

&

Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie  
(Prof. Dr. Peter Biberthaler)

# Identifizierung von miRNA in humanem Serum und Knochen assoziiert mit Osteoporose

Katrin Karpinski

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der  
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen  
Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Martijn van Griensven

2. Prof. Dr. Peter Biberthaler

Die Dissertation wurde am 15.10.2018 bei der Fakultät für Medizin der Technischen  
Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.06.2020  
angenommen.

***Diese Arbeit ist gewidmet meinen Omas,  
Margarete Karpinski und Urszula Bzówka.***

<b>1</b>	<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>3</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>4</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IX</b>
<b>5</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>5.1</b>	<b>Das Krankheitsbild Osteoporose.....</b>	<b>1</b>
5.1.1	Epidemiologie.....	1
5.1.2	Der Aufbau des Knochens und die Remodellierung des Knochengewebes.....	2
5.1.3	Pathogenese und Klassifikation .....	7
5.1.4	Risikofaktoren für osteoporotische Frakturen und deren Prävention .	10
5.1.5	Diagnosestellung.....	13
5.1.5.1	Bildgebende Verfahren .....	14
5.1.5.2	Laborwerte .....	18
5.1.6	Therapie .....	19
5.1.6.1	Kalzium und Vitamin D.....	20
5.1.6.2	Hormonersatztherapie und selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren .....	21
5.1.6.3	Bisphosphonate .....	23
5.1.6.4	Strontiumranelat.....	26
5.1.6.5	Peptide aus der Parathyroidhormon-Familie.....	26
5.1.6.6	Kalzitonin und Fluorid.....	27
5.1.6.7	Denosumab.....	28
<b>5.2</b>	<b>MicroRNA und deren Rolle in der Zelle.....</b>	<b>29</b>
5.2.1	Biogenese der miRNA.....	30
5.2.2	Die Funktion von miRISC .....	32
5.2.3	Extrazelluläre miRNA als Biomarker .....	33
5.2.4	Nomenklatur .....	33
<b>6</b>	<b>Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>37</b>
<b>7.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>37</b>
7.1.1	Geräte.....	37
7.1.2	Verbrauchsmaterial .....	37
7.1.3	Chemikalien.....	38
7.1.4	Nährmedien und Zusätze .....	40

# 1 | INHALTSVERZEICHNIS

7.1.5	Verwendete Kits und Zubehör .....	40
7.1.6	Software .....	41
<b>7.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>41</b>
7.2.1	Gewinnung und Einteilung von Patientenproben .....	41
7.2.2	Zellkultur humaner Osteoblasten und Osteoklasten.....	44
7.2.3	Bestimmung der Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten.....	47
7.2.4	Isolierung von miRNA aus Blutserum und reverse Transkription in cDNA	49
7.2.5	RNA-Gewinnung aus dem Knochen und reverse Transkription in cDNA	52
7.2.6	Quantitative real-time PCR zur Bestimmung regulierter miRNA .....	53
7.2.7	Validierung der regulierten miRNA.....	55
7.2.8	Identifizierung von Zielgenen der miRNAs und bioinformatische Analyse der Daten.....	56
7.2.9	Quantitative real-time PCR potentiell involvierter Gene .....	57
7.2.10	Statistik .....	57
<b>8</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>59</b>
8.1	<b>Charakterisierung von Zellen und Knochen osteoporotischer Patienten im Vergleich zum nicht-osteoporotischen Kontrollkollektiv .....</b>	<b>59</b>
8.2	<b>Identifizierung unterschiedlich exprimierter miRNAs im Serum von Patienten mit Osteoporose .....</b>	<b>60</b>
8.3	<b>Ermittlung regulierter miRNAs im Knochengewebe .....</b>	<b>63</b>
8.4	<b>Diagnostische Wertigkeit der miRNA Expressionen .....</b>	<b>66</b>
8.5	<b>Identifizierung der den miRNAs zugehörigen Gene .....</b>	<b>68</b>
8.6	<b>Zusammenspiel der identifizierten miRNAs mit Genen des Knochenstoffwechsels .....</b>	<b>70</b>
<b>9</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>72</b>
<b>10</b>	<b>Konklusion .....</b>	<b>81</b>
<b>11</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>82</b>
<b>12</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>84</b>
<b>13</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>85</b>
<b>14</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>93</b>
<b>15</b>	<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>94</b>

## 1 | INHALTSVERZEICHNIS

<b>16</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>95</b>
<b>17</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>96</b>

## 2 Abbildungsverzeichnis

<b>ABBILDUNG 1-1:</b> AUFBAU EINES RÖHRENKNOCHENS. ....	3
<b>ABBILDUNG 1-2:</b> BONE REMODELING UNIT .....	4
<b>ABBILDUNG 1-3:</b> ENDOKRINE REGULATION DER KALZIUMHOMÖOSTASE.....	5
<b>ABBILDUNG 1-4:</b> RANKL-OPG-SYSTEM .....	7
<b>ABBILDUNG 1-5:</b> ENTWICKLUNG DER KNOCHENMASSE MIT DEM ALTER.....	8
<b>ABBILDUNG 1-6:</b> TRABEKELSTRUKTUR EINES WIRBELKÖRPERS .....	9
<b>ABBILDUNG 1-7:</b> HÜFTPROTEKTOR.....	12
<b>ABBILDUNG 1-8:</b> ENTSTEHUNG DES "WITWENBUCKELS" .....	13
<b>ABBILDUNG 1-9:</b> RÖNTGENAUFNAHME EINER OSTEOPOROTISCH VERÄNDERTEN WIRBELSÄULE .....	15
<b>ABBILDUNG 1-10:</b> DEXA-MESSUNG DER HÜFTE .....	17
<b>ABBILDUNG 1-11:</b> ÖSTROGENINDUZIERTE BILDUNG VON FASL .....	22
<b>ABBILDUNG 1-12:</b> WIRKUNG NITROGENHALTIGER BISPHOSPHONATE AUF ZELLULÄRE UND BIOCHEMISCHE EBENE .....	25
<b>ABBILDUNG 1-13:</b> AUFBAU DER REIFEN EUKARYONTISCHEN MRNA.....	29
<b>ABBILDUNG 1-14:</b> MIRNA LIN-4 VON C.ELEGANS.....	30
<b>ABBILDUNG 1-15:</b> MIRNA-BIOGENESE .....	31
<b>ABBILDUNG 1-16:</b> FUNKTION VON MIRISC .....	32
<b>ABBILDUNG 2-1:</b> ISOLIERUNG DER MIRNA AUS DEN SERUMPROBEN MITTELS MIRNEASY SERUM/PLASMA KIT VON QIAGEN .....	51
<b>ABBILDUNG 2-2:</b> ABLAUFPLAN DES MIRNA-EXPRESSIONSPROFILS .....	54
<b>ABBILDUNG 3-1:</b> HÖHERE AKTIVITÄT DER OSTEOKLASTEN BEI PATIENTEN MIT OSTEOPOROSE .....	60
<b>ABBILDUNG 3-2:</b> MIRNA VARIATION IM SERUM VON PATIENTEN MIT UND OHNE OSTEOPOROSE .....	61
<b>ABBILDUNG 3-3:</b> UNTERSCHIEDLICH EXPRIMIERTER MIRNAS IM SERUM VON PATIENTEN MIT OSTEOPOROSE UND GESUNDEN KONTROLLEN OHNE OSTEOPOROSE .....	64
<b>ABBILDUNG 3-4:</b> IM KNOCHEN EXPRIMIERTER MIRNAS BEI PATIENTEN MIT OSTEOPOROSE IM VERGLEICH ZU KONTROLLEN OHNE OSTEOPOROSE .....	65

## 2 | ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>ABBILDUNG 3-5:</b> DIAGNOSTISCHE WERTIGKEIT DER IM SERUM IDENTIFIZIERTEN MIRNAS .....	67
<b>ABBILDUNG 3-6:</b> ÜBERBLICK ÜBER DIE VON MIR-93 ANGESTEUERTEN GENE .....	68
<b>ABBILDUNG 3-7:</b> DURCH MIRNA BEEINFLUSSTE GENE DES KNOCHENSTOFFWECHSELS .....	71
<b>ABBILDUNG 4-1:</b> DIE ROLLE REGULIERTER MIRNAS IN DER ENTWICKLUNG VON OSTEOBLASTEN UND OSTEOKLASTEN .....	80

### 3 Tabellenverzeichnis

<b>TABELLE 1-1:</b> GERÄTE. ....	37
<b>TABELLE 1-2:</b> VERBRAUCHSMATERIALIEN. ....	37
<b>TABELLE 1-3:</b> CHEMIKALIEN. ....	38
<b>TABELLE 1-4:</b> NÄHRMEDIEN UND ZUSÄTZE. ....	40
<b>TABELLE 1-5:</b> KITS UND ZUSATZMATERIAL. ....	40
<b>TABELLE 1-6:</b> SOFTWARE. ....	41
<b>TABELLE 1-7:</b> DEMOGRAPHISCHE DATEN DER PROBANDEN, DEREN SERUM IM ARRAY VERWENDET WURDE. ....	43
<b>TABELLE 1-8:</b> DEMOGRAPHISCHE DATEN DER PROBANDEN, DEREN SERUM IM ASSAY ZUR VALIDIERUNG VERWENDET WURDE. ....	44
<b>TABELLE 1-9:</b> DEMOGRAPHISCHE DATEN DER PROBANDEN, DEREN KNOCHEN IM ASSAY ZUR VALIDIERUNG VERWENDET WURDE. ....	44
<b>TABELLE 1-10:</b> SEQUENZEN DER VERWENDETEN PRIMER FÜR DIE OSTEOGENEN MARKER BMPR2, c-Fos, RANKL, RUNX2, OSX, PDCD4, VCAN UND B- TUBULIN ZUR UNTERSUCHUNG POTENTIELL MIRNA-ASSOZIIERTER GENE. ....	57
<b>TABELLE 2-1:</b> REGULIERTE MIRNA BEI PATIENTEN MIT OSTEOPOROSE GEGENÜBER EINER GESUNDEN KONTROLLGRUPPE OHNE OSTEOPOROSE IM MIRNA PCR ARRAY.....	62
<b>TABELLE 2-2:</b> SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT DER REGULIERTEN MIRNAS BEI OPTIMALEM GRENZWERT.....	66
<b>TABELLE 2-3:</b> FUNKTIONELLE IN SILICO ANALYSE DER REGULIERTEN MIRNAS MITTELS INGENUITY PATHWAY ASSESSMENT. ....	69

## 4 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
Abb.	Abbildung
AO	Arbeitsgemeinschaft Osteosynthese
AP	Alkalische Phosphatase
a.p.	anterior-posterior
ADP/ATP	Adenosindiphosphat/ Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Kurve)
B-CLL	B-cell chronic lymphocytic leukemia (Chronische lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ)
BMD	Bone mineral density (Knochenmineraldichte)
BMI	Body-Mass-Index
BMPR2	Bone morphogenetic protein receptor type II (knochenmorphogenetischer Proteinrezeptortyp II)
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation (Differenzierungscluster)
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNS)
CGRP	Calcitonin gene related peptide (Kalzitoningenen-verwandtes Peptid)
COL1A1	Collagen, Type I, alpha 1 (Kollagen Typ I Alpha-1)
CTX	crosslinked C-terminal telopeptide (quervernetztes C-terminales Telopeptid)
DEXA	Dual-energy X-ray absorptiometry (Dual-Röntgen-Absorptiometrie)
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region 8 (DiGeorge Syndrom kritische Region 8)
DNA (DNS)	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ECF (EZF)	Extracellular fluid (extrazelluläre Flüssigkeit)
EDTA	Ethylendiamintetraacetate (Ethylendiamintetraessigsäure)
ER- $\alpha$	Estrogenrezeptor alpha
FasL	Fas Ligand
FCS (FKS)	Fetal calf serum (fötales Kälberserum)
HA	Hydroxylapatit

IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (Internationaler Verband für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin)
IOF	International Osteoporosis Foundation (Internationale Osteoporose Stiftung)
ISCD	International Society for Clinical Densitometry (Internationale Gesellschaft für klinische Densitometrie)
IU	International Unit (Internationale Einheit)
KI	Konfidenzintervall
LPAAT $\beta$	Lysophosphatidic acid acetyltransferase beta (Lysophosphatidsäure Acetyltransferase beta)
LSM	Lymphozyten-Seperationsmedium
LWS/LWK	Lendenwirbelsäule/Lendenwirbelkörper
MACS	Magnetic Cell Separation (magnetische Zellseparation)
MAFB	Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (muskuloaponeurotisches Fibrosarkom Onkogen Homolog B)
M-CSF	Monocyte colony-stimulating factor (Monozytenkolonien-stimulierender Faktor)
MEM	Minimum essential medium (minimal-essentielles Medium)
miRNA/miR	microRNA (mikro-RNA)
miRISC	miRNA-induced silencing complex (miRNA-induzierter Stilllegungskomplex)
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
NFATc	Nuclear factor of activated T-cells (nuklearer Faktor aktivierter T-Zellen)
NOF	National Osteoporosis Foundation (Nationale Osteoporose Stiftung)
OC	Osteocalcin (Osteokalzin)
ON	Osteonektin
OP	Osteopontin
OPG	Osteoprotegerin
OSX	Osterix
PBM	Peak bone mass (maximale Knochendichte)
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell (mononukleäre Zelle des peripheren Blutes)
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)

#### 4 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PCO	Polycystic ovary syndrome (Polyzystisches Ovar-Syndrom)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDCD4	Programmed cell death 4 (programmierter Zelltod 4)
PINP	Procollagen type I N-terminal propeptide (Prokollagen Typ I N-terminales Propeptid)
PIWI	P-element induced wimpy testis (P-Element induzierter verkümmerter Hoden)
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
pri-/pre-miRNA	primary / precursor miRNA (primäre / Vorläufer-miRNA)
PTH	Parathormon
PTHrP	parathyroid hormone-related protein (Parathormon-ähnliches Protein)
qCT	quantitative Computertomographie
qPCR	quantitative PCR
RANK/RANKL	Receptor activator of Nuclear Factor kappa B / -Ligand (Rezeptor Aktivator des Nuklearfaktor-kappa-B / -Ligand)
rhPTH	recombinant human parathyroid hormone (rekombinantes humanes Parathormon)
RNA (RNS)	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
ROC-Kurve	Receiver operating characteristic (Grenzwertoptimierungs-) Kurve
RT	Raumtemperatur
RUNX2	Runt-related transcription factor 2 (Runt-verwandter Transkriptionsfaktor 2)
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SERM	Selektiver Estrogenrezeptormodulator
SRB	Sulforhodamin B
TEP	Totalendoprothese
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor beta (transformierender Wachstumsfaktor beta)
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAP	Tartrate-resistant acid phosphatase (tartratresistente saure Phosphatase)

#### 4 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UTR	untranslated region (untranslatierter Bereich)
UV	ultraviolett
VCAN	Versican
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

---

## 5 Einleitung

### 5.1 Das Krankheitsbild Osteoporose

#### 5.1.1 Epidemiologie

Das Wort Osteoporose setzt sich zusammen aus den griechischen Worten *osteon* für Knochen und *poros* für Pore (Johnell and Hertzman 2006). Dies ist bezeichnend für jene systemische Skeletterkrankung, welche die Masse, Stärke und Mikroarchitektur des Knochens betrifft und in Fragilitätsfrakturen resultiert (Rachner et al. 2011).

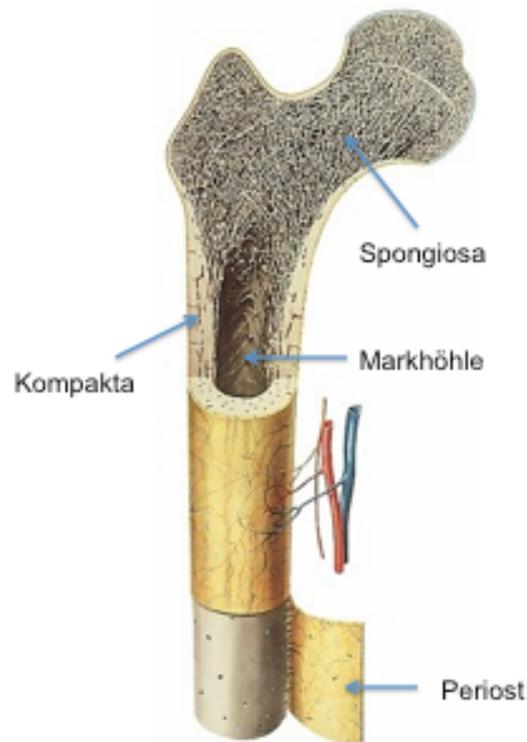
Neben Herz-Kreislauf-Problemen, Bluthochdruck, Schlaganfällen und Diabetes mellitus ist Osteoporose eines der zehn bedeutendsten Krankheitsbilder unserer Gesellschaft. Laut Schätzungen leidet eine von drei Frauen und einer von acht Männern an Osteoporose. Dies bedeutet, dass bis dato 200 Millionen Menschen weltweit von dem Krankheitsbild betroffen sind. Dabei stellen vor allem die damit verbundenen Frakturen ein Problem dar (Bartl and Frisch 2009). Allein in der EU sind jährlich 650.000 Frakturen der Osteoporose zuzuschreiben, was ungefähr 1780 Brüchen am Tag entspricht (Johnell and Hertzman 2006). Typische Lokalisationen für Osteoporose-bedingte Brüche sind der distale Radius, die Wirbelsäule und das proximale Femur. Dabei geht insbesondere die Schenkelhalsfraktur mit einer erhöhten Mortalität einher. Zum Vergleich: Das Risiko für eine Frau, an einer Schenkelhalsfraktur zu sterben, entspricht mit 2,8% dem Risiko, an Brustkrebs zu sterben. Das Mortalitätsrisiko ist nicht nur aufgrund von etwaigen postoperativen Komplikationen nach chirurgischer Versorgung der Fraktur erhöht, sondern auch aufgrund möglicher Komorbiditäten, wie z.B. kardiovaskulären Erkrankungen, einem Schlaganfall oder chronischen Lungenproblemen. Die Hälfte der Patienten erreicht nach einer Fraktur nicht mehr die Mobilität und Unabhängigkeit, die sie vor dem Ereignis hatten (Bartl and Frisch 2009). Somit kann Osteoporose maßgeblich die Lebensqualität beeinträchtigen (Rachner et al. 2011). Bis zum Jahr 2025 wird laut WHO die Invalidität aufgrund von Hüftfrakturen bei 2,6 Millionen Menschen weltweit liegen mit jährlich 700.000 Toten. Auch müssen die mit Therapie und Rehabilitation einer osteoporotisch bedingten Fraktur verbundenen Kosten bedacht werden, die

sich in einigen Ländern für die Behandlung der Schenkelhalsfraktur im ersten Jahr auf umgerechnet geschätzte 22.000€ belaufen (Johnell and Hertzman 2006). Besonders aufgrund der demographischen Alterung der Bevölkerung stellt Osteoporose eine medizinische und sozioökonomische Herausforderung dar (Rachner et al. 2011).

### **5.1.2 Der Aufbau des Knochens und die Remodellierung des Knochengewebes**

Zu den wichtigsten Aufgaben unserer Knochen gehören die Stützfunktion und die Beteiligung an der Fortbewegung, der Schutz innerer Organe sowie des zentralen Nervensystems und die Funktion als Mineraldepot für Kalzium, Phosphat und Magnesium. Knochen bestehen aus der peripheren Kompakta und der im Inneren aus Trabekeln aufgebauten Spongiosa, welche gemeinsam für die Druck-, Zug-, Biege- und Verdrehungsfestigkeit des Knochens verantwortlich sind (Aumüller 2007) (Abbildung 5-1, S.3).

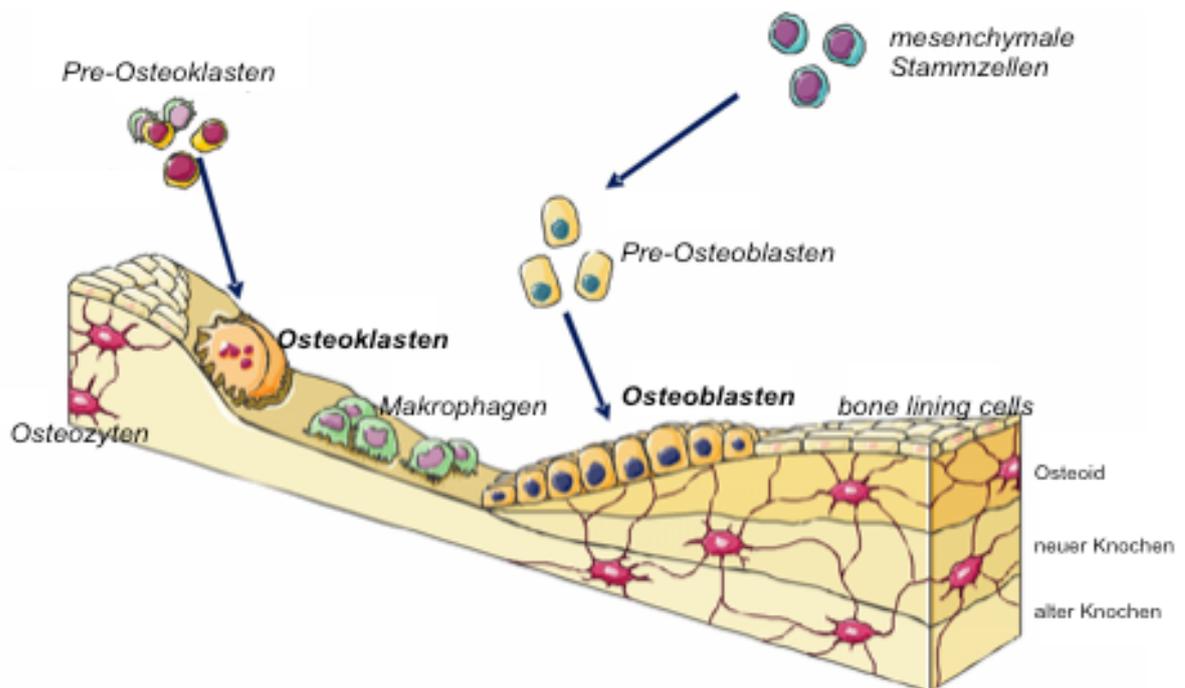
Unser Knochengewebe unterliegt einem ständigen Umbau, welcher es dem Knochen erlaubt, sich äußeren Umständen adäquat anzupassen. Altes oder geschädigtes Knochenmaterial wird kontinuierlich ersetzt. Des Weiteren dient der stetige Umbau der Gewinnung von Kalzium für unseren Körper. Unsere Knochen dienen mit einem Gesamtgehalt von 99% als Hauptspeicher für Kalzium. Für die Remodellierung verantwortlich sind zwei Arten von Zellen: die Osteoklasten und die Osteoblasten. Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, die über die Zwischenstufe der Monozyten aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark hervorgehen. Sie sind durch proteolytische Enzyme und der Fähigkeit zur Phagozytose für die Knochenresorption zuständig. Osteoblasten gehen aus mesenchymalen Stammzellen hervor. Sie dienen dem Wiederaufbau neuer Knochenmatrix durch Sekretion noch nicht mineralisierter Knochensubstanz. In der Ruhephase werden sie durch ihre flache Form auch "bone-lining-cells" genannt. Osteoblasten werden zu Osteozyten, indem sie von der neu gebildeten und noch unreifen Knochenmatrix, dem Osteoid, umschlossen werden. Sie bestimmen unsere Knochenmasse.



