

Klinische Relevanz des Serumproteins Fetuin A – einem Regulator der Kalzifizierung

Dr. Cora Schäfer¹, Prof. Dr. Willi Jahnen-Dechent¹ und Dr. Vincent Brandenburg^{1,2}

¹IKZF BIOMAT, ²Klinik für Nephrologie und klinische Immunologie (Medizinische Klinik II), Universitätsklinikum der RWTH Aachen

Die bedeutendste Form der extraossären Kalzifizierung im Menschen ist die vaskuläre Kalzifizierung. Sie begleitet komplizierend die intimale Atherosklerose oder tritt primär als in der Media lokalisierte Kalzifikation im Rahmen der Arteriosklerose auf. Während in der Vergangenheit die Weichgewebkalzifizierung - einschließlich der vaskulären Kalzifizierung - als passiver Prozeß angesehen wurde, der durch Überschreiten eines kritischen Kalzium x Phosphat-Produktes ausgelöst ist, zeigen neuere Veröffentlichungen, daß dieser Prozeß durch eine Reihe von Regulatoren moduliert wird. Neben Gewebe-gebundenen lokalen Hemmstoffen der Kalzifizierung gibt es auch systemische Regulatoren in Blut und Extrazellulärflüssigkeit. Neben niedermolekularen Modulatoren ist das Plasmaprotein Fetuin-A/ α_2 -HS-Glykoprotein der Haupt-Hemmstoff im Blut. Fetuin-A kann Kristallwachstum verhindern, indem es neu entstehende Kalziumphosphat-Partikel bindet und in löslicher Form hält, bis sie aus der Zirkulation entfernt werden. Untersuchungen an Fetuin-A-defizienten Knock out-Mäusen offenbarten massive Weichgewebkalzifizierungen in einer Reihe von Hauptorganen wie Niere, Lunge und Herz. Klinische Studien haben gezeigt, daß Dialysepatienten über die bekannten Störungen im Kalziumphosphat-Haushalt hinaus auch erniedrigte Fetuin-A Serumspiegel aufweisen. Somit trägt das Fehlen dieses Hemmstoffs der Kalzifizierung erheblich zur Erhöhung des Kalzifizierungsrisikos bei.

Key Words: Kalzifizierung, Kalziumphosphat, Plasmaproteine, Mausmodell, Fetuin-A, Atherosklerose

Kalzium und Phosphat kommen in Form von Hydroxyapatit als Knochenmineral vor, sie sind aber auch essentiell für wesentliche Stoffwechselprozesse im Körper. Dazu zählen zum Beispiel der Energiestoffwechsel und die Signaltransduktion. Dies setzt voraus, daß jederzeit genügend Kalzium- und Phosphationen aus dem Knochenreservoir mobilisierbar und überall im Körper verfügbar sind. Das Blut und alle Extrazellulärflüssigkeiten stellen daher hinsichtlich der Kalzium- und Phosphat-Löslichkeit sogenannte „metastabile“ Lösungen dar. Diese Lösungen präzipitieren zwar nicht spontan Kalziumphosphat, sie ermöglichen aber permanentes Kristallwachstum und damit fortschreitende Präzipitation, sobald sich Kristallkeime gebildet haben.

Regulatoren der Kalzifizierung

Wie ist es dann zu erklären, daß die Mineralisation nur gezielt in Knochen und Zähnen stattfindet und nicht in der extrazellulären Matrix von Weichgeweben?

In mehreren, erst kürzlich erschienenen Artikeln wurde dieser Frage nachgegangen. Es

wird deutlich, daß hierfür bestimmte Proteine als Regulatoren notwendig sind. Murshed und Mitarbeiter konnten zeigen, daß nur die Extrazellulärmatrix von Zellen mineralisiert, in denen das knochenspezifische Strukturprotein Kollagen-Typ I und gleichzeitig ein Pyrophosphat-spaltendes Enzym, die gewebe-unspezifische alkalische Phosphatase gebildet werden¹. Knochenbildende Zellen (Osteoblasten) produzieren das Enzym alkalische Phosphatase in sehr großen Mengen und ermöglichen so die Spaltung des inhibitorischen auf die Mineralisierung wirkenden Pyrophosphats sowie anderer Phosphat-haltiger Moleküle, so daß Phosphat in genügender Menge für die Knochenbildung zur Verfügung steht. Demnach unterliegt der regulierte Prozeß der Mineralisierung offensichtlich einem Gleichgewicht von aktivierenden und inhibierenden Mechanismen.

