LEIBNIZ-
WISSENSCHAFTSCAMPUS
PHOSPHORFORSCHUNG
ROSTOCK

Leibniz-
Wettbewerb

Abschlussbericht

Anschubprojekt: „Methodenentwicklung zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von FGF23 als Marker der Phosphathomöostase bei Schweinen“

Zuwendungsempfänger:	FBN
Kooperationspartner:	UMR
Vorhabensbezeichnung:	porcine FGF23
Laufzeit des Vorhabens:	01.11.2022 – 31.07.2023
Autoren:	Michael Oster, Klaus Wimmers, Dagmar-Christiane Fischer

Hinweis: Der Bericht sollte eine Länge von 8 bis 10 Seiten möglichst nicht überschreiten!

Inhaltsverzeichnis

Kapitel	Seite
1 Zusammenfassung und Schlussfolgerung (ggf. offene Forschungsfragen)	1
2 Einleitung und Ziele des Projektes	1
3 Material und Methoden	2
4 Ergebnisse	3
5 weitere Leistungen und Ziele aus dem Projekt	5
Danksagung	5

1. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-23 (FGF23) ist ein wichtiges, aus dem Knochen stammendes Hormon, das eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der renalen P-Resorption und der Vitamin-D-Hormonsynthese in der Niere spielt. Bisher waren für die Spezies "Schwein" weder qualitative noch quantitative Verfahren zum Nachweis von FGF23 und seinen Rezeptoren verfügbar. Im Rahmen dieses Anschubprojekts konnte ein kommerziell erhältlicher ELISA identifiziert werden, der für die Quantifizierung von porcinen FGF23 aus Serum und Plasma geeignet ist. Weiterhin ist es gelungen, kommerziell verfügbare Antikörper gegen FGF23 und α-Klotho zu identifizieren, die den immunhistochemischen Nachweis dieser Proteine in porcinen Zielgeweben der Mineralstoffhomöostase ermöglichen. Leider ist es nicht gelungen, rekombinantes porcines FGF23 als Grundlage für die Entwicklung eines geeigneten FGF23-spezifischen Antikörpers herzustellen.
Dennoch gelang es, die analytischen Verfahren, die für ein besseres Verständnis der P-Homöostase bei Nutztieren erforderlich sind, kontinuierlich zu optimieren. Der Nachweis von FGF23 in Geweben und der Zirkulation ist ein wichtiger Baustein, um Fragen zur Tiergesundheit, zu systemischen, endogenen Prozessen der Mineralstoffhomöostase, sowie zu P-Emissionen in der Tierhaltung zu adressieren. Auf Basis der jetzt etablierten Methoden soll mittelfristig in Folgearbeiten untersucht werden, inwieweit FGF23 und dessen Rezeptoren nach variabler P-Zufuhr zur Mineralstoffregulation beitragen.

2. Einleitung und Ziele des Projektes

Bei Säugetieren, einschließlich Schweinen, wird die Aufrechterhaltung der Mineralstoffhomöostase durch das komplexe Zusammenspiel von Vitamin D, Parathormon (PTH) und Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23 (FGF23) reguliert. FGF23 ist ein Hormon, das von Osteoblasten und Osteozyten freigesetzt wird. FGF23 wirkt auf die Nieren, Leber, Nebenschilddrüsen und Knochen über die Rezeptoren FGFR1 - FGFR4 (ubiquitär exprimiert) und α-Klotho (exprimiert in Niere, Lunge und Knochen; auch in löslicher Form im Serum vorhanden). Die gewebespezifische Ausprägung der FGF23-Signalkette gestaltet sich durch alternatives Spleißen komplex. FGF23 begünstigt die renale P-Ausscheidung durch Hemmung der renalen P-Transporter. Darüber hinaus unterdrückt FGF23 das Enzym 1α-Hydroxylase, das von *CYP27B1* kodiert wird, und begrenzt so die Umwandlung von Calcidiol in Calcitriol, die biologisch aktive Form von Vitamin D. Es ist weiterhin bekannt, dass Parathormon (PTH), Calcitriol und ein hohes Serum-P-Level die FGF23-Produktion im Knochen induzieren. Diese physiologischen Zusammenhänge gelten für alle Säugetiere, einschließlich großer Tiermodelle wie dem Schwein.
In diesem Anschubprojekt wurden die Voraussetzungen für den quantitativen und qualitativen Nachweis von porcinen FGF23 in unterschiedlichen biologischen Matrizes erbracht. Im Einzelnen handelte es sich um die quantitative Bestimmung von FGF23 in Serum bzw. Plasma mit Hilfe von kommerziell verfügbaren ELISA. Um die Ergebnisse zu validieren, war die Herstellung und Reinigung von rekombinantem porcinen FGF23 geplant. Im zweiten

