disease in multiple myeloma. *International journal of cancer Journal international du cancer* 106(3):455-457.

Tobiume H, Kanzaki S, Hida S, Ono T, Moriwake T, Yamauchi S *et al.* (1997). Serum bone alkaline phosphatase isoenzyme levels in normal children and children with growth hormone (GH) deficiency: a potential marker for bone formation and response to GH therapy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82(7):2056-2061.

Tuchman S, Thayu M, Shults J, Zemel BS, Burnham JM, Leonard MB (2008). Interpretation of biomarkers of bone metabolism in children: impact of growth velocity and body size in healthy children and chronic disease. *The Journal of pediatrics* 153(4):484-490.

Ueda M, Inaba M, Okuno S, Maeno Y, Ishimura E, Yamakawa T *et al.* (2005). Serum BAP as the clinically useful marker for predicting BMD reduction in diabetic hemodialysis patients with low PTH. *Life sciences* 77(10):1130-1139.

Urena P, De Vernejoul MC (1999). Circulating biochemical markers of bone remodeling in uremic patients. *Kidney Int* 55(6):2141-2156.

van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M *et al.* (2004). Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *The Journal of experimental medicine* 199(6):805-814.

van Bezooijen RL, ten Dijke P, Papapoulos SE, Lowik CW (2005). SOST/sclerostin, an osteocyte-derived negative regulator of bone formation. *Cytokine & growth factor reviews* 16(3):319-327.

Voller A, Bartlett A, Bidwell DE (1978). Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *Journal of clinical pathology* 31(6):507-520.

Weinbaum S, Cowin SC, Zeng Y (1994). A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *Journal of biomechanics* 27(3):339-360.

Wergedal JE, Veskovc K, Hellan M, Nyght C, Balemans W, Libanati C *et al.* (2003). Patients with Van Buchem disease, an osteosclerotic genetic disease, have elevated bone formation markers, higher bone density, and greater derived polar moment of inertia than normal. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88(12):5778-5783.

Wigger M, Schaible J, Muscheites J, Kundt G, Haffner D, Fischer DC (2009). Fetuin-A serum concentrations in healthy children. *Annals of clinical biochemistry* 46(Pt 6):511-513.

Woitge HW, Pecherstorfer M, Li Y, Keck AV, Horn E, Ziegler R *et al.* (1999). Novel serum markers of bone resorption: clinical assessment and comparison with established urinary indices. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 14(5):792-801.

Yamada S, Inaba M, Kurajoh M, Shidara K, Imanishi Y, Ishimura E *et al.* (2008). Utility of serum tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP5b) as a bone resorption marker in patients with chronic kidney disease: independence from renal dysfunction. *Clinical endocrinology* 69(2):189-196.

Zaidi M (2007). Skeletal remodeling in health and disease. *Nature medicine* 13(7):791-801.

Zelzer E, Olsen BR (2003). The genetic basis for skeletal diseases. *Nature* 423(6937):343-348.

12. Danksagung

Im besonderen Maße bedanke ich mich bei Frau Dr. rer. nat. habil. D.-C. Fischer für ihre intensive Betreuung und unablässige Unterstützung während dieser Studie.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. D. Haffner für die Vergabe und Betreuung des Themas.

Anja Rahn und Birgit Salewski danke ich für die große Hilfe im Labor und für ihre ständige Bereitschaft, jede Frage zu jeder Zeit zu beantworten.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Universitäts- Kinder- und Jugendklinikums bedanken, die mich während dieser Arbeit tatkräftig unterstützt haben und natürlich auch bei allen Studienteilnehmern.

Ein letzter Dank soll meinen Eltern, meinen Freunden und meinem Freund Alex gelten, die mir während der Zeit mental beigestanden haben und mich ständig motiviert haben diese Dissertation voranzutreiben und abzuschließen.

13. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Sabrina Wolf, eidesstattlich, die vorliegende Arbeit selbstständig ohne fremde Hilfe, nur unter Nutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und weder diese noch eine andere Arbeit zuvor an einer Hochschule als Dissertation eingereicht zu haben.

Rostock, den 14.01.2014

Sabrina Wolf