**Abbildung 5-1:** *Aufbau eines Röhrenknochens.* Dieser besteht aus Substantia compacta (Kompakta) und Substantia spongiosa (Spongiosa) sowie der Knochenhaut (Periost). Im Inneren befindet sich die Cavitas medullaris (Markhöhle) mit Fettgewebe und blutbildendem Knochenmark. (Abbildung modifiziert nach Gioe et al. 2007)

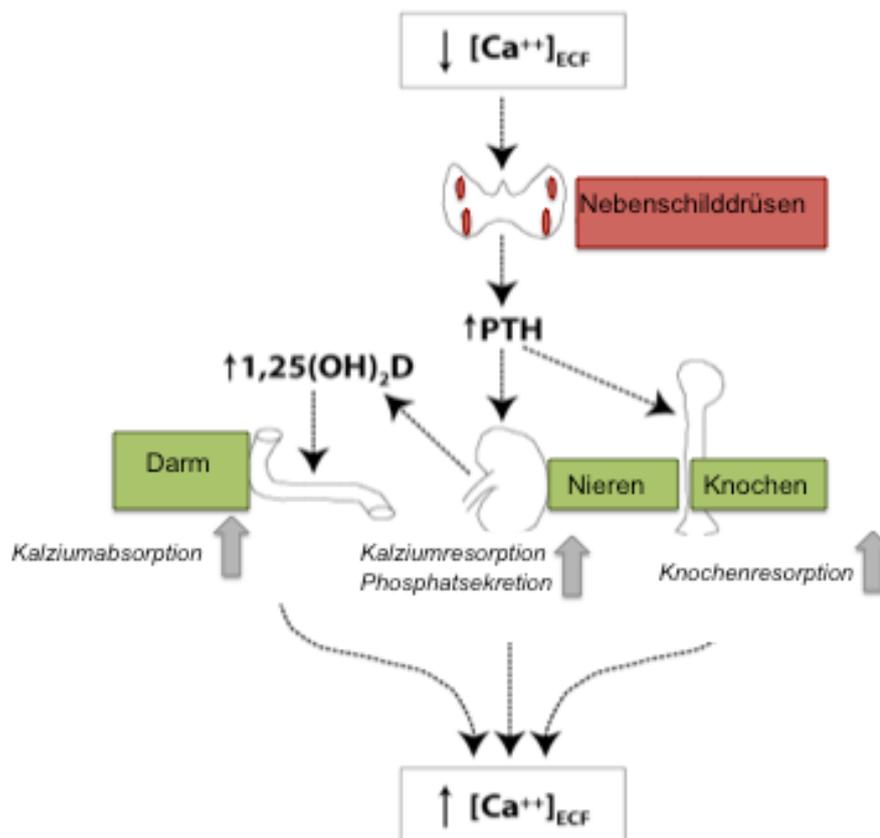
Die Knochengrundsubstanz besteht zu 35% aus organischem und zu 65% aus anorganischem Material. Die organische Matrix besitzt ungeformte Bestandteile wie Proteoglykane und Glykoproteine (Osteokalzin, Osteonektin, Osteopontin) sowie geformte wie das Kollagen Typ I. Die anorganische Matrix beinhaltet neben anderen Mineralien überwiegend das Komplexsalz Hydroxylapatit. Zusammen bilden Osteoklasten und Osteoblasten die sogenannte "bone remodelling unit" (Abbildung 5-2, S.4). Ein ausgereifter Osteoklast resorbiert etwa zehnmal mehr Knochen substanz als von einem Osteoblasten sezerniert wird. Dies macht deutlich, dass für ein Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau mehr Osteoblasten vorhanden sein müssen (Aumüller et al. 2007). Das menschliche Skelett setzt sich aus zwei bis fünf Millionen dieser "bone remodelling units" zusammen. Diese sind für

die Aufrechterhaltung des Skeletts notwendig und spielen somit auch eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Osteoporose. Ein Umbauzyklus braucht ungefähr 120 Tage, wovon die Resorption nur zwei Wochen andauert und die Mineralisation mehrere Monate in Anspruch nimmt. So werden ca. 8% des Skeletts jährlich erneuert. Als eine logische Konsequenz schwindet die Knochenmasse, wenn auf Dauer mehr Knochen resorbiert als produziert wird. Dies resultiert entweder aus einer erhöhten Aktivität der Osteoklasten ("high turnover"), einer verminderten Aktivität der Osteoblasten ("low turnover") oder einer Kombination beider Phänomene (sogenannter atrophischer Knochen). Eine massive Knochenresorption kann durch die erhöhte Konzentration von Kalzium und Kollagenmetaboliten im Urin nachgewiesen werden (Bartl and Frisch 2009).



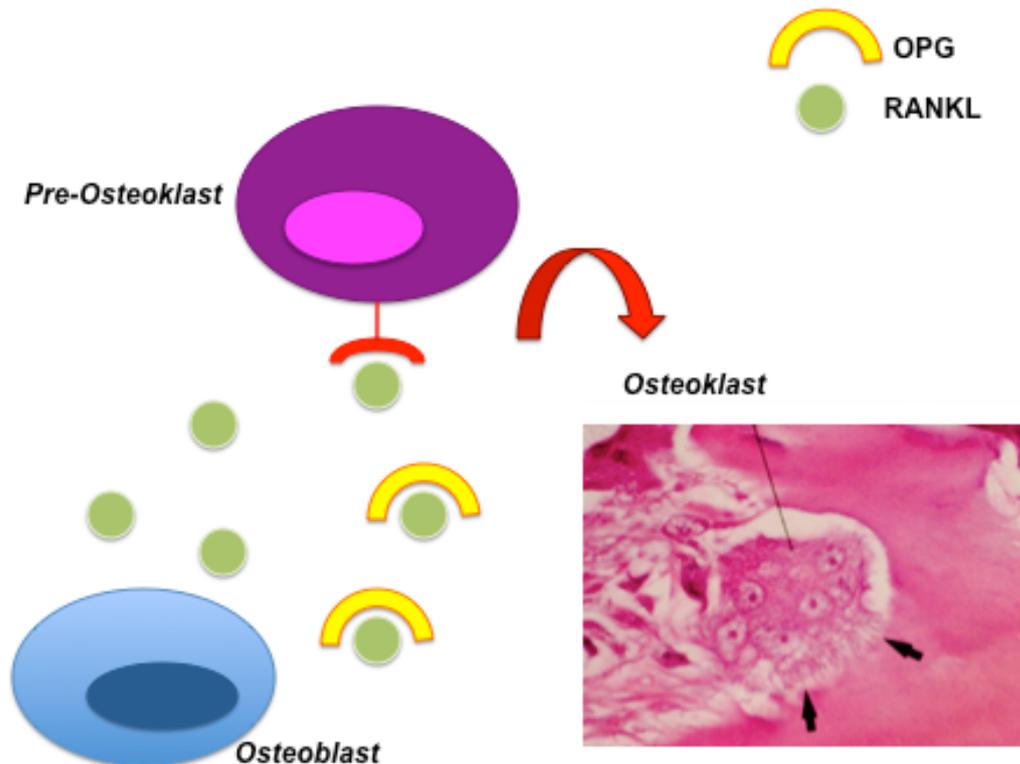
**Abbildung 5-2:** Bone remodeling unit. Bestehend aus Osteoklasten, welche aus Monozyten (Pre-Osteoklasten) hervorgehen und für die Knochenresorption zuständig sind, sowie Osteoblasten, welche aus mesenchymalen Stammzellen entstehen und durch Bildung von Osteoid, der noch nicht mineralisierten Knochenmatrix, dem Knochenaufbau dienen. In Ruhe werden Osteoblasten durch ihr flache Form auch als bone lining cells bezeichnet, durch Osteoid umschlossen werden sie zu Osteozyten. (Abbildung modifiziert nach Stępien 2011)

Diverse Mechanismen sorgen für die Balance zwischen Knochenauf- und -abbau und somit den Erhalt der Knochenmasse. Hierzu zählen hauptsächlich zirkulierende Hormone, lokale Zytokine sowie Vitamine und Mineralien. Außerdem unentbehrlich für die Remodellierung des Knochens ist eine mechanische Beanspruchung. Auch die genetische Regulierung spielt eine wichtige Rolle, z.B. durch den Transkriptionsfaktor Osterix (OSX), welcher für die Differenzierung von Osteoblasten verantwortlich ist. Bei den Hormonen spielt v.a. das Parathormon (PTH) eine Schlüsselrolle im Rahmen der Kalziumhomöostase (Bartl and Frisch 2009) (Abbildung 5-3, S.5).



**Abbildung 5-3:** Endokrine Regulation der Kalziumhomöostase. Durch niedrige Kalziumspiegel in der Extrazellulärflüssigkeit (ECF) kommt es zu einer gesteigerten PTH-Ausschüttung aus den Nebenschilddrüsen. Dies führt zu Knochenabbau durch Osteoklasten und somit zur Gewinnung von Kalzium sowie zu einer gesteigerten renalen Kalziumrückresorption. Des Weiteren fördert PTH die Bildung von Calcitriol ( $1,25(OH)_2$  Vitamin D3) in der Niere, welches wiederum die Kalziumresorption im Darm erhöht. (Abbildung modifiziert nach University of Washington 2013)

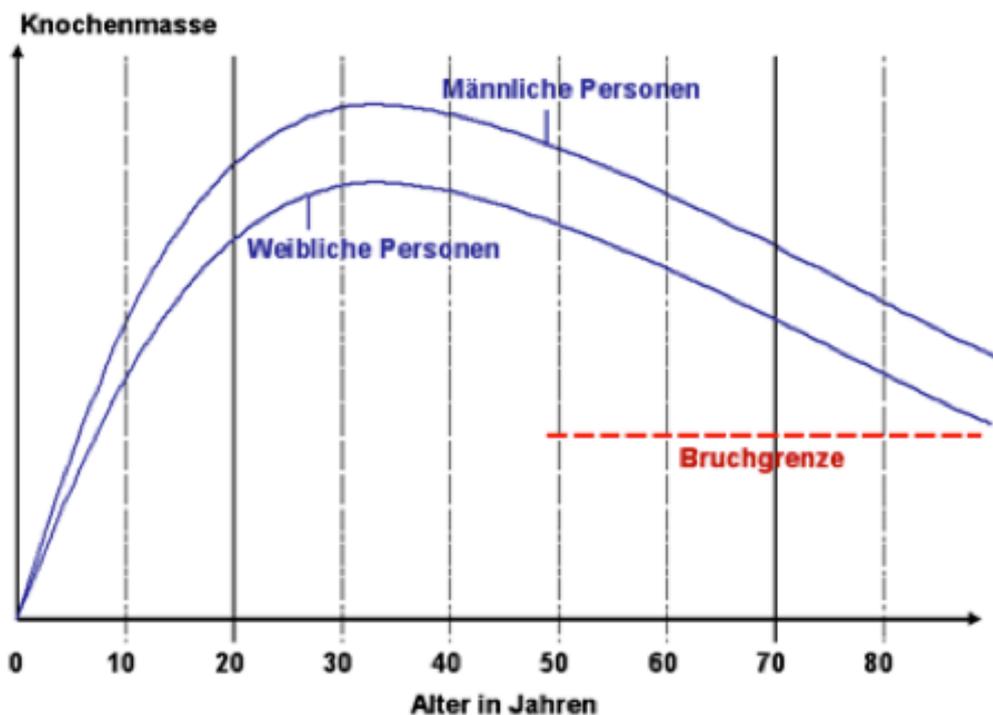
Eine substantielle Rolle im Rahmen des Knochenaufbaus übernehmen außerdem die Androgene, welche sowohl bei Männern als auch bei Frauen die Knochenmineraldichte (bone mineral density, kurz BMD) steigern können. Zu den bedeutendsten Zytokinen gehört das RANK/RANKL/Osteoprotegerin-System (Abbildung 5-4, S.7). Der Rezeptor-Aktivator des NF- $\kappa$ B-Liganden (RANKL), der von Zellen im Knochenmark, Osteoblasten sowie T- und B-Lymphozyten produziert wird und zur Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF) gehört, fördert durch seine Bindung an den RANK-Rezeptor am Osteoklasten bzw. an Vorläuferzellen deren Differenzierung, Proliferation, Aktivierung und Überleben. Somit induziert RANKL die Knochenresorption. Der außerdem von Osteoblasten sezernierte TNF-Rezeptor Osteoprotegerin (OPG) gilt als natürlicher Antagonist von RANKL (Bartl and Frisch 2009, Rachner et al. 2011). Er hemmt die Differenzierung von Osteoklasten aus ihren Vorläuferzellen, indem es den TNF-Faktor RANKL als eine Art Fangrezeptor bindet (Raisz 2005, Bartl and Frisch 2009). Dass Östrogen die Bildung von RANKL hemmt erklärt u.a. das Vorkommen von erhöhter Knochenresorption bei postmenopausalen Frauen, deren Östrogenspiegel erniedrigt sind (Legiran and Brandi 2012).



**Abbildung 5-4:** RANKL-OPG-System. Bindung des Tumornekrosefaktors RANKL an den RANK-Rezeptor (rot) führt zur Differenzierung zum reifen Osteoklasten und damit zur Knochenresorption. OPG fungiert als Fangrezeptor als natürlicher Antagonist von RANKL. (Abbildung modifiziert nach Faculty of Biological Sciences, University of Leeds 2013)

### 5.1.3 Pathogenese und Klassifikation

Eine erhöhte Fragilität des Knochens kann mehrere Ursachen haben. Entweder eine ausreichende Skelettmasse und -stärke während der Wachstumsphase wird nicht erreicht oder es handelt sich um massive Knochenresorption bzw. ungenügende Knochenbildung im Rahmen des Knochenumbaus (Raisz 2005). Die maximale Knochendichte, auch "peak bone mass" (PBM) genannt, erreichen wir im Alter zwischen 25 und 30 Jahren. Danach schwindet die Knochenmasse kontinuierlich unabhängig vom Geschlecht um ungefähr 1% pro Jahr (Bartl and Frisch 2009) (Abbildung 5-5, S.8).

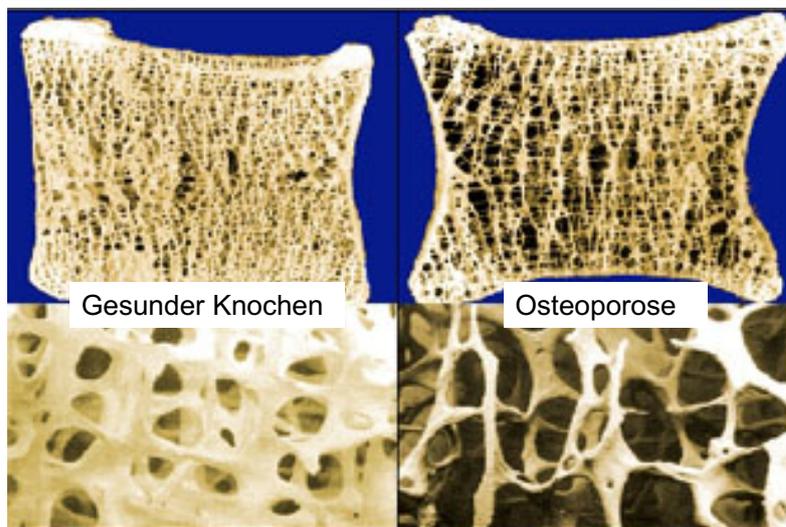


**Abbildung 5-5:** Entwicklung der Knochenmasse mit dem Alter. Die maximale Knochendichte erreichen wir im Alter zwischen 25 und 30 Jahren, danach kommt es zu einem stetigen Rückgang der Knochenmasse um ca. 1% pro Jahr. (Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz 2013)

Die relativ erhöhte Knochenresorption resultiert aus einem niedriger werdenden Spiegel der Steroidhormone. Dabei spielt vor allem das Östrogen eine Rolle, welches unter normalen Umständen die Differenzierung der Osteoblasten fördert und die der Adipozyten hemmt. Ein verminderter Serumspiegel erklärt somit eine relativ erhöhte Anzahl an Adipozyten, die sich auch am Knochen bemerkbar macht (Bartl and Frisch 2009). Bei Frauen in der Menopause mit erniedrigten Östrogenspiegeln wurden als Resultat eines gesteigerten Knochenstoffwechsels erhöhte Marker sowohl für Knochenresorption als auch Knochenbildung gefunden. In diesem Fall scheint eine relativ erhöhte Resorption die Ursache für den Knochenschwund zu sein (Raisz 2005).

Die Knochendichte ist mit einem Anteil von 60-90% verantwortlich für die Stärke des Knochens. Das bedeutet, je dichter der Knochen ist, desto besser ist der Schutz vor Frakturen. Hierbei ist insbesondere die Mikroarchitektur des Knochens von

entscheidender Bedeutung. Da die Knochenresorption zuerst die Trabekelstruktur angreift, entstehen Brüche in erster Linie an Knochen mit einem relativ hohen Anteil an Spongiosa. Dazu gehören die Wirbelkörper, der Femurkopf, der Humeruskopf, die Rippen, der distale Radius und die Ferse (Abbildung 5-6, S.9). Eine solche pathologische Fraktur ist definiert als Fraktur ohne adäquates Trauma und demzufolge durch einen vorgeschädigten Knochen verursacht. Bei Patienten mit Osteoporose entstehen diese Fragilitätsfrakturen als Resultat einer Summe von mehreren Mikrofrakturen im Trabekelwerk (Bartl and Frisch 2009).



**Abbildung 5-6:** Trabekelstruktur eines Wirbelkörpers. Links gesunder Knochen mit dichter Spongiosa, rechts osteoporotisch veränderter Knochen mit rarefiziertem Trabekelwerk. (Abbildung modifiziert nach Orthopädie am Fürstenhof 2013)

Bei der Osteoporose wird zwischen zwei Typen unterschieden. Die primäre Osteoporose tritt im Rahmen des normalen Alterungsprozesses auf. Die sekundäre Form resultiert aus einer anderen Grunderkrankung. Hierzu zählen u.a. endokrinologische Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ I, entzündliche Erkrankungen wie die rheumatoide Arthritis oder mit Malabsorption des Darms

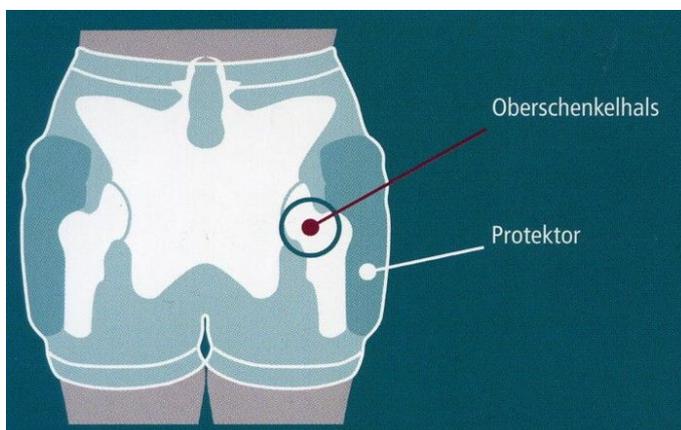
einhergehende Pathologien (Ruchholtz and Wirtz 2012). Eine weitere Art der Einteilung kann in Osteoporose Typ I, welche postmenopausal entsteht, und den altersabhängigen Typ II erfolgen. Typ I ist der am häufigsten vorkommende und wird in erster Linie bei Frauen im Alter zwischen 51 und 75 Jahren aufgrund verminderter Funktion der Ovarien und somit erniedrigten Östrogenspiegeln diagnostiziert. 30% aller Frauen entwickeln nach der Menopause Osteoporose. Betroffen von Frakturen sind bei diesen Patientinnen hauptsächlich die Wirbelkörper und der distale Radius. Der Typ II findet sich erst jenseits des 70. Lebensjahres und dabei doppelt so häufig bei Frauen (Bartl and Frisch 2009).

### **5.1.4 Risikofaktoren für osteoporotische Frakturen und deren Prävention**

Bei jährlichen "Check-ups" werden zwar wichtige Kenngrößen wie Blutdruck, Blutfettwerte und ähnliche Laborparameter bestimmt, ihre Knochendichte kennen jedoch die wenigsten Patienten. Da anderen Morbiditäten wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder Krebs in erster Linie mehr Aufmerksamkeit geschenkt wird und der Verlust an Knochensubstanz ein asymptomatischer Prozess ist, wird Osteoporose oft erst nach einer schmerzhaften Fraktur diagnostiziert (Rachner et al. 2011). Dies passiert meist als Folge eines Sturzes. Dabei ist zu beachten, dass ein Drittel aller über 65-jährigen mindestens einmal im Jahr stürzt. Davon ziehen sich 6% aller über 75-jährigen eine Fraktur zu. Da die PBM und der spätere Verlust an Knochenmasse genetisch determiniert sind (vgl. 5.1.3, S.7), hat der Mensch selbst keinen Einfluss auf diese Faktoren. Auch eine frühe Menopause gehört dazu sowie die natürliche Abnahme der Aktivität der Osteoblasten im Alter. Eine andere Determinante, welche die Patienten jedoch selbst beeinflussen können, ist eine lebenslange ausreichende Kalziumzufuhr. Für die Prävention als auch Therapie ist es das wichtigste Mineral bei Osteoporose. Durch die tägliche Einnahme über die Nahrung oder als Supplement kann verhindert werden, dass sich der Körper benötigtes Kalzium durch Ausscheidung von PTH aus dem Knochen holt (vgl. Abbildung 5-3, S.5). Zwischen dem 19. und dem 50. Lebensjahr sollte die Menge an täglich zugeführtem Kalzium bei ca. 1200 mg liegen, danach sogar bei 1500 mg. Diese Menge kann im Rahmen einer normalen Ernährung hauptsächlich durch Milch

und Milchprodukte, grünes Gemüse, Früchte, Weizenprodukte, Mineralwasser und Fruchtsäfte zugeführt werden. Produkte, die Kalzium für ihren Metabolismus, ihre Neutralisation und Ausscheidung benötigen, sollten gemieden werden. Dazu gehören Alkohol, Koffein, Zucker, Salz, Phosphat, Fette und Säuren. Außerdem sollte auf zu viele Proteine aufgrund der Säuren, die bei ihrem Abbau entstehen, verzichtet werden. Auch die Bedeutung der Vitamin D-Zufuhr darf nicht unterschätzt werden, da diese die Resorption von Kalzium und Phosphat im Darm fördert und zusätzlich die Reifung und Mineralisierung des Osteoids anregt. Es wird eine tägliche Menge von 400-800 IU empfohlen (Bartl and Frisch 2009). Auch eine zu geringe Sonnenlichtexposition kann als Risikofaktor für Frakturen angesehen werden, da ohne UV-Strahlung Vitamin D nicht in seiner aktiven Form wirksam werden kann (Johnell and Hertzman 2006). Sowohl Kalzium- als auch Vitamin D-Mangel können in einem sekundären Hyperparathyreoidismus resultieren (Raisz 2005). Weitere Risikofaktoren für die Entwicklung der Osteoporose sind Komorbiditäten und die damit verbundene Einnahme von Medikamenten, allen voran die Einnahme von Glukokortikoiden. Auch ein niedriger Body-Mass-Index (BMI) korreliert mit einer geringeren Knochendichte und ist somit ein positiver Prädiktor für das Risiko, eine Fraktur zu erleiden. Dies gilt insbesondere für Frauen im Alter zwischen 40 und 59 Jahren. Ihnen sollte von exzessivem Sport und damit verbundenem geringem Körpergewicht abgeraten werden, da dieses den Östrogenspiegel noch weiter sinken lässt. Andererseits korreliert zwar ein hoher BMI mit einer hohen Knochendichte, mit einer Adipositas steigt allerdings auch wiederum das Risiko für Komorbiditäten und Vitaminmangel, welche ihrerseits wieder zu Osteoporose führen können. Neben dem richtigen Körpergewicht sollte auch regelmäßige körperliche Aktivität angestrebt werden. Dies fördert eine gesunde aufrechte Körperhaltung im Alltag und Wirbelsäule sowie Hüfte können vor Fehlbelastung geschützt werden. Außerdem werden dadurch Muskeln und Gelenke gestärkt. Sport hat des Weiteren einen positiven Effekt auf das Körpergleichgewicht, was vor Stürzen schützt, und kann langen postoperativen Phasen der Immobilität vorbeugen. Einen der großen Risikofaktoren für die Entwicklung von Osteoporose stellt ferner das Rauchen dar. Man schätzt, dass Rauchen das Lebenszeitrisko für eine osteoporotisch bedingte vertebrale Fraktur bei Frauen um 13% und Männern sogar um 32% erhöht. 10-20% aller Schenkelhals- bzw. pertrochantären Frakturen bei Frauen mit Osteoporose sind demnach dem Rauchen zuzuschreiben. Es lohnt

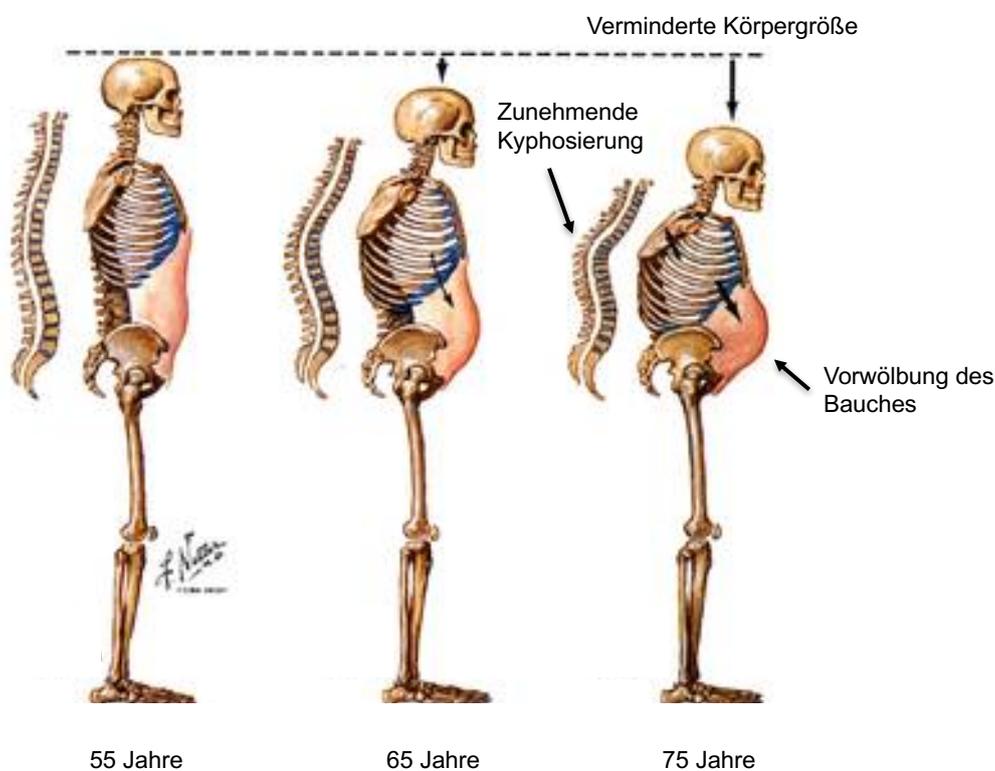
sich im Hinblick auf die Knochengesundheit, jederzeit mit dem Rauchen aufzuhören, da bezüglich der Knochendichte zwischen ehemaligen Rauchern und Menschen, die nie geraucht haben, kein Unterschied festgestellt werden konnte. Abstinenz vom Rauchen reduziert das Osteoporoserisiko um bis zu 50%. Ein Risikofaktor, der oft mit dem Rauchen in Verbindung steht, ist des Weiteren der Alkoholkonsum. Insbesondere der exzessive Alkoholabusus, der oft mit schlechter Ernährung, einer geringen Kalziumaufnahme und verminderten Östrogenspiegeln einhergeht, erhöht die Gefahr, eine osteoporotische Fraktur zu erleiden. Gefährdet sind auch Menschen mit länger andauernden Depressionen. Der negative Einfluss auf die Knochendichte scheint mit der dazugehörigen Medikation, inadäquater Ernährung und Alkoholabusus, verminderter physikalischer Aktivität sowie einem hohen Stresshormon- bzw. niedrigem gonadalem Steroidhormonlevel zusammenzuhängen. Ohne den genauen Pathomechanismus zu kennen verdoppelt sich das Risiko für eine osteoporotische Fraktur auch bei einem bereits vorausgegangenem Bruch (Bartl and Frisch 2009). So gilt es als einen der Hauptrisikofaktoren für Frakturen die Gefahr des Sturzes auszuschalten. Gründe hierfür können beim alten Menschen neben Muskelschwäche, eingeschränkter Mobilität und Medikamenten auch Schwindel und Gleichgewichtsstörungen sowie eingeschränktes Sehvermögen sein. Neben der Behandlung der Ursachen für einen Sturz können zusätzlich Hüftprotektoren zum Einsatz kommen (Johnell and Hertzman 2006) (Abbildung 5-7, S.12).