Teil des Projekts wurden immunhistochemische Färbungen an Paraffinschnitten von demineralisierten und formalinfixierten porcinen Knochen sowie an formlinfixierten porcinen Nierenproben durchgeführt. Durch die erfolgreiche Etablierung dieser Verfahren wird die bei der Bewertung des P-Status und möglicher endogener Mechanismen nach variabler P-Versorgung bei der Spezies Schwein vorhandene analytische Lücke geschlossen.

3. Material und Methoden

Quantifizierung von porcinen FGF23 im Blut mittels kommerzieller ELISA-Kits

Ein Vorab-Screening und Test von sechs kommerziell erhältlichen ELISA-Kits zum Nachweis von FGF23 zeigte, dass diese nicht für die zuverlässige Quantifizierung des porcinen FGF23 geeignet sind. Im Rahmen des Anschubprojektes wurden noch 2 weitere kommerziell erhältliche ELISA-Kits der Hersteller FN (EP0058; Wuhan, China) und Biomedica (BI-20700; Wien, Österreich) getestet. Analysiert wurden Serum- und Plasmaproben von Schweinen verschiedener Altersstufen (28 Lebenstage, 120 Lebenstage, 160 Lebenstage) und Rassen (Deutsche Landrasse, Deutsches Sattelschwein). Das Probenmaterial wurde in Verdünnungsreihen (Assaypuffer, Spike-in) sowie auf Stabilität nach Einfrier-/Auftauzyklen getestet.

Darstellung von rekombinanten FGF23

Zur Etablierung einer Positivkontrolle sollte rekombinantes FGF23 (UniProt no.: A0A287AXR0) per Klonierung dargestellt werden (Trenzyme, Freiburg). Für die Expression des eukaryotischen Proteins FGF23 (His-TEV-FGF23; 27.2kDa; 226 aa / 701 bp inkl. cloning sites und Stoppcodon) wurden Rosetta2(DE3)-kompetente Zellen (*E. coli*) verwendet und unter Standardbedingungen 23.5 h kultiviert (Autoinduktion; erhaltene Biomasse: 2.33 g). Die Zellen wurden anschließend unter Verwendung eines Proteaseinhibitors auf Eis lysiert (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM Imidazol; pH 7.5). Nach Zentrifugation (50,000 g; 20 min; 4°C) wurde die lösliche Fraktion, die die rekombinanten His-getaggten Fusionsproteine enthält, durch Affinitätschromatographie gereinigt (Immobilisierte Metallchelat-Affinitätschromatographie; IMAC). Gebundenes und mit His-getaggtes Protein wurde durch Zugabe von Imidazol (500 mM) zur mobilen Phase eluiert. Die weitere Charakterisierung des Eluates erfolgte durch eine SDS-PAGE (12%iges Gel) mit nachfolgendem Westernblot zur Identifizierung des His-getaggten Proteins mit einem Peroxidase-konjugiertem Antikörper (Anti-His-POD; 1:2.000).

