

**Aus dem Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart**  
**(Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen)**  
**Abteilung für Allgemeine Innere Medizin und Nephrologie**

**Immunhistochemische Expressionsmuster von Klotho,  
FGFR-1, CaSR, VDR, Cyp27B1 und Ki67 bei Patienten  
mit primärem und sekundärem  
Hyperparathyreoidismus**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Lehmann, geb. Kreißig, Renate**

**2019**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. D. M. Alscher

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Artunc

Tag der Disputation: 12.12.2019

## **Widmung**

Ich widme diese Doktorarbeit meinem Mann, der als „Nicht-Mediziner“ wohl am meisten mitgefiebert, mitgelitten und sich mitgefremt hat – und mir als wesentliche Stütze immer zur Seite stand.

Deine motivierenden Worte und Deinen Einsatz haben mir zu jeder Zeit geholfen, dieses „große Projekt“ in einer turbulenten Lebensphase mit 3 kleinen Kindern zu Ende zu bringen. Ich bin glücklich, dass ich Dich habe!

# INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG .....	10
1.1.	Anatomie und Histologie der gesunden Nebenschilddrüse .....	10
1.2.	Physiologie der gesunden Nebenschilddrüse – die Mineral-Homöostase .....	11
1.3.	Hyperparathyreoidismus – Physiologie, Histologie und Pathologie .....	16
1.4.	Fragestellungen .....	21
2.	MATERIAL UND METHODEN .....	23
2.1.	Patientenkollektiv .....	23
2.1.1.	Ethikvotum .....	23
2.2.	Methode .....	24
2.2.1.	Vorbereitung .....	24
2.2.2.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	24
2.2.3.	Eisen-Färbung .....	25
2.2.4.	Immunhistochemie .....	25
2.2.4.1.	Prinzip .....	25
2.2.4.2.	Durchführung der Färbung .....	27
2.2.4.3.	Verwendete Antikörper .....	29
2.3.	Auswertung .....	30
2.3.1.	Morphologie .....	30
2.3.2.	Immunhistochemie .....	32
2.4.	Statistik .....	36
3.	ERGEBNISSE .....	37
3.1.	Primärer Hyperparathyreoidismus .....	37
3.1.1.	Basisdaten .....	37
3.1.2.	Morphologie .....	39
3.1.3.	Immunhistochemie bei pHPT versus gesunde Kontrollgruppe .....	39
3.1.4.	Proliferationsrate bei pHPT versus gesunde Kontrollgruppe .....	42
3.1.5.	Proteinexpression im Vergleich zu Laborwerten .....	42
3.2.	Sekundärer Hyperparathyreoidismus .....	43
3.2.1.	Basisdaten .....	43
3.2.2.	Morphologie .....	46
3.2.3.	Immunhistochemie bei sHPT versus gesunde Kontrollgruppe .....	46
3.2.4.	Proliferationsrate bei sHPT versus gesunde Kontrollgruppe .....	50

3.2.5.	Korrelationen von Proteinexpressionen, Laborparameter und Dauer der Nierenersatztherapie .....	50
4.	DISKUSSION.....	53
4.1.	Primärer Hyperparathyreoidismus .....	53
4.1.1.	Morphologie.....	53
4.1.2.	Klotho-, FGFR-1, CaSR- und VDR-Expressionen .....	55
4.1.3.	Ki-67 .....	59
4.1.4.	Cyp27B1.....	61
4.2.	Sekundärer Hyperparathyreoidismus .....	61
4.2.1.	Morphologie.....	61
4.2.2.	Klotho-, FGFR-1-,CaSR- und VDR-und Expressionen .....	62
4.2.3.	Ki-67 .....	68
4.2.4.	Cyp27B1.....	69
4.2.5.	Korrelationen von Proteinexpressionen und Laboregebnissen und der Dauer der Nierenersatztherapie .....	70
4.2.6.	Klinischer Bezug.....	70
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	72
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	74
7.	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL.....	81
8.	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	83
9.	DANKSAGUNG .....	84

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 1:</b> Die Mineralhomöostase beim Gesunden.....	16
<b>Abbildung 2:</b> Mineralstoffwechsel beim pHPT .....	17
<b>Abbildung 3:</b> Mineralstoffwechsel beim sHPT .....	19
<b>Abbildung 4:</b> 2-Schritt-Detektionssystem EnVision™ .....	27
<b>Abbildung 5:</b> Zelltypen in der NSD .....	32
<b>Abbildung 6:</b> Farbtintensitäten der Proteinexpressionen und Ki-67-Anfärbung	34
<b>Abbildung 7:</b> Vergleich der Färbungen miteinander .....	35
<b>Abbildung 8:</b> Korrelationen zwischen den Expressionen der immunhistochmischen Färbungen der pHPT-Gruppe untereinander (Klotho, FGFR, CaSR, VDR, Cyp27B1, Ki67) .....	41
<b>Abbildung 9:</b> Korrelationskoeffizienten nach Spearman zwischen den IRS der immunhistochemischen Färbungen der sHPT-Gruppe untereinander (Klotho, FGFR, CaSR, VDR, Cyp27B1, Ki67) .....	49

## TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 1:</b> Labor bei pHPT versus Labor bei sHPT .....	20
<b>Tabelle 2:</b> Immunhistochemie bei pHPT versus Immunhistochemie bei sHPT	21
<b>Tabelle 3:</b> In der Studie verwendete Primärantikörper mit Angabe des Wirts und der angewendeten Verdünnung .....	29
<b>Tabelle 4:</b> Bewertung des p-Wertes .....	36
<b>Tabelle 5:</b> Basisdaten und Laborwerte der Patienten mit pHPT .....	38
<b>Tabelle 6:</b> Korrelationen zwischen Proteinexpressionen und Laborwerten in der pHPT-Gruppe. ....	43
<b>Tabelle 7:</b> Basisdaten der sHPT- und der Kontrollgruppe .....	45
<b>Tabelle 8:</b> Korrelationen zwischen Proteinexpressionen und Laborwerten in der sHPT-Gruppe .....	51

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CaSR	für englisch <i>calcium-sensing receptor</i>
CKD	Chronische Niereninsuffizienz (für englisch <i>chronic kidney disease</i> )
DAB	Diaminobenzidin
DBP	Vitamin-D-bindendes Protein
EGR-1	für englisch <i>early growth response protein 1</i>
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor (für englisch <i>fibroblast growth factor</i> )
FGFR	FGF-Rezeptor (für englisch <i>fibroblast growth factor receptor</i> )
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Hb	Hämoglobin
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IRS	Immunreaktiver Score
kb(p)	Kilobasen(paare), entspricht 1.000 Basenpaaren
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade (für englisch <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
MEN	Multiple Endokrine Neoplasie
NSD	Nebenschilddrüse
P-gp	P-glycoprotein

pHPT	primärer Hyperparathyreoidismus
PTH	Parathormon
r	Korrelationskoeffizient
RRT	Nierenersatztherapie (für englisch <i>renal replacement therapy</i> )
SD	Standardabweichung (für englisch <i>standard deviation</i> )
sHPT	sekundärer Hyperparathyreoidismus
tHPT	tertiärer Hyperparathyreoidismus
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VDRE	für englisch <i>vitamin-D responsive element</i>
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Anatomie und Histologie der gesunden Nebenschilddrüse

Die 4 linsengroßen (der Durchmesser beträgt 3–6 mm) Epithelkörperchen befinden sich dorsal der Schilddrüsen, zwei an den oberen Polen der Schilddrüse (Glandulae parathyreoideae superiores) und zwei an den unteren Polen (Glandulae parathyreoideae inferiores) – jedes wiegt 30 bis 40 mg. 2-13 % aller Gesunden haben darüber hinaus noch weitere Glandulae, in den meisten Fällen eine Fünfte im zervikalen Thymus (1).

Die beiden oberen Epithelkörperchen entstehen aus dem Endoderm der 4., die beiden unteren aus dem Endoderm der 3. Schlundtasche (2). Sie steigen gemeinsam mit dem Thymus abwärts bis an den unteren Pol der Schilddrüsenlappen (2).

Die 4 endokrinen Drüsen sind jeweils von einer dünnen, fibrösen Kapsel umgeben. Innerhalb der Kapsel liegen Fettgewebe, Blutgefäße und das Drüsenparenchym. Der Anteil an Fettgewebe erhöht sich von der Pubertät an bis ins 5. Lebensjahrzent und kann dann bis zu 50 % des gesamten Drüsenvolumens ausmachen (3).

Die 4–8 µm großen, polygonalen Hauptzellen bilden die Mehrheit des Drüsenparenchyms. Diese sind je nach Funktion hell oder dunkel gefärbt. Die hellen, wahrscheinlich nicht aktiven Zellen sind glykogenreich, während die dunklen Zellen glykogenarm sind. Den dunklen Hauptzellen wird Hormonaktivität zugeschrieben. Ihr Kern ist rundlich und dicht.

Es kommen auch große (20–40 µm), mitochondrienreiche oxyphile Zellen vor. Intermediärzellen erscheinen als Übergangszellen von der Haupt- zur oxyphilen Zelle. Oxyphile Zellen gehören zur Gruppe der Onkozyten. Das reichliche eosinophile, feinkörnige Zytoplasma verleiht den oxyphilen Zellen ihren Namen.

Die Kerne sind klein, chromatindicht und rund. Diese großen, kubischen bis polyedrischen Drüsenepithelzellen bilden sich infolge von Alterung und Funktionsminderung. Die Funktion der oxyphilen Zellen ist noch unklar.

### **1.2. Physiologie der gesunden Nebenschilddrüse – die Mineral-Homöostase**

Die Hauptzellen produzieren das Polypeptidhormon **Parathormon (PTH)**. PTH besteht aus 84 Aminosäuren, wobei nur das aminoternale 1–34 Peptid biologisch aktiv ist. PTH gehört neben Calcitonin, seinem Gegenspieler, und Calcitriol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) zu den wichtigsten Hormonen der Mineralhomöostase, welche den Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Haushalt über die Knochen, den Darm und die Niere regulieren.

Fällt das ionisierte Serumcalcium, erfolgt nach PTH-Ausschüttung die Bindung von PTH an den PTH-Rezeptor der Osteoblasten, welche daraufhin wiederum Faktoren bilden, die die Osteoklasten zur Knochenresorption aktivieren.  $\text{Ca}^{2+}$  und Phosphat sind die Hauptkomponenten von Hydroxylapatit, der Grundsubstanz unserer Knochen. Bei der Knochenresorption wird Hydroxylapatit aufgelöst und dadurch  $\text{Ca}^{2+}$  und Phosphat freigesetzt.

Über intestinale Epithelien des Duodenums, des Jejunums und des Ileums wird  $\text{Ca}^{2+}$  trans- und parazellulär aufgenommen, wobei die parazelluläre Absorption durch Calcitriol getriggert wird, welches durch eine Veränderung der Struktur der tight junctions über Aktivierung der Proteinkinase C die Zellen für  $\text{Ca}^{2+}$  permeabler macht (4).

Die Niere ist ein zentrales Organ für die Aufrechterhaltung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gleichgewichts. Im Pars convoluta des proximalen Tubulus wird 60-70 % des filtrierten  $\text{Ca}^{2+}$  zum großen Teil parazellulär gemeinsam mit Wasser infolge des „solvent drag“ reabsorbiert, zum kleinen Teil aktiv transzellulär, was durch PTH und Calcitonin gesteuert wird. In der Pars recta des distalen Tubulus wird 20 % des  $\text{Ca}^{2+}$  ebenso trans – und parazellulär zurückgewonnen, wobei auch hier die

kalziotropen Hormone PTH und Calcitonin die aktive  $\text{Ca}^{2+}$ -Absorption durch die Zelle stimulieren (4). In der Pars convoluta des distalen Tubulus wird 10-15 % des filtrierte  $\text{Ca}^{2+}$  ausschließlich transzellulär entgegen eines chemischen und elektrischen Gradienten reabsorbiert (4).

PTH regelt neben der Aufrechterhaltung eines engen Calcium-Spiegels gemeinsam mit anderen Hormonen auch den Phosphat-Haushalt.

In gleicher Weise wie Calcium wird durch PTH aus den Knochen auch **Phosphat** mobilisiert. In der Niere verursacht PTH eine verminderte Reabsorption von Phosphat und somit eine verstärkte Phosphat-Ausscheidung. Normalerweise werden Phosphationen über im Bürstensaum des proximalen Tubulus befindlichen Natrium-Phosphat-Kotransporter (Npt2a, Npt2c und PiT-2) wieder aufgenommen – PTH hemmt die Reabsorption von Phosphat jedoch durch eine rasche Downregulierung der Natrium-Phosphat-Kotransporter (4).

Weiterhin ist PTH für die Aktivierung des inaktiven Calcidiols ( $25\text{-(OH)D}_3$ ) in die aktive Form Calcitriol ( $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ ) verantwortlich. Die dafür notwendige Hydroxylierung wird im proximalen Tubulus durch die  $1\alpha$ -Hydroxylase stimuliert. Deren Gegenspieler 24-Hydroxylase kann die aktive Form des Vitamin-D wieder in die inaktive Form ( $25\text{-(OH)D}_3$ ) bringen.

In einer gesunden NSD wird die PTH-Sekretion durch mehrere Faktoren stimuliert bzw. inhibiert. Hohe  $\text{Ca}^{2+}$ - oder gesteigerte Vitamin-D-Serum-Konzentrationen hemmen die pulsatile PTH-Ausschüttung über einen Feedback-Mechanismus. Vermehrtes Auftreten von Phosphat steigert wiederum die Sekretion von PTH.

$\text{Ca}^{2+}$  wirkt über den **CaSR** (calciumsensitiver Rezeptor), ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, welcher auf der Oberfläche der NSD-Zellen lokalisiert ist (5). Da  $\text{Ca}^{2+}$  intrazellulär als second Messenger für zahlreiche Signaltransduktionen wirkt, ist der extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel streng eingestellt.

Ein weiterer Mitspieler im kalziotropen System ist **Vitamin D**. Diese Gruppe bioaktiver Steroidhormone gelangen entweder durch Aufnahme mit der Nahrung als Prä-Prohormone in den Körper – hierbei ist Cholecalciferol tierischer und Ergocalciferol pflanzlicher Herkunft – oder es wird in der Haut aus 7-Dehydrocholesterin durch UV-Licht Cholecalciferol synthetisiert (6). Diese inaktiven Formen des Vitamin D werden in der Leber zum Prohormon Calcidiol (25-(OH)D<sub>3</sub>) hydroxyliert, um schließlich bei Bedarf in der Niere durch die 1 $\alpha$ -Hydroxylase (kurz Cyp27B1 für Cytochrome P450, Familie 27, Subfamilie B, Polypeptid 1) zum biologisch aktiven Calcitriol (1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) synthetisiert zu werden (6). PTH und niedrige Serumspiegel von Ca<sup>2+</sup> und Phosphat stimulieren diese Aktivierung (6). Im Serum bindet sich Calcitriol an DBP, dem Vitamin-D-bindenden Protein (7). An den überall im Körper vorkommenden Zielzellen verlässt 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> DBP und löst durch Bindung an den nukleären Steroidrezeptor Vitamin-D-Rezeptor (VDR), ein Calcitriol-bindender Transkriptionsfaktor, die Transkription aus (7). Dies geschieht durch Bildung eines Heterodimers von Calcitriol mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) und Bindung des so entstandenen Komplexes an das Vitamin-D Responsive Element (VDRE) innerhalb der Promoter-Region der auf Calcitriol reagierenden Gene (zum Beispiel des CaSR-Gens) (8).

Die Hauptfunktion von **VDR** ist die Regulierung von Serum-Calcium und Phosphat, insofern finden sich VDRs in Zellen der Niere (distales Nephron), der Nebenschilddrüse, des Gastrointestinaltrakts und der Knochen (7). Auf die Detektion von VDR in vielen anderen Geweben hin wurden neben der Mineralhomöostase viele weitere Funktionen des Calciferols entdeckt (9). So werden u.a. die Reduktion des Tumorrisikos beim Mamma- und Kolonkarzinom, ein günstiger Einfluss auf Herz-Kreislaufkrankungen, die Reduktion von Typ 1-Diabetes und eine Verbesserung des Metabolismus bei Typ 2-Diabetes, einen günstigen Verlauf von Autoimmunerkrankungen (zum Beispiel chronisch-entzündliche Darmerkrankungen) und weiteren extraossären Wirkungen diskutiert (9).

Ein weiterer wichtiger Mitspieler innerhalb der Mineralhomöostase ist **FGF 23** (Fibroblasten Wachstumsfaktor, für engl. *fibroblast growth factor*). FGF 23 ist ein Protein, welches der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren angehört und für den Phosphat-Metabolismus zuständig ist (10). Die Gruppe von Wachstumsfaktoren umfassen 22 ähnlich strukturierte Polypeptide, welche zu den Signalproteinen gehören (11). Es wird unterschieden, ob sie intrakrin, parakrin oder endokrin aktiv sind (11). Parakrine und endokrine FGFs wirken als verschlüsselte Signalmoleküle über Fibroblasten Wachstumsfaktor-Rezeptoren (FGFR für engl. *fibroblast growth factor receptor*), wobei die endokrinen FGFs (FGF 19, FGF 21, FGF 23) als Korezeptor das Proteohormon  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Klotho benötigen (11).

Das Proteohormon **Klotho** wurde 1997 von Kuro-o in Tokio entdeckt (12). Das Klotho-Gen besteht aus 5 Exons und 5 Introns (12). Es liegt auf Chromosom 13q12 mit einer Größe von über 50kB (12). Das Klotho-Gen kodiert für ein Singlepass-Transmembranprotein. Die 3 Klotho-Formen ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Klotho) bilden – wie bereits erwähnt – mit verschiedenen FGFRs jeweils einen Komplex, der für die spezifische Bindung der Wachstumsfaktoren unerlässlich ist (13). In vitro Studien zeigen, dass die Bindungsaffinität des Klotho/FGFR1c-Komplexes zu FGF 23 im Vergleich zu anderen FGF Rezeptoren, welche unterschiedliche FGFs binden, viel höher ist. Es wird angenommen, dass Klotho FGFR1c zu einem spezifischen Rezeptor für FGF 23 verändert (14). In dieser Arbeit, wie auch in Fachliteratur, wird  $\alpha$ -Klotho ohne den Buchstaben  $\alpha$  als Klotho bezeichnet. Der Begriff  $\alpha$ -Klotho wurde nach der Entdeckung der beiden anderen Gene aus der Klotho-Familie eingeführt, um Verwechslungen auszuschließen (13).

Klotho wird im distalen Tubulus der Niere, im Choroid Plexus und der Nebenschilddrüse exprimiert.

Kuro-o verband die vermehrte Expression von Klotho zunächst mit Verlängerung der Lebensspanne bei Mäusen – im Umkehrschluss beschrieb er

die Folgen eines Gendefekts ähnlich dem menschlichen Altern (12). Später wurde Klotho als Regulator der Calcium-Homöostase erkannt (15).

FGF 23 wird von Osteozyten und Osteoblasten bei hohen Phosphat- und  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin D-Werten freigesetzt. Es verhindert die Aufnahme von Phosphat im proximalen Tubulus der Niere durch Blockierung des Npt2a (der bedeutendste Natrium-Phosphat-Kotransporter ) (13, 14, 16). Des Weiteren vermindert es die  $1\alpha$ -Hydroxylase-Expression. Cyp27B1 ist – wie oben schon beschrieben – das Schlüsselenzym für die Synthese von Calcitriol, welches die Phosphat-Absorption im Gastrointestinal-Trakt stimuliert (13, 14, 16). Auf diese Weise wird die Phosphat-Aufnahme vermindert.