**Abbildung 5-7:** Hüftprotector (mit freundlicher Unterstützung der suprema GmbH)

### 5.1.5 Diagnosestellung

Zur Anamnese und klinischen Untersuchung bei Verdacht auf Osteoporose gehören die Frage nach Größenminderung, Schmerzen beim Abklopfen der Processus spinosi sowie die Testung der Beweglichkeit der Wirbelsäule. Bei der Inspektion sollte auf eine thorakale Kyphose oder Skoliose im Lumbalbereich geachtet werden (Abbildung 5-8, S.13).



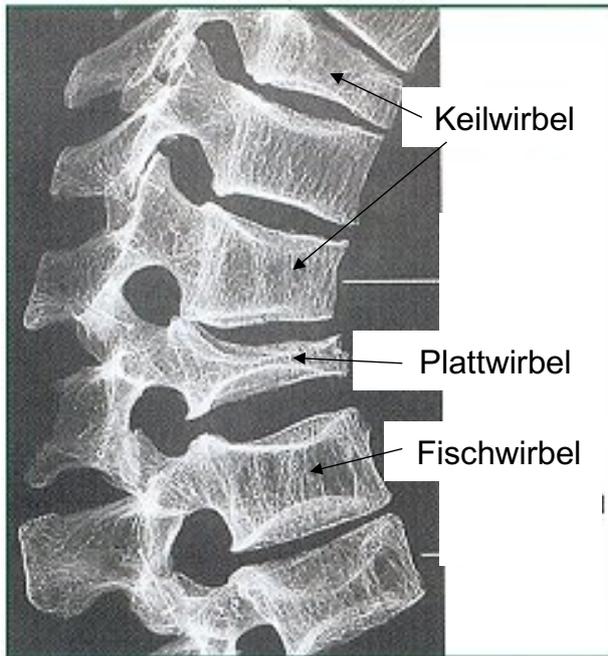
**Abbildung 5-8:** Entstehung des "Witwenbuckels". Zunehmende Kyphosierung der thorakalen Wirbelsäule durch Zusammenbruch der Wirbelkörper sowie eine Minderung der Körpergröße. Links im Alter von 55 Jahren, rechts mit 75 Jahren. Außerdem zu erkennen ist die typische Vorwölbung des Bauches durch die starke Kyphosierung. (Abbildung modifiziert nach Netter 2006)

Als Differentialdiagnose zum Rückenschmerz müssen immer Geschehen inflammatorischen, degenerativen, myelogenen oder neoplastischen Ursprungs ausgeschlossen werden. Chronische Schmerzen im Bereich der Wirbelsäule können

auch viszeral, neurogen, muskulär oder psychosomatisch bedingt sein. Bei einem akuten Schmerzgeschehen muss immer an eine Fraktur durch Kollaps eines Wirbelkörpers gedacht werden (Bartl and Frisch 2009). Auch validierte Fragebögen können für ein Osteoporosescreeing zum Einsatz kommen, um Risikopatienten weiteren diagnostischen Maßnahmen zu unterziehen (Johnell and Hertzman 2006).

#### **5.1.5.1 Bildgebende Verfahren**

Da bei Osteoporose der Knochen in erster Linie quantitativ verringert ist, eignen sich radiologische Techniken zur Diagnosestellung. Konventionelles Röntgen diagnostiziert einen Knochenverlust erst ab einer Reduktion der Knochensubstanz von mindestens 30% und ist somit für eine Früherkennung der Osteoporose nicht geeignet. Bei Betrachtung der Röntgenbilder achtet man in erster Linie auf eine verschmälerte Kortikalis und verminderte Zeichnung der Trabekelstruktur. Diese fällt vor allem periartikulär auf, da die Kortikalis hier natürlicherweise dünner ist. Im Bereich der Wirbelsäule wird anfangs oft das Phänomen der "leeren Schachtel" vorgefunden, welches durch die relative Dichtezunahme der Wirbelabschlussplatten im Vergleich zur rarefizierten Spongiosa entsteht. In einem späteren Stadium finden sich dann sogenannte Fischwirbel, die durch Druck der Bandscheiben auf die geschwächten Wirbelkörper entstehen (Abbildung 5-9, S.15). Durch Bildung von Keilwirbeln entwickelt sich die typische Kyphose (vgl. Abbildung 5-8, S.13). Auch vorausgegangene Frakturen können durch ein Röntgenbild aufgedeckt werden (Greenspan 2007).

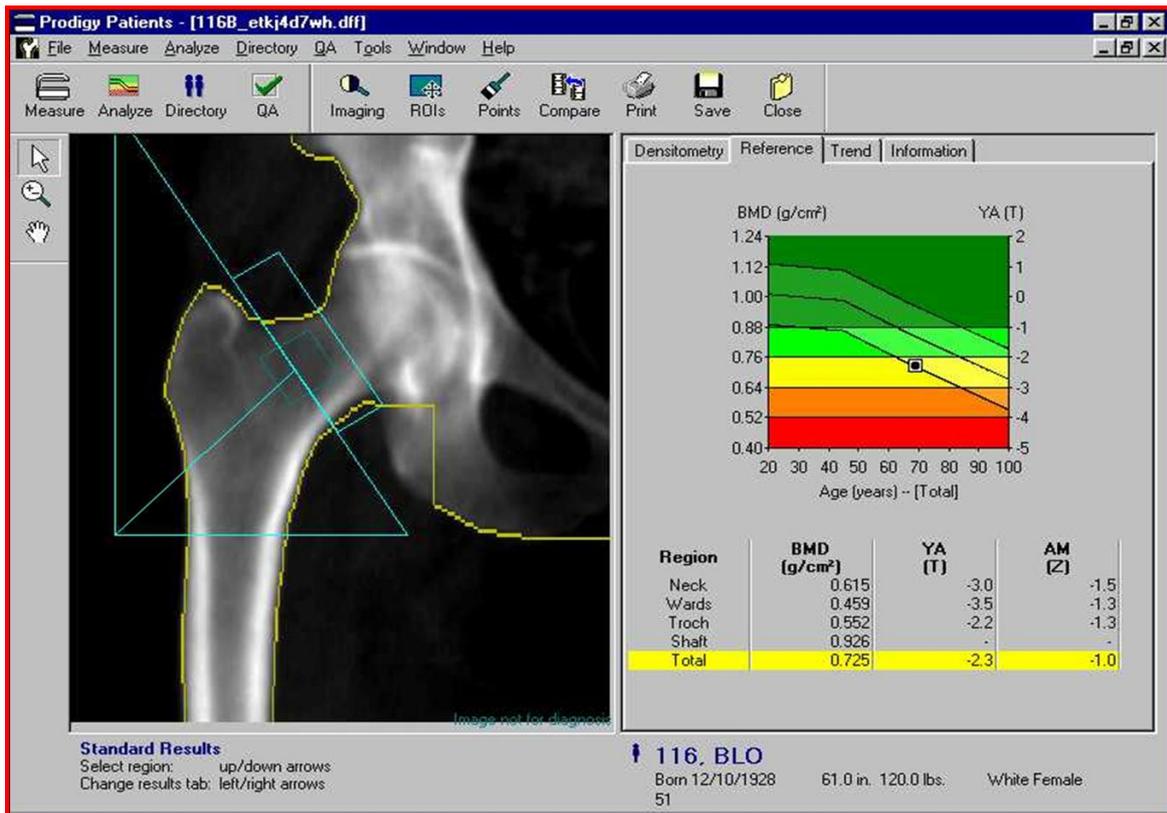


**Abbildung 5-9:** Röntgenaufnahme einer osteoporotisch veränderten Wirbelsäule. Entstehung von sogenannten Fisch-, Keil- und Plattwirbeln durch Zusammenbruch des Trabekelwerks. (Abbildung modifiziert nach Diagnostik- und Therapiezentrum München 2013)

Die beste Methode für die frühe Diagnose der Osteoporose ist die Knochendichtemessung. Diese Art der Früherkennung erlangt besondere Bedeutung, wenn man bedenkt, dass sich bereits ab einer Knochendichteabnahme von 10% das Wirbelkörperfrakturrisiko verdoppelt und das Risiko für eine Schenkelhalsfraktur sogar verdreifacht. Neben dem Frakturrisiko kann auch der Therapieerfolg durch Knochendichtemessung evaluiert werden. Die Knochendichte wird in  $\text{g/cm}^2$  für eine Fläche bzw. in  $\text{g/cm}^3$  für ein Volumen angegeben. Für die Messung stehen verschiedene Methoden zur Verfügung.

Die Messung mittels DEXA (dual energy X-ray absorptiometry) ist die bisher zuverlässigste Methode der Knochendichtebestimmung. Durch seine Kosteneffektivität ist die DEXA-Messung der Goldstandard in der gängigen Praxis. Es kann theoretisch zur Knochendichtemessung des gesamten Skeletts herangezogen werden. Das zu vermessende Körperareal wird zwei Röntgenstrahlen mit unterschiedlichen Energieniveaus ausgesetzt, wodurch die durch den Weichteilmantel absorbierte Röntgenstrahlung herausgerechnet werden kann und

nur die Durchlässigkeit des Knochens beurteilt wird. Durch die Intensität der nicht absorbierten Strahlung ermittelt ein Computerprogramm die Knochendichte. Das Resultat wird in Form einer Standardabweichung (SD) als T-Score bzw. Z-Score festgelegt. Die Standardabweichung als Einheit soll einen Vergleich mit der normalen Knochendichteverteilung in der Bevölkerung ermöglichen. Der Bereich zwischen der 5. und 95. Perzentile gleicht vier Standardabweichungen, eine SD entspricht 10-15% Abweichung zum Mittelwert. Der T-Score entspricht der Anzahl der Standardabweichungen in Bezug auf ein junges Patientenkollektiv gleichen Geschlechts im Alter zwischen 25 und 30 Jahren, in der man die PBM annimmt (vgl. 5.1.3, S.7). Der Z-Score hingegen vergleicht Werte von Menschen desselben Alters, Geschlechts und Volkszugehörigkeit. Laut Definition spricht man von Osteoporose ab einem T-Score von  $-2.5$  SD. Ein Wert ab  $-1.0$  SD entspricht der Vorstufe Osteopenie. Es werden vorrangig die Hüfte und Lendenwirbelsäule von frontal (a.p.) und lateral gemessen (Abbildung 5-10, S.17). Dabei ist bei der Dichtemessung der Wirbelkörper zu beachten, dass hier auch die Wirbelbögen und die Processus spinosi mitgemessen werden, die vorzugsweise aus Kompakta bestehen und somit eine höhere Dichte aufweisen. Laut Empfehlung der ISCD, der internationalen Gesellschaft für klinische Densitometrie (International Society for Clinical Densitometry), sollte die Messung daher an mindestens zwei Stellen vorgenommen und der niedrigste T-Score evaluiert werden. Für die Diagnose Osteoporose sollte idealerweise die Messung des T-Scores der gesamten Wirbelsäule vorgenommen werden. Auch für den Patienten bringt die DEXA-Messung einige Vorteile. Die Prozedur ist nicht invasiv, nimmt nur fünf bis zehn Minuten in Anspruch und der Patient kann bekleidet bleiben. Die Strahlendosis ist mit  $1/10$ - $1/100$  einer normalen Röntgenaufnahme gering (Bartl and Frisch 2009, Cosman et al. 2014). Die Nachteile von DEXA ergeben sich durch die Planarität der Methode, wodurch die Spongiosaarchitektur nicht differenziert beurteilt werden kann, sowie der Tatsache, dass nicht nur explizit der Knochen gemessen wird, sondern das ganze bestrahlte Areal. So kann z.B. eine stark verkalkte Aorta einen falsch negativen Wert liefern oder auch der umgebende Weichteilmantel des Schenkelhalses trotz theoretischer Subtraktion den Wert verfälschen (WHO 2003).



**Abbildung 5-10:** DEXA-Messung der Hüfte. Mit einem T-Score von -2.3 befindet sich dieser Patient an der Grenze zur Osteoporose. (Everything Health 2009)

Eine weitere Methode für die Knochendichtemessung in der Praxis ist quantitative Computertomographie (qCT). Sie liefert Bilder im Querschnitt und erlaubt somit die separate Messung von Spongiosa und Kompakta sowie Volumendichteangaben in  $\text{mg}/\text{cm}^3$ . Die Messung dauert im Vergleich zur DEXA-Methode mit 20 Minuten etwas länger und setzt den Patienten einer relativ hohen Strahlenbelastung aus. Diese variiert von einer effektiven Dosis von 1,5 mSv für eine 3D Aufnahme der Lendenwirbelsäule (LWK 1-2) bis zu 3,0 mSv bei einer 3D-Aufnahme der Hüfte. Zum Vergleich bedeutet eine DEXA-Aufnahme der Wirbelsäule eine Strahlenbelastung von 0,013 mSv bzw. eine effektive Dosis von 0,009 mSv bei einer Aufnahme der Hüfte. Einen weiteren Nachteil bietet die Tatsache, dass durch altersbedingte Einlagerung von Fett im Knochenmark der Wirbelkörper die Knochendichte um bis zu 10-15% falsch zu niedrig eingestuft werden kann. Die Ergebnisse werden in Hydroxylapatit pro  $\text{cm}^3$  angegeben. Normal ist ein Wert  $>120 \text{ mg HA}/\text{cm}^3$ , bei 80-120  $\text{mg HA}/\text{cm}^3$  spricht man von Osteopenie, bei einem Wert  $<80 \text{ mg HA}/\text{cm}^3$  kann

Osteoporose diagnostiziert werden (Committee on Musculoskeletal Imaging 2008, Bartl and Frisch 2009, Damilakis et al. 2010).

Bei beiden Methoden sollte man stets bedenken, dass bei Osteoporose nicht alle Knochen des Skeletts im selben Ausmaß betroffen sind, sodass sich eine konkrete Aussage zur Knochendichte immer nur auf das vermessene Areal bezieht. So wie jeder Wirbelkörper einzeln vermessen werden sollte, gehören auch zu einer korrekten Bestimmung der Knochendichte der Hüfte fünf Regionen, nämlich Schenkelhals, Trochanter major, intertrochantäre Region, Ward-Dreieck und das Hüftgelenk im Ganzen. Mit solchen Knochendichtemessungen kann zuverlässig eine Einschätzung über das Frakturrisiko gegeben und der Therapieerfolg beobachtet werden. Leider ist noch kein Screening etabliert. Daher sollten sich vor allem Patienten mit Risikofaktoren einer Messung unterziehen (vgl. 5.1.4, S.10). Nicht nur aus dem Grund, osteoporotischen Frakturen vorzubeugen, sondern auch, weil ein Knochendichteverlust als Zeichen für eine höhere Mortalität anzusehen ist. Laut der amerikanischen nationalen Stiftung für Osteoporose NOF (National Osteoporosis Foundation) sollte man die BMD-Messung sogar ausweiten auf alle Frauen, die älter sind als 65 Jahre bzw. Männer über 70 Jahre, Patienten mit aufgetretenen Frakturen jenseits des 50. Lebensjahrs, Frauen in der Menopause mit Risikofaktoren wie z.B. einer längerdauernden Hormontherapie, alle postmenopausalen Frauen unter 65 mit Risikofaktoren sowie Männer zwischen 50 und 69 Jahren mit Risikofaktoren (National Osteoporosis Foundation 2013, Bartl and Frisch 2009, Cosman et al. 2014).

### **5.1.5.2 Laborwerte**

In Abwesenheit von Komorbiditäten sind die Laborparameter bei Patienten mit primärer Osteoporose ohne pathologischen Befund. Die Messung bestimmter Knochenmarker kann zwar dabei helfen, die zukünftige Rate an Knochenverlust und das Risiko für künftige Frakturen vorherzusagen sowie einer Therapieüberwachung dienen, die Diagnose der Osteoporose ist damit jedoch nicht möglich. Aus diesem Grund kann die Knochendichtemessung durch das Labor bisher nicht ersetzt werden. Zu den Parametern für die Bildung von Knochen gehören die von den Osteoblasten gebildete knochenspezifische alkalische Phosphatase (AP),

Osteokalzin (osteocalcin=OC), Osteopontin (OP) sowie Osteonektin (ON). Im peripheren Blut gemessen stehen diese Kenngrößen folglich für die Aktivität der Osteoblasten. Hingegen sind Kollagenabbauprodukte Parameter, die für eine erhöhte Knochenresorption stehen. Sie werden ins Blut abgegeben und mit dem Urin ausgeschieden. Bei allen Knochenmarkern sollte man jedoch im Auge behalten, dass sie nicht spezifisch nur vom Knochen gebildet werden. Alle Kenngrößen können sowohl von Resorption als auch Knochenbildung zeugen. Auch durch andere Krankheiten, die nicht primär dem Knochen entspringen, können Knochenmarker im Blut erhöht sein (Bartl and Frisch 2009). So findet man zum Beispiel eine Erhöhung der AP durch Isoenzyme in der Leber bei Hepatitis und Cholestase, aber auch physiologisch durch die Bildung in der Plazenta bei Schwangeren. Auch bei einer Niereninsuffizienz können entsprechende Enzyme und Proteine im Körper akkumulieren (Herold 2014). Weitere biologische Marker zur Detektion der Osteoporose sind in der Entwicklung. So empfehlen die Internationale Osteoporose Stiftung IOF und der Internationale Verband für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin IFCC bereits die Messung von Prokollagen Typ I N-terminalem Propeptid (PINP) und quervernetztem C-terminalem Telopeptid (CTX) im Serum als Parameter für die Knochenformation und -resorption. Allerdings finden sich auch hier die Nachteile der bisher ungenügenden Spezifität für Knochen sowie das Unvermögen, die Aktivität von Osteozyten oder deren periostale Auflagerung im Rahmen der Knochenneubildung widerzuspiegeln. Wie auch bei den oben genannten Kenngrößen gibt es bisher keine Laborparameter, um die Qualität des Knochenmaterials aufzuzeigen, welche letztendlich für die Stabilität des Knochens vorrangig ist (Garnero 2014).

### **5.1.6 Therapie**

Das Hauptziel, das mit der Therapie der Osteoporose verfolgt wird, liegt in der Vermeidung von Frakturen. Zu den geläufigsten Maßnahmen zählen die Supplementation mit Kalzium und Vitamin D sowie die Gabe von Bisphosphonaten, Parathormon, Östrogenrezeptor-Modulatoren und Strontiumranelat. Weitere Maßnahmen sind zielgerichtete Therapien wie mit dem RANKL-Antikörper (Rachner et al. 2011). Die Therapieüberwachung gestaltet sich bei allen Medikamenten

schwierig. Durch die Messung der Knochendichte oder Marker für den Knochenumbau kann keine sichere Aussage über den Therapieerfolg gemacht werden, welcher eine Reduktion von Knochenbrüchen wäre. Oft stimmen Monitoring und Frakturrisiko nicht überein und müssen deshalb für jeden Patienten individuell evaluiert werden. Häufig ist auch die Compliance der Patienten ein Problem, da sie die Medikation meist über Jahre einnehmen müssen, obwohl subjektiv keine Beschwerden bestehen. Durch regelmäßige Knochendichtemessungen kann die Compliance durch Sichtbarmachen des Therapieerfolges verbessert werden. Jedoch muss bedacht werden, dass die Werte der Knochendichtemessung bei Gabe osteoanaboler Präparate initial sinken, da sich die gemessene Knochenfläche durch die Therapie vergrößert (BMD = bone mineral content / area in  $\text{g}/\text{cm}^2$ ). Zudem sind Erfolge mittels Bildgebung meist erst nach sechs Monaten sichtbar (Bonnick and Shulman 2006, Gupta et al. 2012).

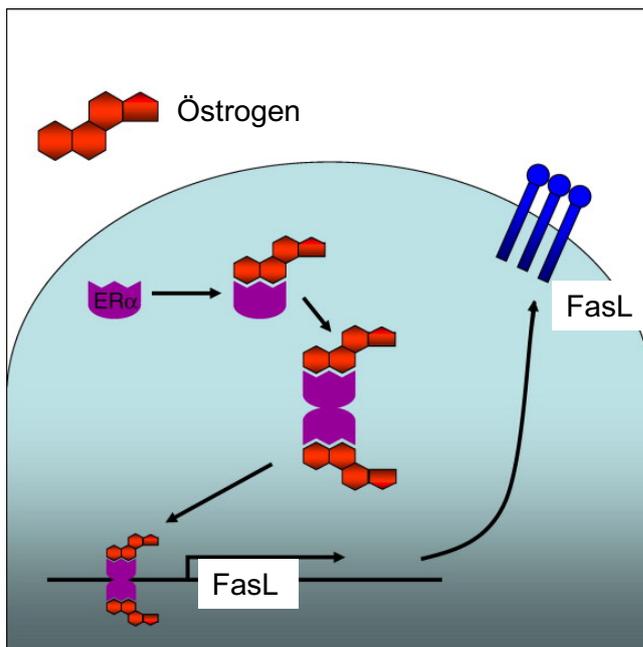
#### **5.1.6.1 Kalzium und Vitamin D**

Fast das gesamte Kalzium in unserem Körper befindet sich im Knochen. Um eine ausreichende Kalziumzufuhr zu gewährleisten, sollte ein Erwachsener täglich 1200-1500 mg zu sich nehmen (vgl. 5.1.4, S.10). Kalzium wirkt dabei in erster Linie durch Hemmung der Sekretion von Parathormon, welches die Knochenresorption anregt (vgl. Abbildung 5-3, S.5). Gegenanzeigen zur Einnahme von Kalzium sind Hyperkalzämie, Nephrolithiasis und Niereninsuffizienz. Vitamin D fördert die Resorption von Kalzium aus dem Darm und hemmt dessen Ausscheidung über die Nieren. Die aktive Form des Vitamin D, das  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , wird unter anderem in der Haut durch UV-Strahlung aus dem Prohormon Vitamin D gebildet. Es hemmt die Synthese von Parathormon (Lips 2001). Des Weiteren begünstigt es die Knochenmineralisation und schützt die Mikroarchitektur der Spongiosa. Außerdem fördert es Muskelmasse und -stärke und kann somit das Risiko für Stürze vermindern. Die empfohlene Zufuhr für den Menschen beträgt ca. 400 IU pro Tag. Für die Therapie werden allerdings nur höhere Dosen von bis zu 1000 IU als wirksam betrachtet. Es konnte gezeigt werden, dass sich durch die alleinige Einnahme von Kalzium und Vitamin D das Frakturrisiko um 40% vermindern lässt (Bartl and Frisch 2009). Die ausschließliche Einnahme von Vitamin D schützt nicht vor Frakturen (Johnell and Hertzman 2006).