Prüfung von kommerziell verfügbaren Antikörpern zum immunhistochemischen Nachweis von FGF-23 bzw. Klotho in procinem Gewebe

Für diese Untersuchungen standen Proben von Nieren und Knochen von 120 Tage alten Schweinen zur Verfügung. Während die Proben von Nieren nach Formalinfixierung in Paraffin eingebettet wurden, mussten die Knochenproben zunächst entkalkt werden. Dies erfolgte über 6 Wochen mit regelmäßigen Wechseln der Entkalkungslösung ("Solvagreen", Roth Gmbh) bevor das Material dann in üblicher Weise entwässert und schließlich in Paraffin

eingebettet werden konnte. Von diesen Präparaten wurden Dünnschnitte (ca. 4µm) angefertigt und an diesen der immunhistochemische Nachweis von FGF23 und Klotho etabliert. Dabei galt es, die optimalen Bedingungen (Verdünnung und Inkubationsbedingungen für den primären Antikörper, Blockieren unspezifischer Bindungsstellen für den Sekundärantikörper, etc.) zu identifizieren (Tabelle 1).

Tabelle 1. Getestete Primärantikörper.

	FGF23	**FGF23**	**α-Klotho**
Hersteller	biorbyt	Biorbyt	OriGene
Produkt (cat-Nr)	BYT-ORB114121	BYT-ORB110181	TA346109
Klonalität	polyklonal	Polyklonal	polyklonal
Markierung	Biotin	HRP	
Host	Kaninchen	Kaninchen	Kaninchen
Konzentration [mg/mL]	1,0	1,0	1,0
Antigendemaskierung	• Kochen mit Citratpuffer (optimal für Nierenproben) • Behandlung mit Trypsin (optimal für Knochenproben)		
Blockieren unspezifischer Bindungsstellen	• 2,5% Pferdeserum • 5% BSA • 2% Milchpulver • 5% BSA und 2,5% Pferdeserum		
getestete Inkubations-bedingungen (Temperatur, Verdünnung, Zeit)	• 37°C (1h oder 2h); 4°C (über Nacht) • 1:50; 1:100; 1:200		
Sekundärantikörper bzw. Detektionssystem	• Avidin-Peroxidase • Peroxidase-konjugierte Antikörper gegen Kaninchen-antikörper mit minimaler Kreuzreaktivität zu Schweineproteinen aus verschiedenen Spezies		

4. Ergebnisse und Diskussion

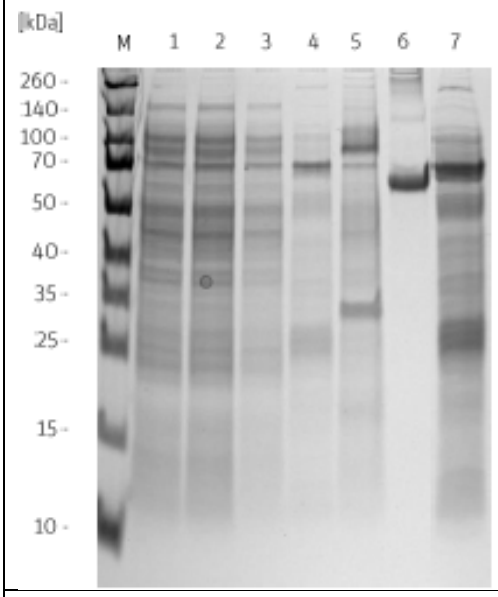
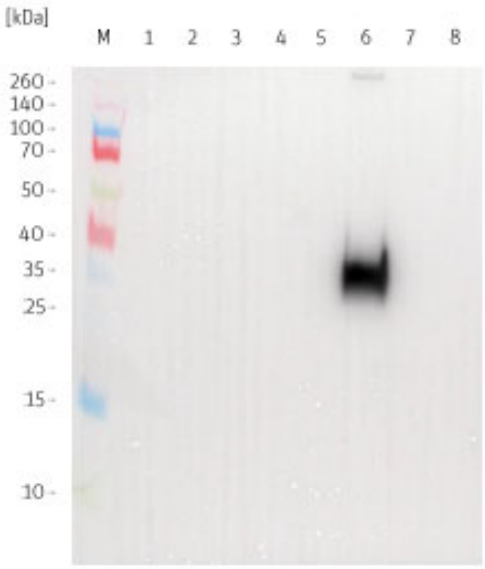
Quantifizierung von porcinen FGF23 im Blut mittels kommerzieller ELISA-Kits