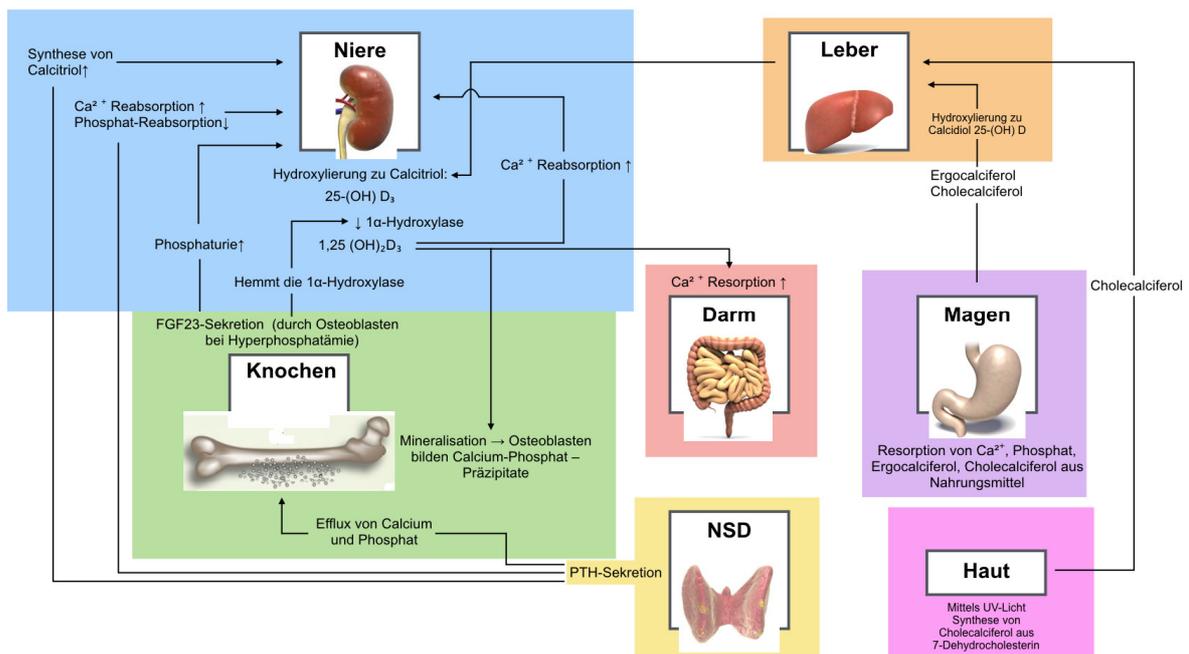
Diese Wirkung wird durch membrangebundenes Klotho verstärkt, indem es die Phosphat Ausscheidung fördert (13).

Im Pars convoluta des distalen Tubulus stimuliert die FGF 23-Bindung an den Klotho/FGFR-Komplex die  $\text{Ca}^{2+}$ -Reabsorption über den TRPV5-Kanal (TRP steht englisch für *transient receptor potential channel*, TRPV steht für die Vanilloid-Rezeptor-Unterfamilie), welcher an der apikalen Membran der Epithelzellen exprimiert wird (13). Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Reabsorption via TRPV5-Kanal wird durch die Aktivierung der Erk1/2 (für englisch *extracellular-signal regulated kinase*), SGK-1 (Serum-Glukokortikoid-regulierte Kinase 1) und WNK4 (für englisch *WNK lysine deficient protein kinase 4* )-Signalkaskaden initiiert (13).

Man geht davon aus, dass nach der Bindung von FGF 23 an den Klotho/FGFR-1 Komplex durch die Aktivierung des MAPK (mitogen-activated protein kinase)-Signalübertragungsweg Egr1 (für englisch *early growth response gene-1*, ein Prototyp der Familie der Zinkfingertranskriptionsfaktoren; entspricht einem Regulator vieler Gene) freigesetzt wird, welches in der gesunden Nebenschilddrüse auf direktem Weg die PTH-Ausschüttung vermindert (17).

Zusammenfassend wird auf diese Weise durch FGF 23 in der Niere die Phosphatausscheidung gefördert und der Serum-Vitamin D- (1,25-Dihydroxyvitamin D) Wert vermindert.

Abbildung 1 gibt einen Überblick über die komplexe Regulierung der Mineralstoffe beim Gesunden.



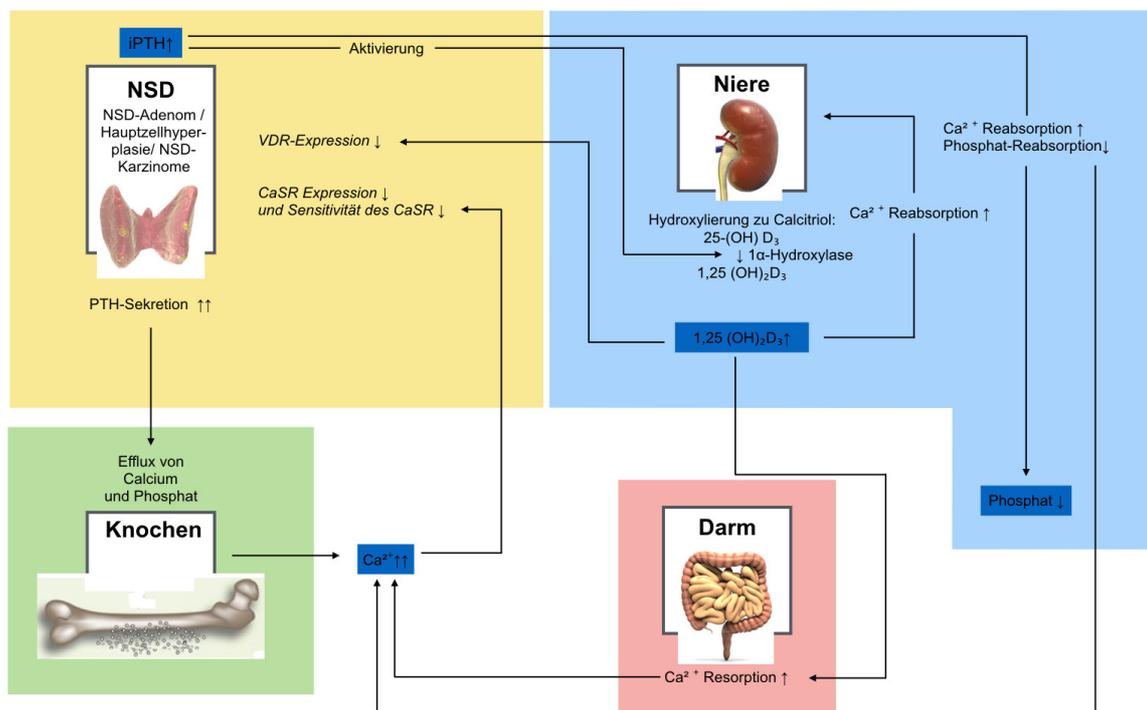
**Abbildung 1:** Die Mineralhomöostase beim Gesunden (Quelle der Organbilder bis auf Knochen von MedicalGraphics.de: Hoffmann M, [Online im Internet:] URL: <http://www.medicalgraphics.de/galerie.html>, [Stand 28.10.2015, 16:30]

### 1.3. Hyperparathyreoidismus – Physiologie, Histologie und Pathologie

Der **primäre Hyperparathyreoidismus** (pHPT) ist eine häufige Ursache für eine Hyperkalzämie, welche durch die autonome Überproduktion von PTH verursacht wird (18). Die Hyperkalzämie wird im Krankheitsfall nicht downreguliert. Neben renalen Befunden (Nephrolithiasis, Nephrokalzinose bis hin zur Niereninsuffizienz) leiden die Patienten an ossären Manifestationen. Infolge von generalisiertem Knochenumbau durch die gesteigerte PTH-Sekretion kommt es zur generalisierten Osteopenie, zu lokalisierten

subperiostalen Resorptionszonen an den Metakarpalknochen und dem „Pfeffer- und-Salz-Schädel“. Gastrointestinal treten Ulcera ventriculi bzw. duodeni, Pankreatitis und Cholelithiasis auf (19). Jedoch hat sich dieses Erscheinungsbild des pHPT in letzter Zeit stark verändert – mehr als 80 % der Patienten sind oligosymptomatisch (18).

Abbildung 2 skizziert den durch Erkrankung veränderten Kreislauf der Mineralstoffe beim pHPT-Patienten.



**Abbildung 2: Mineralstoffwechsel beim pHPT**

Überschüssig produziertes PTH mobilisiert Ca<sup>2+</sup> und Phosphat aus Knochen und steigert die Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme aus dem Darm. Bei Aufhebung der Rückkopplungsmechanismen (Expression und Sensitivität des CaSR sind vermindert) wird die Hyperkalzämie nicht downreguliert. (Quelle der Organbilder bis auf Knochen von MedicalGraphics.de: Hoffmann M, [Online im Internet:] URL: <http://www.medicalgraphics.de/galerie.html>, [Stand 28.10.2015, 16:30]

In 80 % liegen dem pHPT gutartige, solitäre Adenome zugrunde, 15-20 % der Fälle machen Hauptzellhyperplasien aus. Bei weniger als 1 % sind NSD-Karzinome der Grund für den pHPT. Meistens tritt die Erkrankung

sporadisch auf. Familiäre Formen kommen selten vor, am häufigsten im Rahmen einer multiplen endokrinen Neoplasie (MEN I oder MENIIa) (19).

Innerhalb des primären Hyperparathyreoidismus zeichnet sich das Adenom durch eine Vergrößerung eines einzigen Epithelkörperchens aus, welches sich lichtmikroskopisch als ein Knoten darstellt. Dieser ist von einer zarten Kapsel umgeben. Der Knoten setzt sich gewöhnlich aus einer Zellart, meistens den Hauptzellen, zusammen. Es kommen jedoch auch intermediäre und onkozytisch veränderte Zellen vor. Kernpleomorphismen sind nicht ungewöhnlich und werden von Johnson et al. nicht als Zeichen für Malignität betrachtet (20).

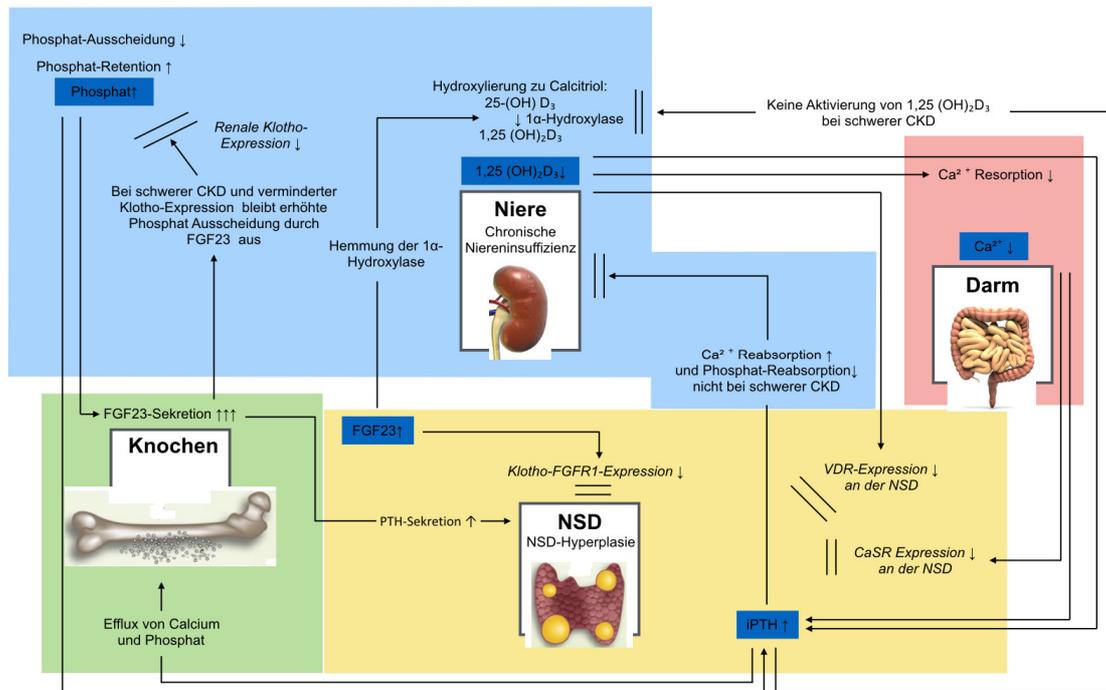
Die Hauptzell-Hyperplasie hingegen tritt bei mehreren Epithelkörperchen gleichzeitig auf. Die vergrößerten Drüsen sind diffus oder knotig verändert. Die zahlreichen Knoten sind nicht eingekapselt. Die Zellart variiert, ebenso wie das Auftreten von Fettzellen (20).

Im Gegensatz zum Adenom findet sich beim Karzinom eine dicke, fibröse Kapsel. Die Zellen sind hier trabekulär oder rosettenförmig angeordnet. Die Kerne sind häufig unauffällig.

Der **sekundäre Hyperparathyreoidismus** (sHPT) ist eine reaktive PTH-Steigerung bei Hypokalzämie und/oder Vitamin-D-Mangel. Am häufigsten liegt eine Niereninsuffizienz zugrunde, seltener eine intestinale Malabsorption und eine Beeinträchtigung des Vitamin-D-Haushaltes (19). Klinisch unterscheidet sich der sHPT wesentlich vom pHPT, da hier keine Hyperkalzämie vorliegt. Neben dem klinischen Erscheinungsbild der vorliegenden Grunderkrankung treten Knochenschmerzen und Spontanfrakturen auf, welche durch die massiven Umbauvorgänge bedingt sind (19).

Histopathologisch findet sich beim sHPT eine Hauptzellhyperplasie (21). Die Größe der Drüse ist abhängig von der Dauer und der Schwere der Erkrankung (21). Im frühen Stadium findet man häufig eine diffuse Gewebsstruktur (21). Das NSD-Stroma und die Fettzellen werden durch chronisch stimulierte

Hauptzellen ersetzt (21). Später geht diese diffuse Hyperplasie in eine noduläre Hyperplasie über (sog. „Pseudoadenome“) (21). Im Vergleich zur hyperplastischen NSD im pHPT ist die Drüse beim sHPT häufiger gleichmäßig vergrößert (21).



**Abbildung 3: Mineralstoffwechsel beim sHPT**

Aufgrund der verminderten Phosphat-Ausscheidung und der daraus entstehenden Hyperphosphatämie beim renalen sHPT wird reaktiv vermehrt PTH und FGF23 gebildet. FGF23 hemmt die 1α-Hydroxylase, konsekutiv wird weniger Calcitriol synthetisiert. Dadurch wird Ca<sup>2+</sup> vermindert im Darm absorbiert. Die Hypokalzämie steigert wiederum die PTH-Ausschüttung. (Quelle der Organbilder bis auf Knochen von MedicalGraphics.de: Hoffmann M, [Online im Internet:] URL: <http://www.medicalgraphics.de/galerie.html>, [Stand 28.10.2015, 16:30]

Laborchemisch unterscheiden sich der pHPT und der sHPT, wie in Tabelle 1 aufgezeigt wird.

	pHPT	sHPT
Calcium i. S.	hochnormal bis deutlich erhöht	normal/niedrig
Calcium i. 24h-Urin	vergleichsweise hoch	eher niedrig
iPTH	erhöht (seltener normal)	erhöht
Phosphat i. S.	erniedrigt oder normal	abhängig von der Grunderkrankung, beim renalen sHPT erhöht
Alkal. Phosphatase	normal oder erhöht	normal oder erhöht
25-OH-Vitamin D3	oft erniedrigt	variabel, oft erniedrigt
1,25-OH-Vitamin D3	oft erhöht	erniedrigt/normal/erhöht

**Tabelle 1: Labor bei pHPT versus Labor bei sHPT**

Es liegen bereits immunhistochemische Studien mit den in Tabelle 1 genannten Markern vor (22) – hier unterscheiden sich beide Formen des HPT nicht wesentlich.

	Klotho	FGFR- Expression	CaSR- Expression	VDR- Expression	PTH- Expression
pHPT	↓	↓	↓	↓	↑
sHPT	↓	↓	↓	↓	x

**Tabelle 2:**

**Immunhistochemie bei pHPT versus Immunhistochemie bei sHPT:**

- ↑ Protein-Expression ist im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erhöht.
- ↓ Protein-Expression ist im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erniedrigt.
- X In der Literatur ist nicht beschrieben, ob die PTH-Expression beim sHPT vermindert oder gesteigert ist.

Die Intensität der Expressionen unterscheidet sich jedoch teilweise deutlich. Im Rahmen der Immunhistochemie gibt es aber noch etliche weitere Variationen, die bislang nicht weiter untersucht sind.

Ein **tertiärer Hyperparathyreoidismus** (tHPT) kann aus einem jahrelang bestehenden sHPT hervorgehen. Aufgrund der übermäßigen und langandauernden Stimulierung der NSD-Funktion arbeitet die NSD bei konsekutivem Wachstum zunehmend autonomer – PTH wird unabhängig von den Serum-Calcium-Werten produziert, was vor allem bei langjährigen Dialyse-Patienten beobachtet werden kann.

### 1.4. Fragestellungen

Unser Verständnis bezüglich der Pathogenese des pHPT und sHPT wurde in letzter Zeit stark erweitert, jedoch gibt es immer noch unbekannte Vorgänge, und einige Zusammenhänge sind weiterhin ungeklärt.

Um die Rolle von Klotho, FGFR-1, CaSR, VDR, Cyp27B1 und Ki67 in der Mineralhomöostase weiter zu beleuchten, untersuchten wir die Expressionsmuster einer großen Sammlung an Nebenschilddrüsen (n=53 Gewebeschnitte von Patienten mit pHPT und n=70 Gewebeschnitte von Patienten mit sHPT) auf verschiedene morphologische Parameter. Ergänzend prüften wir, ob Korrelationen zwischen den immunhistochemischen Analysen untereinander und zwischen den immunhistochemischen Ergebnissen und den Laborwerten vorliegen.

Insbesondere die Rollen von Klotho, FGFR-1, CaSR, VDR und Cyp27B1 werden in der vorgelegten Arbeit weiter untersucht. Über deren Expressionen liegen zum Teil widersprüchliche Ergebnisse vor.

Bezüglich der Morphologie soll die Zellart bestimmt werden, welche am häufigsten beim pHPT, sHPT und bei der gesunden NSD vorkommt.

Insofern soll die Studie dazu dienen, die Mineralhomöostase sowohl in der gesunden, aber vor allem auch in hyperparathyroiden NSD weiter zu klären.

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1. Patientenkollektiv**

Untersucht wurden die Nebenschilddrüsen von insgesamt 130 Patienten:

- 53 Patienten mit pHPT
- 70 Patienten mit sHPT
- 7 Kontroll-Patienten mit gesunder NSD

Die erkrankten NSD wurden zwischen dem 01. Januar 1995 und dem 30. April 2005 aus therapeutischen Gründen operativ entfernt. 7 gesunde NSD, welche in den Jahren 2003 und 2004 im Rahmen von Thyreoidektomien entnommen wurden, wurden diesen gegenübergestellt. Es erfolgte anschließend bei allen Präparaten die Einbettung in Paraffin durch Mitarbeiter der pathologischen Abteilung des Robert-Bosch-Krankenhauses.

Neben dem Gewebe der NSD wurden folgende Blutwerte in der Studie berücksichtigt: Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobin, Glucose, Kreatinin, Calcium und Intaktes Parathormon. Die Blutentnahmen erfolgten innerhalb einer Woche vor der jeweiligen Operation.

Das Alter zur Zeit der Operation und das Geschlecht wurden jeweils mit einbezogen.

#### **2.1.1. Ethikvotum**

Die Tübinger Ethikkommission stimmte der Studie zu (Projektnummer 604/2012BO2).

### **2.2. Methode**

#### 2.2.1. Vorbereitung

Für diese Studie werden die in Paraffin eingebetteten Präparate mittels eines Mikrotoms (Firma Leica, Deutschland: Leica RM) in 3 µm dünne Schnitte geschnitten, welche im Anschluss auf Kapillarspalt-Objektträger (von Firma DAKO GmbH: DAKO REAL Capillary Gap Microscope Slides) aufgezogen werden. Zur Trocknung und Fixierung auf dem Objektträger erfolgt die Inkubation bei 56 °C über eine Nacht im Brutschrank.

Für die darauf folgenden Färbungen der Schnitte müssen folgende Vorbehandlungen durchgeführt werden:

Die Schnitte werden in Küvetten zunächst 30 Minuten lang in einem Tissue-Clear (hier Microclear, Firma Sakura) entparaffiniert, dann jeweils 1 Minute lang in 100%-igem, 96%-igem und 70%-igem Alkohol gespült. Um die Schnitte vor Austrocknung zu schützen, werden sie anschließend in VE-Wasser (vollentsalztes Wasser) gestellt.

#### 2.2.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nach der Vorbereitung der Schnitte werden die Objektträger mit Hämalaun (Firma Merck) gefärbt. Hämalaun stellt die Zellkerne in sehr saurem Milieu rötlich-braun dar. Nachdem die Schnitte mindestens 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gut gewässert werden, um den ursprünglich sehr niedrigen pH-Wert der Färbelösung von 3,0 bis 4,0 auf 6,8 bis 7,0 anzuheben, und so die typische blau-violette Färbung der Kerne zu erreichen, werden sie 1 Minute lang in Eosin (Firma Surgipath Industries, Inc.) inkubiert, welches Zellplasma, Muskulatur und Bindegewebe rosa einfärbt.

Es schließt sich eine kurze Spülung der Objektträger an, indem diese 5-mal in VE-Wasser getaucht werden.