### **5.1.6.2 Hormonersatztherapie und selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren**

Die Östrogenproduktion geht bei Frauen bereits vor der Menopause zurück und verursacht einen kontinuierlichen Verlust an Knochensubstanz (vgl. 5.1.3, S.7). Nach der Menopause verliert der Knochen jährlich ein bis vier Prozent an Masse, sofern keine Therapie erfolgt. Lange Zeit galt die Hormonersatztherapie als Mittel der Wahl für die Behandlung der Osteoporose bei Frauen in der Postmenopause. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Hormoneinnahme über einen Zeitraum von fünf bis zehn Jahren das Frakturrisiko für Wirbelkörper, proximalen Femur und distalen Radius um die Hälfte reduziert wird. Nichtsdestotrotz kann nicht bei allen Patientinnen eine Zunahme der Knochenmasse festgestellt werden. Aus diesem Grund empfiehlt die NOF eine regelmäßige Messung der Knochendichte bei Frauen unter Langzeithormonersatztherapie, um "non-responder" herauszufiltern. Trotz des Erfolges der Östrogene im Rahmen der Osteoporosetherapie gilt der Grundsatz, eine Hormonersatztherapie so wenigen Frauen wie möglich und nur so lange wie nötig zu verschreiben. Maßgeblich wegen des Langzeitrisikos für Brustkrebs und kardiovaskuläre Ereignisse, welches mit dieser Hormontherapie zusammen mit der Gabe von Gestagenen assoziiert ist. Darüber hinaus existieren bezüglich des Therapieerfolges vergleichbare Alternativen, die mit einem geringeren Risikoprofil behaftet sind (Johnell and Hertzman 2006, Bartl and Frisch 2009).

Die Wirkungen des Östrogens am Knochen sind komplex. Unter anderem inhibieren sie die Aktivität der Osteoklasten und stimulieren die Kollagensynthese durch die Osteoblasten. Des Weiteren fördern Östrogene die Kalziumaufnahme aus dem Darm und begünstigen die Sekretion von Kalzitinin, welches in der Lage ist Osteoklasten zu inhibieren. Außerdem beeinflussen sie die PTH-Sekretion und verbessern den Blutfluss im Knochen (Bartl and Frisch 2009). Durch die Induktion von Fas Ligand (FasL) in den Osteoblasten bedingen Östrogene eine Apoptose von Präosteoklasten (Krum et al. 2008) (Abbildung 5-11, S.22).



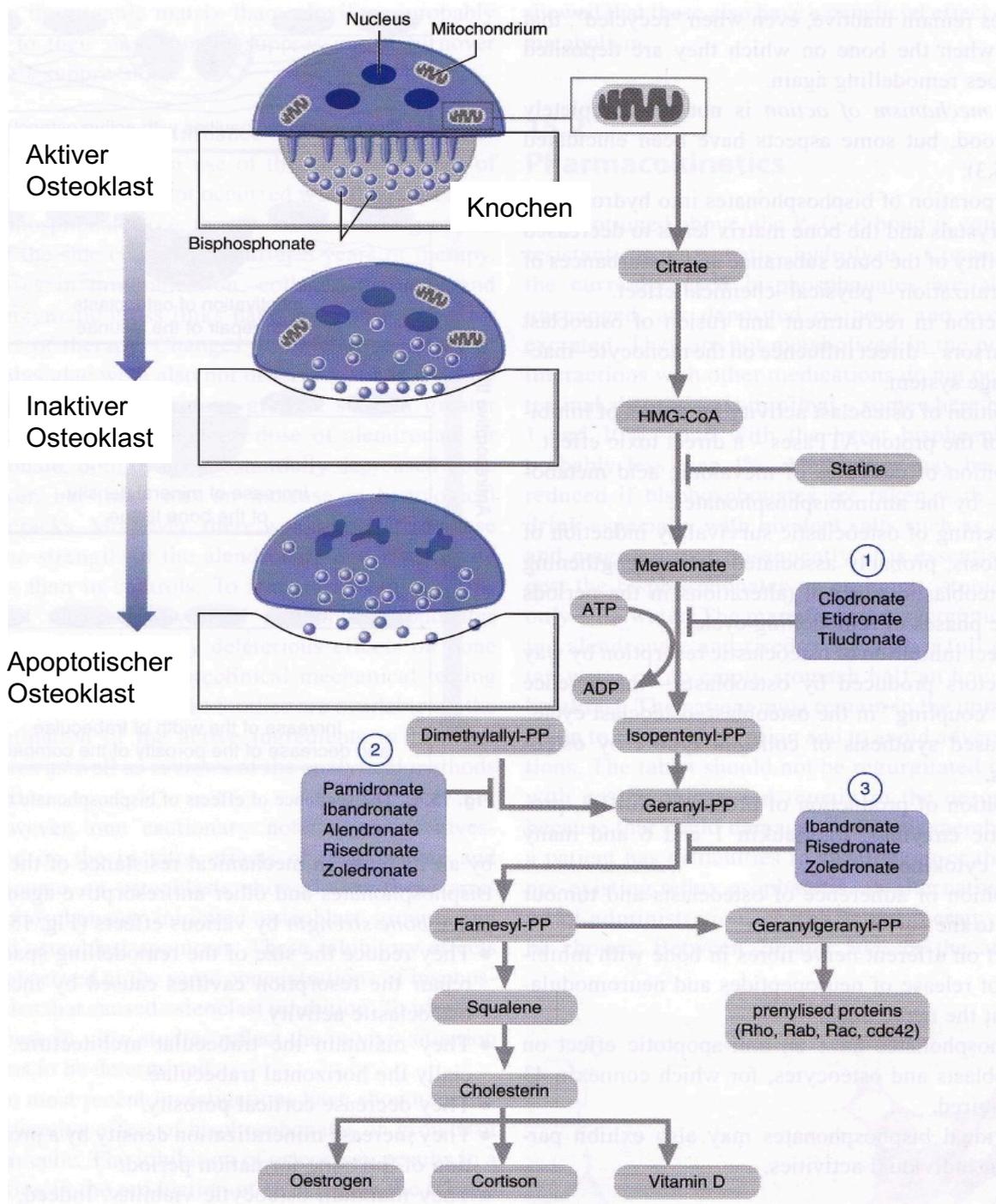
**Abbildung 5-11:** Östrogeninduzierte Bildung von FasL. Durch Bindung von Östrogen an intrazelluläre ER $\alpha$ -Rezeptoren und Bildung von Dimeren in Osteoblasten entsteht durch Transkription der Fas Ligand, welcher durch seine Bindung an Rezeptoren von Präosteoklasten zu deren Apoptose führt. (Abbildung modifiziert nach Del Fattore et al. 2008)

Eine Alternative stellen sogenannte Östrogenrezeptor-Modulatoren dar. Stellvertretend hierfür sei als Beispiel das Raloxifen genannt. Es handelt sich hierbei um einen selektiven Östrogenrezeptormodulator (SERM) der zweiten Generation, welcher keinen Einfluss auf Brust- oder Uterusgewebe hat. SERM binden mit hoher Affinität an Östrogenrezeptoren, von denen zwei Untereinheiten existieren (ER- $\alpha$  und ER- $\beta$ ). Dabei wirkt Östrogen am Skelett hauptsächlich über den ER $\alpha$ -Rezeptor. Raloxifen wirkt am Knochen als Östrogenagonist und blockiert die Produktion von Zytokinen, welche die Osteoklastendifferenzierung stimulieren. Ergänzend fördert es die Ausscheidung des transformierenden Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ 3 aus Osteoblasten, welcher die Osteoklastenaktivierung inhibiert. Somit kann die Knochenresorption unterdrückt werden (Raisz 2005, Bartl and Frisch 2009).

### **5.1.6.3 Bisphosphonate**

Mit der Einführung der Bisphosphonate vor ca. 30 Jahren begann eine neue Ära in der Behandlung von Knochenkrankheiten. Bisphosphonate stellen heutzutage einen der Hauptpfeiler in der Therapie der Osteoporose dar. Durch ihre Interaktion mit Osteoklasten verhindern sie die Knochenresorption und können so das Auftreten von Frakturen vermeiden. Da Bisphosphonate zusätzlich keinen nachteiligen Effekt auf die Knochenformation haben führen sie langfristig zu einem gesunden Gleichgewicht von Auf- und Abbau im Knochen. Sie werden im klinischen Alltag erfolgreich nicht zuletzt im Rahmen der Prävention und Behandlung der Osteoporose eingesetzt, sondern haben auch die Therapie anderer Knochenerkrankungen wie der Osteogenesis imperfecta, dem Morbus Paget oder dem Multiplen Myelom verbessert. Auch zur Schmerzreduktion bei Knochenmetastasen, z.B. beim Prostatakarzinom, werden sie erfolgreich eingesetzt (Reyes et al. 2015). Bisphosphonate haben eine hohe Affinität für bestimmte Strukturen an der Oberfläche des Knochens. Sie werden schließlich im Rahmen des Aufbaus von Knochenmatrix eingeschlossen und können dort für Jahre inaktiv verweilen. Durch das Einschleusen des Bisphosphonats in Hydroxylapatitkristalle und die Knochenmatrix vermindert sich die Löslichkeit der Knochensubstanz. Durch die Osteoklasten werden sie im Rahmen der Knochenresorption aufgenommen. Es gibt diverse Angriffspunkte, an denen die verschiedenen Bisphosphonate an Osteoklasten ihre Wirkung entfalten (Abbildung 5-12, S.25). Ein direkter Effekt auf das Monozyten-Makrophagen-System besteht durch den negativen Einfluss auf die Rekrutierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen. Die Osteoklastenaktivität selbst wird durch inhibierte Proton-Adenosintriphosphatasen vermindert. Weiterhin kann die Apoptose der Osteoklasten induziert sowie ihre Anhaftung am Knochen erschwert werden. Bisphosphonathaltige Präparate wirken auch auf Osteoblasten, indem deren Kollagen Typ I Produktion angeregt wird. Ferner haben sie Einfluss auf Faktoren, welche die Aktivität der Osteoklasten einschränken. Außerdem wirken sie zusammen mit Connexin 43, einem Transmembranprotein, anti-apoptotisch auf Osteoblasten und Osteozyten. Die Therapie mit Bisphosphonaten bewirkt eine Erhöhung der Knochenmasse, welche aus einer verminderten Knochenresorption resultiert, sowie erhöhte mechanische Resistenz als Konsequenz einer verbesserten Stärke des Knochens (Reszka and Rodan 2003, Bartl and Frisch 2009). Durch die

Therapie mit Bisphosphonaten weisen Resorptionsflächen am Knochen sowie dazugehörige Resorptionshöhlen eine verminderte Größe auf. Es bleiben primär die horizontalen Trabekel der Spongiosa erhalten. Durch eine verlängerte Periode der Knochenbildung steigt auch die BMD durch entsprechende Mineralisierung. Die verbesserte Mikroarchitektur schützt den Patienten vor Fragilitätsfrakturen. Durch ihre P-C-P-Gruppe sind Bisphosphonate vor enzymatischer Hydrolyse geschützt. Dadurch werden sie im Körper nicht metabolisiert und unterliegen keinerlei Interaktionen mit anderen Medikamenten. Allerdings beträgt die intestinale Resorption der Bisphosphonate lediglich 1-10%. 20-50% der absorbierten Bisphosphonate haften am Knochen fest, der Rest wird unverändert ausgeschieden (Bartl and Frisch 2009). Durch die erforderliche Langzeitbehandlung mit Bisphosphonaten sind auch Nebenwirkungen wie gastrointestinale Beschwerden, Vorhofflimmern, atypische Femurfrakturen sowie vereinzelt Fälle von Kieferosteonekrosen beschrieben worden (Reyes et al. 2015). Dennoch sind Bisphosphonate aufgrund ihrer bewiesenen Wirksamkeit und dem vergleichsweise geringen Risikoprofil zurzeit Mittel der Wahl in der Behandlung der postmenopausalen Osteoporose. Zur oralen Gabe stehen mehrere Präparate zur Auswahl. Dazu gehören Alendronat, Risedronat, Etidronat und Ibandronat. Die Bisphosphonate Ibandronat, Zoledronat, Clodronat und Pamidronat sind auch als intravenöse Therapie verfügbar und müssen einmal bzw. viermal im Jahr verabreicht werden. Vorteile sind hier die bessere Compliance der Patienten, die hundertprozentige Bioverfügbarkeit sowie die Abwesenheit gastrointestinaler Nebenwirkungen. Im Rahmen der Behandlung unterscheidet man die drei Phasen: Reparatur (Dauer bis zu 12 Monate), Wiederaufbau (6-36 Monate) und Erhaltung (24-60 Monate). Je nach Schweregrad der diagnostizierten Osteoporose und individuellem Anstieg der Knochendichte dauert die Therapie mit Bisphosphonaten 2-5 Jahre (Reszka and Rodan 2003, Bartl and Frisch 2009).



**Abbildung 5-12:** Wirkung nitrogenhaltiger Bisphosphonate auf zellulärer und biochemischer Ebene. Die im Knochen eingelagerten Bisphosphonate werden im Rahmen der Knochenresorption durch den aktiven Osteoklasten aufgenommen. Im Zytoplasma des Osteoklasten wird die Bildung von Sterinen und Isoprenoiden auf verschiedenen Ebenen gehemmt. Dadurch wird dieser inaktiviert oder bei einer höheren Dosis der Bisphosphonate sogar apoptotisch. (Abbildung modifiziert nach Bartl und Frisch 2009)

#### **5.1.6.4 Strontiumranelat**

Strontium ist ein zweiwertiges Kation, welches dem Kalzium chemisch sehr ähnelt. Auf der einen Seite fördert es die Bildung von Präosteoblasten, ihre Differenzierung zu Osteoblasten, die Synthese von Kollagen Typ I sowie die Mineralisierung von Knochenmatrix und kann so die Dichte der Spongiosa verbessern. Auf der anderen Seite hemmt es Osteoklasten und seine Vorläuferzellen. Somit hat es in geringer Dosis sowohl einen Effekt auf die Knochenformation als auch -resorption. Durch die Ablagerung des Strontiumranelats in die Hydroxylapatitkristalle zwischen den Kollagenfasern erhöht es die Knochenmasse und verbessert dadurch die mechanischen Eigenschaften des Knochens. Allerdings ist Vorsicht geboten, da durch die Fähigkeit des eingelagerten Medikaments, Röntgenstrahlen zu absorbieren, die Knochendichte im Rahmen der DEXA-Messung häufig falsch zu hoch eingeschätzt wird. In Studien war das verminderte Frakturrisiko mit dem nach Einnahme von Bisphosphonaten vergleichbar (Marie et al. 2001, Bartl and Frisch 2009).

#### **5.1.6.5 Peptide aus der Parathyroidhormon-Familie**

Im Gegensatz zu oben genannten Therapieoptionen, welche eine reduzierte Aktivität der Osteoklasten bewirken und somit in einer erhöhten Knochendichte resultieren, handelt es sich beim Parathormon um eine osteoanabole Therapie. Dieses Hormon regelt normalerweise den Kalziumhaushalt, indem es bei Bedarf die Freisetzung von Kalzium und Phosphat aus dem Knochen fördert und durch die Anregung der Produktion von aktivem Vitamin D in den Nieren den Kalziumtransport im Darmtrakt stimuliert (vgl. Abbildung 5-3, S.5). Außerdem kann es die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten und folgendermaßen die Knochenbildung vorantreiben. Dies geschieht durch Bindung an den PTH/PTHrP Typ I Rezeptor, der wiederum eine Reihe von Signalkaskaden in Gang setzt, unter anderem den Wnt-Signalweg im Osteoblasten. Zusätzlich verbessert PTH die Mikroarchitektur des Knochens durch gesteigerte Knochendichte, -stärke und -verbundenheit. In der Therapie kann auch ein Parathormon-Fragment namens Teriparatid (rekombinantes humanes Parathormon mit der Aminosäuresequenz 1-34, kurz rhPTH 1-34) subkutan verabreicht werden (Ebeling and Russell 2003). Der genaue Mechanismus

der eigentlich paradoxen knochenaufbauenden Wirkung ist noch unbekannt. Die Therapie nimmt eineinhalb Jahre in Anspruch, die Kosten dafür sind allerdings ungefähr zehnmal höher im Vergleich zur Therapie mit Bisphosphonaten. Eine Anschlussbehandlung mit einem antiresorptiven Präparat wird empfohlen (Bartl and Frisch 2009, Iniguez-Ariza and Clarke 2015).

#### **5.1.6.6 Kalzitonin und Fluorid**

Das Hormon Kalzitonin wird für gewöhnlich von den parafollikulären C-Zellen der Schilddrüse produziert und dient als natürlicher Gegenspieler des PTH. Durch seine Bindung an Rezeptoren auf der Oberfläche von Osteoklasten kann es deren Aktivität inhibieren und somit Fragilitätsfrakturen vorbeugen. Ein Einfluss auf die Knochendichte konnte nicht nachgewiesen werden. Als Therapie steht es in Form von subkutaner Injektion oder als Nasenspray zur Verfügung. Jedoch schränken seine Nebenwirkungen wie Übelkeit, Nasenbluten oder allergische Reaktionen die Verwendung ein. Außerdem besteht der Verdacht, Kalzitonin könne in geringem Maße das Krebsrisiko für bestimmte Malignitäten erhöhen. Aufgrund der hohen Kosten einer Therapie mit Kalzitonin sowie den häufigen Injektionen, die nötig sind, ist es für den Langzeitgebrauch ungeeignet. Eine Indikation für die Therapie ist zum Beispiel das akute Schmerzgeschehen nach einer Wirbelkörperfraktur (Bartl and Frisch 2009, Cosman et al. 2014).

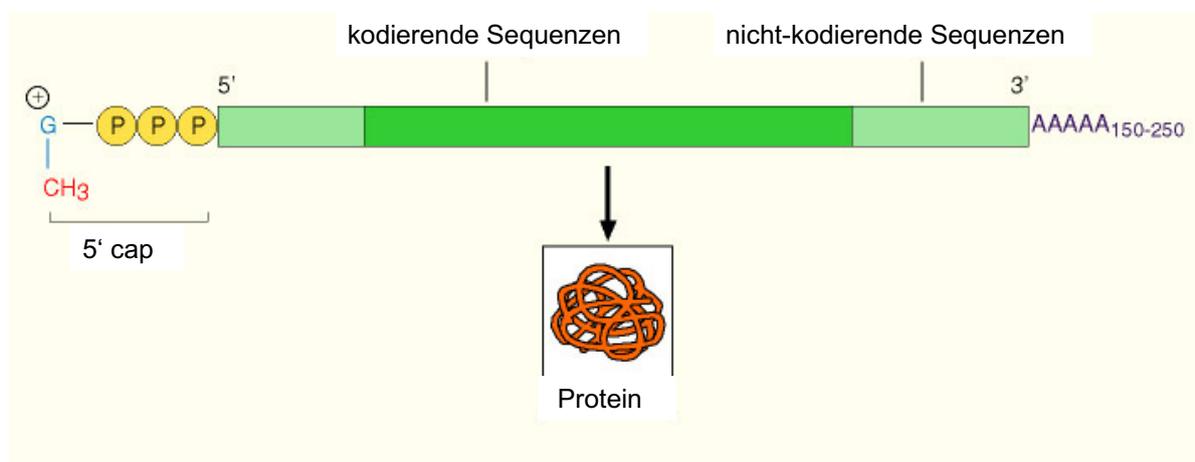
Fluorid hingegen zählt nicht mehr zur Erstlinientherapie der Osteoporose. Es wird jedoch aus wirtschaftlichen Gründen noch in einigen Ländern als Medikament verwendet. Fluorid fördert die Knochenentwicklung durch Anregung der Osteoblasten, indem es deren intrazellulären Kalziumgehalt erhöht, und führt so zu einer verbesserten Knochenmasse (Duan et al. 2015). Seine Wirksamkeit bezüglich der Frakturprävention konnte bisher allerdings nicht bestätigt werden, da der neu geformte Knochen sich als weniger widerstandsfähig erweist. Auch die Nebenwirkungen sprechen gegen eine Erstlinientherapie mit Fluorid. Man empfiehlt, nur geringe Dosen über drei bis vier Jahre zusammen mit Vitamin D und Kalzium zu verabreichen (Bartl and Frisch 2009).

### **5.1.6.7 Denosumab**

Ein neuer Ansatz in der Behandlung der Osteoporose ist die gezielte sogenannte "targeted therapy" mit Antikörpern, allen voran der humane monoklonale Antikörper Denosumab. Er bindet als Antagonist den Rezeptor Aktivator des Nuklearfaktor-kappa-B-Liganden (RANKL). Dieses Zytokin ist essentiell für Bildung, Funktion und Überleben der Osteoklasten (vgl. 5.1.2, S.2 und Abbildung 5-4, S.7). Somit wirkt Denosumab als antiresorptives Agens. Es wird dem Patienten alle sechs Monate subkutan verabreicht. In einer Studie über drei Jahre konnte eine Reduktion von Wirbelkörperfrakturen um 68% und eine Reduktion von Schenkelhalsfrakturen um 40% gezeigt werden (Cummings et al. 2009).

## 5.2 MicroRNA und deren Rolle in der Zelle

MicroRNAs (miRNAs) sind kurze nicht-kodierende einzelsträngige RNA-Segmente mit einer Länge von 19-24 Nukleotiden. Sie sind an essenziellen biologischen Funktionen wie der Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt (Slack 2011). Diese kurzen RNA-Segmente regulieren die Genexpression, indem sie in die posttranskriptionelle Phase eingreifen und somit die Proteinsynthese hemmen. Dies geschieht durch die Interaktion mit mRNA (Abbildung 1-13, S.29).