Neben niedermolekularen Faktoren wie dem genannten Pyrophosphat sind aus genetischen Studien heute eine Reihe von Proteinen bekannt, die den Prozeß der Kalzifizierung modulieren. Die überwiegende Mehrheit ist durch die gezielte Deletion des jeweils kodierenden Gens in Knock out-Mäu-

sen identifiziert worden. Das Ausschalten der Pyrophosphatwirkung – einmal durch Deletion des für die Produktion notwendigen Enzyms Ecto-Nukleotid-Pyrophosphatase-Phosphodiesterase 1 (Enpp1) oder eines Transporters für Pyrophosphat (Ank) – bewirkt in Mäusen die Kalzifizierung von Gelenkknorpel. Ein weiteres Paradebeispiel dafür, daß Proteine die Kalziumphosphat-Präzipitation spezifisch und ausschließlich in den Geweben verhindern können, in denen sie gebildet werden, ist das Matrix-Gla-Protein (MGP). Dieses weitgehend unlösliche Protein ist in der Extrazellulärmatrix, in Arterien und Knorpel lokalisiert. Die MGP-Knock out-Maus weist erwartungsgemäß arterielle und Knorpel-Kalzifizierungen auf, was letztlich zur Ruptur der Aorta wenige Wochen nach Geburt der Tiere führt.

Fetuin-A, ein systemischer Inhibitor der Kalzifizierung

Den bisher beschriebenen lokal wirkenden Regulatoren der physiologischen Mineralisierung im Knochen oder der pathologischen Kalzifizierung in Weichgeweben steht bislang ein einziges systemisch inhibierend wirkendes Plasmaprotein gegenüber, das Fetuin-A/ α_2 -HS-Glykoprotein (genetisches Symbol: AHSG). Dieses etwa 60 kDa große Glykoprotein wird in der Leber synthetisiert und zirkuliert in einer relativ hohen Konzentration von 0,4-1,0 g/L. Es kann *in vitro* die Kalziumphosphat-Präzipitation inhibieren, indem es mit hoher Affinität an einen Kristallisationskeim bindet, dessen Wachstum verhindert und ein kolloidales Aggregat bildet^{2,4}. Diesen löslichen hochmolekularen Komplex haben wir in Analogie zu den Lipoprotein-Partikeln, die die Zirkulation von sonst unlöslichen Lipiden ermöglichen, Calciprotein-Partikel (CPP) genannt. Einer groben Schätzung zufolge ist Fetuin-A für rund 50% des inhibitorischen Effekts von Serum gegenüber der spontanen Präzipitation verantwortlich.

Phänotyp der Fetuin-A Defizienz

Fetuin-A puffert und stabilisiert einen Überschuß von Kalzium und Phosphat im Blut, der aus vermehrtem Knochenabbau resultiert (siehe Abb. 1). Die Stabilisierung des Komplexes ist zwar nur vorübergehend, aber unter Normalbedingungen ausreichend, um effizient aus der Zirkulation entfernt zu werden, so daß es nicht zu Kalziumphosphat-Ablagerungen kommen kann. Mäusen, die dieses Protein nicht mehr herstellen können, fehlt dieser wichtige Stabilisations- und Wegräum (Clearing)-Mechanismus. Dementsprechend zeigen Fetuin-A-Knock out-Mäuse Weichgewebkalzifizierungen in einer Reihe von Hauptorganen, wie etwa Lunge, Niere und Herz⁵ (siehe Abb. 2). Bei älteren Fetuin-A-