Beim Kit des Herstellers FN, ausgewiesen für den Nachweis von porcinen FGF23, konnte keine spezifische Bindung zu Probenmaterial der Spezies Schwein gezeigt werden. Der Assay des Herstellers Biomedica, der primär für den Nachweis von humanen FGF23 ausgewiesen ist, erwies sich für den Nachweis von porcinem FGF23 geeignet. Die Ergebnisse der Verdünnungsreihen und Spike-in Wiederfindung (80-91%) waren zufriedenstellend. Die Verdünnungen wiesen eine Wiederfindung von 120-140% auf, was auf Matrixeffekte hinweist und als systematischer Fehler angesehen werden kann. Die Messungen waren nach 2 Einfrier-/Auftauzyklen reproduzierbar. Die Nachweisgrenze liegt bei 5.4 ng/ml. Summa summarum kann mit diesem Assay die Serum- und Plasmakonzentration von FGF23 bei Schweinen bestimmt werden.

Darstellung von rekombinanten FGF23

Der Versuch, His-getaggtes rekombinantes porcines FGF23 durch Nutzung eines etablierten Systems darzustellen, muss leider als gescheitert angesehen werden. Das von den Bakterien erzeugte rekombinante Protein wurde durch Affinitätschromatographie isoliert und die durch Imidazol eluierte Fraktion in einer SDS-PAGE mit nachfolgendem Westernblot analysiert. Obwohl nach elektrophoretischer Auftrennung und nachfolgender Färbung verschiedene Proteine in dieser Fraktion nachweisbar sind (Abbildung 1A) konnte im Westernblot kein His-getaggtes Protein nachgewiesen werden (Abbildung 1B). Wir vermuten, dass dieser Befund darauf zurückzuführen ist, dass FGF23 für die verwendeten Bakterien (*E. coli*) toxisch ist.

Abbildung 1: Analyse der Reinigung. A – SDS-PAGE; B – Western Blot.

<table>
<tr><td>A
 
</td><td>B
 
</td></tr>
<tr><td>1 Soluble fraction (IMAC load; 3 µl)
2 IMAC flowthrough (3 µl)
3 IMAC wash (15 µl)
4 IMAC elution (3 µl)
5 Insoluble fraction (3 µl)
6 BSA (2.0 µg)
7 IMAC elution (15 µl)</td><td>1 Soluble fraction (IMAC load; 3 µl)
2 IMAC flowthrough (3 µl)
3 IMAC wash (15 µl)
4 IMAC elution (3 µl)
5 Insoluble fraction (3 µl)
6 Positive control (His-Tag; 0.5 ng)
8 IMAC elution (15 µl)</td></tr>
</table>

Spezifität von kommerziellen primären FGF23- und α-Klotho Antikörpern

Die zur Verfügung stehenden Antikörper erlaubten den Nachweis von FGF23 und Klotho in Niere und Knochen, allerdings sind noch weitere Untersuchungen erforderlich, um das optimale Protokoll zu definieren. Einen ersten Eindruck zur Lokalisation der genannten Proteine in Niere und Knochen gibt Abbildung 2. Der mit Biotin konjugierte Anti-FGF23-Antikörper ist für immunhistochemische Analysen im Knochen eher ungeeignet.