Die Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe beginnt mit einem kurzen, fünfmaligen Eintauchen in 70%-igen Alkohol. Anschließend erfolgt die Entwässerung der Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 96 % und 100 % Ethanol für jeweils eine Minute). Vor der „Eindeckung“ werden die Schnitte eine Minute lang in Microclear gestellt.

Eingedeckt wird ein Objektträger, indem er zunächst sorgfältig mit einem Tuch abgetupft wird. Mithilfe einer Pipette wird Gurr (Eindeckmittel der Firma Merck) auf den Schnitt gegeben. Das Deckglas wird, ohne Lufteinschlüsse zu verursachen, vorsichtig aufgelegt und angedrückt. Auf diese Weise werden die Schnitte haltbar gemacht.

### 2.2.3. Eisen-Färbung

Die Anfärbung von Eisen in den Schnitten erfolgt nach der Berliner-Blau-Reaktion. Die Entparaffinierung wird wie oben beschrieben (2.2.1.) durchgeführt. 2%-iges Kaliumferrocyanid und 1%-iges HCl werden im Verhältnis 1:1 gemischt. In dieser Färbelösung werden die Schnitte sofort nach Herstellung der Färbelösung 20 Minuten lang inkubiert. Nach einer kurzen Spülung in VE-Wasser erfolgt die Gegenfärbung der Zellkerne 10 Minuten lang in Kernechtrot (Kernechtrot-Aluminium-Sulfat, Firma Chroma). Nach einer weiteren Spülung in VE-Wasser werden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe 2.2.2.) ab 96 % entwässert. Im Anschluss an das Einwirken in Microclear werden die Schnitte eingedeckt (siehe 2.2.2.).

### 2.2.4. Immunhistochemie

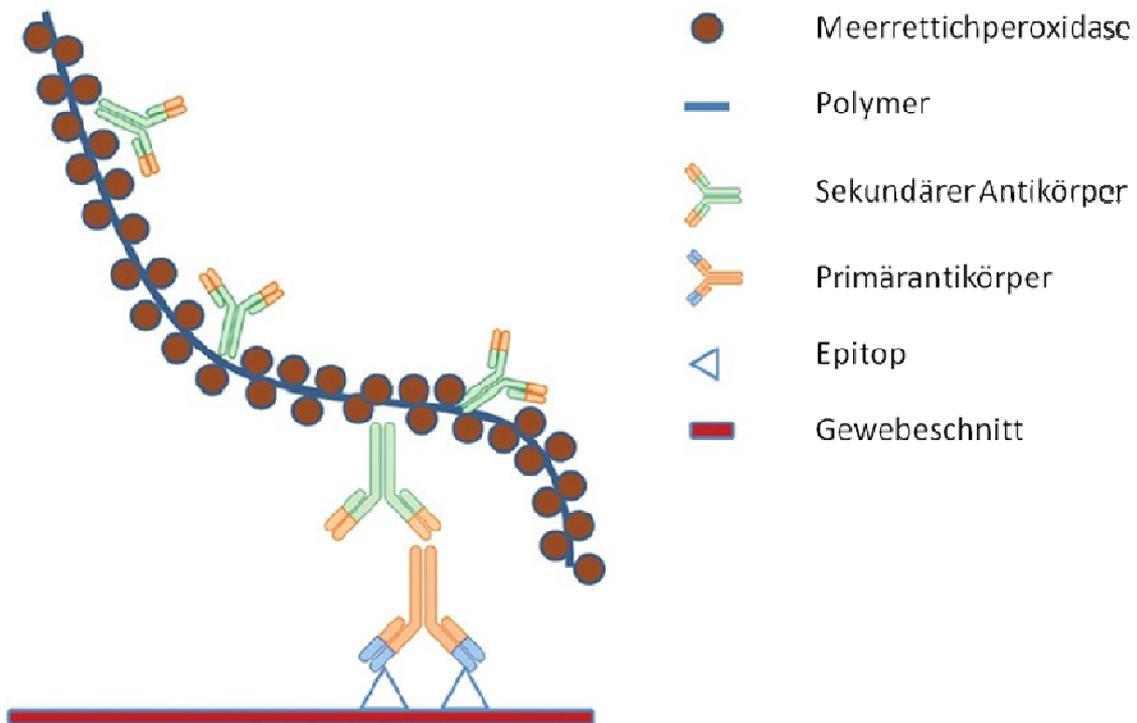
#### 2.2.4.1. Prinzip

Ziel der Immunhistochemie ist es, bestimmte Antigene in einem histologischen Gewebeschnitt zu detektieren. Um diese sichtbar zu machen, gibt es unterschiedliche Methoden. In unserer Studie wird das 2-Schritt-Detektionssystem EnVision™ durchgeführt.

Hierbei werden die Schnitte mit den primären Antikörpern inkubiert, welche an die passenden Epitope der Antigene spezifisch binden (Schritt 1). Anschließend werden Sekundär-Antikörper eingesetzt, welche gegen Immunglobuline der Tier-Spezies gerichtet sein müssen, aus welcher der Primärantikörper gewonnen wurde (Schritt 2). Andernfalls benötigt man Brückenantikörper, welche die Antikörper der Tier-Art des primären Antikörpers erkennen und wiederum vom Sekundärantikörper einer anderen Tier-Spezies gebunden werden können. Folglich bedienen wir uns in diesem Fall der 3-Schritt-Detektionstechnik.

Die Sekundär-Antikörper sind auf einem Dextran-Polymer gekoppelt. An das Dextran-Gerüst sind des Weiteren HRP- (Meerrettichperoxidase, für englisch *horseradish peroxidase*) Enzymmoleküle gebunden.

Der entstandene Komplex wird durch die enzymatische Umsetzung des Chromogens 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) durch HRP sichtbar gemacht. DAB liefert nach Oxidation einen braunen Farbstoff. Um die Gewebestrukturen besser erkennen zu können, werden die Zellkerne im Anschluss mit Hämalaun gegengefärbt.



**Abbildung 4: 2-Schritt-Detektionssystem EnVision™** – HRP (Meerrettichperoxidase) setzt den Komplex mit DAB enzymatisch zu einem braunen Endprodukt um. Schema aus [Sandoval-Sus JD, Chavez J, Dalia S (2016) A New Therapeutic Era in GCB and ABC Diffuse Large B-cell Lymphoma Molecular Subtypes: A Cell of Origin-Driven Review. *Curr Cancer Drug Targets*16(4):305-322.]

#### 2.2.4.2. Durchführung der Färbung

Durch Vernetzungs-Reaktionen auf Formalin hin ist die Antigenoberfläche nicht mehr zugänglich – die Epitope sind maskiert. Daher muss zunächst eine Demaskierung erfolgen, welche in unserer Studie im Dampfgerät (Firma Kenwood, Japan) durchgeführt wird: VE-Wasser wird im Dampfgerät 20 Minuten erhitzt. Im Anschluss werden die Schnitte je nach Antikörper entweder in einer pH 6- (Firma DAKO) oder pH 9-Lösung (Firma DAKO) 30 Minuten lang im Dampfgerät belassen. Die folgende Abkühlung dauert 20 Minuten.

Die Färbung selbst wird mit einer Färbemaschine (Firma DAKO Deutschland GmbH: TechMate 500 Plus) durchgeführt. Die Färbemaschine nutzt die Kapillarwirkung, die zwischen den speziell dafür angefertigten Objektträgern beim Aneinanderlegen entsteht. Es wird gefärbt, indem nachfolgend aufgeführte

Flüssigkeiten sukzessive in den Kapillarspalt gesaugt werden und je nach Flüssigkeit unterschiedlich lang inkubieren:

- Pufferlösung (Waschpuffer 1 bis 4 aus ChemMate Buffer Kit der Firma DAKO Deutschland GmbH)
- Peroxidase Blocking Lösung (Firma DAKO Deutschland GmbH)
- Hämatoxylin (Firma Merck)
- Sekundär-Antikörper (EnVision/HRP Rabbit/Mouse; Lösung A aus Detektionskit der Firma DAKO)
- Evtl. Brücken Antikörper (Bei der Klotho-Färbung: Anti-goat der Firma Open Biosystems; bei der VDR-Färbung: Anti-rat der Firma DAKO Deutschland GmbH)
- DAB-Lösung (Lösung C (1:50 in Lösung B) aus Detektionskit der Firma DAKO)
- Primär-Antikörper (separat aufgelistet in 2.2.4.3.)

Zwischen den einzelnen Schritten werden die Flüssigkeiten anhand von Saugpads wieder aus den Kapillarspalten entfernt.

Hierfür müssen die Objektträger paarweise in einen Halter gebracht werden. Die Flüssigkeiten für die einzelnen Färbeschritte werden sorgfältig in die dafür vorgesehenen Wännchen pipettiert.

Pro Durchlauf werden je eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle (ohne den Primär-Antikörper) mitgefärbt, wobei jeweils Nierengewebe verwendet wird.

Nach Beendigung des Programmes werden die Schnitte wieder in VE-Wasser gestellt, um sie wiederum vor Austrocknung zu schützen. Anschließend erfolgt die Entwässerung der Schnitte und die „Eindeckung“ mit einem Deckglas (siehe 2.2.2.).

2.2.4.3. Verwendete Antikörper

In Tabelle 3 werden die verwendeten Antikörper mit dem Hersteller und der Artikelnummer angegeben. Des Weiteren enthält die Tabelle Informationen, aus welcher Tier-Spezies der Primärantikörper gewonnen wurde und in welcher Verdünnung die Antikörper in unserer Studie verwendet wurden. Die geeignete Verdünnung wurde in Vorversuchen an Geweben aus der NSD und der Niere ausgetestet.

Antikörper gegen	Firma	Artikelnummer	Wirt	Verdünnung
Klotho	Santa Cruz Biotechnology	sc-22220	Ziege	1:50
FGFR-1	Sigma	F 5421	Kaninchen	1:700
CaSR	Acris	SM5036P	Ratte	1:100
VDR	Acris	SP4561P	Kaninchen	1:200
Ki 67	DAKO	M 7240	Maus	1:100
Cyp 27B1	Santa Cruz	sc-67261	Kaninchen	1:40

**Tabelle 3: In der Studie verwendete Primärantikörper mit Angabe des Wirts und der angewendeten Verdünnung** (aus [Latus J, Lehmann R, Roesel M, Fritz P, Braun N, Ulmer C, Steurer W, Biegger D, Ott G, Dippon J, Alscher MD, Kimmel M (2013) Involvement of  $\alpha$ -klotho, fibroblast growth factor-, vitamin-D- and calcium-sensing receptor in 53 patients with primary hyperparathyroidism. Endocrine 44(1): 255-263.]

## 2.3. Auswertung

Die auf einem Objektträger fixierten Schnitte der Nebenschilddrüsen wurden unter einem Mikroskop (Leitz Dialux 20EB, Durchlichtmikroskop) auf verschiedene Eigenschaften hin untersucht. Alle Schnitte wurden in 3 x 3 Felder (9 Areale) unterteilt. Jedes Feld wurde separat analysiert.

### 2.3.1. Morphologie

Zunächst wurde in jedem Feld sowohl der häufigste, als auch der zweithäufigste Zelltyp festgelegt. Unterschieden wurde zwischen folgenden **Zelltypen** (siehe auch Abbildung 5):

- Hauptzellen
- Oxyphile Zellen
- Helle Zellen

Weiterhin wird der **Gewebsaufbau** berücksichtigt. Wir differenzieren zwischen:

- Diffus und
- Knotig

Die **Nuclei** werden auf Abweichungen bezüglich ihrer Normgröße hin untersucht:

- Isomorphie
- Anisomorphie (liegt vor, wenn Kerne um das 1,2- bis 2-fache von der normalen Größe differieren)

Außerdem wird in die Studie mit einbezogen, ob das Gewebe **Degenerationen** (wie Einblutungen, Risse, Zysten) enthält:

- Degenerationen vorhanden

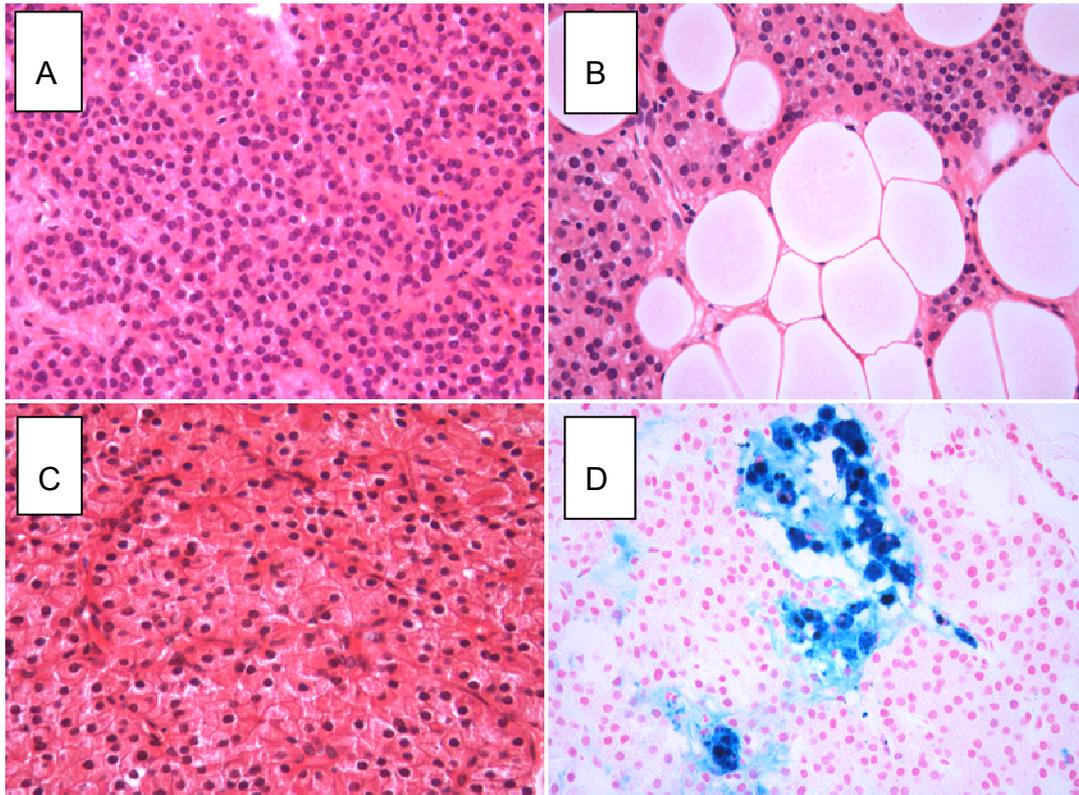
- Degenerationen nicht vorhanden

Das **Vorkommen von Fettzellen** innerhalb der Kapsel (siehe **Abbildung 5 B**) wird in 4 Kategorien eingeteilt:

- keine vorhanden
- wenig vorhanden 1 bis 5%
- mittelmäßig viele vorhanden 5 bis 25%
- viele vorhanden mehr als 25%

**Eisenablagerungen**, welche als ein Indikator für zellulären Stress benutzt werden, wird äquivalent eingestuft:

- keine vorhanden
- wenig vorhanden 1 bis 5%
- mittelmäßig viele vorhanden 5 bis 25%
- viele vorhanden mehr als 25%



**Abbildung 5:**

**A: Hauptzellen** in gesunder Nebenschilddrüse (Hämatoxylin-Eosin-Färbung)

**B:** Reichliches Vorkommen von **Fettzellen** in gesunder Nebenschilddrüse (Hämatoxylin-Eosin-Färbung)

**C: Oxyphile Zellen** in gesunder Nebenschilddrüse (Hämatoxylin-Eosin-Färbung)

**D:** Reichliches **Eisen-Vorkommen** (Anfärbung des Eisen-Vorkommens durch Berliner-Blau-Reaktion)

### 2.3.2. Immunhistochemie

Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte (außer Ki 67-Schnitte) werden auf folgende Eigenschaften hin untersucht.

Es wird festgestellt, welche im Lichtmikroskop erkennbaren **Zellorganellen** angefärbt sind:

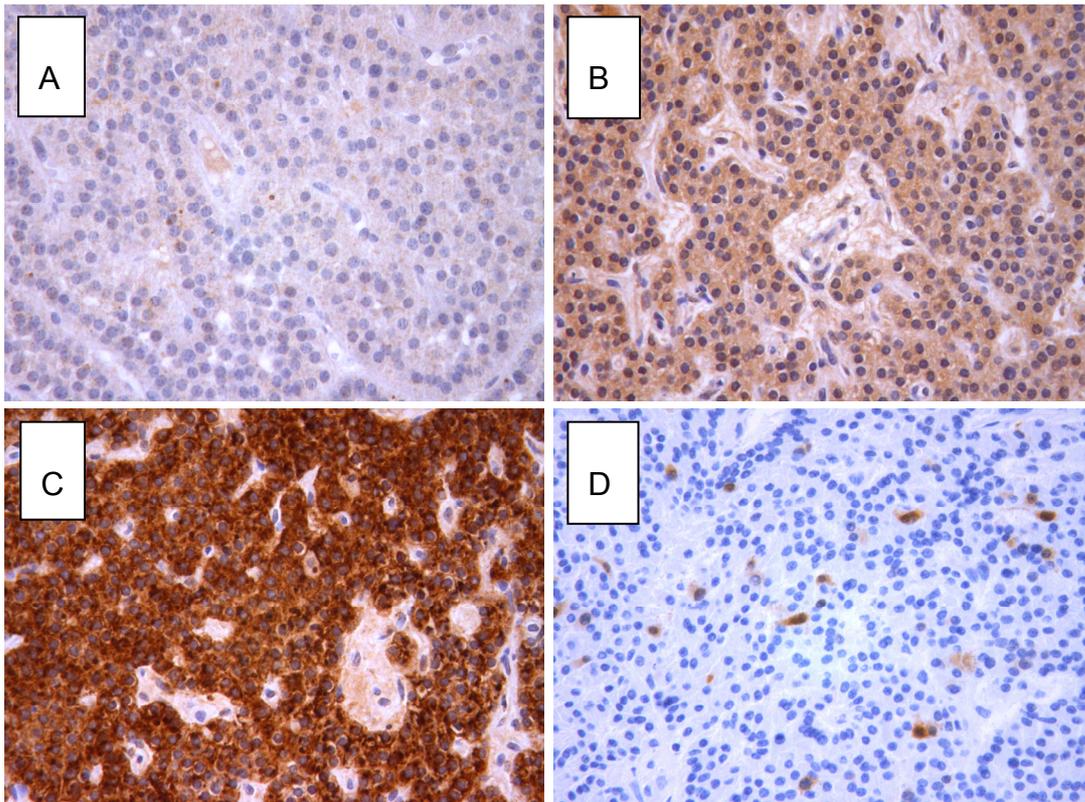
- das Zytoplasma
- der Zellkern

- Membran

Die **Intensität der Färbung** wird wie folgt beurteilt (siehe auch Abbildungen 6 A – C):

- keine Färbung                      Grad 0
- geringe Färbung                    Grad 1
- mittelstarke Färbung              Grad 2
- kräftige Färbung                  Grad 3

Der **Anteil der am intensivsten gefärbten Zellen** wird in Prozent angegeben. Ebenso wird analysiert, wie intensiv der restliche Anteil der im 9-er Feld vorliegenden Zellen gefärbt ist. Auch hier erfolgt eine prozentuale Einschätzung.