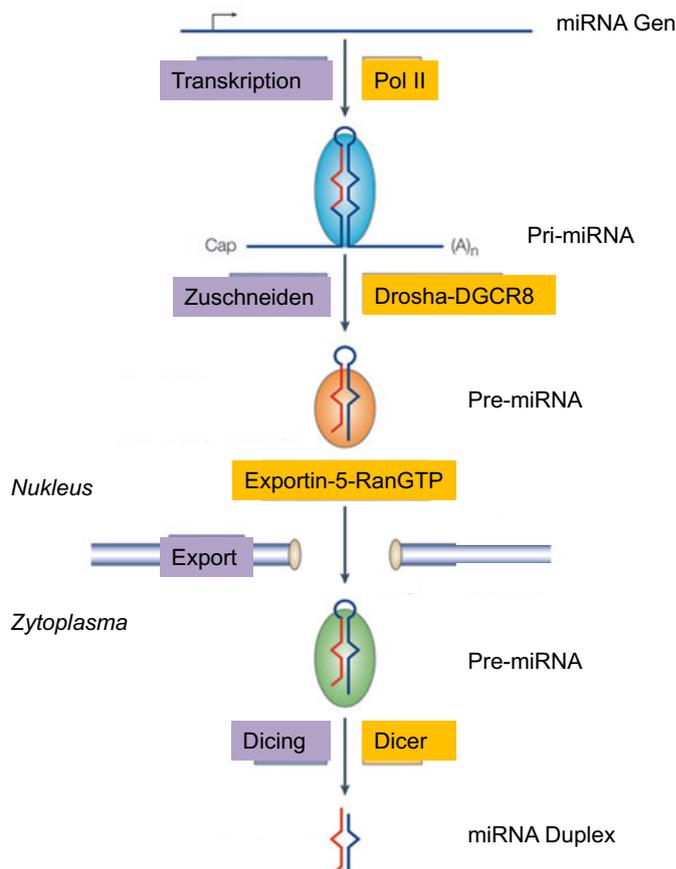


**Abbildung 5-13:** Aufbau der reifen eukaryontischen mRNA. Am 3'-Ende findet sich der sogenannte Poly-A-Schwanz, der aus mehreren aneinandergereihten Adenin-Nukleotiden (A) besteht und die mRNA vor dem enzymatischen Abbau bewahrt. Am 5'-Ende findet sich das 7-Methylguanidin (G), welches über eine 5'-5'-Triphosphat-Bindung (P) mit der mRNA verbunden ist. (Abbildung modifiziert nach Knippers 2006)

Seit der ersten Entdeckung dieser Genregulatoren um 1990 im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) wurden einige weitere hundert miRNAs in Pflanzen und Tieren identifiziert. Die ersten waren *lin-4* und *let-7*, welche an ihren Zielgenen direkt mit dem 3'-Ende des untranslatierten Bereichs (UTR) der mRNA agieren. Man schätzt, dass bis zu drei Prozent der DNA für miRNAs kodieren (Morris 2008). Loci hierfür können unabhängige Transkriptionseinheiten oder Cluster



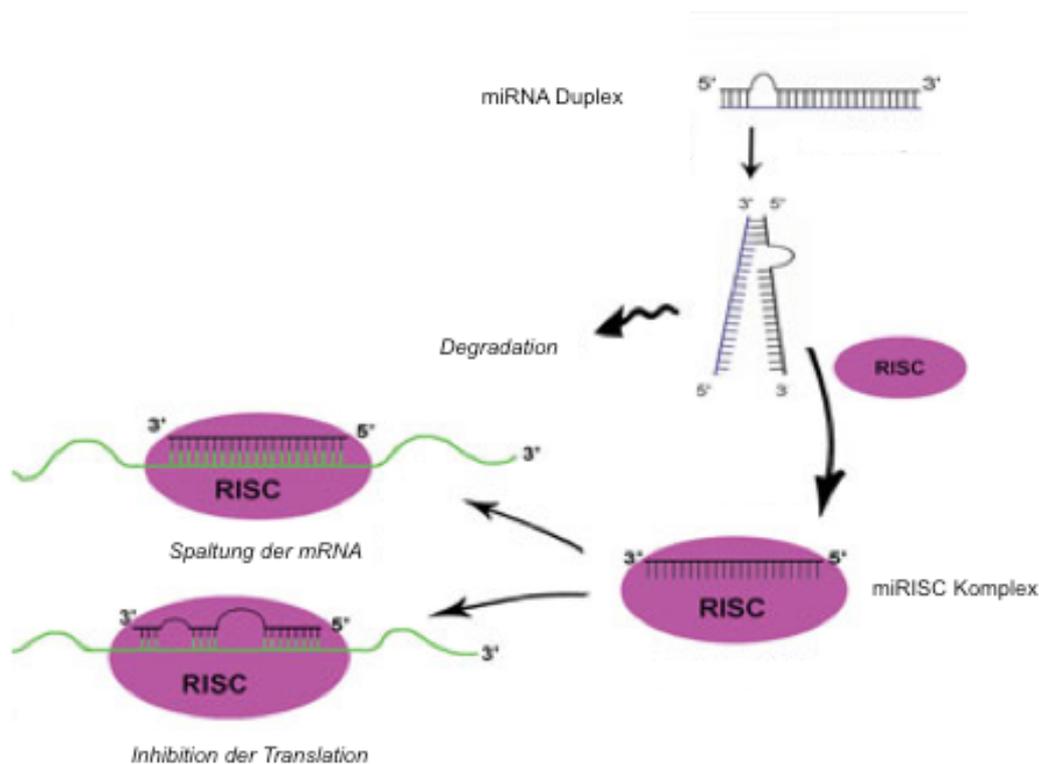
und spaltet ihre Haarnadelstrukturen an der Basis ab, wodurch die pre-miRNA entsteht. Die pre-miRNA, welche um die 70 Nukleotide lang ist, wird anhand von Exportin 5 in das Zytoplasma befördert. Mithilfe von Dicer, einem RNase III ähnlichen Enzym, entsteht hier die ausgereifte miRNA in Form eines doppelsträngigen mehrere Nukleotide langen miRNA-Komplexes (Abbildung 5-15, S.31). Ein Strang bindet anschließend an die mRNA, der andere wird degradiert. Entschieden wird dies durch die freie Energie, welche für eine Bindung nötig ist. Der Strang des Komplexes, dessen 5'-Ende weniger Energie für eine Bindung mit der mRNA verbraucht, wird zum ausgereiften Führungsstrang. Dieser wird nun Teil des Proteinkomplexes miRISC (miRNA-induzierter Stilllegungskomplex). Durch diesen Komplex wird letztlich die Proteinproduktion verhindert (s.5.2.2, S.32) (Morris 2008).



**Abbildung 5-15: MiRNA-Biogenese.** Das miRNA Gen wird durch die RNA-Polymerase II (Pol II) transkribiert. Die entstandene pri-miRNA wird durch den Proteinkomplex Drosha-DGCR8 gespalten, woraus die pre-miRNA resultiert. Nach dem Export ins Zytoplasma entsteht mit Hilfe des Enzyms Dicer der reife miRNA Duplex. (Abbildung modifiziert nach Narry Kim 2005)

## 5.2.2 Die Funktion von miRISC

Die Aufgabe der miRNA als Bestandteil von miRISC besteht in der Identifizierung ihrer Ziel-mRNA mit Hilfe einer komplementären Sequenz, um so die Proteinsynthese zu blockieren. Für die Aktivität der miRNA wird als wesentlicher Bestandteil von miRISC ein Argonautprotein benötigt. Dieses enthält eine PAZ-Domäne, welche die miRNA erkennt, sowie *PIWI*, welches eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung des Zielgens spielt (Slack 2011). Man schätzt, dass ein Drittel der gesamten mRNAs in Säugetieren von miRNAs reguliert werden (Miyaki and Asahara 2012). Es können mehrere Kopien einer miRNA oder auch Kombinationen verschiedener miRNAs an die mRNA binden. Dies kann zu einer Spaltung und Degradation derselben führen. Außerdem kann miRISC die Initiation und Elongation der Translation inhibieren oder die Deadenylierung der Ziel-mRNA als Konsequenz haben (Morris 2008) (Abbildung 5-16, S.32).



**Abbildung 5-16:** Funktion von miRISC. Nachdem ein Strang des miRNA Duplex degradiert wurde, bildet der andere mit dem Protein RISC den miRISC Komplex. Dieser kann zur Spaltung der mRNA führen oder die Translation derselben hemmen. (Abbildung modifiziert nach Norton Lasley 2010)

Eine mögliche Erklärung für die Aktivität von miRISC ist, dass in dem Komplex enthaltene Proteine an die Kappe der Ziel-mRNA binden und somit den Zugang von Initiationsfaktoren blockieren (Slack 2011).

### 5.2.3 Extrazelluläre miRNA als Biomarker

Um eine gezielte Funktion der Zelle sowie ihrer Differenzierung zu gewährleisten, muss der Gehalt an miRNA genau kontrolliert werden. Eine Abweichung ist oft mit pathologischen Vorgängen assoziiert (Wang et al. 2013). Solche Missverhältnisse sind bis dato hauptsächlich mit Krebs oder Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems beschrieben worden (Slack 2011, Papageorgiou et al. 2012). Aberrante miRNA-Signaturen sind allerdings nicht nur an oben genannten Pathologien beteiligt, sondern können auch in anderen Bereichen wie z.B. bei der Endometriose als Biomarker dienen (Wang et al. 2013). Für 13 Arten von Krebs offenbaren miRNAs bis dato das Potential für diagnostische und prognostische Zwecke (Kosaka et al. 2010). Damit zirkulierende miRNAs im Blut nicht durch Nukleasen degradiert werden, gehen sie für ihre Stabilität Komplexe mit diversen Proteinen oder Mikrovesikeln ein. Der Zweck dieser frei zirkulierenden miRNAs ist allerdings noch nicht bekannt. Dennoch besteht die Möglichkeit, sie als nicht-invasive Biomarker einzusetzen. Eine Veränderung ihrer Spiegel im Blut bei Krankheit könnte durch vermehrte Zellyse oder durch eine erhöhte Exosombildung aus befallenen Zellen erklärt werden (Shaffer et al. 2012). Trotz der Fortschritte im letzten Jahrzehnt bezüglich der Entdeckung von miRNAs ist die Forschung auf diesem Feld noch in der Entwicklung. Über ihre genaue Aktivität sowie Zielgene ist bis heute noch wenig bekannt (Slack 2011).

### 5.2.4 Nomenklatur

Alle reifen miRNAs sind zu erkennen an dem Präfix miR-, Vorstufen werden mit mir- bezeichnet. Anschließend werden sie durchnummeriert (z.B. miR-24, miR-89). Unabhängig vom Organismus erhalten identische miRNAs dieselbe Nummer. Um die Gattung zu beschreiben, werden weiterhin Präfixe verwendet (z.B. hsa- für *Homo sapiens*). Nahezu identische miRNAs einer Spezies mit nur geringfügigen

Unterschieden in ihrer Sequenz erhalten einen Buchstaben als Suffix (z.B. miR-13a und miR-13b). Gehen identische miRNAs aus unterschiedlichen Lokalisationen der Haarnadelstrukturen hervor, so werden diese durch nummerierte Suffixe gekennzeichnet (z.B. hsa-miR-34-1 und hsa-miR-34-2). Entspringen zwei unterschiedliche miRNAs demselben Vorläufer, nur von gegensätzlichen Armen, erhalten sie das Suffix -3p (für das 3'-Ende) bzw. -5p (für das 5'-Ende) (Ambros et al. 2003, Griffiths-Jones et al. 2006).

## 6 Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit

Zwar existieren einige wenige Marker, durch die ein Knochenumsatz annähernd bestimmt werden kann. Nichtsdestotrotz sind spezifische Biomarker bei der Diagnose der Osteoporose kaum etabliert (vgl. 5.1.5.2, S.18). 30-50% aller Frauen und 15-30% aller Männer weltweit werden eine Fraktur aufgrund von Osteoporose erleiden. Laut WHO wird die Rate an Hüftfrakturen bis zum Jahr 2050 global bei 6,3 Millionen liegen. In Bezug auf die demographische Alterung unserer Bevölkerung ist es daher von essenzieller Bedeutung, neue Biomarker für eine Früherkennung der Osteoporose zu etablieren, welche im Hinblick auf die Krankheitsprogression praktikabler wären als der heutige Goldstandard der DEXA-Messung (vgl. 5.1.5.1, S.14).

Mit neuen Publikationen über frei zirkulierende extrazelluläre miRNAs wächst auch das Interesse an ihrem Potential als Biomarker (Wang et al. 2013). Auf dem Feld der Onkologie oder kardiovaskulärer Erkrankungen sind in den letzten Jahren bereits einige miRNA-Signaturen beschrieben worden (vgl. 5.2.3, S.33). Zu veränderten Regulationen von miRNA-Signalwegen bei muskuloskeletalen Erkrankungen können bisher jedoch kaum Aussagen gemacht werden (Miyaki and Asahara 2012). Mizoguchi et al. konnte zeigen, dass in murinen Osteoklasten ein Mangel des Enzyms *Dicer*, welches an der Biogenese von miRNAs beteiligt ist (vgl. 5.2.1, S.30), die Anzahl der Osteoklasten zurückgehen lässt und eine gesteigerte Knochenmasse begünstigt (Mizoguchi et al. 2010). Auch scheint die Ausschaltung von *Dicer* im Signalweg von Chondrozyten deren Proliferation zu hemmen (Kobayashi et al. 2008). Dies lässt erkennen, dass im Rahmen der Genexpression miRNAs auch eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Knochen und Knorpel spielen. Bei der Krankheitsentstehung der Arthrose ist bereits eine Beteiligung von miRNAs beschrieben. Diese häufigste muskuloskeletale Erkrankung, welche durch den Untergang von Gelenkknorpel charakterisiert und von artikulärer Entzündung begleitet ist, wird im Rahmen der Knorpel-Homöostase durch miRNAs kontrolliert (Miyaki and Asahara 2012, Seeliger et al. 2016). Hierbei scheint vor allem miRNA-140 an der Pathogenese beteiligt zu sein (Zhang et al. 2013). Zudem wurden bei Patienten mit

Gelenkrheumatismus erhöhte Spiegel von miR-24 und miR-125a-5p im Plasma gefunden (Murata et al. 2013).

Diese Forschungsergebnisse bekräftigen die Idee, miRNAs als neue nicht-invasive Biomarker im Rahmen muskuloskeletaler Erkrankungen zu erproben. Daher ist das primäre Bestreben dieser Arbeit herauszufinden, ob miRNAs auch beim Krankheitsbild der Osteoporose eine Rolle spielen und womöglich als Biomarker oder potentielle Therapieziele dienen können.

Daher wurden folgende Ziele adressiert:

1. Gibt es einen Unterschied in der Aktivität von Osteoklasten und Osteoblasten bei Patienten mit Osteoporose im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe? Dies wurde durch Messung der Enzyme TRAP und AP bestimmt.
2. Isolierung von miRNA aus Serum von Patienten mit Osteoporose sowie einem gesunden Kontrollkollektiv.
3. Identifikation von miRNAs bei Patienten mit Osteoporose im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv mithilfe eines Arrays. Gibt es hier signifikante Unterschiede in der Hoch- bzw. Runterregulierung?
4. Validierung der Ergebnisse des Arrays durch Untersuchung der einzelnen hoch- bzw. runterregulierten miRNAs mittels qPCR.
5. Wie verhält es sich mit der identifizierten miRNAs im Knochengewebe der Patienten?

## 7 Material und Methoden

### 7.1 Material

#### 7.1.1 Geräte

Die verwendeten Geräte werden in Tabelle 1-1 aufgelistet.

Biophotometer + HELLMATray cell	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
CT-Scanner iCT	Philips, Best, Niederlande
Homogenisator MM 400	Retsch, Haan, Deutschland
Inkubator HERAcell 150	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland
Mastercycler® pro	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Platereader Fluostar Omega	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Q-PCR Gerät CFX96	BioRad, München, Deutschland
Sterilwerkbank, MSC Advantage	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Stickstofftank LS 3000	Taylor-Wharton, Theodore, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

**Tabelle 1-1:** Geräte.

#### 7.1.2 Verbrauchsmaterial

Eine Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien ist in Tabelle 1-2 aufgeführt.

Einmalspritzen Inject®	Braun, Melsungen, Deutschland
Monovette S EDTA 9ml	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Monovette S Serum 7,5ml	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Multiwellplatten	PAA GmbH, Pasching, Österreich

Pipetten + Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Skalpelle, No. 10	Feather, Osaka, Japan
Sterile Handschuhe	Apotheke, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland
Sterilfilter 0,22 µm	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen, steril 75 und 175 cm <sup>2</sup>	PAA GmbH, Pasching, Österreich
Zellkulturschalen 10cm <sup>2</sup>	PAA GmbH, Pasching, Österreich
Zellschaber, 20mm Lamelle	PAA GmbH, Pasching, Österreich

**Tabelle 1-2:** Verbrauchsmaterialien.

### 7.1.3 Chemikalien

In Tabelle 1-3 werden für diese Arbeit verwendeten Chemikalien genannt.

Agarose	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
All protect	Qiagen, Hilden, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	Apotheke, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland
Borsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenol Blau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
CD14 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumcarbonat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Apotheke, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Folinreagenz	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Apotheke, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland
Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
L-Ascorbat-2-phosphat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
LSM-1077	PAA GmbH, Pasching, Österreich
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumtartrat*H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, Deutschland
4-Nitrophenol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat (pNpp)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
pUC 19 DNA Marker	Roth, Karlsruhe, Deutschland
RNAlater	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
TRI Reagent	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
TRIS	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypan Blue 0,5%	Biochrome, Berlin, Deutschland
Sulforhodamin B Natriumsalz	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Tabelle 1-3: Chemikalien.

### 7.1.4 Nährmedien und Zusätze

Tabelle 1-4 gibt die Liste der verwendeten Nährmedien und Zusätze wieder.

BSA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Earle's Salts/Ham's F12 Medium	PAA GmbH, Pasching, Österreich
FCS	PAA GmbH, Pasching, Österreich
L-Glutamine	PAA GmbH, Pasching, Österreich
M-CSF	Peptotech, Hamburg, Deutschland
MEM	PAA GmbH, Pasching, Österreich
PBS	PAA GmbH, Pasching, Österreich
Penicillin / Streptomycin	PAA GmbH, Pasching, Österreich
RANKL	Peptotech, Hamburg, Deutschland
Trypsin / EDTA	PAA GmbH, Pasching, Österreich

**Tabelle 1-4:** Nährmedien und Zusätze.

### 7.1.5 Verwendete Kits und Zubehör

Alle benötigten Kits sowie Zusatzmaterial werden in Tabelle 1-5 aufgezählt.

cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Human Serum & Plasma miRNA PCR Array MIHS-106Z	Qiagen, Hilden, Deutschland
miRNeasy Serum/Plasma Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
miRNeasy Spike-In Control	Qiagen, Hilden, Deutschland
miScript II RT Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
miScript SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNU6/ SNORD96a Primer	Qiagen, Hilden, Deutschland
SsoFast EvaGreen Supermix	BioRad, München, Deutschland

**Tabelle 1-5:** Kits und Zusatzmaterial.

## 7.1.6 Software

Verwendete Software wird in Tabelle 1-6 genannt.

EndNote X6	Japone / Team LnDL, Thomson Reuters, San Francisco, CA, USA
Graph Pad Prism 5.01	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
Ingenuity Pathway Assessment / Ingenuity Knowledge Base 8.7	Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA
Mindways calibration phantom and software	Mindways Software Inc., Austin, TX, USA
TargetScan Human V5.1	Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, UK

**Tabelle 1-6:** Software.

## 7.2 Methoden

### 7.2.1 Gewinnung und Einteilung von Patientenproben

Zu Beginn der Studie war das Ziel, Blut und Knochenmaterial von Patienten zu gewinnen, die über die chirurgische Notaufnahme in das Klinikum rechts der Isar in München kamen und hier aufgrund einer Pathologie an der Hüfte behandelt wurden. Das Patientengut für die Gewinnung der Serumproben setzte sich aus 63 Personen zusammen, die entweder infolge einer Schenkelhalsfraktur bzw. pertrochantären Fraktur (AO-Klassifikation 31-A/B) in der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie operativ mittels Gammanagel oder Totalendoprothese (TEP) behandelt wurden oder anlässlich einer Arthrose des Hüftgelenks eine TEP in der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie bekamen. Die Patienten wurden alle sowohl mündlich als auch schriftlich über die geplante Studie aufgeklärt. Mit der Einwilligung zur Teilnahme haben alle Patienten eine Einverständniserklärung unterschrieben. Auch mussten alle Patienten Fragen nach Alter, Größe, Gewicht, der aktuellen Diagnose und Erkrankungen der letzten drei Monate beantworten. Des Weiteren wurden die Patienten gebeten anzugeben, ob sie

Raucher sind, an Diabetes mellitus leiden oder eine bereits bekannte Osteoporose haben beziehungsweise eine DEXA-Messung vorweisen können. Um an der Studie teilnehmen zu können, mussten die Probanden als Einschlusskriterium ein Alter über 50 Jahre vorweisen. Ausschlusskriterien waren eine Hormonersatztherapie in den letzten drei Monaten, Infektionskrankheiten, bösartige Tumore sowie gutartige Zysten des Ovars (außer Endometriome) und das Polyzystische Ovar-Syndrom (PCO). Zudem eine während der Operation entdeckte Inflammation des Beckenraumes sowie bekannte chronische, systemische, metabolische oder endokrine Erkrankungen des Patienten. Die Studie wurde vom lokalen Ethikkomitee der medizinischen Fakultät der Technischen Universität München genehmigt (Projektnummer 2413/09a) und nach der neuesten Version der Deklaration von Helsinki aus dem Jahre 2008 durchgeführt.

Den Patienten, die eingewilligt hatten, an der Studie teilzunehmen, wurde zunächst Blut abgenommen und dieses im Labor bis zur weiteren Verarbeitung gekühlt aufbewahrt. Die Proben aller eingeschlossenen Patienten wurden in zwei Gruppen aufgeteilt - eine Gruppe von Personen mit Osteoporose und eine Gruppe von Personen ohne Osteoporose (Kontrollkollektiv). Die Gruppierung in osteoporotische und nicht-osteoporotische Patienten basierte dabei primär auf klinischer, radiologischer und intraoperativer Einschätzung des Arztes sowie falls vorhanden dem Ergebnis einer bereits durch den Patienten vorweisbaren DEXA-Messung. Die endgültige Einteilung erfolgte anhand von während der Operation gewonnenem Knochenmaterial, welches einer Knochendichtemessung mittels q-CT unterzogen wurde.

Für den zum Start der Studie geplanten Array wurden zunächst 20 Serumproben verarbeitet. Aus diesen Proben wurden zwei Pools geschaffen, die jeweils aus Serumproben von 10 Osteoporotikern beziehungsweise 10 Nicht-Osteoporotikern stammten. Für die darauffolgenden Assays zur Validierung der hoch- bzw. runterregulierten miRNAs wurden weitere der bereits gesammelten Proben benutzt. Hierfür wurden Serumproben von je 30 Patienten mit und 30 Patienten ohne Osteoporose untersucht. Die Proben der Gruppe der Patienten mit Osteoporose setzte sich zusammen aus der

extrahierten miRNA von sieben Osteoporotikerinnen, deren Serum bereits für den Array verwendet wurde, sowie 23 weiteren Proben von Patientinnen mit Osteoporose. Das Kontrollkollektiv bestand aus zehn für den Array verwendeten Serumproben plus 20 weiterer Proben von Patientinnen ohne Osteoporose. Zur optimalen Vergleichbarkeit beider Gruppen entstammten die für den Array benutzten Serumproben nur von Frauen.

Der Assay, mit dem die Knochenproben evaluiert wurden, wurde anhand von 40 Knochenproben durchgeführt, die intraoperativ bei Entnahme des Hüftkopfes von je 20 Personen mit beziehungsweise 20 Personen ohne Osteoporose gewonnen wurden. Die Gruppierung erfolgte anhand von qCT-Messungen.

Die genauen demographischen Daten der eingeschlossenen Patienten können der Tabelle 1-7 (S.43), Tabelle 1-8 (S.44) und Tabelle 1-9 (S.44) entnommen werden.

	Patienten mit Osteoporose	Gesunde Kontrollen
eingeschlossene Probanden (N)	10	10
Durchschnittsalter (Spanne)	79,3 (66-89)	78,8 (67-91)
Body mass index $\pm$ SD	24,7 $\pm$ 4,3	25,4 $\pm$ 4,4
Geschlecht (m:w)	3:7	0:10
Knochendichte (mg/cm <sup>3</sup> ) $\pm$ SD	75,1 $\pm$ 12,3	203,0 $\pm$ 38,1

**Tabelle 1-7:** Demographische Daten der Probanden, deren Serum im Array verwendet wurde.

	Patienten mit Osteoporose	Gesunde Kontrollen
eingeschlossene Probanden (N)	30	30
Durchschnittsalter (Spanne)	78,3 (57-92)	76,6 (57-94)
Body mass index $\pm$ SD	24,2 $\pm$ 3,9	26,5 $\pm$ 5,4
Geschlecht (m:w)	0:30	0:30
Knochendichte (mg/cm <sup>3</sup> ) $\pm$ SD	76,8 $\pm$ 8,5	207,6 $\pm$ 51,2

**Tabelle 1-8:** Demographische Daten der Probanden, deren Serum im Assay zur Validierung verwendet wurde.

	Patienten mit Osteoporose	Gesunde Kontrollen
eingeschlossene Probanden (N)	20	20
Durchschnittsalter (Spanne)	80,5 (66-92)	73,3 (51-92)
Body mass index $\pm$ SD	23,3 $\pm$ 3,8	26,8 $\pm$ 4,8
Geschlecht (m:w)	0:20	11:9
Knochendichte (mg/cm <sup>3</sup> ) $\pm$ SD	81,9 $\pm$ 19,8	219,7 $\pm$ 53,6

**Tabelle 1-9:** Demographische Daten der Probanden, deren Knochen im Assay zur Validierung verwendet wurde.

## 7.2.2 Zellkultur humaner Osteoblasten und Osteoklasten

Mittels Luer-Knochenzange wurde unter sterilen Kautelen Spongiosa aus den Femurköpfen extrahiert, welche den Probanden zuvor im Rahmen des Einsatzes einer TEP entnommen wurden. Diese Femurköpfe wurden idealerweise innerhalb von 24 Stunden nach Entnahme weiterverarbeitet,

nachdem sie in einem sterilen Gefäß aus dem OP ins Labor transportiert wurden. Die gewonnene Spongiosa wurde in Petrischalen aufgefangen, die mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) befüllt waren. Die Knochenstücke wurden mithilfe von Zange und Skalpell weiter verkleinert, bis sie eine Größe von ca. 3-5 mm aufwiesen. Anschließend wurde das PBS der Zellkulturschale vorsichtig aspiriert und das Knochenmaterial mittels Zange in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, welches wiederum mit 20 ml PBS gefüllt wurde. Das Ganze wurde mithilfe eines Vortexmischers für zehn Sekunden gründlich durchmischt. Danach wurde für ca. 30 Sekunden gewartet, bis sich die Knochenfragmente am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt hatten, um den Überstand an PBS vorsichtig aspirieren zu können. Es wurden ein weiteres Mal 20 ml PBS hinzugefügt und die ganze Prozedur vier bis fünf Mal wiederholt, bis der Überstand klar war und die Knochenstücke ein elfenbeinartiges Aussehen hatten. Diese Knochenfragmente wurden im Anschluss in Zellkulturflaschen transferiert, wobei ca. 10 ml des gewonnenen Materials auf eine 175 cm<sup>2</sup> große Zellkulturflasche kamen. Jede Flasche wurde mit 20 ml Osteoblastenmedium befüllt und die Knochenfragmente möglichst gut am Boden verteilt. Das verwendete Medium setzte sich zusammen aus 500 ml Minimum Essential Medium (MEM), 50 ml fötalem Kälberserum (FKS), 5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung (bestehend aus 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) sowie 25 mg L-Ascorbat-2-phosphat. Das Ganze wurde bei Bedingungen von 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für sieben Tage inkubiert. Nach sieben sowie nach 14 Tagen wurde das alte Medium je durch 20 ml frisches Osteoblastenmedium ersetzt. Anschließend erfolgte der Mediumwechsel zweimal wöchentlich. Nach ein bis zwei Wochen konnte das Herauswachsen der Osteoblasten aus den Knochenstückchen unter dem Mikroskop beobachtet werden. Als die Zellen auf dem Boden der Zellkulturflasche konfluierend zu wachsen schienen, konnte die erste Passage angelegt werden. Dafür wurden die Knochenfragmente mittels Auswaschen durch PBS entfernt und das Medium aspiriert. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit 20 ml PBS gewaschen und die Lösung dann vorsichtig wieder aspiriert. Den Zellkulturflaschen wurden nun 2-3 ml Trypsin/EDTA-Lösung hinzugefügt und das Ganze für sieben bis zehn Minuten bei 37 °C inkubiert, um die Ablösung der Zellen vom Boden der

Flasche hervorzurufen, was mithilfe des Mikroskops beobachtet werden konnte. Nachfolgend wurde die Trypsin/EDTA-Lösung durch Zugabe von 10 ml Osteoblastenmedium inaktiviert. Die Zellsuspension wurde wiederum in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und diese Lösung für zehn Minuten bei 650 x g zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand aspiriert und die am Boden konglomerierten Zellen mittels 30 ml Kulturmedium resuspendiert. Mithilfe einer Pipette wurde das Ganze noch einmal vorsichtig vermischt, um das Pellet aufzulösen. Neue 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen wurden nun mit den Zellen beimpft, um so die erste Passage zu generieren. Diese Prozedur wurde sooft wiederholt, bis schließlich die dritte Passage für weitere Experimente verwendet wurde. Dabei hatte die Kultur eine Dichte von 2 x 10<sup>4</sup> Zellen pro cm<sup>2</sup>.