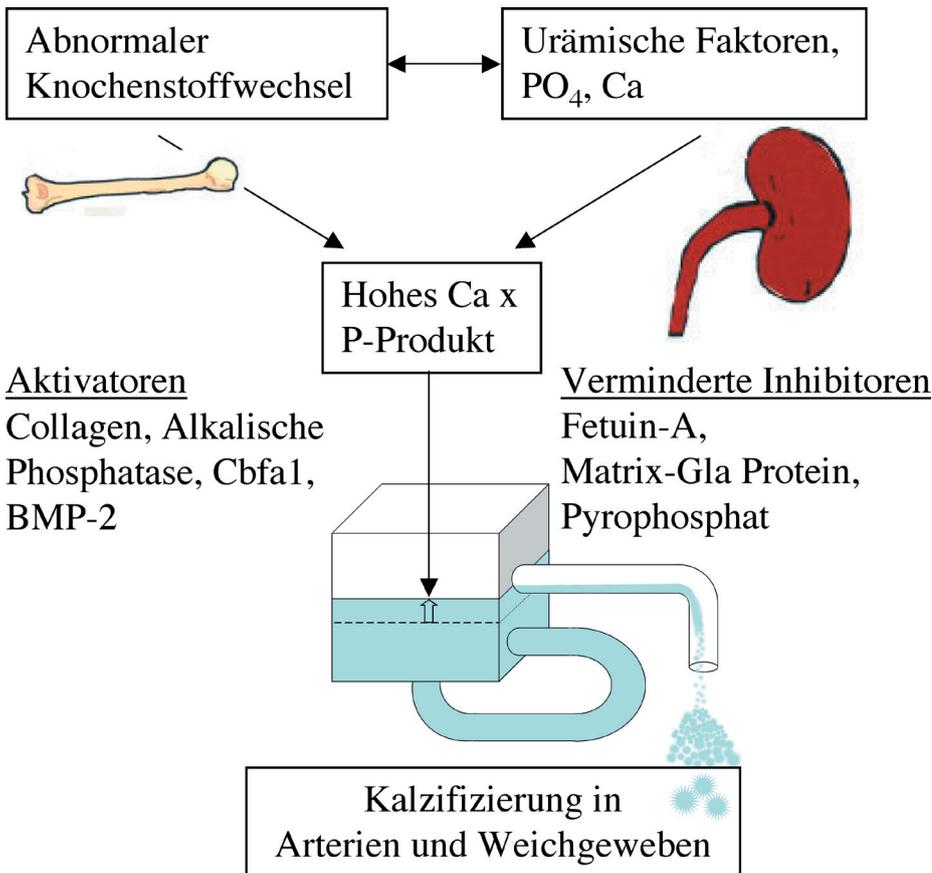


Abb.1: Regulatoren der Kalzifizierung in Arterien und Weichgeweben. Ein zu hohes Kalzium x Phosphat-Produkt, meist einhergehend mit einem sekundären Hyperparathyreoidismus, gilt als Hauptrisikofaktor für ektopische Kalkablagerungen. Daneben gibt es eine Reihe von Proteinen, die lokal auf bestimmte Stimuli hin im Gewebe exprimiert werden und dort die Kalzifizierung aktivieren. Dieser Prozeß kann insbesondere bei einem relativen Mangel an Inhibitoren beschleunigt ablaufen.