**Abbildung 6:**

A: Schwach gefärbtes Zytoplasma wird als Grad 1 eingestuft (hier Färbung mittels Antikörper gegen Klotho)

B: Mittelstark gefärbte Zellen werden in den Grad 2 eingeteilt (hier Färbung mittels Antikörper gegen Cyp 27B1)

C: Kräftig gefärbte Zellen werden als Grad 3 eingestuft (hier Färbung mittels Antikörper gegen PTH)

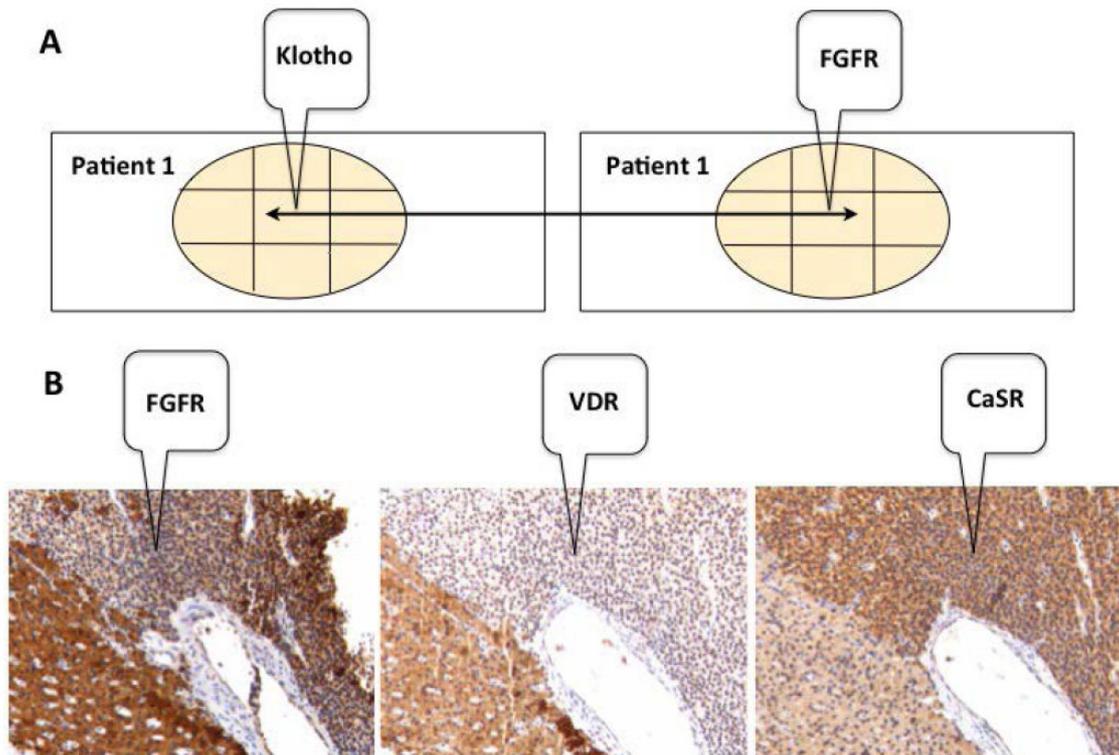
D: Angefärbte Zellen durch Antikörper gegen Ki 67

Um die **Proteinexpression** auszudrücken, wurde der IRS (immunoreactive score) bestimmt, der aus dem Produkt des Prozentsatzes der angefärbten Areale und deren Färbeintensität besteht. Wie oben schon erwähnt, nimmt die Intensität Werte zwischen 0 und 3 an, sodass der IRS folglich einen Wertebereich von 0 bis 300 besitzt.

Der **IRS** (immunreaktiver Score) wurde ursprünglich von Remmele und Stegner entwickelt und dient durch den immunhistochemischen Hormonrezeptornachweis klassischerweise der Klassifizierung von Mammatumoren (23).

Um sich teilende Zellen zu markieren, ist das Protein Antigen Ki-67 geeignet. Das Protein ist in der G1-, S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus vorhanden, nicht jedoch in der Ruhephase G0. Somit ist Antigen Ki-67 ein guter Marker, um die Proliferationsfraktion einer Zellpopulation zu bestimmen (24). Das Maß der Proliferation wird durch die Anzahl der gefärbten Zellen pro 1000 Zellen (%) angegeben. Alle Zellen des auszuwertenden Schnittes, welche sich im Zellzyklus in der G1-, S-, G2- oder M-Phase befinden, werden somit erfasst.

Wie auch in der Auswertung der Hämatoxylin-Eosin- und Eisen-Färbungen werden alle Analysen aufgrund der hohen Variabilität in jedem der oben beschriebenen 9 Felder durchgeführt. Jedes Feld einer Färbung kann so direkt mit einer anderen Färbung verglichen werden (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7: Direkter Vergleich der Färbungen miteinander**

**A:** Zunächst wird der IRS in jedem Feld aller Färbungen ermittelt. Somit können die Proteinexpressionen mit denselben einer anderen Färbung in dem entsprechenden Feld direkt verglichen werden.

**B:** Immunhistochemische Färbungen mittels FGFR, CaSR und VDR im gleichen Schnitt.

Abbildung aus [Latus J, Lehmann R, Roesel M, Fritz P, Braun N, Ulmer C, Steurer W, Biegger D, Ott G, Dippon J, Alscher MD, Kimmel M (2013) Analysis of  $\alpha$ -klotho, fibroblast growth factor-, vitamin-D and calcium-sensing receptor in 70 patients with secondary hyperparathyroidism. *Kidney Blood Press Res* 37(1): 84-94.]

## 2.4. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgt mit R (Version 2.12.0). Die Daten wurden als Mittelwerte und Standardabweichungen wiedergegeben. Der IRS wurde durch den Mittelwert und den Interquartilsabstand ermittelt.

Um numerische Daten zu vergleichen, wurde der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test angewendet, nominale Daten wurden mit dem exakten Test nach Fisher analysiert. Die univariate logistische Regression wurde benutzt, um mögliche Prädiktoren des pHPT und des sHPT aufzufinden. Korrelationen wurden mithilfe von Spearmans Rangkorrelationskoeffizient untersucht.

Ein Ergebnis wird als signifikant gewertet, wenn  $p < 0,05$ , als hoch signifikant, wenn  $p < 0,01$  und als höchst signifikant, wenn  $p < 0,001$  (siehe auch Tabelle 4).

p-Wert	p-Wert	p-Wert	p-Wert	p-Wert
0 - 0,001	0,001 - 0,01	0,01 - 0,05	0,05 – 0,1	0,1 - 1
Höchst signifikant	Hoch signifikant	Signifikant	Schwach signifikant	Nicht signifikant

**Tabelle 4: Bewertung des p-Wertes**

### **3. ERGEBNISSE**

Innerhalb der Studie analysierten wir insgesamt 130 Paraffinschnitte, davon 53 Proben aus Nebenschilddrüsen von Patienten, welche an pHPT erkrankt sind und 70 Proben aus Nebenschilddrüsen von Patienten, welche unter sHPT leiden. 7 Nebenschilddrüsen von Patienten ohne Erkrankung derselben wurden als Kontrollgruppe untersucht.

#### **3.1. Primärer Hyperparathyreoidismus**

##### **3.1.1. Basisdaten**

Das mittlere Alter bei Diagnosestellung lag bei  $57.0 \pm 13,8$ , das der Kontrollgruppe bei  $59,2 \pm 16,8$  ( $p > 0,05$ ).

Verglichen zur Kontrollgruppe waren die laborchemischen Werte von Phosphat, Calcium, PTH und Kreatinin alle signifikant erhöht (bei allen Werten  $p < 0,05$ ). Die genauen Mittelwerte der einzelnen Faktoren sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Variable (Einheit [Normbereich])	pHPT	Kontrollgruppe
Anzahl (n)*	53	7
Alter (Jahre ± SD)	57,0 ± 13,8	59,2 ± 16,8
Weiblich/Männlich	40/13	4/3
Hb (g/dl ± SD [13-18])	13,5 ± 1,8	13,9 ± 1,6
Leukozyten (Giga/l ± SD [4,0-11,3])	7,6 ± 1,9	7,6 ± 1,4
Phosphat (mmol/l [0,68-1,68])	0,9 ± 0,3	1,06 ± 0,2
Calcium** (mmol/l [1,90-2,70])	2,8 ± 0,3	2,18 ± 0,1
PTH*** (pmol/l [1,1-7,3])	36,6 ± 39,5	3,30 ± 2,3
Harnstoff (mg/dl [10-25])	79,3 ± 62	28,8 ± 7,8
Kreatinin (mg/dl [0,5-1,4])	0,88 ± 0,3	0,8 ± 0,1

**Tabelle 5:**

**Alter, Geschlecht und Laborwerte der Patienten mit pHPT**

\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001

Aus [Latus J, Lehmann R, Roesel M, Fritz P, Braun N, Ulmer C, Steurer W, Biegger D, Ott G, Dippon J, Alscher MD, Kimmel M (2013) Involvement of α-klotho, fibroblast growth factor-, vitamin-D- and calcium-sensing receptor in 53 patients with primary hyperparathyroidism. Endocrine 44(1): 255-263.]

### 3.1.2. Morphologie

Was die Morphologie betrifft, so finden sich sowohl in der Gruppe der erkrankten Nebenschilddrüsen als auch in der gesunden Kontrollgruppe Hauptzellen als der vorherrschende Zelltyp.

Bei lediglich 14 Schnitten der pHPT-Gruppe überwogen helle Zellen, bei 7 Schnitten waren es oxyphile Zellen. Diese fanden wir in den gesunden Kontrollen nicht vor, helle Zellen herrschten hier in 2 Glandulae vor. Die statistische Auswertung des hauptsächlich vorkommenden Zelltyps ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen ( $p = 0,55$ ).

Architektonisch wurde untersucht, ob das Gewebe diffus oder knotig aufgebaut ist. Sowohl in der Gruppe der pHPT-Schnitte als auch in der damit verglichenen Kontrollgruppe fand sich häufiger eine diffuse Struktur, seltener eine knotige (in der pHPT-Gruppe 37 versus 16, in der Kontrollgruppe 5 versus 2,  $p = 0,73$ ). Degenerative Veränderungen im Sinne von Hämorrhagien, Rissen oder das Vorkommen von Zysten wurden abgefragt. So fanden sich in der pHPT-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe bei 37 von 53 Schnitten degenerative Veränderungen, während man bei den gesunden Kontrollen keine Degeneration beobachten konnte ( $p = 0,03$ ).

Was das Vorkommen von Fettzellen betrifft, so war die Anzahl derselben in der Gruppe der pHPT Patienten signifikant geringer. Hier zeigten 46 von 53 Patienten keine oder nur wenige Fettzellen ( $p < 0,001$ ).

### 3.1.3. Immunhistochemie bei pHPT versus gesunde Kontrollgruppe

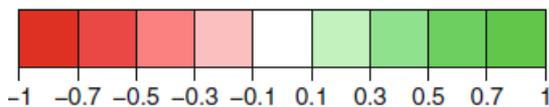
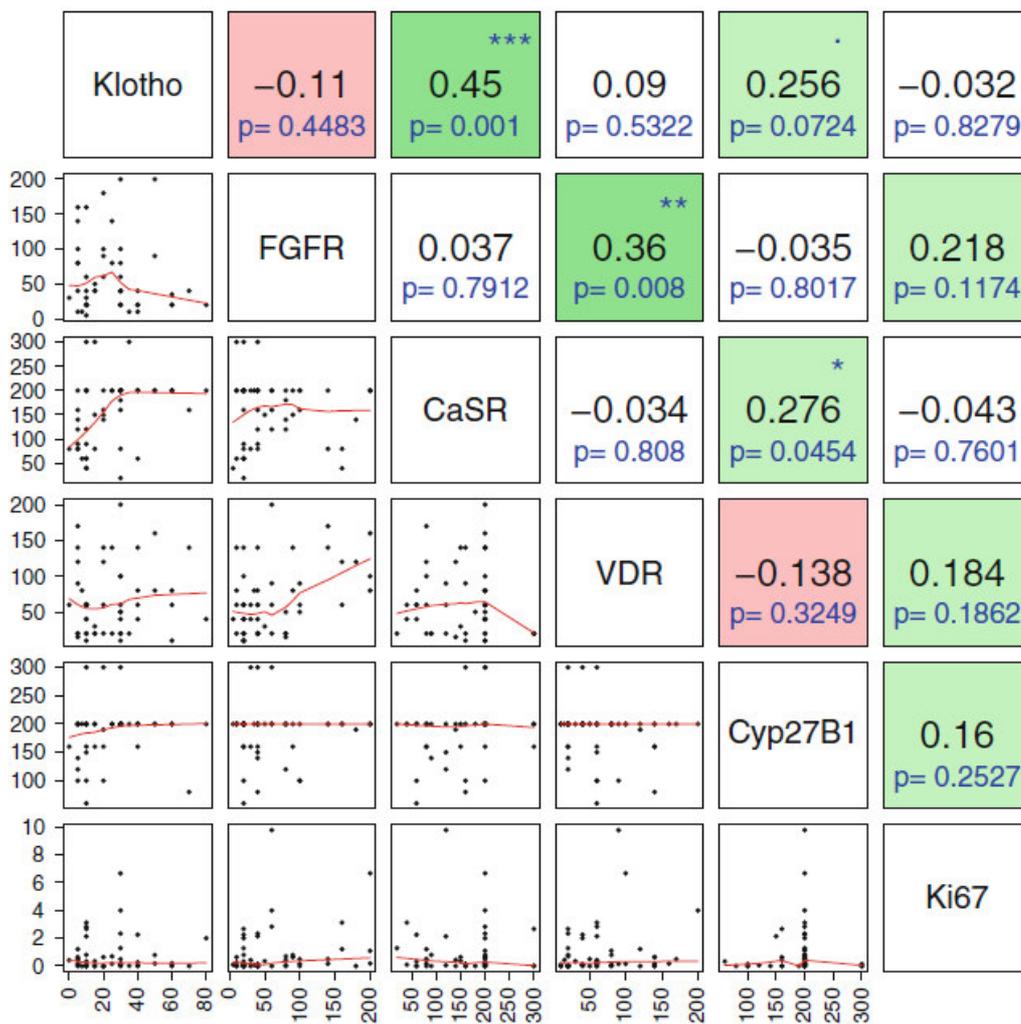
Die mit dem Antikörper gegen Klotho gefärbten Schnitte zeigten in der Gruppe der gesunden NSD einen deutlich höheren IRS verglichen zu der Gruppe der an pHPT erkrankten NSD ( $p = 0,004$ ). Die Variabilität des IRS war in der pHPT-Gruppe hoch (der Median lag bei 13, der Interquartilsabstand bei 15).

Die NSD, welche durch Anti-FGFR gefärbt waren, wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen der pHPT- und der gesunden Kontrollgruppe auf ( $p = 0,35$ ). Wie bei Klotho, so zeigte sich auch bei FGFR in der pHPT-Gruppe eine hohe Variabilität (Median bei 20 mit einem Interquartilsabstand von 40).

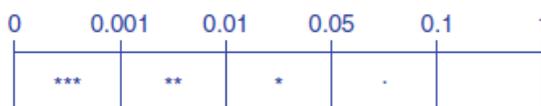
Entsprechend der Klotho-Färbung ergaben sich bei den Färbungen der Kontrollgruppen mittels den Antikörpern CaSR und VDR wesentlich stärkere IRSs verglichen mit der pHPT-Gruppe ( $p = 0,007$  und  $p < 0,001$ ). Die hohe Variabilität zeigt sich auch bei der Färbung durch diese beiden Antikörper (bei CaSR lag der Median bei 20, der Interquartilsabstand bei 60, bei VDR hatte der Median einen Wert von 40 und der Interquartilsabstand war 35).

Zwischen den IRSs von Cyp27B1 und der Kontrollgruppe wurde keine signifikante Korrelation gefunden ( $p = 0,53$ ).

Statistisch wurde der Korrelationsindex nach Spearman zwischen den IRSs der immunhistochemischen Färbungen untereinander ermittelt. Es gab in der pHPT-Gruppe sowohl zwischen Klotho und CaSR ( $r = 0,45$ ,  $p = 0,001$ ), als auch zwischen FGFR und VDR ( $r = 0,36$ ,  $p = 0,008$ ) signifikant positive Korrelationen. Weiterhin war der Vergleich der IRSs von Cyp27B1 und CaSR positiv signifikant ( $r = 0,28$ ,  $p = 0,045$ ). Zwischen den Proteinexpressionen von Cyp27B1 und Klotho lag ein positiver Trend vor ( $r = 0,26$ ,  $p = 0,07$ ). Abbildung 8 zeigt die Korrelationen zwischen den Proteinexpressionen der verschiedenen Färbungen in der pHPT-Gruppe untereinander.



Korrelationskoeffizient



p-Wert

**Abbildung 8: Korrelationen zwischen den Expressionen der immunhistochemischen Färbungen der pHPT-Gruppe untereinander (Klotho, FGFR, CaSR, VDR, Cyp27B1, Ki67).** Die große Ziffer entspricht dem Korrelationskoeffizient r. Dieser kann Werte zwischen -1 und 1 annehmen. Die Sterne (\*) stellen orientierend den p-Wert dar.

Aus [Latus J, Lehmann R, Roesel M, Fritz P, Braun N, Ulmer C, Steurer W, Biegger D, Ott G, Dippon J, Alscher MD, Kimmel M (2013) Involvement of  $\alpha$ -klotho, fibroblast growth factor-, vitamin-D- and calcium-sensing receptor in 53 patients with primary hyperparathyroidism. Endocrine 44(1): 255-263.]

Neben dem IRS wurde die Lokalisation jeder immunhistochemischen Färbung ermittelt. So war das Zytoplasma bei der Färbung mit Antikörpern gegen Klotho und FGFR gefärbt, während bei der Färbung mit Antikörpern gegen CaSR neben dem Zytoplasma auch die Membran gefärbt war. Der Antikörper gegen VDR färbte das Zytoplasma und die Kerne, während der Antikörper gegen PTH eine Anfärbung des Zytoplasmas und seltener der Membran auslöste. Auffallend, jedoch nur schwach signifikant war die Neigung der gesunden NSD zu vermehrter Anfärbung der Zellmembran.

Die Untersuchung, ob in knotigem Gewebesaufbau im Vergleich zum diffusen Gewebesaufbau eine Veränderung der Proteinexpression bemerkbar ist, ergab kein statistisch signifikantes Ergebnis.

### 3.1.4. Proliferationsrate bei pHPT versus gesunde Kontrollgruppe

Zwischen den unterschiedlichen Zelltypen konnten wir keine unterschiedliche Proliferationsrate feststellen. Die Proliferationsrate der gesunden NSD lag bei  $0,1 \% \pm 0,1$ . Die an pHPT erkrankte NSD zeigte im Vergleich zur gesunden NSD einen Trend zur erhöhten Proliferationsrate ( $p = 0,07$ ).

### 3.1.5. Proteinexpression im Vergleich zu Laborwerten

Der IRS der Klotho-Färbung innerhalb der pHPT-Gruppe korrelierte positiv mit Serum-Phosphat und Serum-Kreatinin ( $r = 0,41$ ,  $p = 0,03$  und  $r = 0,42$ ,  $p = 0,002$ ), nicht jedoch mit Serum-Calcium ( $r = -0,13$ ,  $p = 0,66$ ). Eine weitere positive Korrelation ergab der Vergleich der Proteinexpression von CaSR mit den Werten von Serum-Phosphat in der pHPT-Gruppe ( $r = 0,36$ ,  $p = 0,04$ ).

Ansonsten wurden keine positiven Wechselbeziehungen zwischen den Proteinexpressionen der 53 Patienten mit pHPT und deren Laborwerten gefunden.

	Serum-Calcium	Serum-Phosphat	Serum-Kreatinin	Serum-Harnstoff	Serum-iPTH
<b>Klotho</b>	r = -0,13 p = 0,66	r = 0,41 p = 0,03*	r = 0,42 p = 0,002**	r = 0,14 p = 0,37	r = 0,18 p = 0,14
<b>FGFR</b>	r = 0,14 p = 0,95	r = -0,20 p = 0,85	r = 0,07 p = 0,28	r = -0,44 p = 0,70	r = 0,15 p = 0,62
<b>VDR</b>	r = -0,12 p = 0,60	r = -0,16 p = 0,56	r = 0,07 p = 0,40	r = 0,08 p = 0,25	r = -0,67 p = 0,37
<b>CaSR</b>	r = -0,09 p = 0,43	r = 0,36 p = 0,04*	r = -0,10 p = 0,49	r = -0,48 p = 0,83	r = -0,11 p = 0,48

**Tabelle 6: Korrelationen zwischen Proteinexpressionen (anhand des IRS) von Klotho, FGFR, CaSR und VDR und Laborwerten in der pHPT-Gruppe**

\* p = < 0,05, \*\* p = < 0,01.

Aus [Latus J, Lehmann R, Roesel M, Fritz P, Braun N, Ulmer C, Steurer W, Biegger D, Ott G, Dippon J, Alschner MD, Kimmel M (2013) Involvement of  $\alpha$ -klotho, fibroblast growth factor-, vitamin-D- and calcium-sensing receptor in 53 patients with primary hyperparathyroidism. Endocrine 44(1): 255-263.]

## 3.2. Sekundärer Hyperparathyreoidismus

### 3.2.1. Basisdaten

Im Vergleich zu der pHPT-Gruppe war das mittlere Alter beim sHPT geringer: es lag bei  $49,4 \pm 14,2$ . Das mittlere Alter der Kontrollgruppe befand sich bei  $59,2 \pm 16,8$  (mittleres Alter sHPT versus mittleres Alter Kontrollgruppe:  $p < 0,05$ ). Bezüglich der Geschlechterverteilung konnten wir keine Häufung

feststellen. Es lag auch keine vorherrschende Krankheitsdiagnose vor, die in der sHPT-Gruppe zum chronischen Nierenversagen geführt hätte.

Von den 70 Patienten führten 50 zum Zeitpunkt der Operation eine Hämodialyse durch, 16 eine Peritonealdialyse und 4 hatten ein funktionierendes Transplantat.