Für die Generierung von Osteoklasten mussten zunächst Monozyten (PBMCs) aus dem Vollblut der Patienten isoliert werden. Dafür wurde ein Reaktionsgefäß mit je 30 ml EDTA-Blut des Probanden sowie mit 20 ml Lymphozyten-Separationsmedium (LSM) befüllt, welches einen Dichtegradienten zur Trennung von Zellen und anderen Bestandteilen erstellt. Bei 1000 x g wurde das Ganze für 20 Minuten bei 22 °C zentrifugiert, bis sich die zellulären Bestandteile des Blutes in verschiedene Phasen auftrennten. Benötigt wurde die Interphase, welche Lymphozyten und Monozyten enthielt, und mittels Pipette einem neuen Reaktionsgefäß zugeführt wurde. Es wurden weiterhin 40 ml PBS hinzugefügt und die Zellsuspension bei 650 x g für zehn Minuten bei 22 °C zentrifugiert. Um an das Pellet heranzukommen, wurde der Überstand nach Zentrifugation aspiriert und das Zellkonglomerat ein weiteres Mal mittels 40 ml PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das gewonnene Pellet weiterverarbeitet. Das nächste Ziel war es, die Monozyten von den Leukozyten mittels magnetischer Zellseparation (Magnetic Cell Separation, kurz MACS) zu trennen. Mithilfe von magnetischen Mikrokügelchen (MicroBeads), an welche CD14-Antikörper gebunden sind, können so pure Zellpopulation erhalten werden. Das Pellet wurde mittels PBS und EDTA resuspendiert. Die genaue Zellzahl wurde mittels Hämozytometer bestimmt und so die Anzahl an MicroBeads berechnet, die für die Zellsuspension benötigt wurden. Pro 1 x 10<sup>8</sup> Zellen wurden 200 µl humaner

CD14 MicroBeads verwendet sowie 800 µl PBS und EDTA. Dabei durften pro Säule maximal  $1 \times 10^8$  Zellen verwendet werden. Wurden für einzelne Proben mehr Zellen gezählt, so wurden die Mono- und Leukozyten noch einmal resuspendiert und weniger µl der Suspension verwendet. Die fertige Suspension, bestehend aus Mono- und Leukozyten sowie CD14-Mikrobeads und PBS + EDTA, wurde auf eine MACS-Säule geladen, die in ein magnetisches Feld eines MACS-Separators platziert wurde. Die durch die CD14-MicroBeads magnetisch geladenen Monozyten, welche an ihrer Oberfläche das Glykoprotein CD14 tragen, wurden so in der Säule festgehalten und von den Leukozyten getrennt. Nach Verwerfen der sich im Reaktionsgefäß befindenden unmarkierten Leukozyten wurden die Monozyten mithilfe von PBS und EDTA aus der Säule gelöst und in einem neuen Reaktionsgefäß aufgefangen. Die Monozyten wurden wiederum mithilfe des Hämozytometers ausgezählt und insgesamt  $1 \times 10^6$  Zellen pro Well auf einer 24-Well-Platte ausplattiert. Für die Differenzierung wurden die gewonnenen Monozyten die ersten sechs Tage mit Osteoklasten-Kulturmedium kultiviert. Dieses bestand aus  $\alpha$ -MEM, 10% FKS, 2% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin und 5 pg/ml M-CSF. Das Medium wurde an Tag eins und Tag vier gewechselt. Anschließend wurde Medium verwendet, welches anstelle von M-CSF RANKL enthielt. Im Folgenden konnte die Differenzierung zu Osteoklasten beobachtet werden. Mit den Versuchen wurde an Tag 14 der Kultur begonnen.

### **7.2.3 Bestimmung der Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten**

Um die Aktivität der gewonnenen Osteoblasten zu bestimmen, wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) gemessen (vgl. 5.1.5.2, S.18). Dazu wurden die zuvor gewonnenen Osteoblasten in der dritten Passage nach Aspiration des Kulturmediums zunächst zweimal mit PBS gewaschen, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Osteoblasten für 30 Minuten bei 37 °C mit para-Nitrophenylphosphat (pNPP)-Puffer inkubiert, der 0,2 % 4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat,

50 mM Glycin, 1 mM  $MgCl_2$  und 100 mM TRIS enthielt und einen pH-Wert von 10,5 aufwies. Das Reaktionsgemisch wurde im Anschluss daran auf eine 96-Well-Platte pipettiert, welche darüber hinaus eine Negativkontrolle ohne Zellen enthielt. Das durch das in den Osteoblasten enthaltene Enzym alkalische Phosphatase gebildete 4-Nitrophenol wurde mittels Fluorometer bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen und die genaue Menge von AP mithilfe einer Standardkurve errechnet.

Die berechnete Konzentration musste nun noch durch den Proteingehalt der Zellen geteilt werden, um die Aktivität der AP auf die relative Zellzahl normieren zu können. Der Proteingehalt wurde durch Färbung mit Sulforhodamin B (SRB) bestimmt. SRB bindet an zelluläre Proteine und kann so zur Berechnung der Zelldichte herangezogen werden. Dazu wurden die Osteoblasten zunächst mit PBS gewaschen und anschließend in einer 96-Well-Platte mit Methanol und SRB-Lösung bedeckt, die neben Sulforhodamin noch verdünnte einprozentige Essigsäure enthielt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde die SRB-Lösung wieder von den Zellen entfernt. Das zellgebundene SRB wurde zur Quantifizierung mithilfe von 10 mM ungepufferter TRIS Lösung entfernt und dessen spezifische Absorption bei 565 nm gemessen. Anschließend musste hiervon noch die Absorption der 96-Well-Platte abgezogen werden, welche bei 690 nm gemessen wurde. Die Zellzahl konnte nun graphisch bestimmt werden, da sich bei optischen Dichtegradienten von 1-200 % die Ergebnisse der SRB-Färbung linear zum Proteingehalt der Zellen verhalten. Die Trendlinie konnte nun herangezogen werden, um das erhaltene Dichtesignal auf den Proteingehalt herunterzurechnen.

Das Enzym tartratresistente alkalische Phosphatase (TRAP) wiederum wird als wichtiger zytochemischer Marker für Osteoklasten angesehen. Um dessen Aktivität bei Patienten mit Osteoporose von gesunden Kontrollen abzugrenzen, wurde auf einer 96-Well-Platte zu 50  $\mu$ l Überstand der Osteoklasten an Tag 14 der Kultur (s.o.) 150  $\mu$ l Substrat-Pufferlösung mit einem pH von 5,5 hinzugefügt. Diese bestand aus 5 mM 4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat in einem Puffer aus 100 mM Natriumacetat und 50 mM di-Natriumtartrat Dihydrat. Es wurde mit Triplets

gearbeitet. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 3M NaOH gestoppt. Bei 405 nm wurde sofort im Anschluss die jeweilige Absorption gemessen und die durchschnittliche Absorption der Triplets bestimmt. Die Absorption der Negativkontrolle im Sinne eines Kulturmediums ohne Zellen wurde weiterhin davon abgezogen. Die genaue Aktivität der TRAP wurde anhand einer zuvor vorbereiteten Standardkurve berechnet. Das gemessene Signal wurde auf die Proteinkonzentration der Zellen normiert, welche durch die Methode nach Lowry bestimmt worden war. Diese basiert auf zwei Reaktionen. Zuerst bilden Kupfer(II)ionen einen blauen Komplex mit Peptidbindungen. Im zweiten Schritt werden diese Kupfer(II)ionen zu Kupfer(I)ionen reduziert, welche wiederum das gelbe Folinreagenz zu Molybdänblau reduzieren, das mittels Photometer gemessen werden kann. Es wurde wiederum in Triplets auf einer 96-Well-Platte gearbeitet. Diese wurde mit je 2 µl bovinem Serumalbumin (BSA) mit einer Konzentration von 10 µg/µl und den Proben befüllt. Es wurden je 150 µl Lösung hinzugefügt, welche aus di-Natriumtartrat Dihydrat, CuSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1M NaOH und ddH<sub>2</sub>O frisch hergestellt wurde. Das Ganze wurde bei Raumtemperatur (RT) für zehn Minuten inkubiert und schließlich Folin-Reagenz hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei RT wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 750 nm und dem entsprechenden Programm gemessen. Mittels Standardkurve konnte so die Proteinmenge berechnet werden.

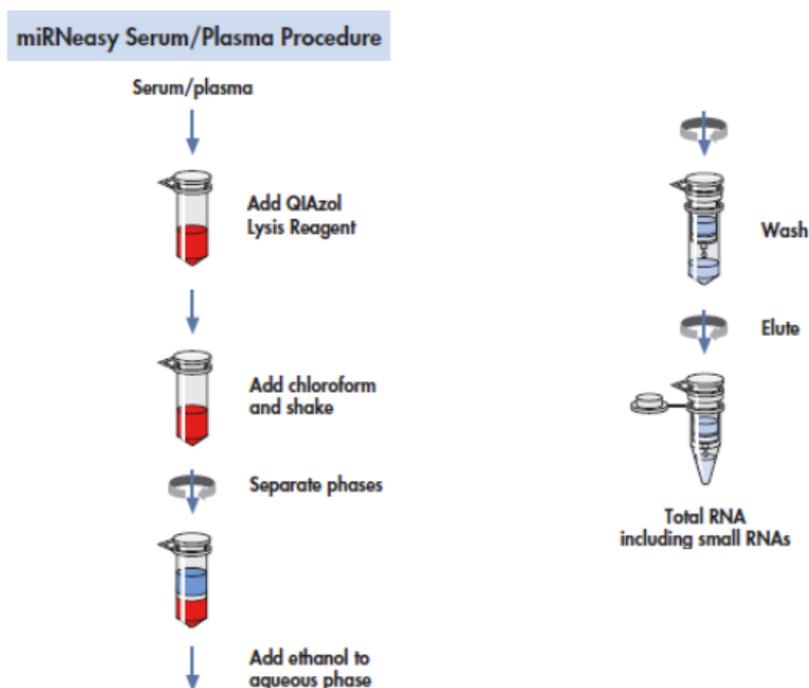
### **7.2.4 Isolierung von miRNA aus Blutserum und reverse Transkription in cDNA**

Die miRNA wurde nach Anleitung mit dem miRNeasy Serum/Plasma Kit aus den gewonnenen Serumproben isoliert. Das Prinzip des Kits gründet auf einer Auflösung der Proben durch ein Phenol-Guanidin-Thiocyanat, wodurch Proteinkomplexe und RNAsen denaturiert werden, und dem anschließenden Herausfiltern der gesamten RNA mittels Siliciumdioxidmembran (Abbildung 2-1, S.51).

Zur Gewinnung des Blutserums wurden die Serumröhrchen für zehn Minuten bei 1900 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in neue Röhrchen pipettiert. Das Ganze wurde ein weiteres Mal für zehn Minuten bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde der klare Überstand aller jeweiligen Proben in einem Reaktionsgefäß zusammengefasst und nach kurzer Durchmischung aliquotiert. Die Aliquots wurden bis zu Beginn der Isolierung bei -80 °C gelagert.

Für die Isolierung wurden 200 µl des erhaltenen Überstandes, welcher zuvor bei RT aufgetaut war und nochmals bei 16000 x g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert wurde, mit 1000 µl des im Kit enthaltenen QIAzol Lysis Reagents vermischt und für fünf Minuten bei RT inkubiert. Anschließend kamen 200 µl Chloroform hinzu sowie 3,5 µl Spike-In Control, die als Normalisierungskontrolle diente und  $1,6 \times 10^8$  Kopien/µl der *C. elegans* miR-39 miRNA enthielt. Nach zweiminütiger Inkubation bei RT und Zentrifugation bei 12000 x g und 4 °C für 25 Minuten wurde die obere wässrige Phase, welche nun nur noch RNA enthielt, in ein neues 2 ml Röhrchen transferiert und 900 µl 96 %iger Ethanol hinzugegeben, um ideale Bedingungen zur Bindung für RNA Moleküle von einer ungefähren Größe von 18 Nukleotiden und mehr zu schaffen. Von dieser Mischung wurden 700 µl auf eine RNeasy MinElute Spin Säule gegeben. Das Ganze wurde zentrifugiert und der mittels 2 ml Röhrchen aufgefangene Durchfluss verworfen. Die Prozedur wurde mit dem Rest der Probe wiederholt, bis diese komplett aufgebraucht war. Zwei unterschiedliche im Kit erhaltene Puffer (RWT und RPE) wurden nun jeweils hintereinander auf die Säule gegeben und der Durchfluss wiederum verworfen. Zuletzt wurden 500 µl 80 %iger Ethanollösung auf die Säule gegeben, das Ganze für zwei Minuten bei 8000 x g und RT zentrifugiert und die Säule dann auf ein neues 2 ml Auffanggefäß aufgesetzt. Dieses wurde bei offenem Deckel und voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Nachdem die Säule ein weiteres Mal auf ein neues 1,5 ml großes Auffanggefäß platziert wurde, konnten 14 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran der Säule pipettiert werden. So wurde die RNA eluiert und die Probe konnte nach Zentrifugation bei -80 °C aufbewahrt werden (Qiagen February 2012).

Anschließend wurde die gesamte aus dem Serum gewonnene miRNA mithilfe des miScript II RT Kits in cDNA umgeschrieben (Abbildung 2-2, S.54). Dazu wurden je 1,5 µl jeder miRNA-Probe zusammen mit einem Master Mix in einem PCR Reaktionsgefäß kurz zentrifugiert. Dieser enthielt pro 1,5 µl miRNA-Probe 4,0 µl "HiSpec Buffer", 2,0 µl "Nucleics Mix", 10,5 µl Aqua ad iniectionabilia und 2,0 µl Reverse Transcriptase Mix. Die miRNA wurde im Anschluss mittels Poly(A)-Polymerase polyadenyliert und durch die reverse Transkriptase mithilfe eines Oligo-dT-Primers in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden die Proben anhand eines speziellen Programms im Mastercycler® pro inkubiert. Dieses setzte sich zusammen aus einer Inkubation von 60 Minuten bei 37 °C gefolgt von fünf Minuten bei 95 °C. Anschließend wurden die Proben im Rahmen des Programmes auf 4 °C heruntergekühlt. Zu den 20 µl gewonnener cDNA wurden 200 µl Aqua ad iniectionabilia gegeben und alles bei -20 °C gelagert.



**Abbildung 2-1:** Isolierung der miRNA aus den Serumproben mittels miRNeasy Serum/Plasma Kit von QIAGEN (miRNeasy Serum/Plasma Handbook Feb. 2012)

## 7.2.5 RNA-Gewinnung aus dem Knochen und reverse Transkription in cDNA

Um miRNA aus dem erhaltenen Knochenmaterial zu isolieren, wurde dieser zunächst unter Zuhilfenahme von flüssigem Stickstoff mit einer Knochenmühle gemahlen und anschließend die RNA mittels TRI-Reagent und Chloroform extrahiert. Die Spongiosa der Proben wurde hierfür jeweils mit 20 ml flüssigem Stickstoff in einem Mörser zusammengebracht. Somit konnte der Knochen mittels Stößel zerkleinert werden. Das so gewonnene Knochenpulver wurde in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1000 µl TRI-Reagens zusammengebracht. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten auf Eis kamen 200 µl Chloroform hinzu. Nach Durchmischung mittels Vortexmischer wurde das Ganze für zehn Minuten wiederum auf Eis inkubiert. Die Mischung wurde anschließend für zehn Minuten bei 14000 x g und 4 °C zentrifugiert und die wässrige RNA enthaltende Phase in einem neuen Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol vermischt. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten auf Eis sowie anschließender Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen. Das erhaltene RNA Pellet wurde mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und im Anschluss für zehn Minuten bei 14000 x g und 4 °C zentrifugiert. Diese Prozedur wurde ein weiteres Mal wiederholt. Nach Abgießen des Überstandes wurden die Reaktionsgefäße bei offenem Deckel kopfüber auf ein Papiertuch zum Trocknen gestellt, damit das restliche Ethanol verdampfen konnte. Daraufhin wurde das Pellet mittels Aqua ad iniectabilia resuspendiert. Mit einem Photometer wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm respektive 280 nm sowohl die Menge als auch Reinheit der isolierten RNA überprüft.

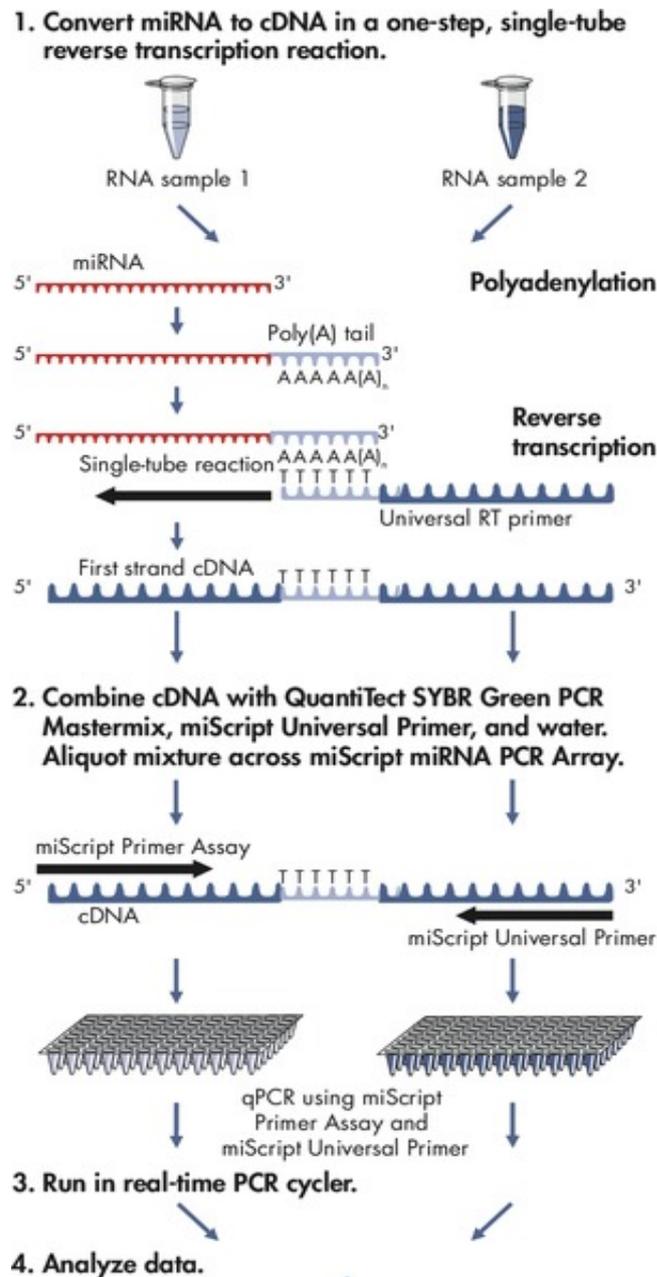
Für die Genexpressionsanalyse der Knochenproben wurde die extrahierte RNA mittels First Strand cDNA Synthesis Kit in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Synthese beruhte auf dem gleichen Prinzip wie bei dem zuvor verwendeten Kit von Qiagen. Die aus dem Knochen gewonnene RNA wurde mittels Poly(A)-Polymerase polyadenyliert und durch das Enzym Reverse Transkriptase anhand eines Oligo-dT-Primers in Einzelstrang-cDNA umgeschrieben. Es wurden je 9 µl RNA mit 2 µl eines Mixes bestehend aus

oligo(dT)<sub>18</sub> Primer und einem Random Hexamer Primer im Thermocycler für fünf Minuten bei 65 °C inkubiert und anschließend durch ein voreingestelltes Programm auf 4 °C heruntergekühlt. Nach diesem Schritt wurden je 9 µl pro Well eines weiteren Reaktionsmix hinzugegeben, der Reaktionspuffer, RiboLock™ RNase Inhibitor, dNTP Mix und M-MuLV Reverse Transkriptase enthielt. Die Inkubation im Thermocycler wurde fortgeführt, diesmal für 60 Minuten bei 37 °C und fünf Minuten bei 70 °C sowie zum Abschluss einer Kühlung auf 4 °C. Die Proben wurden anschließend mit Aqua ad iniectabilia verdünnt und bei -20 °C gelagert.

### **7.2.6 Quantitative real-time PCR zur Bestimmung regulierter miRNA**

Mit den zwei Pools der aus dem Blutserum gewonnenen Proben wurde jeweils der Human Serum & Plasma miRNA PCR Array MIHS-106Z durchgeführt. Dieser ermöglichte es durch die enthaltenen Primer Assays 83 verschiedene miRNAs zu untersuchen. Das Expressionslevel jeder einzelnen miRNA wurde im Anschluss durch qPCR bestimmt. Es wurde zunächst ein Reaktionsmix mittels miScript SYBR Green PCR Kit vorbereitet, der neben 100 µl des jeweiligen cDNA-Pools noch 1375 µl QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 275 µl miScript Universal Primer und 1000 µl RNase freies Wasser enthielt. Je 25 µl dieses Mixes wurden pro Well auf die 96-Well-Platte des Arrays gegeben. Danach wurde die PCR im Thermocycler durchgeführt, um Kopien der jeweiligen cDNA-Sequenzen zu synthetisieren. Initial wurde hierfür bei 95 °C für 15 Minuten die im Master Mix enthaltene DNA Polymerase aktiviert. Danach folgten 40 vorprogrammierte Zyklen, die sich aus drei Schritten zusammensetzten: Der Denaturierung für 15 Sekunden bei 94 °C, um die doppelsträngige cDNA zu separieren, dem Abkühlen auf 55 °C für 30 Sekunden zur Bindung der Primer an die cDNA-Einzelstränge sowie der Extension für 30 Sekunden bei 70 °C zur Bildung des komplementären DNA-Stranges mittels Polymerase (Qiagen 2014) (Abbildung 2-2, S.54). Die Expressionslevel wurden anhand des Durchschnittswertes der Housekeeper

RNA-Moleküle SNORD96a und RNU6 mit der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode normiert und berechnet (Livak and Schmittgen 2001).



**Abbildung 2-2:** Ablaufplan des miRNA-Expressionsprofils. Nach Umschreibung der miRNA in cDNA durch die reverse Transkriptase werden die Expressionslevel der jeweiligen miRNAs mittels miScript SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) und qPCR bestimmt (SABiosciences 2000-12).