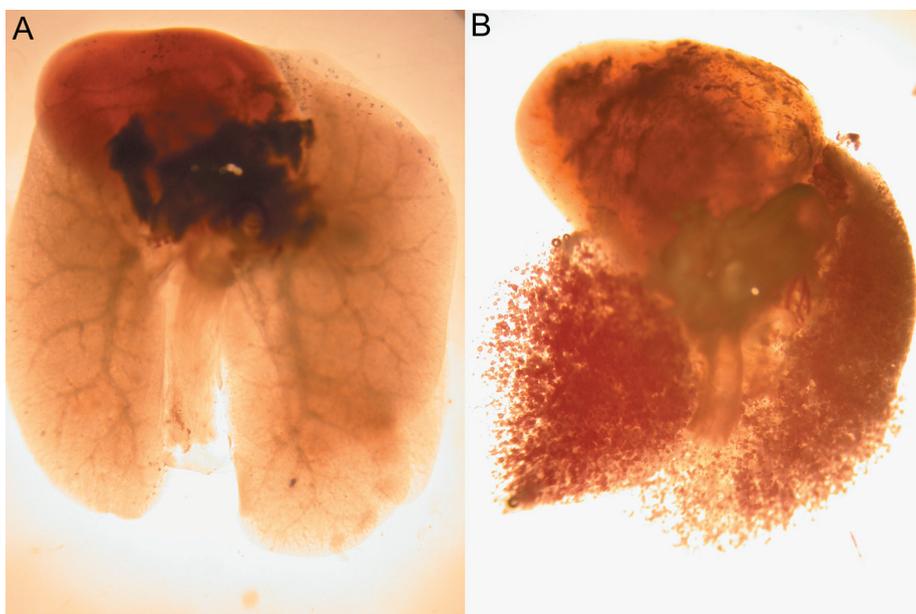


Abb.2: Makroskopische Ansicht von Herz und Lunge von 10 Monate alten Wildtyp- (A) und Fetuin-A-Knock out-Mäusen (B). Die Organe wurden nach Präparation mit Alizarinrot angefärbt. Während im Herzen der Knock out-Maus hauptsächlich linienförmige Strukturen positiv gefärbt sind, waren in den Lungenflügeln eine Vielzahl kleiner rundlicher Kalziumphosphat-Präzipitate nachweisbar. In den Organen der Wildtyp-Maus konnten keine Kalzifizierungen festgestellt werden.

defizienten Mäusen kommt es aufgrund der fortschreitenden Kalzifizierung in der Niere zur Beeinträchtigung der Funktion. Danach entwickelt sich nach klassischem Muster ein sekundärer Hyperparathyreoidismus, wie es auch bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz zu beobachten ist⁶.

Nephelometrische Bestimmung des Fetuin-A-Spiegels im Menschen

Nach anfänglichen Messungen der Fetuin-A-Serumspiegel mit einem indirekten ELISA-Assay verwenden wir jetzt die Methode der Nephelometrie als eine sehr verlässliche und schnelle Technik zur Messung der Fetuin-A-Konzentration im Blut.

Die Nephelometrie wird mit dem gleichen polyklonalen Fetuin-A-Kaninchen-Antikörper durchgeführt wie vorausgehende ELISA-Messungen⁷. Die Übertragung der mittels ELISA gewonnenen Konzentrationen auf die Nephelometrie-Streulichtmessung erfolgte durch entsprechende Verdünnungsreihen. Der polyklonale Fetuin-A-Kaninchen-Antikörper reagiert nicht mit Fetuin-B, einem nahe verwandten Protein mit bisher ungeklärter Funktion⁸. Die Präanalytik gestaltet sich einfach, da sich Fetuin-A im Serum auch nach zweitägiger Lagerung bei Raumtemperatur stabil zeigte. Davon ausgenommen sind Proben von Patienten mit Septikämie oder Coagulopathien, die eine erhöhte proteolytische Aktivität im Serum aufweisen können⁹.

Die Nephelometriemethode mißt linear zwischen 0,05 und 2,6 g/L Fetuin-A im Serum. Die Präzisionswerte sind für die Intra-Assay-Präzision ein Variationskoeffizient (VK) von 7,75% und für die Präzision von-Tag-zu-Tag ein VK von 8,5%.

Normwerte

In einem großem Kollektiv von fast 1.000 nicht dialysepflichtigen Patienten (80% mit einer glomerulären Filtrationsrate von >60 ml/min, mittleres Alter 67 Jahre) konnte ein Normwert für Fetuin-A von 0,4-1,0 g/L definiert werden (siehe Abb. 3).