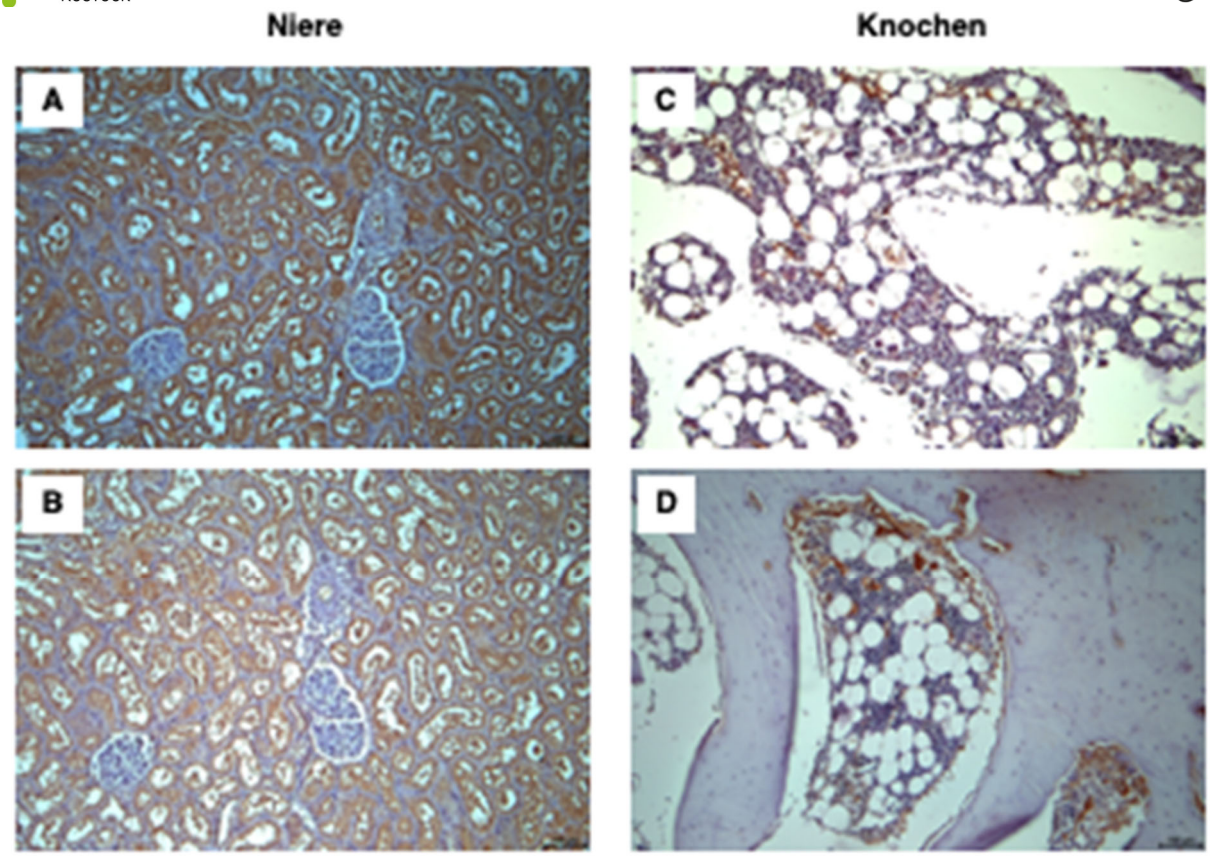


Abbildung 2: Resultat der immunhistochemischen Analyse von porciner Niere (A, B) und entkalktem Knochen (C, D) bei Verwendung des Peroxidase-konjugiertem FGF23 Antikörpers (A, C), des Biotin-konjugierten Primärantikörpers (B) und des polyklonalen Antiserums gegen Klotho (D) in Kombination mit einem Peroxidase-markierten Detektionssystem.

5. weitere Leistungen und Ziele aus dem Projekt

Basierend auf den hier dargestellten Ergebnissen zur immunchemischen Quantifizierung (ELISA) und dem qualitativen Nachweis (Immunhistochemie) von FGF23 und Klotho ist die Einwerbung weiterer Drittmittel im Rahmen eines interdisziplinären Projekts zur systemischen Interaktion von Knochen, Nebenschilddrüse, Niere und Darm beim Schwein geplant.

Danksagung

Die Autoren danken für die finanzielle Zuwendung des Leibniz-Wissenschaftscampus Phosphorforschung Rostock im Rahmen der Anschubprojekte der 2. Förderphase. Wir danken Angela Garve und Anja Rahn für ihre exzellente technische Unterstützung.