Wie beim pHPT, so gab es auch signifikante Unterschiede zwischen den Blutwerten der sHPT-Patienten und die der Kontrollgruppe. So waren das Serum-Calcium, Serum-Phosphat, Serum-PTH, Serum-Krea und Serum-Harnstoff der erkrankten Gruppe gegenüber den entsprechenden Werten der gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht (alle < 0,0001). In Tabelle 7 sind die Basisdaten aufgelistet.

Variable (Einheit [Normbereich])	sHPT-Gruppe	Kontroll-Gruppe
Anzahl (n)	70	7
Alter (Jahre ± SD)	49,4 ± 14,2	59,2 ± 16,8
Weiblich/Männlich	36/34	4/3
RRT zum Zeitpunkt der Operation:		
Hämodialyse	50	
Peritonealdialyse	16	
Transplantiert	4	

Variable (Einheit [Normbereich])	sHPT-Gruppe	Kontroll-Gruppe
<b>Präoperative Medikation:</b>		
Vitamin D (n = 23, µg/d)	<b>1,17 ± 0,83</b>	
Aktives Vitamin D (n = 19, µg/d)	<b>1,07 ± 0,87</b>	
<b>Phosphatbinder:</b>		
Sevelamer (n = 13, mg/d)	<b>3360 ± 1858</b>	
Calciumacetat (n = 26, mg/d)	<b>3852 ± 2087</b>	
Algeldrat (n = 20, mg/d)	<b>3660 ± 1568</b>	
Hb (g/dl ± SD [13 – 18])	<b>12,4 ± 2,2</b>	<b>13,9 ± 1,6</b>
Leukozyten (Giga/l ± SD [4,0-11,3])	<b>7,3 ± 2,8</b>	<b>7,6 ± 1,4</b>
Phosphat*** (mmol/l [0,68-1,68])	<b>1,8 ± 0,6</b>	<b>1,06 ± 0,21</b>
Calcium*** (mmol/l [1,90-2,70])	<b>2,6 ± 0,2</b>	<b>2,18 ± 0,14</b>
PTH*** (pmol/l [1,1-7,3])	<b>132,3 ± 80,3</b>	<b>3,30 ± 2,28</b>
Harnstoff*** (mg/dl [10-25])	<b>111,2 ± 50,3</b>	<b>28,8 ± 7,8</b>
Kreatinin*** (mg/dl [0,5-1,4])	<b>7,7 ± 3,7</b>	<b>0,80 ± 0,13</b>

**Tabelle 7: Basisdaten der sHPT- und der Kontrollgruppe**

RRT = Nierenersatztherapie (für englisch Renal Replacement Therapy)

\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001

Aus [Latus J, Lehmann R, Roesel M, Fritz P, Braun N, Ulmer C, Steurer W, Biegger D, Ott G, Dippon J, Alscher MD, Kimmel M (2013) Analysis of α-klotho, fibroblast growth factor-, vitamin-D and calcium-sensing receptor in 70 patients with secondary hyperparathyroidism. Kidney Blood Press Res 37(1): 84-94.].

### 3.2.2. Morphologie

Sowohl in den gesunden, als auch in den durch sHPT erkrankten NSD-Schnitten war die Hauptzelle der vorherrschende Zelltyp. Zwischen beiden Gruppen gab es keinen statistischen Unterschied ( $p = 0,36$ ). Nur in 10 von 70 Schnitten der sHPT Gruppe dominierten die oxyphilen Zellen.

Entsprechend den Ergebnissen der pHPT-Gruppe wurde auch in der sHPT-Gruppe ein vorwiegend diffusers Gewebesaufbau vorgefunden. Verglichen mit der Kontrollgruppe gab es jedoch mehr knotige Areale in den Schnitten der sHPT-Gruppe ( $p = 0,03$ ).

Anisomorphe Zellen lagen in der sHPT-Gruppe im Gegensatz zur Kontrollgruppe vor, der Vergleich ergab jedoch keine statistische Signifikanz ( $p = 0,63$ ). Degenerative Veränderungen und Eisenanfärbung lagen in der gesunden Kontrollgruppe im Vergleich zur sHPT-Gruppe vermindert vor – ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen ( $p > 0,05$ ). Beim Gegenüberstellen der beiden Gruppen erreichte aber das Vorkommen der Fettzellen statistische Signifikanz: so ist der Gehalt an Fettzellen in der gesunden Nebenschilddrüse wesentlich größer ( $p < 0,001$ ).

### 3.2.3. Immunhistochemie bei sHPT versus gesunde Kontrollgruppe

Wie schon beim pHPT beobachtet, war der IRS von Klotho in der gesunden NSD im Vergleich zum IRS der durch sHPT erkrankten NSD signifikant höher ( $p < 0,001$ ). Entsprechend der pHPT-Gruppe war auch bei der sHPT-Gruppe die Variabilität der Klotho-Färbung sehr hoch (Median bei 10,0, Interquartilsabstand bei 15).

Bei Färbung durch das Antigen FGFR verhielt es sich umgekehrt: so war hier der IRS der sHPT-Gruppe verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe höher, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen ( $p = 0,07$ ). Jedoch konnte

man auch hier eine hohe Variabilität beobachten (Median der FGFR-Expression bei 33,8 mit einem Interquartilsabstand von 21,9).

Die IRSs der CaSR- und der VDR-Färbungen waren in der Kontrollgruppe – wie auch der IRS von Klotho – im Gegensatz zur sHPT-Gruppe signifikant höher ( $p = 0,01$  und  $p = 0,001$ ). Auch hier wurde eine hohe Variabilität festgestellt (der Median der CaSR-Expression war bei 70 mit einem Interquartilsabstand von 40, der Median der VDR-Expression lag bei 27,5 mit einem Interquartilsabstand von 26,9).

Cyp27B1 war in der sHPT-Gruppe nicht signifikant anders exprimiert als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,8$ ).

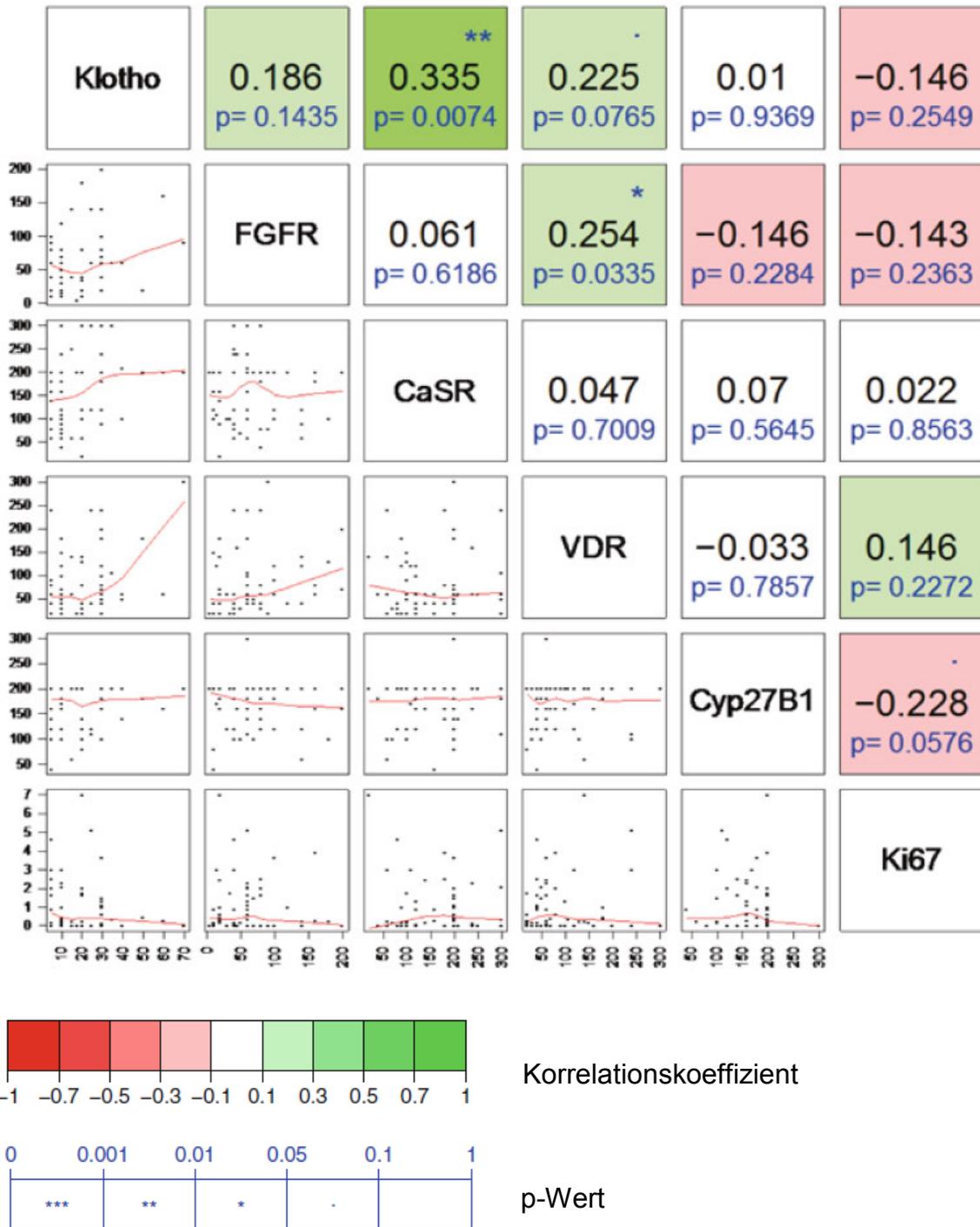
Auch bei den 70 Schnitten der sHPT-Patienten wurde der Korrelationsindex nach Spearman zwischen den Proteinexpressionen der immunhistochemischen Färbungen mittels der Antikörper untereinander ermittelt (siehe Abbildung 9).

In der sHPT-Gruppe zeigten sich statistisch signifikante Korrelationen zwischen den IRSs von Klotho und CaSR ( $r = 0,34$ ,  $p = 0,007$ ), sowie von FGFR und VDR ( $r = 0,25$ ,  $p = 0,03$ ). Mithilfe der 9-Felder-Analyse konnte zwischen den Proteinexpressionen von FGFR und VDR eine höchst signifikant positive Korrelation detektiert werden ( $p = 0,0004$ ).

Weiterhin verglichen wir diffuse bzw. nodale Areale zwischen den immunhistochemischen Färbungen. In diffus aufgebauten Arealen korrelierten die Färbungen mittels CaSR und VDR negativ miteinander ( $r = -0,287$ ,  $p = 0,006$ ). Bezüglich des Gewebeaufbaus und der Proteinexpressionen konnte keine weitere Wechselbeziehung festgestellt werden.

Die Lokalisation der Antikörper wurde für jede Färbung festgehalten. Klotho und FGFR-Antigene wurden im Zytoplasma vorgefunden, während Anti-CaSR neben dem Zytoplasma auch die Zellmembranen anfärbte. Bei eben erwähnten Proteinen (Klotho, FGFR und CaSR) waren im Hinblick auf die Lokalisation keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der sHPT- und der

Kontrollgruppe feststellbar ( $p > 0,05$ ). Ki-67 ist in allen Diagnosegruppen ausschließlich im Kern lokalisiert. VDR zeigte in der Kontrollgruppe lediglich eine Färbung des Kerns, während in der sHPT-Gruppe eine Tendenz zur Färbung des Kerns und des Zytoplasmas zu erkennen ist ( $p > 0,05$ ).



**Abbildung 9: Korrelationskoeffizienten nach Spearman (große Ziffer) zwischen den IRS der immunhistochemischen Färbungen der sHPT-Gruppe untereinander (Klotho, FGFR, CaSR, VDR, Cyp27B1, Ki67).** Die große Ziffer entspricht dem Korrelationskoeffizient r. Dieser kann Werte zwischen -1 und 1 annehmen. Die Sterne (\*) stellen orientierend den p-Wert dar.

Aus [Latus J, Lehmann R, Roesel M, Fritz P, Braun N, Ulmer C, Steurer W, Biegger D, Ott G, Dippon J, Alscher MD, Kimmel M (2013) Analysis of  $\alpha$ -klotho, fibroblast growth factor-, vitamin-D and calcium-sensing receptor in 70 patients with secondary hyperparathyroidism. *Kidney Blood Press Res* 37(1): 84-94.]

### 3.2.4. Proliferationsrate bei sHPT versus gesunde Kontrollgruppe

Wie oben schon beschrieben wurde die Proliferationsrate durch die Anfärbung mit dem Antigen Ki-67 ermittelt. In der sHPT-Gruppe (wie auch in der pHPT-Gruppe) konnte kein Unterschied der Rate der sich teilenden Zellen zwischen den unterschiedlichen Zelltypen festgestellt werden. In den Schnitten der gesunden Kontrollgruppe lag die Proliferationsrate bei  $0,1 \% \pm 0,1$ , welche im Vergleich zu der Rate der sHPT-Gruppe signifikant geringer war ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.5. Korrelationen von Proteinexpressionen, Laborparameter und Dauer der Nierenersatztherapie

Wie schon in der pHPT-Gruppe, so wurden auch in der sHPT-Gruppe die Proteinexpressionen mit den Blutwerten verglichen (siehe Tabelle 8). Der IRS von VDR korrelierte in der sHPT-Gruppe signifikant positiv mit den Serumwerten von Phosphat und Kreatinin ( $p = 0,02$  und  $p = 0,04$ ). Zwischen der Proteinexpression von VDR und der Calcium-Konzentration im Serum konnte ein positiver Trend festgestellt werden ( $p = 0,05$ ). Ebenso eine Tendenz zur positiven Korrelation zeigte in der sHPT-Gruppe die Expression von FGFR und den Serum-Phosphat- und Kreatinin-Werten ( $p = 0,07$  und  $p = 0,08$ ).

	Calcium	Phosphat	Kreatinin	Harnstoff	iPTH
<b><u>Klotho</u></b>					
Korrelationskoeffizient	0,063	0,0003	-0,019	0,138	0,236
p-Wert	0,62	0,32	0,68	0,35	0,10
<b><u>FGFR</u></b>					
Korrelationskoeffizient	0,137	0,240	0,214	0,073	0,152
p-Wert	0,26	0,07	0,08	0,61	0,26
<b><u>VDR</u></b>					
Korrelationskoeffizient	0,232	0,301	0,254	0,162	0,022
p-Wert	0,05	0,02*	0,04*	0,25	0,28
<b><u>CaSR</u></b>					
Korrelationskoeffizient	0,135	0,089	0,111	0,06	0,136
p-Wert	0,26	0,50	0,36	0,68	0,98

**Tabelle 8: Korrelationen zwischen Proteinexpressionen (anhand des IRS) von Klotho, FGFR, CaSR und VDR und Laborwerten in der sHPT-Gruppe**

\*p<0,05

Aus [Latus J, Lehmann R, Roesel M, Fritz P, Braun N, Ulmer C, Steurer W, Biegger D, Ott G, Dippon J, Alscher MD, Kimmel M (2013) Analysis of  $\alpha$ -klotho, fibroblast growth factor-, vitamin-D and calcium-sensing receptor in 70 patients with secondary hyperparathyroidism. *Kidney Blood Press Res* 37(1): 84-94.]

Ob die Dauer der Nierenersatztherapie vor Entnahme der NSD einen Einfluss auf den IRS hat, analysierten wir über den Vergleich von den

Proteinexpressionen und der Dauer der Nierenersatztherapie. Es ergaben sich jedoch keine statistisch signifikanten Korrelationen (Klotho:  $r = 0,002$ ,  $p = 0,71$ , FGFR:  $r = 0,0007$ ,  $p = 0,82$ , CaSR:  $r = 0,003$ ,  $p = 0,63$ , VDR:  $r = 0,001$ ,  $p = 0,80$ ).

## 4. DISKUSSION

### 4.1. Primärer Hyperparathyreoidismus

Die Pathophysiologie des pHPT ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird in letzter Zeit vor allem in westlichen Ländern festgestellt, dass sich der pHPT zunehmend asymptomatisch präsentiert (25, 26). Griebeler et al. untersuchten die Inzidenz des pHPT zwischen 1965 und 2010 in Rochester (27). Im Zeitraum von 1965 bis 6/1974 lag diese bei 17,4, zwischen 7/1974 und 1984 bei 84,1 (Peak durch Einführung von Routineuntersuchungen von Calcium im Serum), zwischen 1985 und 1997 bei 27,9 und zwischen 1998 und 2010 bei 50,4 pro 100 000 (27). Die Inzidenz von pHPT steigt also u. a. aufgrund früherer Diagnosestellung durch bessere Labormöglichkeiten und ein Osteoporose-Screening. Jedoch wäre eine noch geringere Inzidenz durch frühzeitige und bessere Therapien wünschenswert.

Die Veränderung des klinischen Bildes und die Inzidenz des pHPT machen die Wichtigkeit weiterer Forschung zu der Pathophysiologie des pHPT und der darauf basierenden neuen Therapiemöglichkeiten deutlich. Insbesondere die Rollen von CaSR, VDR und dem FGFR-1-Klotho-Komplex in der Entwicklung des pHPT sind teilweise noch unklar.

#### 4.1.1. Morphologie

Der vorherrschende **Zelltyp** ist sowohl bei den 7 gesunden, als auch bei den 53 durch pHPT erkrankten NSD die Hauptzelle, was durch die Studie von Demiralay et al. bestätigt wird (28). Wir konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Schnitten des pHPT und den Schnitten der gesunden Kontrollgruppe bezüglich der **Anzahl der** Haupt-, hellen und oxyphilen **Zellen** feststellen (alle  $p > 0,05$ ).

Die dunkle Hauptzelle kommt häufiger vor als die helle Zelle, was nicht nur auf die NSD mit pHPT, sondern auch auf gesunde NSD und NSD mit sHPT zutrifft. Banek et al. bestätigen das (29).

In den Proben von Patienten ohne NSD-Erkrankung (Kontrollgruppe) detektierten wir vor allem eine diffuse **Gewebsstruktur**. Wir hätten innerhalb der pHPT-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe mehr knotige Strukturen erwartet. Johnson et al. beschreiben das gutartige, solitäre Adenom als Vergrößerung einer gesunden NSD umgeben von einer zarten Kapsel (20). Die Hauptzellhyperplasien würden jedoch knotiges Gewebe aufweisen (20, 28). Wie oben beschrieben (siehe 1.3.) liegen dem pHPT zu 80% Adenome zugrunde, in 15-20% Hauptzellhyperplasien. Insofern wäre ein vermehrtes Vorkommen von knotiger Struktur in unseren 53 Proben im Vergleich zu den 7 gesunden Proben erwartet worden, es konnte hier jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p > 0,05$ ).

Was **degenerative Veränderungen** betrifft, so erwarteten wir auch hier eine Häufung bei erkrankten Geweben. Dies hat sich bestätigt: Degenerationen waren in den gesunden NSD nicht auffindbar. Im Gegensatz dazu konnte man dieselben in 37 von 53 Schnitten innerhalb der pHPT-Gruppe vorfinden ( $p = 0,03$ ).

Im Gegensatz zur Kontrollgruppe war die Quantität der **Fettzellen** in der pHPT-Gruppe deutlich geringer ( $p < 0,001$ ). 46 der 53 pHPT-Schnitte boten nur wenig oder gar keine Fettzellen. Dass der Fettzellanteil in Adenomen oder in der Hauptzellhyperplasie im Gegensatz zur gesunden NSD vermindert ist, ist in der Literatur beschrieben (20). Fettzellen betreffend muss man jedoch beachten, dass man erhebliche physiologische Unterschiede in den Nebenschilddrüsen feststellen kann: bei älteren und adipösen Personen findet man mehr Fettzellen; die Verteilung des Fetts variiert selbst innerhalb eines Epithelkörperchens und zwischen den Glandulae eines Individuums (20). Und dennoch könnte laut Johnson der Fettanteil ein Hinweis auf den Grad der Überfunktion sein (20).

### 4.1.2. Klotho-, FGFR-1, CaSR- und VDR-Expressionen

Wie in einigen Studien schon beschrieben (30, 31), stellten auch wir eine deutliche Verminderung der Expression von **Klotho** bei erkrankten NSD im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe fest ( $p = 0,004$ ). Dementsprechend maß Björklund im Vergleich zu seiner Kontrollgruppe signifikant geringere Klotho mRNA-Werte (30).