Fetuin-A-Serumwerte sind geschlechtsabhängig. Frauen haben höhere Werte als Männer. Darüber hinaus besteht eine Altersabhängigkeit (siehe Abb. 4). Generell treten bei allen getesteten Tierspezies die höchsten Fetuin-A-Serumkonzentrationen in der Phase des stärksten Knochenwachstums auf, was vermutlich damit zu tun hat, daß in dieser Phase besonders viel Kalzium und Phosphat im Körper mobilisiert werden und das mögliche Risiko ungewollter Kalzifizierung steigt. Interessanterweise waren die ersten beobachteten Knock out-Mäuse mit Kalzifizierung sämtlich ex-schwangere Weibchen¹⁰. Über ein ähnlich erhöhtes Kalzifizierungsrisiko bei schwangeren

Frauen ist nichts bekannt. Allerdings kennt man das Phänomen der physiologischen Hyperkalzämie bei Schwangeren und stillenden Frauen. Es wird damit erklärt, daß die Mütter große Mengen an Kalzium (und Phosphat) mobilisieren müssen – zunächst im Blut, dann in der Muttermilch –, um den Bedarf des mineralisierenden Skeletts im Baby zu decken. In dieser Situation sind die Antikalzifizierungs-Strategien des Körpers vermutlich besonders aktiv, und zwar erfolgreich, sonst gäbe es mehr Berichte über Kalzifizierungen während der Schwangerschaft oder der Stillzeit.

Klinische Relevanz des Fetuin-Spiegels

In Dialysepatienten treten vermehrt vasculäre Kalzifizierungen als weitere Komplikation der beschleunigten urämischen Atherosklerose auf. Das Ausmaß der Kalzifizierung korreliert mit der Mortalität in der Dialysepopulation. In einer klinischen Querschnittsstudie konnten wir zeigen, daß die Fetuin-A-Plasmakonzentration in Dialysepatienten signifikant niedriger ist als in Gesunden. Diese erniedrigte Konzentration korrelierte mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität⁷. Moe und Mitarbeiter konnten zeigen, daß niedrige Fetuin-A-Serumspiegel bei Dialysepatienten auch mit Koronararterienkalzifikation einhergehen¹¹. Fetuin-A ist ein Negativ-Akutphase-Protein, das heißt, im Verlauf einer Entzündung wird die Plasmakonzentration herunterreguliert. Da Dialysepatienten quasi permanent einen Status der Mikroinflammation und somit erniedrigte Fetuin-A-Spiegel und zudem meist ein erhöhtes Niveau an Kalzium x Phosphat-Produkt aufweisen, kommen in diesem Kollektiv gleich zwei Risikofaktoren zum Tragen. Um dieses Risikopotential besser abschätzen zu können, haben wir einen Assay (Nephelometrie) etabliert, um die Fetuin-A-Serumspiegel zusammen mit dem Hauptentzündungsparameter C-reaktives Protein messen zu können.

Hinsichtlich der Vorhersage des Auftretens von Kalzifikationsereignissen sind bestimmte punktuelle Fetuin-A-Werte nur eingeschränkt verwertbar. Das liegt zum einen daran, daß Fetuin-A immer gemeinsam mit anderen Auslösern der Kalzifikation bewertet werden muß (z.B. dem Grad der Inflammation, ausgedrückt in CRP-Werten, oder dem Maß der Kalzium-Phosphat-Haushaltsstörung). Zum anderen ist möglicherweise nicht nur der absolute Fetuin-A-Wert für das Verhindern der ektopen Kalzifikation wichtig, sondern auch die Fähigkeit des Individuums, bei Gefahr der Kalzifizierung die Fetuin-A-Werte aufrechtzuerhalten. In diesem Zusammenhang sind kürzlich erschienene Arbeiten von Stenvinkel und Mitarbeitern interessant. Sie zeigten, daß