### 7.2.7 Validierung der regulierten miRNA

Zur Validierung der Ergebnisse des Arrays wurden die detektierten miRNAs mittels einzelner Assays untersucht. Hierfür wurde mit Duplikaten gearbeitet und das miScript SYBR Green PCR Kit und das CFX 96 Touch Real-Time PCR System verwendet. Pro Well wurden 50 µl eines durch das Kit vorgegebenen Reaktionsmixes benötigt, der sich aus QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, den spezifischen Primern, der cDNA-Matrize und RNase freiem Wasser zusammensetzte. Die Bedingungen der PCR-Zyklen entsprachen denen des Arrays. Die Quantifizierung der in cDNA umgeschriebenen miRNA erfolgte mittels SYBR Green. Dies wurde dadurch ermöglicht, dass SYBR Green an alle DNA-Doppelstränge während einer PCR-Reaktion bindet und dadurch fluoresziert. Ein erhöhter Gehalt an miRNA respektive cDNA führte somit zu einer intensiveren Fluoreszenz der Probe, welche nach jedem Zyklus gemessen wurde. Somit konnte eine Aussage über die Höhe der Konzentration gemacht werden. Nach dem letzten PCR-Zyklus wurde weiterhin eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Damit konnte die Reinheit und Spezifität der Proben bestimmt werden.

Neben den im Array hochregulierten miRNAs wurden auch miR-93 und miR-637 untersucht. Diese waren nicht im Array enthalten, jedoch laut Literatur zum Zeitpunkt der Studie mit der Knochenentwicklung assoziiert (Zhang et al. 2011, Yang et al. 2012). Die relativen Expressionslevel wurden wie oben beschrieben errechnet.

Auch in den 40 uns zur Verfügung gestandenen Knochenproben, die sich aus 20 Proben von Patienten mit Osteoporose sowie 20 Proben von Patienten ohne Osteoporose zusammensetzten (vgl. Tabelle 1-9, S.44), wurde die Expression der regulierten miRNAs aus dem Array bestimmt. Zudem wurden wiederum neben den regulierten miRNAs im Array auch der Gehalt an miR-93 und miR-637 im Knochen untersucht, um diesen mit dem im Serum vorhandenen Gehalt vergleichen zu können.

Um das diagnostische Potential der miRNAs im Serum zu evaluieren, wurden Grenzwertoptimierungs-Kurve (ROC-Kurven) verwendet. Dieses statistische Verfahren bietet eine valide Aussagekraft über die diagnostische Genauigkeit

der Signaldetektionen. Die Kurven wurden nach logarithmischer Umwandlung der relativen Expression der identifizierten miRNAs der für alle im Rahmen der Validierung verwendeten Proben analysiert. Zur Generierung der ROC-Kurven wurden die jeweiligen Grenzwerte der detektierten miRNAs in einem Diagramm verbunden, auf dessen X-Achse die Spezifität (100%-0%) und auf der Y-Achse die Sensitivität (0%-100%) aufgetragen waren. Die Kurve ergibt sich aus der Tatsache, dass Sensitivität und Spezifität sich für jeden angenommenen Grenzwert ändern. Anschließend wurde für jede regulierte miRNA die Fläche unter der Kurve (AUC) berechnet, um eine Aussage über seine Diskriminierungsfähigkeit zu machen. Je näher dieser Wert an 1 ist, desto besser eignet sich der Parameter für die klinische Diagnostik.

### **7.2.8 Identifizierung von Zielgenen der miRNAs und bioinformatische Analyse der Daten**

Für die zuvor validierten miRNAs wurden potentielle Zielgene durch die Generierung passender Zielstrukturen mithilfe der Software TargetScan Human V5.1 identifiziert. Diese Software ermöglicht es, Zielstrukturen vorherzusagen, indem sie auf Faktoren wie Homologie der Sequenzen, wahrscheinliche biologische Funktion und bestätigte Ziele zurückgreift. Die damit vorhergesagten Ziele wurden nach erhaltener Sequenz und der Aussicht auf Regulation der Genexpression mittels miRNA unter Zuhilfenahme eines Kontext-Scores angeordnet. Frühere Studien konnten zeigen, dass ein Kontext-Score kleiner -0,3 als biologisch relevant angesehen werden kann (Grimson et al. 2007). Vorausberechnete Ziele unserer miRNA wurden mit Ingenuity Pathway Assessment und Ingenuity Knowledgebase weiter analysiert. Diese Software ermöglichte es, die angesteuerten Gene der einzelnen miRNAs darzustellen (vgl. Abbildung 3-6, S.68).

## 7.2.9 Quantitative real-time PCR potentiell involvierter Gene

Zur Analyse potentieller miRNA assoziierter osteogener Marker wurden die transkribierten cDNAs der Knochenproben verwendet. Zur Untersuchung wurde mit EVAGreen und dem CFX96 Touch Real-Time PCR System von Bio-Rad gearbeitet. Die untersuchten Gene umfassten BMPR2, c-Fos, OSX, PDCD4, RANKL, RUNX2 und VCAN. Die genauen Sequenzen der Vorwärts- und Rückwärtsprimer können Tabelle 1-10 (S.57) entnommen werden. Die relative Expression der Gene wurde durch q-PCR bestimmt. Die Expressionslevel wurden normiert mithilfe von  $\beta$ -Tubulin und der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode (Livak and Schmittgen 2001).

	No.	Vorwärtsprimer 5'→3'	Rückwärtsprimer 5'→3'
BMPR2	NM_001204.6	GAGACGAGAGCAACAAGCTG	TCACCTATCTGTATACTGCTGCC
c-Fos	aus (Dulinska, Gil et al. 2005)	CACGACCATGATGTCTCGG	AGTAGATTGGCAATCTCGGT
RANKL	NM_033012.3	TCCCAAGTTCTCATACCCTGA	CATCCAGGAAATACATAACACTCC
RUNX2	NM_004348	AACTCAAGTCCCCCGCTCCC	TGGGCAACAGAGTCTGGCGA
OSX	NM_152860	CCCAGGCAACACTCCTACTC	GGCTGGATTAAGGGG AGCAAA
PDCD4	NM_014456.4	ACCCTGCAGATCCTGATAACT	TCCACTTCTAAGGGCGTCAC
VCAN	NM_004385.4	AATGCCGTCTGCAGGGTGCC	GGCCGCAAGCGACTGTTCT
$\beta$ -Tubulin	NM_001069.2	GAGGGCGAGGACGAGGCTTA	TCTAACAGAGGCAAACTGAGCACC

**Tabelle 1-10:** Sequenzen der verwendeten Primer für die osteogenen Marker BMPR2, c-Fos, RANKL, RUNX2, OSX, PDCD4, VCAN und  $\beta$ -Tubulin zur Untersuchung potentiell miRNA-assoziierter Gene.

## 7.2.10 Statistik

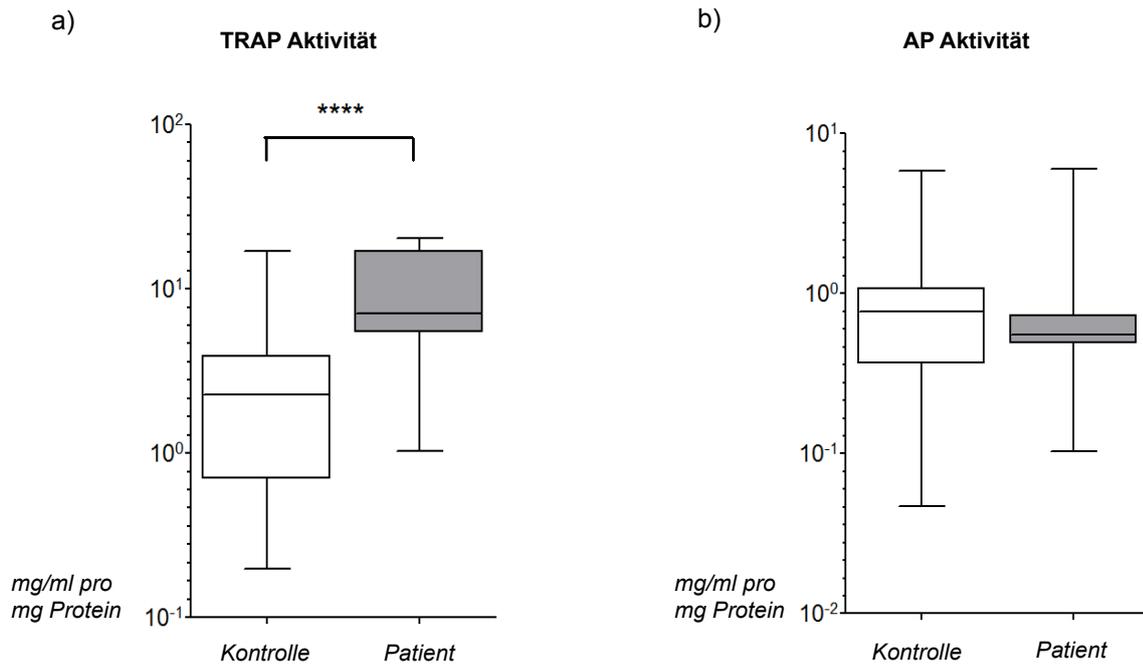
Die Ergebnisse für die Aktivität der Enzyme AP und TRAP sowie der regulierten miRNAs und aller untersuchten Gene wurden nach logarithmischer Umwandlung mittels Boxplots dargestellt. Hierbei sind die 25.,

50. und 75. Perzentile erkennbar, wobei die obere und untere Quartile die Box begrenzen und innerhalb der Box der Median erkennbar ist. Der größte bzw. kleinste Wert der Daten wird durch den oberen bzw. unteren Whisker begrenzt. Der zweiseitige Mann-Whitney U Test wurde zur Bestimmung der Signifikanz der unterschiedlich exprimierten miRNAs der Patienten mit Osteoporose im Vergleich zu der Gruppe ohne Osteoporose angewendet. Dafür wurde die Software GraphPad Prism verwendet. Um den diagnostischen Nutzen der detektierten miRNAs im Serum zu bestimmen wurde mit ROC-Kurven gearbeitet. Hierfür wurden die Daten logarithmisch umgewandelt. Zur Auswertung wurde der p-Wert herangezogen und die Grenzen mit der höchsten Sensitivität und Spezifität bestimmt. Als statistisch ausreichendes Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt.

## **8 Ergebnisse**

### **8.1 Charakterisierung von Zellen und Knochen osteoporotischer Patienten im Vergleich zum nicht-osteoporotischen Kontrollkollektiv**

Um die Aktivität der Osteoblasten beider Personengruppen mit und ohne Osteoporose zu untersuchen, wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase gemessen. Hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden (Abbildung 3-1b, S.60). Um die Aktivität der knochenresorbierenden Zellen von Patienten mit Osteoporose und der gesunden Kontrollgruppe zu vergleichen, wurde die Aktivität des Enzyms TRAP in den gewonnenen Osteoklasten bestimmt. Hierbei war eine signifikant ( $p < 0.0001$ ) um das 3,4-fach höhere Aktivität von TRAP in der Patientengruppe mit Osteoporose feststellbar (Abbildung 3-1a, S.60).

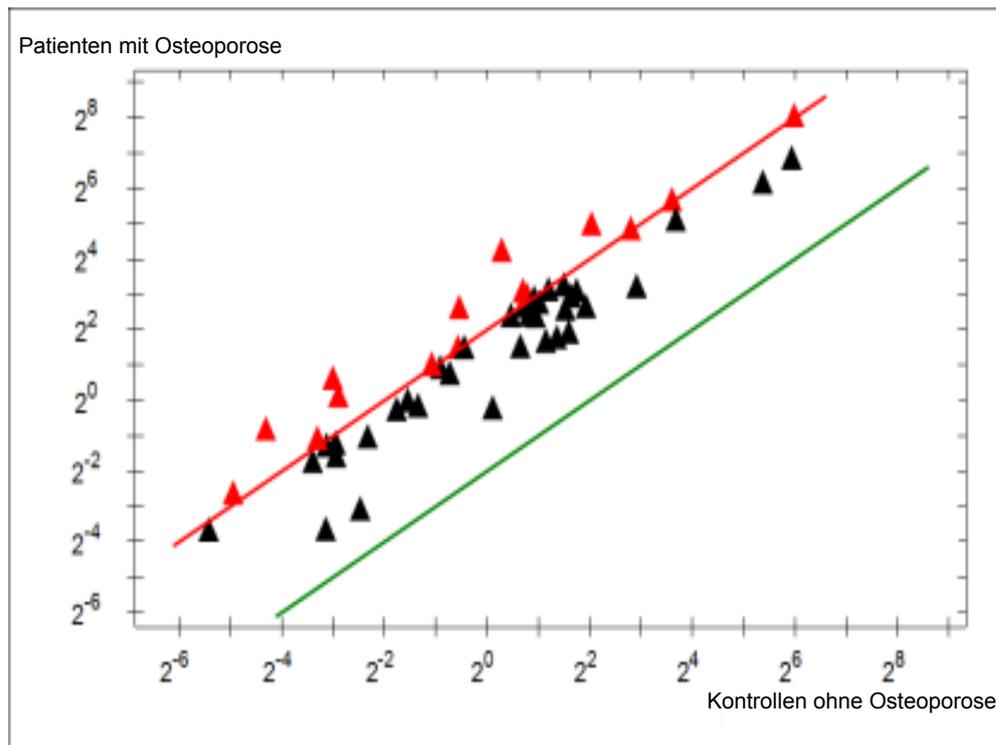


**Abbildung 3-1:** Höhere Aktivität der Osteoklasten bei Patienten mit Osteoporose. Die Menge an tartratresistenter alkalischer Phosphatase (TRAP) der Osteoklasten ist bei Patienten mit Osteoporose signifikant erhöht (a) mit \*\*\*\*  $p < 0.0001$  bei verwendetem zweiseitigem Mann-Whitney U Test. Die Menge an alkalischer Phosphatase (AP) der Osteoblasten weist zwischen beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied auf (b). Die beiden zu vergleichenden Gruppen bestehen jeweils aus Patienten mit Osteoporose (Patient; N=10) und Patienten ohne Osteoporose (Kontrolle; N=10). Auf der Y-Achse werden die Aktivitäten der jeweiligen Enzyme in mg/ml pro mg Protein der Osteoklasten bzw. Osteoblasten mittels Box-Plots angezeigt. Hierbei sind die 25., 50. und 75. Perzentile erkennbar, wobei die obere und untere Quartile die Box begrenzen und innerhalb der Box der Median erkennbar ist. Der größte bzw. kleinste Wert der Daten wird durch den oberen bzw. unteren Whisker begrenzt.

## 8.2 Identifizierung unterschiedlich exprimierter miRNAs im Serum von Patienten mit Osteoporose

Um herauszufinden, ob sich im Serum von Patienten mit Osteoporose im Vergleich zu Patienten ohne Osteoporose anders exprimierte miRNAs identifizieren lassen, wurden die extrahierten miRNA-Proben mit dem Human Serum & Plasma miRNA PCR Array analysiert. Dabei waren im Serum insgesamt 51 miRNAs der 83 im Array vorgegebenen detektierbar. Unter diesen waren im Serum von Patienten mit Osteoporose im Vergleich zur

gesunden Kontrollgruppe ohne Osteoporose 11 miRNAs signifikant hochreguliert. Es handelt sich hierbei um die miRNAs miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-24-3p, miR-25-3p, miR-27a-3p, miR-100-5p, miR-122-5p, miR-124-3p, miR-125b-5p, miR-148a-3p und miR-223-3p. Das Expressionsverhältnis der beiden Gruppen zueinander wurde berechnet und mittels Verteilungsdiagramm dargestellt (Abbildung 3-2, S.61).



**Abbildung 3-2:** miRNA Variation im Serum von Patienten mit und ohne Osteoporose. Die Dreiecke stehen für die detektierten miRNAs. Auf der X-Achse aufgetragen ist die relative Expression der gesunden Kontrollen ohne Osteoporose (N=10), auf der Y-Achse die relative Expression der Patienten mit Osteoporose (N=10). 11 miRNAs waren im Serum der Osteoporosegruppe im Vergleich zur gesunden Gruppe signifikant erhöht (mit  $p > 0,05$ , dargestellt durch alle roten Dreiecke, welche die rote Linie überschreiten bzw. die Tendenz dazu haben). Es fanden sich keine herunterregulierten miRNAs (Dreiecke mit Unterschreitung der grünen Linie).

Im Pool der Osteoporotiker war hierbei die miRNA miR-122-5p mit einer 15,79-fachen Expression am stärksten erhöht. Unter den untersuchten miRNAs waren keine herunterregulierten miRNAs detektierbar (Tabelle 2-1, S.62).

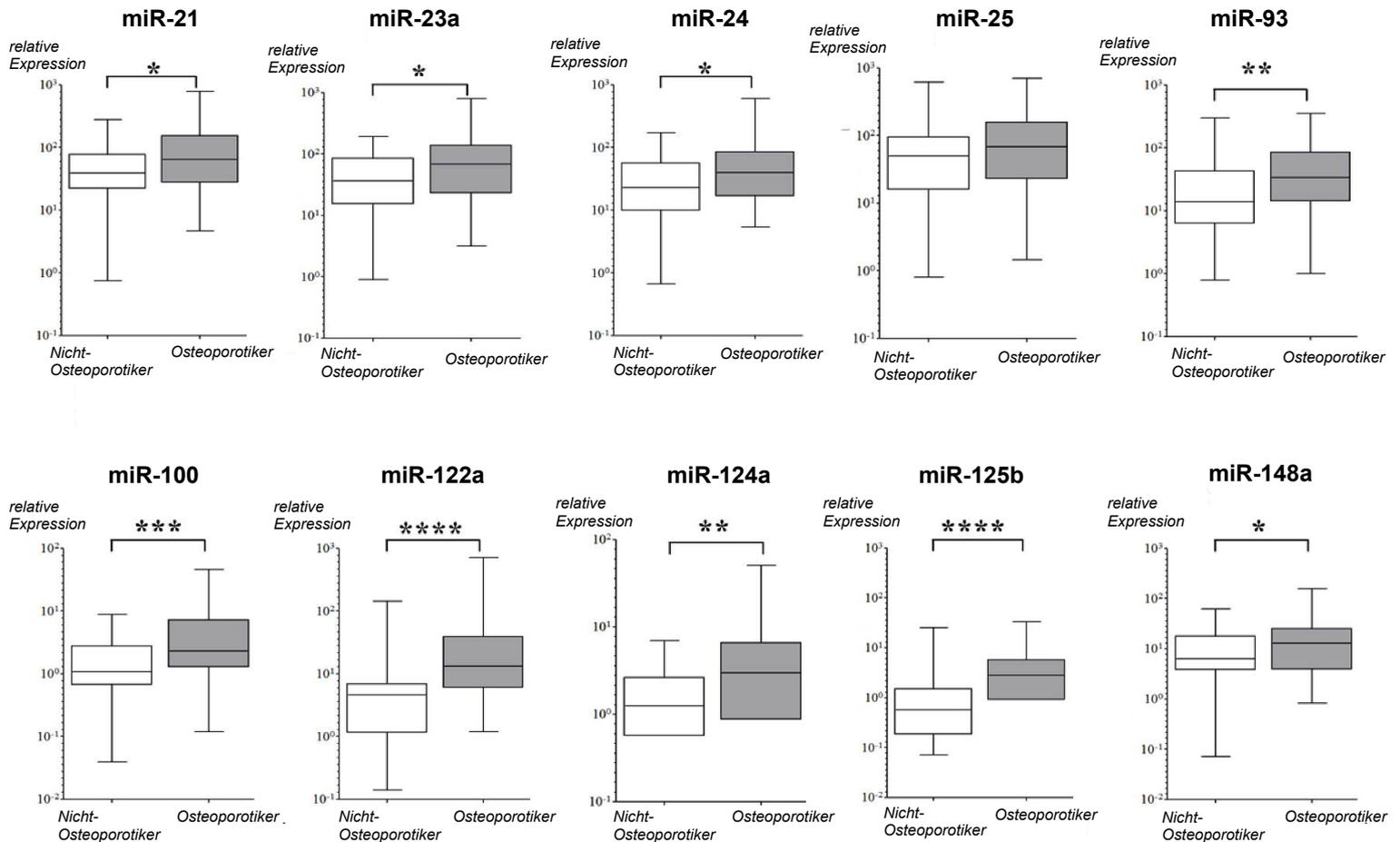
miRNA	Regulierung	Verhältnis	miRNA	Regulierung	Verhältnis
hsa-let-7a-5p	NS	-	hsa-miR-27a-3p	hochreguliert	4,60
hsa-miR-1	unbestimmt	-	hsa-miR-296-5p	unbestimmt	-
hsa-miR-100-5p	hochreguliert	8,26	hsa-miR-29a-3p	NS	-
hsa-miR-106b-5p	NS	-	hsa-miR-30d-5p	NS	-
hsa-miR-10b-5p	unbestimmt	-	hsa-miR-34a-5p	NS	-
hsa-miR-122-5p	hochreguliert	15,79	hsa-miR-375	unbestimmt	-
hsa-miR-124-3p	hochreguliert	11,35	hsa-miR-423-5p	NS	-
hsa-miR-125b-5p	hochreguliert	12,57	hsa-miR-499a-5p	unbestimmt	-
hsa-miR-126-3p	NS	-	hsa-miR-574-3p	NS	-
hsa-miR-133a	unbestimmt	-	hsa-miR-885-5p	NS	-
hsa-miR-133b	unbestimmt	-	hsa-miR-9-5p	unbestimmt	-
hsa-miR-134	unbestimmt	-	hsa-miR-92a-3p	NS	-
hsa-miR-141-3p	unbestimmt	-	hsa-let-7c	NS	-
hsa-miR-143-3p	NS	-	hsa-miR-107	unbestimmt	-
hsa-miR-146a-5p	NS	-	hsa-miR-10a-5p	unbestimmt	-
hsa-miR-150-5p	NS	-	hsa-miR-128	NS	-
hsa-miR-155-5p	unbestimmt	-	hsa-miR-130b-3p	NS	-
hsa-miR-17-5p/106a-5p	NS	-	hsa-miR-145-5p	NS	-
hsa-miR-17-3p	unbestimmt	-	hsa-miR-148a-3p	hochreguliert	9,12
hsa-miR-18a-5p	NS	-	hsa-miR-15a-5p	NS	-
hsa-miR-192-5p	NS	-	hsa-miR-184	unbestimmt	-
hsa-miR-195-5p	NS	-	hsa-miR-193a-5p	NS	-
hsa-miR-196a-5p	unbestimmt	-	hsa-miR-204-5p	unbestimmt	-
hsa-miR-19a-3p	NS	-	hsa-miR-206	unbestimmt	-
hsa-miR-19b-3p	NS	-	hsa-miR-211-5p	unbestimmt	-
hsa-miR-200a-3p	unbestimmt	-	hsa-miR-26b-5p	NS	-
hsa-miR-200b-3p	unbestimmt	-	hsa-miR-30e-5p	NS	-
hsa-miR-200c-3p	unbestimmt	-	hsa-miR-372	unbestimmt	-
hsa-miR-203a	unbestimmt	-	hsa-miR-373-3p	unbestimmt	-
hsa-miR-205-5p	unbestimmt	-	hsa-miR-374a-5p	NS	-
hsa-miR-208a	unbestimmt	-	hsa-miR-376c-3p	unbestimmt	-
hsa-miR-20a-5p	NS	-	hsa-miR-7-5p	NS	-
hsa-miR-21-5p	hochreguliert	7,88	hsa-miR-96-5p	unbestimmt	-
hsa-miR-210	NS	-	hsa-miR-103a-3p	NS	-
hsa-miR-214-3p	unbestimmt	-	hsa-miR-15b-5p	NS	-
hsa-miR-215	unbestimmt	-	hsa-miR-16-5p	NS	-
hsa-miR-221-3p	NS	-	hsa-miR-191-5p	NS	-
hsa-miR-222-3p	NS	-	hsa-miR-22-3p	NS	-
hsa-miR-223-3p	hochreguliert	4,25	hsa-miR-24-3p	hochreguliert	5,34
hsa-miR-224-5p	NS	-	hsa-miR-26a-5p	NS	-
hsa-miR-23a-3p	hochreguliert	4,23	hsa-miR-31-5p	unbestimmt	-
hsa-miR-25-3p	hochreguliert	4,25			

**Tabelle 2-1:** Regulierte miRNA bei Patienten mit Osteoporose (N=10) gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe ohne Osteoporose (N=10) im miRNA PCR Array. 11 miRNAs waren bei den Osteoporotikern signifikant hochreguliert (grau unterlegt). Alle weiteren miRNAs in den Proben konnten entweder nicht bestimmt werden bzw. überschritten den Schwellenwert und waren somit uninterpretierbar (NS) oder es konnte keine differierende Regulation der miRNA in beiden Proben festgestellt werden (unbestimmt).