Die Annahme liegt nahe, dass die **Klotho**- und **FGFR-1**-Expressionen korrelieren, zumal davon ausgegangen wird, dass Klotho und FGFR-1 einen Komplex bilden, um FGF 23 spezifisch binden zu können (14). Der Vergleich beider Expressionen ergab in unserer Studie jedoch keine Abhängigkeit ( $r = -0,11$ ,  $p = 0,45$ ), was möglicherweise daran liegt, dass nicht alle FGFRs der NSD den Korezeptor Klotho binden. Bei der Expression von FGFR-1 zeigte sich im Gegensatz zu der Expression von Klotho kein signifikanter Unterschied zwischen der pHPT- und der gesunden Kontrollgruppe ( $p = 0,35$ ), was mit dem Ergebnis von Björklund übereinstimmt (30). Klotho senkt als Kofaktor durch den FGF 23-Signalweg die PTH mRNA und die Protein-Level in vitro und in vivo (17, 32). Yamashita et al. stellten die Hypothese auf, dass bei erhöhter PTH-Produktion beim pHPT und der daraus resultierenden Hypophosphatämie durch verminderte Phosphat-Reabsorption in der Niere konsekutiv der FGF 23-Level sinken müsse (33). Seine Studie ergab jedoch, dass FGF 23 bei den pHPT Patienten und der gesunden Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede zeigte. Lediglich Patienten mit Niereninsuffizienz, wie wir das auch beim sHPT sehen, wiesen erhöhte Werte auf (33).

Offensichtlich gibt es in der NSD zwei unterschiedliche Mechanismen der PTH-Sekretion: Imura et al. beschreiben eine  $Ca^{2+}$ -abhängige PTH-Sekretion via Rekrutierung der  $Na^+/K^+$ -ATPase der Plasma-Membran (15). Auf der anderen Seite steht die bekannte Klotho-unabhängige Regulierung (30). Björklund spekuliert, ob Klotho durch diese mögliche Rekrutierung der  $Na^+/K^+$ -ATPase im Fall der Hypokalzämie das hauptsächliche Hormon zur Regulierung der

PTH-Sekretion darstelle, im Falle der Hyperkalzämie der Klotho-unabhängige Mechanismus die PTH-Sekretion aufrecht erhalte (30).

Ob die Klotho/FGFR-Achse in der Entwicklung des pHPT eine doch geringere Rolle spielt oder ob die reduzierte Klotho-Expression beim pHPT eine FGF 23-Resistenz verursacht, analog dem Geschehen beim sHPT, muss weiter geklärt werden.

Björklund veröffentlichte die umgekehrte Korrelation von Klotho-mRNA-Werten und Serum Kalzium (30). Da er außerdem keine Korrelation zwischen Klotho und PTH-Werten feststellen konnte, kam er zu dem Schluss, dass Serum-Ca<sup>2+</sup> streng mit der Klotho-Expression im pHPT assoziiert und die übermäßige PTH-Ausschüttung im Falle einer pHPT-Erkrankung von Klotho-unabhängigen Mechanismen reguliert sein könnte.

Wir stellten zwischen der Klotho-Expression und PTH ebenso keine Korrelation fest. In unseren Studien korrelierte der IRS der Klotho-Färbung innerhalb der pHPT-Gruppe positiv mit Serum-Phosphat und Serum-Kreatinin ( $r = 0,41$ ,  $p = 0,03$  und  $r = 0,42$ ,  $p = 0,002$ ), nicht jedoch mit Serum-Calcium ( $r = -0,13$ ,  $p = 0,66$ ). Die Serum-Phosphat-Werte korrelierten wiederum positiv mit der Protein-Expression von CaSR ( $R = 0,36$ ,  $p = 0,04$ ).

Auch Nakajima konnte keine signifikante Abhängigkeit zwischen Klotho und Serum-Ca<sup>2+</sup> feststellen: die Expression von  $\alpha$ -Klotho mRNA war unter hyperkalzämischen Bedingungen variabel und nicht konstant erniedrigt (34). Insofern bleibt unklar, inwiefern Klotho von Ca<sup>2+</sup>-Werten abhängig ist.

Wie schon erwähnt, stellten wir bei den pHPT-Proben eine Korrelation zwischen der Expression von Klotho und den Serum Phosphat-Werten und zwischen den Expressionen von Klotho und CaSR bei pHPT fest. Dieses Ergebnis unterscheidet sich von bereits veröffentlichten Studien (35, 36). Die von uns detektierte Korrelation zwischen Serum Phosphat-Werten und der CaSR-Expression könnte erstmals auf einen Zusammenhang zwischen der Expression von CaSR und dem klinischen Ausmaß der Erkrankung hindeuten.

In unserer Studie exprimierten sich **CaSR** und **VDR** in der gesunden NSD deutlich stärker als in der Gruppe der erkrankten NSD (siehe auch in 35, 36): die IRS von CaSR und VDR der gesunden Kontrollgruppe waren im Vergleich zu den IRS der pHPT-Gruppe wesentlich höher ( $p = 0,007$  und  $p < 0,001$ ), korrelierten jedoch nicht miteinander ( $r = -0,03$ ,  $p = 0,8$ ), was mit der Studie von Varshney et al. übereinstimmt (22). Yano et al. hingegen präsentieren eine stark positive Korrelation zwischen den Expressionen von CaSR und VDR und stellen hypothetisch zur Diskussion, ob diese markant verminderten Expressionen Ursache für die Proliferation der NSD-Zellen bei pHPT darstellen könnten (36).

Wie zwischen den Expressionen von Klotho und CaSR ( $r = 0,45$ ,  $p = 0,001$ ), so konnten wir auch signifikant positive Korrelationen zwischen den Expressionen von FGFR und VDR feststellen ( $r = 0,36$ ,  $p = 0,008$ ).

Varshney et al. und Yano et al. beschrieben ebenso eine verminderte Expression von CaSR und VDR bei pHPT (22, 36). Die Reduktion der CaSR-Expression beim pHPT ist laut Varshney nachvollziehbar, da  $\text{Ca}^{2+}$  im erkrankten Körper keine effiziente Kontrolle über die PTH-Synthese und -Sekretion bietet (22). Varshney zieht in Betracht, dass die reduzierte VDR-Expression ursächlich verantwortlich sei für die verminderte CaSR-Expression, da sich auf dem CaSR-Gen VDREs (Vitamin-D Responsive Elements) befinden und das Gen durch das gebildete Heterodimer aus Calcitriol und dem Retinoid-X-Rezeptor reguliert wird (22). Varshney verwirft somit die Hypothese von Brown (37), der die verminderte CaSR-Expression als Initiator der Tumorgenese sieht. In Varshneys Untersuchungen war VDR noch deutlich geringer exprimiert als CaSR – insofern geht er davon aus, dass CaSR erst sekundär vermindert wird. Auch in unserer Studie lag der Median des IRS von VDR deutlich unter dem von CaSR (60 versus 200). Somit können wir die Hypothese von Varshney stützen. Er sieht mögliche Gründe dafür in der Blockierung der Gen-Transkription, instabiler mRNA oder Veränderungen derselben nach Translation, evtl. auch von Gen-Silencing (Gen-Stilllegung) durch Hypermethylierung in der Promotor-Region, was durch anderweitige Studien

schon in Erwägung gezogen wurde (35, 38, 39), unwahrscheinlich hingegen seien erhöhte Serumwerte von  $\text{Ca}^{2+}$  oder PTH als Ursache einer verminderten Expression von CaSR und VDR (22).

Wie Varshney, so schreibt auch Carling der VDR-Expression eine wichtige Bedeutung zu (38). Carling berichtet von einer signifikant geringeren mRNA Expression des VDR in Adenome der NSD verglichen mit der Expression einer gesunden NSD des gleichen Patienten (38). Dies spreche dafür, dass die verminderte Expression des VDR eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des pHPT spiele und nicht etwa nur das Ergebnis biochemischer Störungen sei (38).

$\text{Ca}^{2+}$  zeigte in unseren Daten keine signifikante Wechselbeziehung zur CaSR-Expression ( $p = 0,43$ ). Wir gehen davon aus, dass die Rezeptoren für  $\text{Ca}^{2+}$  aufgrund der Hyperkalzämie downreguliert werden. Jedoch spielen sicherlich noch weitere Faktoren eine Rolle, sonst würde eine negative Korrelation vorliegen. Zum Beispiel wäre es gut denkbar, dass die CaSR nicht mehr sensitiv für  $\text{Ca}^{2+}$  sind. Damit übereinstimmend beschrieb Farnebo, dass gesunde NSD im Gegensatz zu erkrankten NSD als Antwort auf Hyperkalzämie die Expression von CaSR mRNA nicht downregulieren (40). Carrillo-López erreicht andere Ergebnisse: durch seine Studien kommt er zu dem Schluss, dass die Regulierung des VDR und CaSR von  $\text{Ca}^{2+}$  beeinflusst wird – die Protein-Spiegel des VDR-Gens und die Intensität der immunhistochemischen Anfärbung würden jedoch durch Gabe von Calcitriol und Calcium steigen (41). Interessanterweise gäbe es auch eine Steigerung beim CaSR, jedoch nur bei Calcium-Gabe und nicht bei Calcitriol-Gabe (41).

Die Vielzahl an Studien, welche zum Teil widersprüchlich argumentieren, und um zu verstehen, warum die Rückkopplung zwischen  $\text{Ca}^{2+}$  und den Rezeptoren nicht mehr funktioniert, machen es notwendig, die exakte Pathogenese in weiteren Studien zu klären.

Aufgrund der vorgestellten Studien gehen wir davon aus, dass die Protein-Expressionen von VDR und CaSR eine wichtige Rolle in der Entwicklung des

pHPT spielen, und ziehen in Betracht, dass die Rezeptoren einen synergistischen Effekt haben könnten. Des Weiteren lässt unsere Studie vermuten, dass die Expression des CaSR eventuell einen Hinweis auf das klinische Ausmaß der Erkrankung geben kann.

### 4.1.3.Ki-67

Die Proliferationsrate der gesunden NSD lag in unserer Studie bei  $0,1\% \pm 0,1$ . Die an pHPT erkrankte NSD zeigte im Vergleich zur gesunden NSD einen Trend zur erhöhten Proliferationsrate ( $p = 0,07$ ).

In der pHPT-Gruppe zählten wir im Schnitt nur einen positiven Kern pro tausend Zellen, in der gesunden Gruppe liegt die Zahl im Schnitt bei null Kernen pro tausend Zellen.

Andere Studienergebnisse divergieren zum Teil stark: Abbona et al. findet zwischen den verschiedenen hyperparathyroiden Nebenschilddrüsen keinen signifikanten morphologischen Unterschied (42). Jedoch zeigten sich in der Anfärbung mit dem Proliferationsfaktor Ki-67 eine Differenz: gesunde Nebenschilddrüsen färbten im Mittel 0.8 Kerne / 1000 Zellen an, Drüsen mit Hyperparathyreoidismus 26 Kerne / 1000 Zellen, und eine Gruppe von NSD-Tumore, welche die histologischen Merkmale eines Karzinoms aufwiesen, 60 Kerne / 1000 Zellen (42). Auf der Basis seiner Studien schlussfolgerte Abbona, dass mehr als 60 positive Kerne pro 1000 Zellen ein Hinweis auf malignes Geschehen sind (42).

Thomopoulou erkannte in seinen Studien auch einen signifikanten Unterschied zwischen der Anfärbung mit monoklonalen Antikörpern gegen das Ki-67 Antigen bei erkrankten NSD versus gesunden NSD: der Mittelwert des Prozentsatzes aller angefärbten Kerne lag bei den gesunden NSD bei 0,19, bei der pHPT-Gruppe bei 3,38 (43). Der proliferative Index war bei den erkrankten NSD erhöht (43).

Wang berichtet von einem hohen Proliferationsindex (> 5 % positive Zellkerne) in nur 27 % der Karzinome und in nur 5 % Adenome (44). Die Sensitivität, Karzinome von einem benignen Geschehen zu unterscheiden, liege nur bei 27 % (44).

Weitere Studien bestätigen einen signifikanten Unterschied zwischen der Proliferationsrate von pHPT erkrankten und gesunden NSD. Wir fanden jedoch nur einen statistischen Trend – und kommen zu dem Schluss, dass die immunhistochemische Anfärbung durch Ki-67 lediglich ein Hinweis auf malignes Geschehen geben kann. Wang rät, in jedem Fall für die Diagnostik Ergänzung durch die klinische Manifestation, biochemischen Werte und weitere immunhistochemische Untersuchungen (Galectin-3 und Parafibromin) durchzuführen, um eine hohe Sensitivität zu erlangen (44). Das ist auch aus unserer Sicht eine sinnvolle und notwendige Maßnahme.

Yano entdeckte über den Vergleich zwischen der erkrankten und der gesunden NSD hinaus noch weitere Korrelationen (36). Wie in 4.1.2. schon erwähnt, detektierte Yano eine positive Korrelation zwischen den Expressionen von CaSR und VDR, weiterhin korrelierte mit beiden Expressionen der Färbeindex von Ki-67 negativ (36). Er geht davon aus, dass aufgrund verminderter Expressionen von VDR und CaSR die erkrankte NSD proliferiere (36). In seinen Untersuchungen haben auch Ki67 mit Serum-PTH und Serum-Ca<sup>2+</sup> vor OP eine positive Wechselbeziehung, das Protein stehe also in Zusammenhang mit der klinischen Schwere des pHPT (36). Wir untersuchten die gleichen Zusammenhänge – die Ergebnisse erreichten jedoch keine statistische Signifikanz.

Die Auswertung von immunhistochemischen Schnitten, welche durch Anti-Ki-67 angefärbt wurde, ist uneinheitlich. Die absolute Anzahl gefärbter Kerne ist mikroskopisch gut zählbar, die relative Anzahl ist jedoch schwer zu bestimmen, da die absolute Anzahl der Zellen schwer zu zählen ist. Es resultieren eventuell große Differenzen – dies spiegelt sich auch darin wieder, dass einige Autoren die positiv angefärbten Kerne in Prozent, andere in Promille angeben.

### 4.1.4. Cyp27B1

Bezüglich der 1 $\alpha$ -Hydroxylase kamen wir in unserer Studie zu folgenden Ergebnissen: zwischen den IRSs von Cyp27B1 und der Kontrollgruppe wurde keine signifikante Korrelation gefunden ( $p = 0,53$ ). Der Vergleich des IRS von Cyp27B1 und CaSR ergab eine positive Signifikanz ( $r=0,28$ ,  $p=0,05$ ). Zwischen der Proteinexpression von Cyp27B1 und Klotho lag ein positiver Trend vor ( $r = 0,26$ ,  $p = 0,07$ ).

FGF23 hemmt die 1 $\alpha$ -Hydroxylase (45). Jedoch wurde das Enzym erst kürzlich in der NSD entdeckt. So muss die Rolle von Cyp27B1 nun neu geklärt werden.

Diese Studie stellt eine der größten Kohortenstudien dar, in welcher vermutlich alle Proteine untersucht werden, die in der erkrankten NSD eine Rolle spielen. Jedoch muss man berücksichtigen, dass unsere Kontrollgruppe mit 7 gesunden Nebenschilddrüsen sehr klein war, und die ungleiche Anzahl der Patienten in beiden Gruppe die Aussagekraft der Studie limitieren.

## 4.2. Sekundärer Hyperparathyreoidismus

### 4.2.1. Morphologie

Auch beim sHPT zeigte sich die Hauptzelle als die am häufigsten vorkommende Zelle – zwar zu einem geringeren Anteil als bei den gesunden NSD – aber die Differenz war statistisch nicht signifikant. Sheu Grabellus beschrieb die Morphologie des sHPT als eine primäre Hauptzellenhyperplasie (21). Im Gegensatz zur gesunden NSD kommt die oxyphile Zelle beim sHPT etwas häufiger vor, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen.

Oxyphile Zellen zählen zu den Onkozyten. Der Begriff Onkozyt geht auf Hamperl zurück – er beschrieb 1931 zum ersten Mal das Onkozytom, welches aus Onkozyten bestehe (46). Er weist Onkozyten in verschiedenen Organen nach (46). Hamperl geht davon aus, dass es sich um die milde Form einer degenerativen Metaplasie handelt (46). Jedoch sind Onkozyten nicht

grundsätzlich degenerativer Natur (47). Wie schon in 1.1. erwähnt, so sind die oxyphilen Zellen sehr mitochondrienreich und weisen somit eine hohe Aktivität der Enzyme der Atmungskette auf. Müller-Höcker konnte zeigen, dass in der NSD einzelne Zellen vorkommen, welche einen Defekt in der Atmungskette aufweisen (47). Diese würden schon in normalen NSD auftreten, nähmen mit dem Alter zu und seien vor allem im sHPT ausgeprägt (48).

In der sHPT-Gruppe war eine knotige Architektur des NSD-Schnittes häufiger vorhanden als in der gesunden Kontrollgruppe. Das war zu erwarten – vorhergegangene Studien kamen zu dem gleichen Ergebnis (49, 50).

Auch das statistisch signifikant vermehrte Fett-Vorkommen in gesunden NSD entspricht den Beobachtungen in anderen Arbeiten: Tokumoto fand viele Fettzellen in den gesunden NSD (49); je fortgeschrittener der sHPT ist, desto knotiger ist die NSD und desto weniger Fett enthält das Parenchym (49).

Zusammengefasst erlaubt aus unserer Sicht bezüglich der Morphologie lediglich die Gewebsarchitektur und das Auftreten von Fettzellen eine Differenzierung zwischen gesunder und durch sHPT erkrankter NSD.

### 4.2.2. Klotho-, FGFR-1-, CaSR- und VDR- und Expressionen

Neben den rein morphologischen Analysen untersuchten wir verschiedene Protein-Expressionen bei der sHPT und der Kontrollgruppe, verglichen diese jeweils untereinander und mit den Laborwerten.

Die Protein-Expressionen von Klotho, CaSR und VDR waren bei der sHPT-Gruppe im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe vermindert. Umgekehrt bei der Expression von FGFR-1: hier war diese in der sHPT-Gruppe erhöht. Mit  $p = 0,07$  erreichte diese Differenz jedoch keine statistische Signifikanz. Der Vergleich zwischen der gesunden und erkrankten Gruppe bezüglich der Anfärbung durch Cyp27B1 ergab keinen Unterschied.

Dass der **Klotho/FGFR-1**-Komplex und FGF 23, welches an den Komplex bindet, eine große Rolle im Mineralhaushalt spielt, ist unumstritten. Inwiefern

FGF 23 aber direkt auf die NSD wirkt, ist noch nicht ganz klar und viele Studien versuchen die Pathophysiologie im Mineralhaushalt der gesunden und erkrankten NSD zu klären.

Im Rahmen der CKD (chronic kidney disease) kommt es aufgrund krankheitsbedingter Retention von Phosphat zu einer Sekretion von FGF 23 durch Osteoblasten, welches die Hyperphosphatämie durch Phosphaturie in der Niere kompensieren soll. Weiterhin inhibiert es die  $1\alpha$ -Hydroxylase, welche enzymatisch das inaktive Vitamin D (Calcidiol oder  $25\text{-(OH)D}_3$ ) in seine aktive Form Calcitriol ( $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ ) umändert. Bei erhöhter Sekretion von FGF 23 sinkt konsekutiv das Calcitriol. Es ist dem Organismus bei CKD nicht möglich, Calcitriol im Normbereich zu halten. Da Klotho und FGFR-1 in der NSD reichlich exprimiert werden, stellt sich die Frage, ob FGF 23 direkt die Funktion der NSD beeinflusst. Aufgrund dieser Vermutung wurden kürzlich die NSD-Zellen von Rindern und Ratten untersucht (17, 32). Es wurde gezeigt, dass FGF 23 die PTH mRNA und die PTH-Sekretion in der NSD in vitro senkte (17, 32). Interessanterweise steigerte FGF 23 die Expression der  $1\alpha$ -Hydroxylase in der NSD innerhalb 3h – im Gegensatz zu dem Effekt in der Niere, wo umgekehrt die Expression der  $1\alpha$ -Hydroxylase reduziert wird (32). Aus der Erhöhung der  $1\alpha$ -Hydroxylase in der NSD schlussfolgerte man, dass FGF 23 ein negativer, direkter Regulator der PTH mRNA und Sekretion in vitro sei (32).

Komaba et al. und Kumata et al. untersuchten die Expressionen von Klotho und FGFR-1 – sie kamen zu dem Ergebnis, dass diese Expressionen bei der sHPT-Gruppe im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant vermindert waren (51, 52); in unserer Studie hingegen präsentierte sich die Klotho-Expression im Vergleich zur Expression in der gesunden Kontrollgruppe vermindert, die FGFR-1-Expression jedoch erhöht (mit  $p = 0,07$  wurde jedoch keine statistische Signifikanz erreicht). Nach Krajisnik et al. sinken auch die mRNA von Klotho und FGFR1 bei Patienten mit CKD, und zwar parallel zur glomerulären Filtrationsrate, also letztendlich korrelierend mit der Nierenfunktion (53) – was die immunhistochemischen Ergebnisse von einigen Studien stützt. Bei Kumata et al. korrelierten die Expressionen von Klotho und FGFR-1 signifikant positiv

(52). Wie schon im Kontext des pHPT beschrieben, so detektierten wir auch beim sHPT keine Korrelation zwischen den Expressionen von Klotho und FGFR-1. In der gesunden NSD erwarteten wir eine positive Korrelation, da – wie oben beschrieben – Klotho ein Kofaktor für FGFR-1 ist.