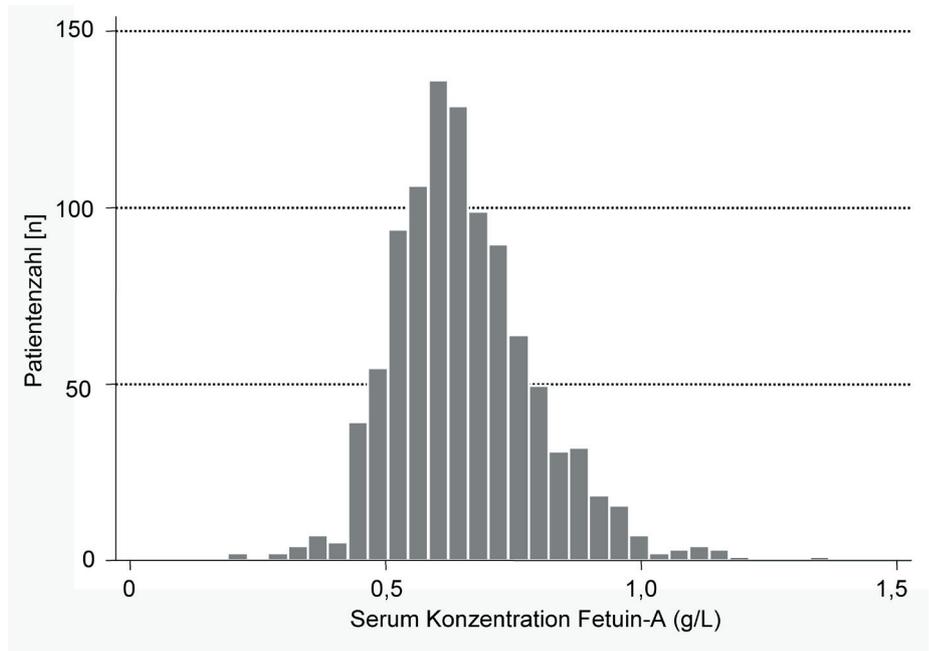


Abb. 3: Normalverteilung der Fetuin-A-Serumkonzentration in ca. 1.000 nierengesunden Probanden. Normalwert 0,4 – 1,0 g/L.

Patienten mit dem 256Thr/Ser Fetuin-A Allotyp¹² unter Inflammation mit dem Fetuin-A-Serumspiegel „zusammenbrechen“.

Wir haben mittlerweile 10 Dialysepatienten mit Kalziphylaxie (akute, schwere, lebensbedrohliche arterioläre Obstruktionserkrankung mit Kalziumphosphat-Ausfällung vornehmlich im subkutanen Fett) im zeitlichen Verlauf beobachtet, bei denen die Fetuin-A-Werte überwiegend im (unteren) Normbereich lagen. Diese Patienten zeigten jedoch alle gleichzeitig erhöhte Inflammationsmarker (CRP >20 mg/L). Fetuin-A ist ein negatives Akutphase-Protein und möglicherweise wird sich (delta) Fetuin-A als relevanter Prädiktor von Kalzifikationsereignissen erweisen. In einer Querschnittsanaly-

se bei Nicht-Dialysepatienten korreliert das Fetuin-A mit dem hoch-sensitiven CRP im Normbereich oder leicht erhöhten Bereich nur schlecht. Erst oberhalb von 20 mg/L CRP sinken in Kohorten-Querschnittsanalysen die mittleren Serumwerte von Fetuin-A deutlich ab. (Abb. 5).

Ausblick

Mäuse mit Fetuin-Defizienz, die auf verschiedenen genetischen Hintergründen gezüchtet wurden, weisen unterschiedlich starke Ausprägungen der Weichgewebekalzifizierung auf⁶. Dies deutet auf weitere, genetisch determinierte protektive Mechanismen und Modulatoren hin. Diese

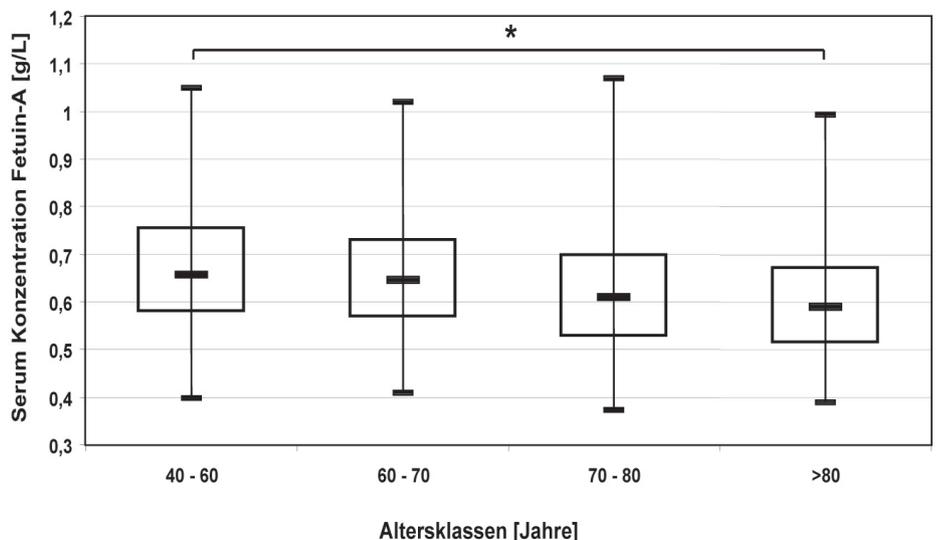


Abb 4: Fetuin-A-Serumkonzentration bei nierengesunden Probanden in Abhängigkeit vom Lebensalter (Minimum, 25% Perzentile, Median, 75% Perzentile, Maximum)

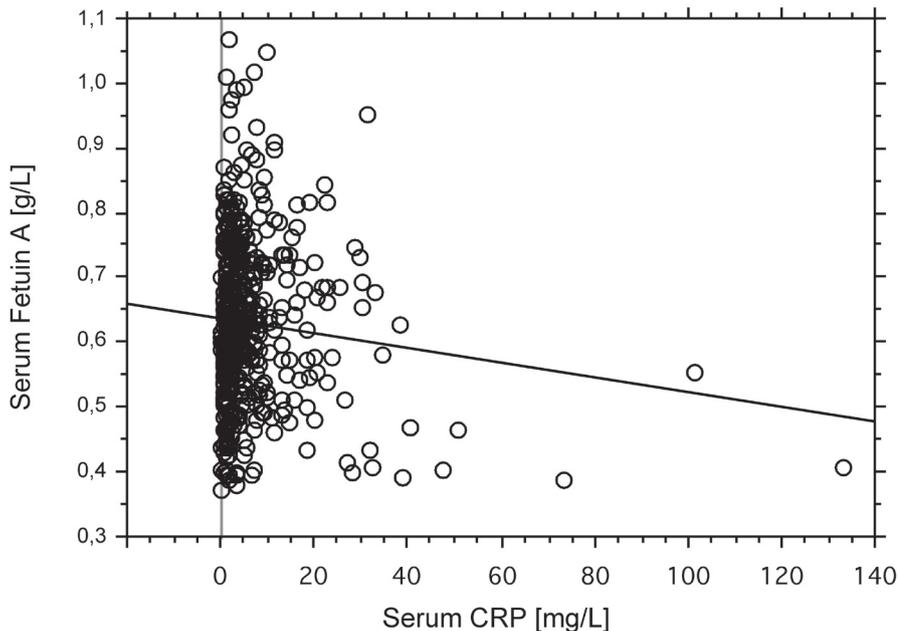


Abb. 5: Fetuin-A-Serumkonzentration in Korrelation zum C-reaktiven Protein. In einem CRP-Bereich <10 mg/L besteht keine Korrelation zwischen der Serumkonzentration von CRP und Fetuin-A.

gilt es in Zukunft zu identifizieren und zu charakterisieren. Hieraus könnten sich neue Behandlungsansätze für Risikopatienten, wie etwa die Population der Dialysepatienten mit einem gestörten Mineralhaushalt ergeben.