Weiterhin wurde ein Unterschied zwischen den Expressionen in knotigen Arealen versus diffuser Areal festgestellt: so war beim sHPT sowohl Klotho als auch FGFR-1 in knotigen Arealen noch geringer exprimiert als in diffusen Arealen (51, 52).

Demgegenüber erkannten wir in unserer Studie keine Unterschiede zwischen den IRS von Klotho und FGFR-1 in nodulären oder diffusen Gebieten.

Komaba detektierte neben der verminderten Expression des Klotho/FGFR-1-Komplexes eine signifikante Erhöhung der Proliferationsrate, die ebenso hauptsächlich in nodulären Arealen auftrat, so dass er davon ausgeht, dass die Proliferation bei sHPT und die Resistenz auf extrem hohe FGF 23-Werte die verminderte Expression von Klotho und FGFR-1 nach sich zieht (51).

Galitzer wollte in seiner Studie diese Resistenz der NSD auf das erhöhte FGF23 beim sHPT genauer klären. Er untersuchte, ob die fortschreitende Zellproliferation bei CKD mit der Herrunterregulation des Klotho/FGFR-1-Komplexes korreliert (54). Zu diesem Zweck maß er die Quantität von Ki-67, die Klotho-, FGFR-1-, CaSR-, VDR-Expressionen und die PTH-Level zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Phosphat-Gabe bei CKD. Ki-67 stieg in den ersten Tagen bei den CKD-Ratten stark an, verminderte Expressionen von Klotho, FGFR-1, CaSR und VDR zeigten sich erst Wochen später. Er schloss daraus, dass die Downregulation des Klotho-FGFR-1-Komplexes nicht direkte Folge auf die Zellproliferation sein kann.

Der FGFR-1/Klotho-Komplex spielt sicherlich eine bedeutende Rolle. FGF 23 senkt Calcitriol, welches wiederum die Sekretion von PTH auslöst. Ob erhöhtes FGF 23 direkt eine verminderte Expression von Klotho und FGFR-1 beim sHPT nach sich zieht, stellt Galitzer in Frage (54).

Neben verminderten Klotho- und FGFR-1-Expressionen detektierte Hong auch verminderte **CaSR- und VDR**-Expressionen beim sHPT versus der gesunden Kontrollgruppe (55), was unsere Ergebnisse und die vieler weiterer Autoren stützt.

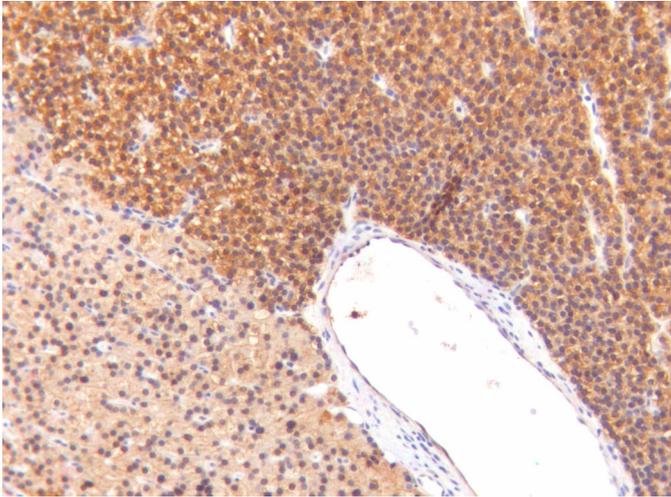
Kumata et al. sahen neben der positiven Korrelation von Klotho und FGFR-1 ebenso positive Korrelationen zwischen den Expressionen von Klotho und CaSR und zwischen den Expressionen von FGFR-1 und CaSR (52). In teilweiser Übereinstimmung damit erfassten wir eine statistisch signifikante Korrelation zwischen den Expressionen von Klotho und CaSR beim sHPT.

Auf Calcium und Calcitriol-Gaben reagiert eine an sekundärem Hyperparathyreoidismus erkrankte Nebenschilddrüse nicht. Man würde erwarten, dass sich auf eine Therapie die PTH-Ausschüttung reduziert. Dieses Phänomen wurde in der Vergangenheit mit der verminderten Expression des Calcium-sensing und des Vitamin-D Rezeptors erklärt (56, 49, 50, 57, 58). Inzwischen geht man aber davon aus, dass bei erkrankten Nebenschilddrüsen (sHPT), insbesondere bei nodulären Drüsen, auch die verringerte Expression des FGFR-1/Klotho-Komplexes ursächlich ist (51).

Eine größere Reduktion der Messenger RNA des CaSR wurde in der nodulären im Gegensatz zu der diffusen Hyperplasie festgestellt (59, 60). Wang stellt dementsprechend immunhistochemisch fest, dass die CaSR-Expression in nodulären Arealen geringer ist als in diffusen Arealen (60). Wir untersuchten in unserer Studie diesen Zusammenhang beim sHPT, konnten jedoch keine Unterschiede zwischen nodalen versus diffusen Arealen bei der CaSR-Färbung feststellen.

Die Verminderung der Expression des CaSR im Falle eines sHPT erfolgt aufgrund mehrerer Faktoren innerhalb der NSD-Zelle, und ist nicht selbst kausal für die Pathogenese verantwortlich: so haben veränderte Phosphatwerte (entweder diätetisch oder urämisch verursacht) Einfluss auf die Expression von CaSR (61). Hohe Phosphatwerte bei CKD vermindern die CaSR-Expression bei urämischen Versuchstieren (61). Vitamin-D ist offensichtlich direkter Regulator

des CaSR – 2 Promotorregionen des CaSR-Gens P1 und P2 haben VDREs (62). Weiterhin scheint der Reduktion des CaSR die Hyperplasie vorauszugehen (63).



**Abbildung 10: Anfärbung mit Anti-CaSR** - Membrane der Hauptzellen intensiv gefärbt, Membrane der oxyphilen Zellen schwach gefärbt

Wie in nebenstehender Abbildung erkennbar, färbte der Antikörper gegen CaSR die Membranen der Zellen in der NSD intensiv, vor allem die der Hauptzellen. Die Membrane der oxyphilen Zellen waren weniger stark angefärbt (siehe

Abbildung 10). Das

Zytoplasma der Zellen war

hingegen gering oder gar nicht

gefärbt. Das entspricht den Untersuchungen vorangegangener Studien (64).

Die reduzierte Intensität der CaSR-Expression bei sHPT, die auch wir detektierten, erklärten Martín-Salvago et al. dadurch, dass sich bei der erkrankten NSD weniger Hauptzellen befänden (64). Die Zellen, welche die Hauptzellen ersetzen (oxyphile Zellen), würden weniger CaSR exprimieren (64). Sie gehen davon aus, dass die NSD unter dem Einfluss der CKD nicht nur hyperplastisch wird, sondern auch ein schrittweiser Wechsel der gewöhnlichen Zellpopulation stattfindet (64). Diese Hypothese ist für uns gut nachvollziehbar, da wir in den erkrankten NSD mehr oxyphile Zellen als in der Kontrollgruppe fanden.

Bezüglich des CaSR kann man zusammenfassend festhalten: weiterhin sind aufgrund unterschiedlicher Ergebnisse viele Details unklar. Der Proliferation der NSD bei sHPT scheint die verminderte VDR-Expression und anschließend die verminderte Expression des CaSR zu folgen. Unsere Daten stellen in Frage, ob

die Reduktion der Expression von CaSR in knotigen Arealen, welche in der NSD beim sHPT vermehrt vorkommen, stärker auftritt.

In der sHPT-Gruppe fanden wir des Weiteren im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine Tendenz zur vermehrten nukleären und zytoplasmatischen Färbung durch **VDR** (keine statistische Signifikanz). In der gesunden NSD war VDR ausschließlich nukleär exprimiert. VDR zählt als Calcitriol-bindender Transkriptionsfaktor zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren. Somit gehört die Kernfärbung zum erwarteten Bild. Die reichlich vorkommende zytoplasmatische Färbung, die sowohl beim pHPT, als auch beim sHPT in Erscheinung tritt, eröffnet eventuell neue Einblicke in die Pathogenese des HPT. Bekannt ist, dass Vitamin-D als hochaffiner Ligand intrazellulär an VDR bindet und so in den Zellkern transportiert wird, wo der Komplex die Transkription seiner Zielgene reguliert. Neuere Studien zeigen, dass es schnelle Effekte von nukleären Rezeptoren außerhalb des Zellkerns gibt, welche keine Gentranskription mit sich bringt (65). Diese nicht-genomischen Effekte setzen aber Signalkaskaden in Gang, welche für die Gentranskription benötigt werden (65). Es wurde gezeigt, dass in Zellen eines Kolon-Karzinoms ein zytoplasmatischer VDR-Pool als Antwort auf eine Vitamin-D-Therapie eine intrazelluläre Signalkaskade aktivieren kann, die die transkriptionale Regulierung durch VDR verbessern kann (65). Fraglich ist, ob sich dieser Mechanismus auch in der erkrankten NSD abspielt.

Da sowohl die Morphologie als auch die Intensität der immunhistochemischen Färbungen innerhalb eines Schnittes stark variierten, wurden alle Schnitte in 9 Felder geteilt und jedes Feld einzeln analysiert (siehe auch unter 2.3.). Diese detaillierte 9-Felder-Analyse ergab eine hochsignifikante Korrelation zwischen den Proteinexpressionen von **FGFR-1** und **VDR**. In gesunden NSD wird die FGF 23-Sekretion durch Phosphat stimuliert. FGF 23 hält normalerweise Phosphat im Normbereich. Weiterhin sinkt in der gesunden NSD bei erhöhtem FGF 23 das PTH. Canalejo et al. beschrieben in einer Studie, dass die Expressionen von CaSR und VDR durch FGF 23 erhöht wurden (66), die Expressionen von FGFR-1 und Klotho beim sHPT waren vermindert.

Interessanterweise stieg die VDR-Expression bei den urämischen Ratten nach Applikation von FGF 23 nicht an. Das deutet möglicherweise auf eine FGF 23-Resistenz der erkrankten NSD hin. Eine in unserer Arbeit gefundene Korrelation zwischen FGFR-1 und VDR ermöglicht eventuell eine neue Sicht auf die Pathogenese des sHPT. Eine direkte Interaktion zwischen FGFR-1 und VDR sollte in weiteren Studien verfolgt werden.

Von vielen Studien bestätigt, gehen wir davon aus, dass im Erkrankungsfall der NSD durch sHPT die Proteinexpressionen von Klotho, CaSR und VDR im Vergleich zur gesunden NSD deutlich vermindert sind. Es werden weitere Studien benötigt, um die Pathogenese des sHPT detaillierter und präziser beschreiben zu können.

### 4.2.3. Ki-67

Wenn die Mechanismen, den  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt konstant zu halten, bei einer CKD nicht mehr ausreichen und es zur Hypocalcämie kommt, versucht der Körper dies durch eine NSD-Hyperplasie zu kompensieren (67). Die Nebenschilddrüsenvergrößerung gibt laut Goodman wichtige Hinweise auf die Progression der Niereninsuffizienz und die Schwere der Erkrankung (68).

Um die Proliferation beim sHPT zu untersuchen, färbten wir die Schnitte durch Ki-67 an. Die Proliferationsrate war – wie zu erwarten – beim sHPT höher. Die Differenz erreichte eine statistische Signifikanz.

Wie beim pHPT (siehe 4.1.3.), so resultierte bei Thomopoulou auch bezüglich des sHPT in seinen Studien ein signifikanter Unterschied zwischen der Anfärbung mit monoklonalen Antikörpern gegen das Ki-67 Antigen bei erkrankten NSD versus gesunden NSD (43). Entsprechend dem Geschehen beim pHPT war der proliferative Index bei den erkrankten NSD erhöht (43). Jedoch konnte er zwischen den einzelnen pathologischen Gruppen keinen Unterschied feststellen (43). Auch bezüglich nodulär versus diffus aufgebauter Drüsen wurden keine Differenzen erkannt (43). Eine neuere Studie stellt aber genau diesen Unterschied fest: hier zeigte sich, dass signifikant mehr Kerne in

knotigen Areale im Vergleich zu diffusen Arealen angefärbt waren (51). Die Fallzahl in dieser Studie war gering höher – Thomopoulou untersuchte 40 Patienten mit pHPT, 30 mit sHPT und eine unbekannte Anzahl an gesunden NSD, Komaba hatte die Proben von 80 Patienten mit sHPT und 7 normalen NSD.

Im Vergleich der Proteinexpressionen untereinander gab es auch einige Korrelationen mit Ki-67:

In Einklang mit der Studie von Kumata et al. (52) fanden wir eine negative Korrelation zwischen Ki-67, Klotho und FGFR-1 – ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen. Komaba et al. detektierten hier keine Korrelation (51). Wie in 4.2.2. schon erläutert, so vermutet Kumata, dass die verminderte Expression von Klotho und FGFR-1 beim sHPT als indirekte Reaktion auf die Hyperproliferation folgt, ohne jedoch ursächlich für die Pathogenese des sHPT verantwortlich zu sein (52).

Die Expression von Cyp27B1 korreliert zu Ki-67 ebenso negativ – p beträgt jedoch nur 0,06, sodass wir hier auch nur von einem Trend sprechen können.

#### 4.2.4. Cyp27B1

Die Rolle von **Cyp27B1** ist bezüglich der Pathogenese des sHPT noch nicht vollständig geklärt. Der Vergleich zwischen der gesunden und erkrankten Gruppe bezüglich der Anfärbung durch Cyp27B1 ergab keinen Unterschied. Bei der Gegenüberstellung der unterschiedlichen Proteinexpressionen (siehe auch Abbildung 9) fand sich ein Trend zur negativen Korrelation bei der Expression von Cyp27B1 und Ki-67. Es wurde diskutiert, ob Cyp27B1 ein Tumorsuppressorgen darstellen könnte (69), doch die Studienlage lässt diesen Rückschluss bisher noch nicht zu. Feststeht, dass das renale Cyp27B1 beim sHPT durch hohe FGF23-Werte inhibiert wird, und die NSD-Zellen bei sHPT im Gegensatz zur gesunden NSD vermehrt proliferieren. Fraglich ist auch, ob das parathyroide Cyp27B1 im Rahmen des sHPT funktionell verändert ist, was

aufgrund von Krajisnik`s Studie in Erwägung zu ziehen ist (32, siehe auch 4.2.2).

### 4.2.5. Korrelationen von Proteinexpressionen und Laborergebnissen und der Dauer der Nierenersatztherapie

Auf der Suche nach Korrelationen zwischen den immunhistochemischen Färbungen und Laborwerten stießen wir in der sHPT-Gruppe auf einen positiven Zusammenhang zwischen VDR, Kreatinin und Phosphat, und stellen somit auch beim sHPT einen direkten Zusammenhang zur Klinik her. Wie schon beschrieben, könnte analog dem vermuteten Geschehen beim pHPT der reduzierten Expression von CaSR die Verringerung der Expression von VDR vorausgehen. VDR besetzt in beiden Fällen eine Schlüsselrolle. Auch hier sind weitere Studien notwendig, um das Geschehen beim sHPT genau rekonstruieren zu können.

Erstaunlicherweise konnten wir keine Korrelationen zwischen den Proteinexpressionen und der Dauer der Nierenersatztherapie feststellen. Seo et al. berichten zu Beginn einer RRT von einer negativen Korrelation zwischen der renalen Klotho-Expression und dem Kreatinin-Wert, jedoch sei die Intensität der Klotho-Expression kein Prädiktor für den Grad der renalen Erholung (70).

### 4.2.6. Klinischer Bezug

Die Proteine der NSD sind beim sHPT geringer exprimiert als in der gesunden Kontrollgruppe, während die Proliferation in der sHPT-Gruppe ansteigt. Der Funktionsverlust ist mit dem Verlust der Differenzierung während der Entwicklung des sHPT zu erklären. Die Drüse proliferiert – dies führt unter Umständen zu einem autonomen HPT. Das ist häufig der Zeitpunkt, an dem Patienten nicht mehr medikamentös behandelt werden können, sondern häufiger einer Operation unterzogen werden müssen.

Inwieweit eine medikamentöse Therapie mit Vitamin D, aktivem Vitamin D oder Calcimimetika die Proteinexpression beeinflusst, ist weiterhin unklar.

Die Patienten der sHPT-Gruppe unserer Studie erhielten in dem Zeitraum der Untersuchung kein Calcimimetika.

### 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorgelegte Arbeit stellt eine der größten Studien mit Gewebe erkrankter NSD dar. Wir präsentieren eine detaillierte Analyse an erkrankter Nebenschilddrüse (pHPT und sHPT) im Vergleich zur gesunden Nebenschilddrüse. Die Schnitte der Nebenschilddrüsen wurden mittels pathophysiologisch relevanter Proteine immunhistochemisch gefärbt. Nach Teilung der Schnitte in 3 x 3 Felder wurden unter Einbeziehung der Serumwerte konventionelle, detaillierte morphologische und immunhistochemische Analysen der Nebenschilddrüsen durchgeführt.

Nebenschilddrüsen von 53 Patienten mit pHPT, hyperplastische Nebenschilddrüsen von 70 sHPT Patienten und normales Nebenschilddrüsen-Gewebe von 7 Patienten wurden im Rahmen von Parathyreoidektomien gewonnen.

Die Morphologie des **pHPT** betreffend war die Anzahl der Lipozyten in der pHPT-Gruppe signifikant geringer ( $p < 0,001$ ). Die Protein-Expressionen von Klotho, CaSR und VDR waren in der der pHPT-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert ( $p = 0,004$ ,  $p = 0,007$ ,  $p < 0,001$ ). Die Untersuchung von FGFR-1 erbrachte zwischen den beiden Gruppen keine Unterschiede ( $p = 0,35$ ). Der Vergleich der Expressionen untereinander zeigte signifikant positive Korrelationen, sowohl zwischen Klotho und CaSR als auch zwischen FGFR und VDR. Zwischen der Klotho-Expression und den Serum-Calcium Werten konnte keine Korrelation ermittelt werden ( $R = -0,13$ ,  $p = 0,66$ ), jedoch korrelieren die Expressionen von CaSR und Klotho mit Serum-Phosphat positiv. Verminderte Proteinexpressionen von CaSR und VDR scheinen bei der Entwicklung des pHPT beteiligt zu sein. Die Rolle der FGFR/Klotho-Achse bleibt weiterhin ungeklärt. Ob diese Ergebnisse neue Einblicke in die Pathogenese der Erkrankung geben können ist noch unklar und muss weiter geklärt werden.

Bezüglich der Morphologie im Rahmen des **sHPT** erlaubt das Vorkommen von Fettzellen in der normalen Nebenschilddrüse im Gegensatz zur sHPT-Gruppe und die Gewebe-Struktur (knotig bei Patienten mit sHPT) die Unterscheidung zwischen der normalen Nebenschilddrüse und der Nebenschilddrüse von Patienten mit sHPT. Die Proteinexpression von Klotho, CaSR und VDR war in der normalen Nebenschilddrüse höher als in der sHPT-Gruppe ( $p < 0,001$ ,  $p = 0,01$  und  $p = 0,001$ ). Da die Variabilität von jeder Proteinexpression innerhalb jedem Gewebeschnitt hoch war, wurden bei allen Patienten Korrelationen zwischen den unterschiedlichen immunhistochemischen Variablen für jedes der neun Felder analysiert. Anhand dieser Auswertung konnte eine höchst signifikante positive Korrelation zwischen den Expressionen von FGFR und VDR gefunden werden ( $p = 0,0004$ ). Interessanterweise fanden wir bezüglich VDR eine Tendenz zu vermehrter Kern/Zytoplasma-Färbung in der sHPT-Gruppe verglichen zu normalen Nebenschilddrüsen Zellen, welche eine ausschließliche Kernfärbung für VDR aufzeigten ( $p > 0,05$ ).