Fetuin-A-Knock out-Mäuse auf dem DBA/2 Stamm-Hintergrund entwickeln ebenso wie Dialysepatienten eine Niereninsuffizienz mit sekundärem Hyperparathyreoidismus. Jedoch unterscheiden sich die Krankheitsbilder hinsichtlich der Lokalisation der Kalkablagerungen. Während in den Patienten vordringlich arterielle Kalzifizierungen auftreten, sind diese in Mäusen den Ablagerungen in Hauptorganen wie Herz, Lunge und Niere völlig untergeordnet⁵. Auch dies deutet auf unterschiedliche Protektionsmechanismen und/oder Risikofaktoren bei den zwei Spezies hin. Im Menschen gelten zum Beispiel Rauchen, Diabetes, Bluthochdruck, hohes LDL-Cholesterin und niedriges HDL-Cholesterin als bedeutende Risikofaktoren der vaskulären Kalzifizierung. Diese Risikofaktoren müssen jedoch im Mausmodell erst provoziert werden. Ein etabliertes Modell um Einflußfaktoren der Atherosklerose im Tier untersuchen zu können, ist die Apolipoprotein E-defiziente Maus. Diese Mäuse entwickeln eine Hyperlipidämie und als Folge bilden sich cholesterinreiche Ablagerungen in Arterien, die sogenannten atherosklerotischen Plaques, die sekundär verkalken können. Welchen Einfluß der systemische Kalzifizierungsinhibitor Fetuin-A bei diesem Prozeß spielt, wird momentan in Mäusen mit doppelter Gendefizienz (Apolipoprotein E x Fetuin-A) untersucht.

Literatur

- [1] Murshed, M., Harmey, D., Millan, J. L., McKee, M. D., and Karsenty, G., *Genes Dev* 19 (2005), 1093-1104.
- [2] Heiss, A., DuChesne, A., Denecke, B., Grötzinger, J., Yamamoto, K., Renné, T., and Jahnen-Dechent, W., *J Biol Chem* 278 (2003), 13333-13341.
- [3] Jahnen-Dechent, W. (2004) in *Biomaterialization Progress in Biology, Molecular Biology and Application* (Bauerlein, E., ed), 2 Ed., Wiley-VCH, Weinheim.
- [4] Schinke, T., Amendt, C., Trindl, A., Pöschke, O., Müller-Esterl, W., and Jahnen-Dechent, W., *J Biol Chem* 271 (1996), 20789-20796.
- [5] Merx, M. W., Schäfer, C., Westenfeld, R., Brandenburg, V., Hidajat, S., Weber, C., Ketteler, M., and Jahnen-Dechent, W., *J Am Soc Nephrol* 16 (2005), 3357-3364.
- [6] Schäfer, C., Heiss, A., Schwarz, A., Westenfeld, R., Ketteler, M., Floege, J., Müller-Esterl, W., Schinke, T., and Jahnen-Dechent, W., *J Clin Invest* 112 (2003), 357-366.
- [7] Ketteler, M., Bongartz, P., Westenfeld, R., Wildberger, J., Mahnen, A., Böhm, R., Metzger, T., Wanner, C., Jahnen-Dechent, W., and Floege, J., *The Lancet* 361 (2003), 827-833.
- [8] Denecke, B., Gräber, S., Schäfer, C., Heiss, A., Wölje, M., and Jahnen-Dechent, W., *Biochem J* 376 (2003), 135-145.
- [9] Nawratil, P., Lenzen, S., Kellermann, J., Haupt, H., Schinke, T., Müller-Esterl, W., and Jahnen-Dechent, W., *J Biol Chem* 271 (1996), 31735-31741.
- [10] Jahnen-Dechent, W., Schinke, T., Trindl, A., Müller-Esterl, W., Sablitzky, F., Kaiser, S., and Blessing, M., *J Biol Chem* 272 (1997), 31496-31503.
- [11] Moe, S. M., Reslerova, M., Ketteler, M., O'neill, K., Duan, D., Koczman, J., Westenfeld, R., Jahnen-Dechent, W., and Chen, N. X., *Kidney Int* 67 (2005), 2295-2304.
- [12] Stenvinkel, P., Wang, K., Qureshi, A. R., Axelsson, J., Pecoits-Filho, R., Gao, P., Barany, P., Lindholm, B., Jogestrand, T., Heimbürger, O., Holmes, C., Schalling, M., and Nordfors, L., *Kidney Int* 67 (2005), 2383-2392.

Korrespondenzadresse

Dr. Vincent Brandenburg
 IZKF BIOMAT
 Universitätsklinikum Aachen
 Pauwelsstraße 30
 D-52074 Aachen
 Tel.: +49-(0)241-80-80163 / -80157
 Fax.: +49 (0)241-80-082 573
 eMail: Vincent.Brandenburg@post.rwth-aachen.de