CaSR, VDR und eine beeinträchtigte Klotho/FGFR-Achse scheinen die grundlegenden Mitspieler in der Entwicklung des sHPT zu sein. Ob die ermittelte Korrelation zwischen FGFR und VDR und die Tendenz zu vermehrter Kern/Zytoplasma-Färbung neue Erkenntnisse in die Pathogenese der Erkrankung geben können, muss in weiteren Studien an anderen Nebenschilddrüsen-Gewebebanken verifiziert werden.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Gomes EM, Nunes RC, Lacativa PG, Almeida MH, Franco FM, Leal CT, Patrício Filho PJ, Farias ML, Gonçalves MD (2007) Ectopic and extranumerary parathyroid glands location in patients with hyperparathyroidism secondary to end stage renal disease. *Acta Cir Bras* 22(2):105-109.
2. Burke JF, Chen H, Gosain A (2014) Parathyroid conditions in childhood. *Semin Pediatr Surg.* 23(2): 66-70.
3. Heffes CS (2008) Embryology, anatomy, and histology. Pp. 1012-1028. In: Wenig B. *Atlas of Head and Neck Pathology*. 2nd ed. China: Saunders Elsevier.
4. Blaine J, Chonchol M, Levi M (2015) Renal Control of Calcium, Phosphate, and Magnesium Homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol* 10(7):1257-1272.
5. Loupy A, Ramakrishnan SK, Wootla B, Chambrey R, de la Faille R, Bourgeois S, Bruneval P, Mandet C, Christensen EI, Faure H, Cheval L, Laghmani K, Collet C, Eladari D, Dodd RH, Ruat M, Houillier P (2012) PTH-independent regulation of blood calcium concentration by the calcium-sensing receptor. *J Clin Invest* 122(9): 3355-3367.
6. Renz-Polster H, Krautzig S (2008) Vitamin D, S. 796, in *Basislehrbuch Innere Medizin*, Urban & Fischer Verlag München.
7. Landry CS, Ruppe MD, Grubbs EG (2011) Vitamin D receptors and parathyroid glands. *Endocr Pract* 17 Suppl 1: 63-68.
8. Valdivielso JM, Fernandez E (2006) Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta* 371(1-2): 1-12.
9. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E (2005) Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 289(1): 8-28.
10. Fukumoto S (2008) Physiological regulation and disorders of phosphate metabolism--pivotal role of fibroblast growth factor 23. *Intern Med* 47(5): 337-343.
11. Itoh N, Ohta H, Konishi M (2015) Endocrine FGFs: Evolution, Physiology, Pathophysiology, and Pharmacotherapy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6: 154.

12. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI (1997) Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390(6655): 45-51.
13. Kim JH, Hwang KH, Park KS, Kong ID, Cha SK (2015) Biological Role of Anti-aging Protein *Klotho*. *J Lifestyle Med* 5(1): 1-6.
14. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T (2006) *Klotho* converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* 444(7120): 770-774.
15. Imura A, Tsuji Y, Murata M, Maeda R, Kubota K, Iwano A, Obuse C, Togashi K, Tominaga M, Kita N, Tomiyama K, Iijima J, Nabeshima Y, Fujioka M, Asato R, Tanaka S, Kojima K, Ito J, Nozaki K, Hashimoto N, Ito T, Nishio T, Uchiyama T, Fujimori T, Nabeshima Y (2007)  $\alpha$ -*Klotho* as a regulator of calcium homeostasis. *Science* 316(5831): 1615-1618.
16. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Baum MG, Schiavi S, Hu MC, Moe OW, Kuro-o M (2006) Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by *klotho*. *J Biol Chem* 281(10): 6120-6123.
17. Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro-o M, Mohammadi M, Sirkis R, Naveh-Many T, Silver J (2007) The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest* 117(12): 4003-4008.
18. Gasser RW (2013) Clinical aspects of primary hyperparathyroidism: clinical manifestations, diagnosis, and therapy. *Wien Med Wochenschr* 163(17-18): 397-402.
19. Renz-Polster H, Krautzig S (2008) Hyperparathyreoidismus (HPT), S. 798, in *Basislehrbuch Innere Medizin*, Urban & Fischer Verlag München.
20. Johnson SJ, Sheffield EA, McNicol AM (2005) Best practice no 183. Examination of parathyroid gland specimens. *J Clin Pathol* 58(4): 338-342.
21. Sheu-Grabellus SY, Schmid KW (2015) Pathologie der Nebenschilddrüse: Praktisches für den pathologischen Alltag. *Pathologe* 36(3): 229-236.
22. Varshney S, Bhadada SK, Saikia UN, Sachdeva N, Behera A, Arya AK, Sharma S, Bhansali A, Mithal A, Rao SD (2013) Simultaneous expression analysis of vitamin D receptor, calcium-sensing receptor, cyclin D1, and PTH in symptomatic primary hyperparathyroidism in Asian Indians. *Eur J Endocrinol* 169(1): 109-116.

23. Remmele W, Stegner HE (1987) Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologie* 8(3): 138-140.
24. Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 182(3): 311-322.
25. Crouzeix G, Kerlan V (2014) Primary hyperparathyroidism: new concepts, new recommendations. *Ann Endocrinol (Paris)* 75 Suppl 1: 21-36.
26. Zhao L, Liu JM, He XY, Zhao HY, Sun LH, Tao B, Zhang MJ, Chen X, Wang WQ, Ning G (2013) The changing clinical patterns of primary hyperparathyroidism in Chinese patients: data from 2000 to 2010 in a single clinical center. *J Clin Endocrinol Metab* 98(2): 721-728.
27. Griebeler ML, Kearns AE, Ryu E, Hathcock MA, Melton LJ 3rd, Wermers RA (2015) Secular trends in the incidence of primary hyperparathyroidism over five decades (1965-2010). *Bone* 73: 1-7.
28. Demiralay E, Altaca G, Demirhan B (2011) Morphological evaluation of parathyroid adenomas and immunohistochemical analysis of PCNA and Ki-67 proliferation markers. *Turk Patoloji Derg* 27(3): 215-220.
29. Banek T, Banek L, Pezerović-Panijan R (2005) Morphology of healthy human parathyroid glands in cytologic smears. *Acta Cytol* 49(6): 627-633.
30. Björklund P, Krajisnik T, Akerström G, Westin G, Larsson TE (2008) Type I membrane klotho expression is decreased and inversely correlated to serum calcium in primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 93(10): 4152-4157.
31. Martínez Díaz-Guerra G, Hawkins Carranza F (2009) Concept, etiology and epidemiology of primary hyperparathyroidism. *Endocrinol Nutr* 56 Suppl 1: 2-7.
32. Krajisnik T, Björklund P, Marsell R, Ljunggren O, Akerström G, Jonsson KB, Westin G, Larsson TE (2007) Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1 $\alpha$ -hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *J Endocrinol* 195(1): 125-131.
33. Yamashita H, Yamashita T, Miyamoto M, Shigematsu T, Kazama JJ, Shimada T, Yamazaki Y, Fukumoto S, Fukagawa M, Noguchi S (2004) Fibroblast growth factor (FGF)-23 in patients with primary hyperparathyroidism. *Eur J Endocrinol* 151(1): 55-60.

34. Nakajima K, Okazaki T, Okamoto T, Kimura H, Takano K, Sato K (2010) Genes up- or down-regulated by high calcium medium in parathyroid tissue explants from patients with primary hyperparathyroidism. *Endocr J* 57(2): 153-159.
35. Sudhaker Rao D, Han ZH, Phillips ER, Palnitkar S, Parfitt AM (2000) Reduced vitamin D receptor expression in parathyroid adenomas: implications for pathogenesis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 53(3): 373-381.
36. Yano S, Sugimoto T, Tsukamoto T, Chihara K, Kobayashi A, Kitazawa S, Maeda S, Kitazawa R (2003) Decrease in vitamin D receptor and calcium-sensing receptor in highly proliferative parathyroid adenomas. *Eur J Endocrinol* 148(4): 403-411.
37. Brown AJ, Zhong M, Finch J, Ritter C, McCracken R, Morrissey J, Slatopolsky E (1996) Rat calcium-sensing receptor is regulated by vitamin D but not by calcium. *Am J Physiol.* 270: F454-460.
38. Carling T, Rastad J, Szabó E, Westin G, Akerström G (2000) Reduced parathyroid vitamin D receptor messenger ribonucleic acid levels in primary and secondary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 85(5): 2000-2003.
39. Garner SC, Hinson TK, McCarty KS, Leight M, Leight GS Jr, Quarles LD (1997) Quantitative analysis of the calcium-sensing receptor messenger RNA in parathyroid adenomas. *Surgery* 122(6): 1166-1175.
40. Farnebo F, Enberg U, Grimelius L, Bäckdahl M, Schalling M, Larsson C, Farnebo LO (1997) Tumor-specific decreased expression of calcium sensing receptor messenger ribonucleic acid in sporadic primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 82(10): 3481-3486.
41. Carrillo-López N, Fernández-Martín JL, Cannata-Andía JB (2009) The role of calcium, calcitriol and their receptors in parathyroid regulation. *Nefrologia* 29(2): 103-108.
42. Abbona GC, Papotti M, Gasparri G, Bussolati G (1995) Proliferative activity in parathyroid tumors as detected by Ki-67 immunostaining. *Hum Pathol* 26(2): 135-138.
43. Thomopoulou GE, Tseleni-Balafouta S, Lazaris AC, Koutselini H, Kavantzias N, Davaris PS (2003) Immunohistochemical detection of cell cycle regulators, Fhit protein and apoptotic cells in parathyroid lesions. *Eur J Endocrinol* 148(1): 81-87.

44. Wang O, Wang CY, Shi J, Nie M, Xia WB, Li M, Jiang Y, Guan H, Meng XW, Xing XP (2012) Expression of Ki-67, galectin-3, fragile histidine triad, and parafibromin in malignant and benign parathyroid tumors. *Chin Med J (Engl)* 125(16): 2895-2901.
45. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Fukumoto S, Yamashita T (2004) FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res* 19(3): 429-435.
46. Hamperl H (1931) Oncocyten und Geschwülste der Speicheldrüsen. *Virchows Arch* 282: 724-736.
47. Müller-Höcker J (1998) Die onkozytäre Metaplasie/Neoplasie – Morphologie, Biochemie, Molekulargenetik. *Pathologe*. 19(2): 104-114.
48. Müller-Höcker J, Aust D, Napiwotzky J, Münscher C, Link TA, Seibel P, Schneeweiss SG, Kadenbach B (1996) Defects of the respiratory chain in oxyphil and chief cells of the normal parathyroid and in hyperfunction. *Hum Pathol*. 27(6): 532-541.
49. Tokumoto M, Tsuruya K, Fukuda K, Kanai H, Kuroki S, Hirakata H (2002) Reduced p21, p27 and vitamin D receptor in the nodular hyperplasia in patients with advanced secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 62(4): 1196-1207.
50. Fukuda N, Tanaka H, Tominaga Y, Fukagawa M, Kurokawa K, Seino Y (1993) Decreased 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor density is associated with a more severe form of parathyroid hyperplasia in chronic uremic patients. *J Clin Invest* 92(3): 1436-1443.
51. Komaba H, Goto S, Fujii H, Hamada Y, Kobayashi A, Shibuya K, Tominaga Y, Otsuki N, Nibu K, Nakagawa K, Tsugawa N, Okano T, Kitazawa R, Fukagawa M, Kita T (2010) Depressed expression of Klotho and FGF receptor 1 in hyperplastic parathyroid glands from uremic patients. *Kidney Int* 77(3): 232-238.
52. Kumata C, Mizobuchi M, Ogata H, Koiwa F, Nakazawa A, Kondo F, Kadokura Y, Kinugasa E, Akizawa T (2010) Involvement of alpha-klotho and fibroblast growth factor receptor in the development of secondary hyperparathyroidism. *Am J Nephrol* 31(3): 230-238.
53. Krajisnik T, Olauson H, Mirza MA, Hellman P, Akerström G, Westin G, Larsson TE, Björklund P (2010) Parathyroid Klotho and FGF-receptor 1 expression decline with renal function in hyperparathyroid patients with chronic kidney disease and kidney transplant recipients. *Kidney Int* 78(10): 1024-1032.

54. Galitzer H, Ben-Dov IZ, Silver J, Naveh-Many T (2010) Parathyroid cell resistance to fibroblast growth factor 23 in secondary hyperparathyroidism of chronic kidney disease. *Kidney Int* 77(3): 211-218.
55. Hong YA, Choi DE, Lim SW, Yang CW, Chang YK (2013) Decreased Parathyroid Klotho Expression Is Associated With Persistent Hyperparathyroidism After Kidney Transplantation. *Transplant Proc* 45(8): 2957-2962.
56. Kifor O, Moore FD Jr, Wang P, Goldstein M, Vassilev P, Kifor I, Hebert SC, Brown EM (1996) Reduced immunostaining for the extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor in primary and uremic secondary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 81(4): 1598-1606.
57. Gogusev J, Duchambon P, Hory B, Giovannini M, Goureau Y, Sarfati E, Drüeke TB (1997) Depressed expression of calcium receptor in parathyroid gland tissue of patients with hyperparathyroidism. *Kidney Int* 51(1): 328-336.
58. Yano S, Sugimoto T, Tsukamoto T, Chihara K, Kobayashi A, Kitazawa S, Maeda S, Kitazawa R (2000) Association of decreased calcium-sensing receptor expression with proliferation of parathyroid cells in secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 58(5): 1980-1986.
59. McCann LM, Beto J (2010) Roles of calcium-sensing receptor and vitamin D receptor in the pathophysiology of secondary hyperparathyroidism. *J Ren Nutr* 20(3): 141-150.
60. Wang NN, Wang XY, Peng T, Wu HF, Hu JM, Zhao WH, Yu XB (2004) Expression of the calcium receptor CaR in the parathyroid of secondary hyperparathyroidism patients. *Chin Med J (Engl)* 117(9): 1408-10.
61. Ritter CS, Martin DR, Lu Y, Slatopolsky E, Brown AJ (2002) Reversal of secondary hyperparathyroidism by phosphate restriction restores parathyroid calcium-sensing receptor expression and function. *J Bone Miner Res* 17(12): 2206-2213.
62. Hendy GN, Canaff L, Cole DE (2013) The CASR gene: alternative splicing and transcriptional control, and calcium-sensing receptor (CaSR) protein: structure and ligand binding sites. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 27(3): 285-301.
63. Ritter CS, Finch JL, Slatopolsky EA, Brown AJ (2001) Parathyroid hyperplasia in uremic rats precedes down-regulation of the calcium receptor. *Kidney Int* 60(5): 1737-1744.

64. Martín-Salvago M, Villar-Rodríguez JL, Palma-Alvarez A, Beato-Moreno A, Galera-Davidson H (2003) Decreased expression of calcium receptor in parathyroid tissue in patients with hyperparathyroidism secondary to chronic renal failure. *Endocr Pathol.* 14(1): 61-70.
65. Ordóñez-Morán P, Muñoz A (2009) Nuclear receptors: genomic and non-genomic effects converge. *Cell Cycle* 8(11): 1675-1680.
66. Canalejo R, Canalejo A, Martínez-Moreno JM, Rodríguez-Ortiz ME, Estepa JC, Mendoza FJ, Muñoz-Castaneda JR, Shalhoub V, Almaden Y, Rodríguez M (2010) FGF23 fails to inhibit uremic parathyroid glands. *J Am Soc Nephrol* 21(7): 1125-1135.
67. Parfitt AM (1997) The hyperparathyroidism of chronic renal failure: a disorder of growth. *Kidney Int* 52(1): 3-9.
68. Goodman WG, Quarles LD (2008) Development and progression of secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease: lessons from molecular genetics. *Kidney Int* 74(3): 276-288.
69. Lauter K, Arnold A (2009) Analysis of CYP27B1, encoding 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase, as a candidate tumor suppressor gene in primary and severe secondary/tertiary hyperparathyroidism. *J Bone Miner Res* 24(1): 102-104.
70. Seo MY, Yang J, Lee JY, Kim K, Kim SC, Chang H, Won NH, Kim MG, Jo SK, Cho W, Kim HK (2015) Renal Klotho expression in patients with acute kidney injury is associated with the severity of the injury. *Korean J Intern Med* 30(4): 489-495.

## 7. ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Die Arbeit wurde im Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart und dem angegliederten „Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie“ unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Mark Dominik Alscher und Priv.-Doz. Dr. med. Martin Kimmel durchgeführt.

Diese Studie wurde von Prof. Dr. med. Mark Dominik Alscher, Priv.-Doz. Dr. med. Martin Kimmel und Dr. med. Peter Fritz konzipiert. Die Vorversuche wurden von mir mit Hilfe von Frau Dagmar Biegger im „Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie“ am Robert-Bosch-Krankenhaus geplant und durchgeführt.

Das NSD-Gewebe wurde von mir geschnitten und auf die Objektträger fixiert. Die anschließende Vorbereitung der Schnitte, die eigentliche Färbung, die Entwässerung, Trocknung und Eindeckung führte ich nach anfänglicher Unterstützung von Frau Biegger selbständig durch. Die Auswertung am Mikroskop erfolgte durch mich – beratend und kontrollierend standen mir Dr. med. Peter Fritz und Priv.-Doz. Dr. med. Martin Kimmel zur Seite.

Die Labordaten wurden von Dr. med. Meike Roesel zusammengestellt.

Die am Mikroskop erhobenen Daten sowie die Laborwerte wurden von Dr. rer. nat. Jürgen Dippon, Sven Goletz und mir statistisch ausgewertet.

Bei der grafischen Gestaltung der Tabellen 1 bis 3 unterstützte mich Frederike Plieth – der Inhalt wurde ausschließlich von mir verfasst.

Jörg Latus und Priv.-Doz. Dr. med. Martin Kimmel fassten die Ergebnisse in 2 Publikationen zusammen (siehe 8.). Aus den Veröffentlichungen übernahm ich die Tabellen 3, 5, 6, 7 und 8, sowie die Abbildungen 7, 8 und 9, was in der Fußnote jeweils gekennzeichnet wurde.

Die Dissertation wurde durch mich verfasst. Wurden Inhalte und Texte weiterer Personen verwendet, wurde dies entsprechend gekennzeichnet und im Literaturverzeichnis ausgeführt.

Schramberg, den 01.08.2019

## 8. VERÖFFENTLICHUNGEN

Die Inhalte der Studie wurden bereits durch 2 Publikationen in renommierten Fachzeitschriften publiziert:

1. Involvement of  $\alpha$ -klotho, fibroblast growth factor-, vitamin-D- and calcium-sensing receptor in 53 patients with primary hyperparathyroidism. Latus J, Lehmann R, Roesel M et al. Endocrine. 2013; 44(1): 255-263.
2. Analysis of  $\alpha$ -klotho, fibroblast growth factor-, vitamin-D and calcium-sensing receptor in 70 patients with secondary hyperparathyroidism. Latus J, Lehmann R, Roesel M et al. Kidney Blood Press Res. 2013; 37(1): 84-94.

## 9. DANKSAGUNG

Ich bedanke mich sehr bei Herr Prof. Dr. med M. D. Alscher, der mich als Doktorvater begleitet hat.

Mein großer Dank gilt auch Priv.-Doz. Dr. med Martin Kimmel, der mich durch die gesamte Zeit betreut hat, jederzeit Fragen beantwortet hat und geduldig auch in der Zeit war, in der während der Familiengründung so wenig Kapazität für die Doktorarbeit frei war. Er hat mich immer wieder motiviert. *Vielen Dank für Deinen großen Einsatz!*

Dagmar Biegger war mir in der Zeit der Labor- und praktischen Arbeit eine sehr kompetente Anleiterin. Sie stand jederzeit mit Rat und Tat zur Hilfe. *Dagmar, vielen Dank für Deine umfassende Unterstützung!*

Vielen Dank an Frederike: *Ohne Deine Hilfe wären die 3 Grafiken wirklich unprofessionell gewesen.*

Sarah – *Deine immer wieder aufmunternden Worte schätze ich sehr. Wer weiß: vielleicht hätte ich das Projekt „Doktorarbeit“ ohne Dich nicht bis hierher gebracht.*

Tausend Dank an Thomas, meinen Mann: *Ohne Deine Urlaubstage, die Du an mich abgetreten hast, hätte ich die Doktorarbeit nicht zu Ende bringen können. Auch wenn ich viel länger gebraucht habe, als wir gehofft hatten, hast Du mich immer wieder ermutigt.*

Levi, Ben und Elias: *Ihr seid klasse, dass Ihr mich immer wieder an den Schreibtisch gelassen habt. Ihr seid tolerant gewesen, auch wenn ihr es nicht verstehen konntet, dass man für eine Doktorarbeit noch länger als ein Tag benötigt.*

Mama und Papa: *Vielen Dank, dass Ihr immer wieder unsere Kinder betreut habt. Auch in den turbulentesten Zeiten konnten wir mit Euch rechnen.*

Mutter und Vater: *ich bin froh, dass ich Euch habe. Euer Vertrauen in mich, dass ich die Doktorarbeit schaffe, hat mir immer wieder gut getan. Vielen Dank für die Arbeitswoche, in der Ihr uns bekocht und die Kinder versorgt habt.*

Letztendlich verdanke ich alles meinem Gott!