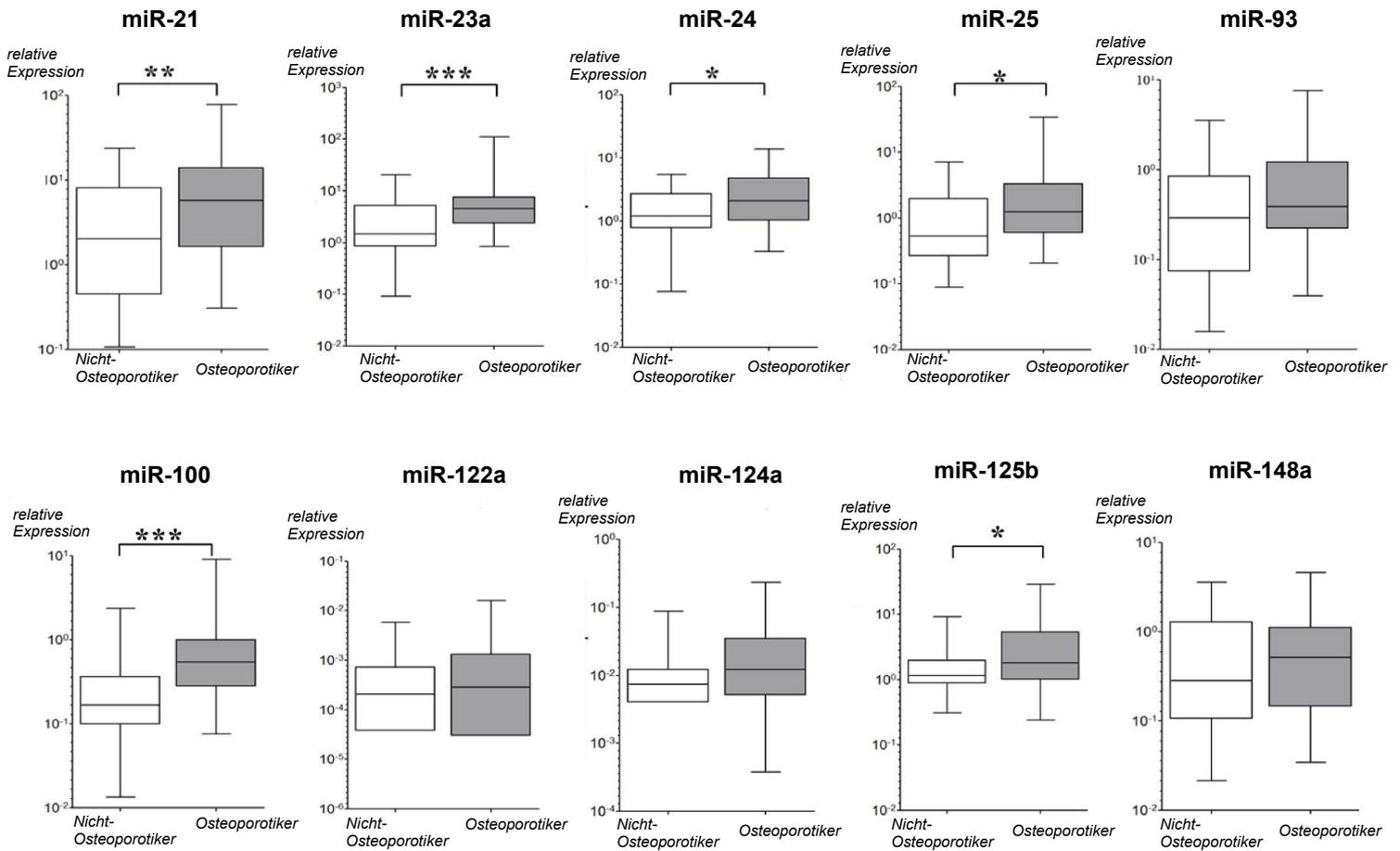
Um das Ergebnis der im Array hochregulierten miRNAs zu validieren, wurden weitere Proben einer größeren Kohorte analysiert. Dabei wurden neben den 11 hochregulierten miRNAs auch die miR-93 und miR-637 untersucht. Neun miRNAs waren hierbei signifikant erhöht bei Patienten mit Osteoporose im Vergleich zur Gruppe ohne Osteoporose. Diese miRNAs waren namentlich miR-21, miR-23a, miR-24, miR-93, miR-100, miR-122a, miR-124a, miR-125b und miR-148a. Die Expressionen der jeweiligen miRNA können der Abbildung 3-3 (S.64) entnommen werden. Auch die miRNA miR-25 war im Serum der Patienten mit Osteoporose erhöht, die Ergebnisse zeigten jedoch keine statistische Signifikanz.

### **8.3 Ermittlung regulierter miRNAs im Knochengewebe**

Von den untersuchten miRNAs im Serum konnten im Knochengewebe von Patienten mit Osteoporose sechs miRNAs mit einer signifikanten Hochregulierung identifiziert werden. Im Vergleich zum Knochenmaterial von Patienten ohne Osteoporose war die Expression von miR-21, miR-23a, miR-24, miR-25, miR-100 und miR-125b signifikant erhöht. Dabei zeigten miR-23a und miR-100 den größten Unterschied bei Osteoporotikern im Gegensatz zu Patienten ohne Osteoporose. Ohne statistische Signifikanz waren weiterhin miR-93, miR-122a, miR-124a und miR-148a erhöht (Abbildung 3-4, S.65). Wie auch schon in den getesteten Serumproben gab es keinen Anhaltspunkt für herunterregulierte miRNAs bei Osteoporotikern in Gegenüberstellung zur Kontrollgruppe ohne Osteoporose. Die miRNAs miR-21, miR-23a, miR-24, miR-100 und miR-125b waren sowohl im Serum als auch im Knochen von Patienten mit Osteoporose signifikant erhöht.



**Abbildung 3-3:** Unterschiedlich exprimierte miRNAs im Serum von Patienten mit Osteoporose (N=30) und gesunden Kontrollen ohne Osteoporose (N=30). Die relative Expression ist dargestellt mittels Boxplots. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001 für den Vergleich angezeigt im Mann-Whitney U Test.



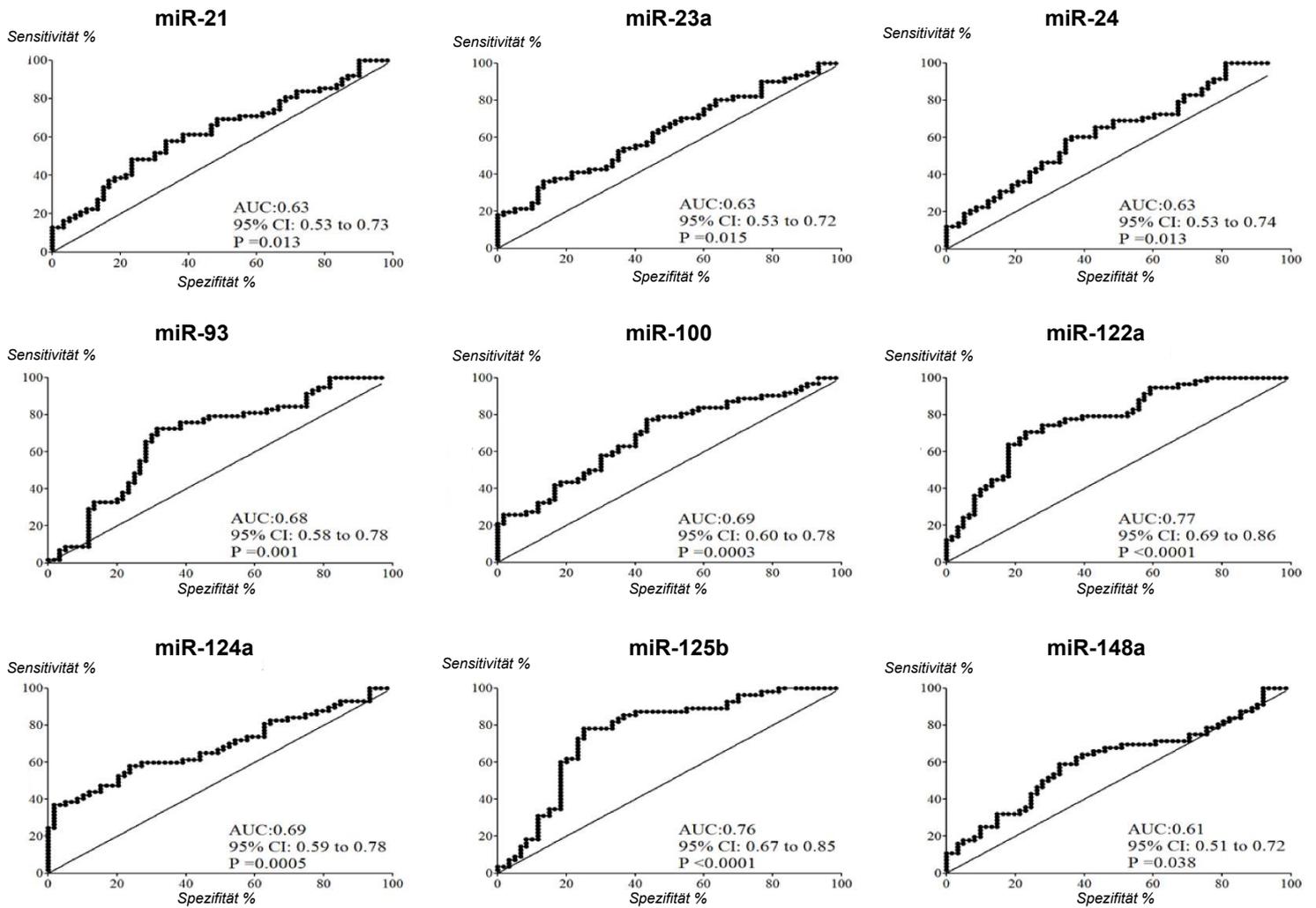
**Abbildung 3-4:** Im Knochen exprimierte miRNAs bei Patienten mit Osteoporose (Osteoporotiker; N=20) im Vergleich zu Kontrollen ohne Osteoporose (Nicht-Osteoporotiker; N=20). Die miRNAs miR-21, miR-23a, miR-24, miR-25, miR-100 und miR-125b waren im Knochengewebe der Osteoporotiker signifikant erhöht. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  im Vergleich ermittelt mit dem Mann-Whitney U Test.

## 8.4 Diagnostische Wertigkeit der miRNA Expressionen

Um den möglichen diagnostischen Nutzen der neun im Serum der Patienten mit Osteoporose signifikant hochregulierten miRNAs zu bewerten, wurde eine ROC-Kurven-Analyse durchgeführt und mit dem zugehörigen Flächeninhalt unter der Kurve (area under the curve, kurz AUC) gearbeitet. Wie der Abbildung 3-5 (S.67) entnommen werden kann, war die AUC bei miRNA-122a mit einem Wert von 0,77 die größte (95% Konfidenzintervall KI = 0,69-0,86,  $p < 0,0001$ ). Die AUC der übrigen miRNAs betrug 0,63 für miR-21 (95% KI = 0,53-0,73,  $p = 0,013$ ), 0,63 für miR-23a (95% KI = 0,53-0,73,  $p = 0,015$ ), 0,63 für miR-24 (95% KI = 0,53-0,74,  $p = 0,013$ ), 0,68 für miR-93 (95% KI = 0,58-0,78,  $p = 0,001$ ), 0,69 für miR-100 (95% KI = 0,60-0,78,  $p = 0,0003$ ), 0,69 für miR-124a (95% KI = 0,59-0,78,  $p = 0,0005$ ), 0,76 für miR-125b (95% KI = 0,67-0,85,  $p < 0,0001$ ) und 0,61 für miR-148a (95% KI = 0,51-0,72,  $p = 0,038$ ). In Tabelle 2-2 (S.66) können die Sensitivität und Spezifität der jeweiligen miRNAs eingesehen werden.

miRNA	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
miR-21	61,29	61,67
miR-23a	57,38	56,67
miR-24	60,34	60,35
miR-93	68,97	68,34
miR-100	62,90	61,67
miR-122a	74,14	72,14
miR-124a	61,40	61,02
miR-125b	76,36	75,00
miR-148a	62,50	62,30

**Tabelle 2-2:** Sensitivität und Spezifität der regulierten miRNAs bei optimalem Grenzwert.



**Abbildung 3-5: Diagnostische Wertigkeit der im Serum identifizierten miRNAs.** Je näher der Wert der AUC an 1 ist, desto besser eignet sich der Parameter für die klinische Diagnostik. Der höchste Wert findet sich für die miRNA-122a. AUC = area under the curve (Fläche unter der Kurve), CI = confidence interval (Konfidenzintervall).

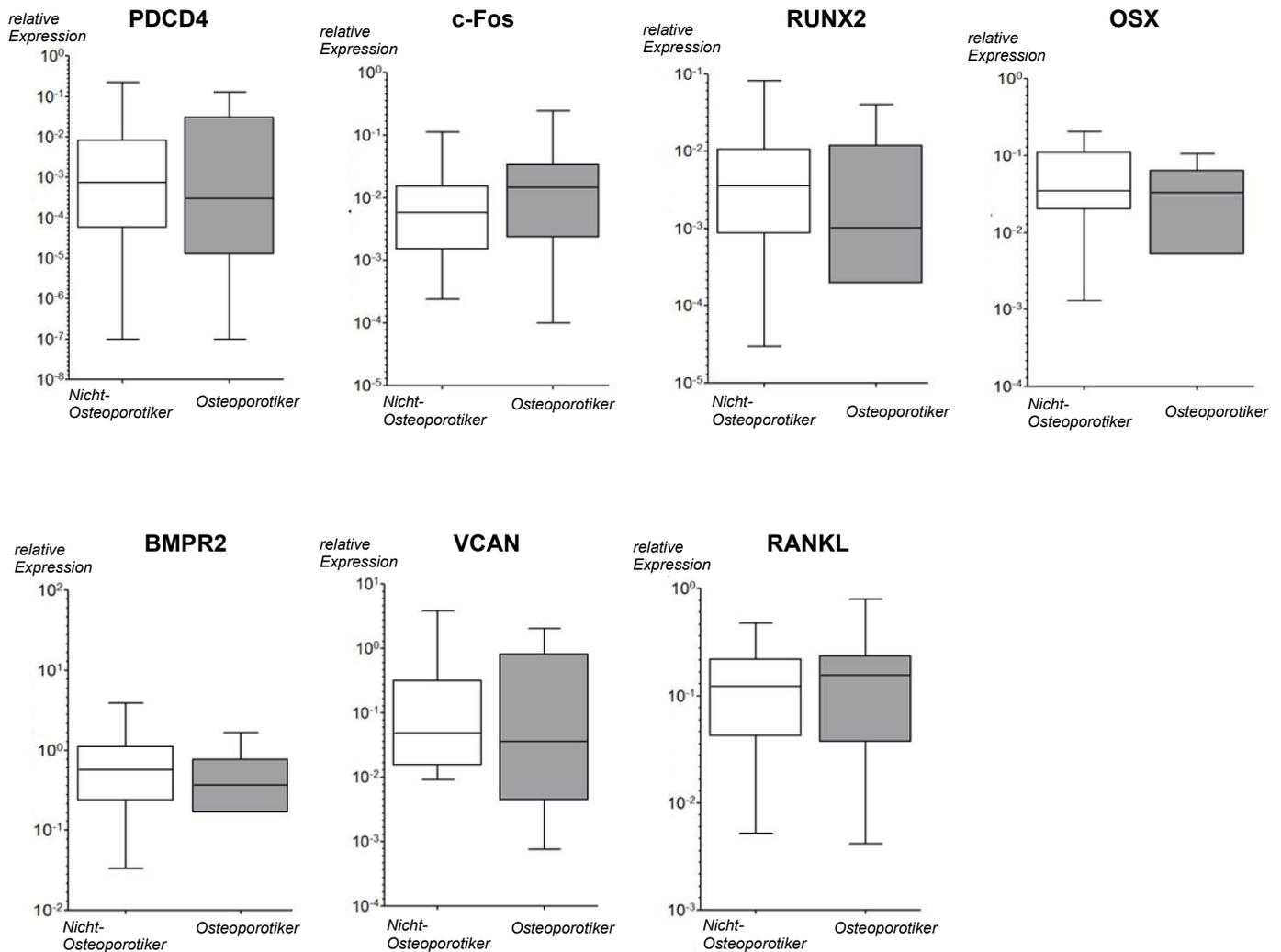


<b>miR-21</b>	Gewebemorphologie, embryonale Entwicklung, Entwicklung des Organismus, zelluläre Funktionen und deren Aufrechterhaltung, Zellinteraktion und Signalwege, Medikamentenmetabolismus.
<b>miR-23</b>	Entwicklung und Funktion des Skelett- und Muskelapparats, zelluläre Verständigung, Verletzung/Missbildung des Organismus, Zell- und Gewebemorphologie, zelluläre Anordnung und Organisation.
<b>miR-24</b>	Krebs, Immunerkrankungen, Zelltod und -überleben, neurologische Erkrankungen, Funktionsstörung des Skelett- und Muskelapparats, Gewebemorphologie.
<b>miR-93</b>	Zellwachstum und -proliferation, Zellinteraktion und Signalwege, Entwicklung des zentralen Nervensystems und dessen Funktion, embryonale Entwicklung, Organentwicklung und -morphologie.
<b>miR-100</b>	Entwicklung und Funktion des auditorischen und vestibulären Systems, Organmorphologie, embryonale Entwicklung, DNA Replikation/Rekombination/Reparatur, Entwicklungsstörung, renale Hypertrophie.
<b>miR-122</b>	Infektionskrankheiten, Erkrankungen des Hörapparats sowie Bindegewebes, Erbkrankheiten, Erkrankungen der Atemwege, Zellinteraktion und Signalwege.
<b>miR-124</b>	Fettstoffwechsel, molekularer Transport, Biochemie kleiner Moleküle, Energieproduktion, Gewebeentwicklung, Zellmorphologie und -bewegung.
<b>miR-125</b>	Erkrankungen des Bindegewebes, entzündliche Erkrankungen, posttranslationale Modifizierung, Zell-Signalwege, Proteinsynthese, zelluläre Funktionen und deren Aufrechterhaltung, Zellwachstum und -proliferation.
<b>miR-148</b>	Entwicklung und Funktion des auditorischen und vestibulären Systems, Organmorphologie, embryonale Entwicklung, Genexpression, Zelltod und -überleben, Zellentwicklung.

**Tabelle 2-3:** Funktionelle in silico Analyse der regulierten miRNAs mittels Ingenuity Pathway Assessment.

## **8.6 Zusammenspiel der identifizierten miRNAs mit Genen des Knochenstoffwechsels**

Um den Effekt der evaluierten miRNAs auf Gene, die im Rahmen des Knochenstoffwechsels eine Rolle spielen, zu beurteilen, wurden die Knochenproben beider Patientengruppen herangezogen. Für die Analyse wurden BMPR2, c-Fos, OSX, PDCD4, RANKL, RUNX2 und VCAN untersucht (Abbildung 3-7, S.71). Die Genexpression von BMPR2 war bei bestehender Diagnose Osteoporose vermindert im Vergleich zu Patienten, die keine Osteoporose hatten. Die Analyse ergab bei Osteoporotikern eine Hochregulierung von c-Fos im Vergleich mit der Kontrollgruppe ohne Osteoporose, OSX und PDCD4 hingegen wiesen eine Herunterregulierung auf. In der Gruppe der Osteoporotiker zeigte sich außerdem verglichen mit den Nicht-Osteoporotikern eine leichte Hochregulierung des Gens RANKL. Die Expression von RUNX2 war bei Patienten mit Osteoporose im Vergleich zu Nicht-Osteoporotikern herunterreguliert. Auch das Gen VCAN zeigte ein niedrigeres Expressionsmuster bei Osteoporotikern verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe ohne Osteoporose. Alle Ergebnisse wiesen jedoch keine statistische Signifikanz auf.



**Abbildung 3-7:** *Durch miRNA beeinflusste Gene des Knochenstoffwechsels.* Verglichen werden die Expression von PDCD4, c-Fos, RUNX2, OSX, BMPR2, VCAN und RANKL im Knochen von Patienten mit Osteoporose (Osteoporotiker; N=20) und ohne Osteoporose (Nicht-Osteoporotiker; N=20). Es gibt keine signifikanten Unterschiede im jeweiligen Expressionsmuster.

## 9 Diskussion

Beim Krankheitsbild der Osteoporose verursacht ein Ungleichgewicht zwischen knochenbildenden Osteoblasten und knochenresorbierenden Osteoklasten einen Umbau der Knochenmasse und -struktur, welche zu vermehrten Frakturen führen kann. Für ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden pathogenetischen Mechanismen der Osteoporose wurde diese Studie der Untersuchung spezifischer miRNA-Signalwege gewidmet.

Bei der Aktivität der alkalischen Phosphatase, ein von Osteoblasten gebildetes Enzym, welches einen Marker für die Knochenformation darstellt (Shen et al. 2015), gibt es keinen Unterschied zwischen der Gruppe der Osteoporotiker und der Kontrollgruppe ohne Osteoporose. Das Enzym TRAP, welches in großen Mengen in den Lysosomen der Osteoklasten vorkommt, ist ein etablierter zytochemischer Marker für die Bestimmung der Knochenresorption (Ballanti et al. 1997). Die deutlich höhere Aktivität dieses Enzyms in der Gruppe der Osteoporotiker macht die gesteigerte Knochenresorption bei Osteoporose deutlich. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass Monozyten, die Vorläuferzellen von Osteoklasten, bei Patienten mit Osteoporose eine erhöhte Migration in den Bereich des Knochens aufzeigen, in dem Knochenresorption stattfindet (Liu et al. 2005). Dies spricht für ein Ungleichgewicht zwischen der Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten bei Osteoporose zugunsten der Osteoklasten. Bereits Gruber et al. postulierten 1986, dass die individuelle Aktivität der Osteoklasten bei Frauen mit postmenopausaler Osteoporose größer ist als die der Osteoblasten (Gruber et al. 1986). Die erhöhte Knochenresorption durch Osteoklasten resultiert somit bei gleichbleibender Knochenformation durch Osteoblasten in einer verminderten Knochenmasse.

Diverse Studien deuten darauf hin, dass umfangreiche Wechselwirkungen zwischen lokalen und systemischen Regulatoren der Knochenfunktion eine Rolle in der Pathogenese der Osteoporose spielen (Zaidi 2007). 2002 zeigten Torricelli et al., dass von Osteoporotikern isolierte Osteoblasten eine geringere Proliferationskapazität aufweisen, unter normalen

Differenzierungsbedingungen jedoch im Vergleich zu Osteoblasten von Gesunden keinen Unterschied in ihrer Aktivität erkennen lassen (Torricelli et al. 2002). Diese Ergebnisse lassen weitere regulatorische Funktionen bei der Pathogenese der Osteoporose vermuten.

Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass bis dato die biomolekularen Mechanismen der Krankheit Osteoporose noch nicht ausreichend verstanden sind. Zur Verbesserung des Verständnisses der zugrundeliegenden pathogenetischen Grundlagen in Bezug auf die Knochenhomöostase sowie eine Erweiterung der diagnostischen Möglichkeiten bei Osteoporose stellt die Untersuchung von am Krankheitsprozess beteiligter miRNA einen wichtigen Schritt dar.

Es ist bewiesen, dass miRNAs in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen eine entscheidende Rolle spielen (Velu et al. 2012). Dies ist zum Beispiel für solide Tumoren wie das hepatozelluläre Karzinom (Ge et al. 2014), für die chronisch-lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ (B-CLL) (Calin et al. 2002) oder bei Diabetes mellitus Typ I (Takahashi et al. 2014) und Typ II beschrieben (Kong et al. 2011). Selbst zur Diagnostik des Herzinfarktes (Adachi et al. 2010) oder als Marker bei Frauen mit Risiko für eine Frühgeburt (Elovitz et al. 2014) werden miRNAs bereits erforscht. Für mit dem Knochen assoziierte Erkrankungen gibt es allerdings weiterhin Forschungsbedarf bezüglich veränderter miRNA-Signaturen, da hier bis dato nur sehr wenig bekannt ist. Gerade im Hinblick auf Osteoporose gibt es zum Zeitpunkt dieser Studie keine Hinweise auf eine Beteiligung von miRNA.

Im klinischen Alltag ist die Laboranalyse von Serummarkern eines der wichtigsten diagnostischen Hilfsmittel. Auch veränderte Level frei zirkulierender miRNAs bei Patienten mit Osteoporose könnten ihr großes Potential zur Früherkennung der Osteoporose offenbaren. Die Serumanalyse hätte mehrere Vorteile verglichen mit der gängigen DEXA-Messung. Zum einen ermöglicht ein Biomarker im Serum eine systemische Analyse und nicht nur die Messung der lokalen Knochendichte der Hüfte oder der Wirbelsäule, welche zudem mit einer Strahlenbelastung für den Patienten einhergeht. Zum anderen wäre eine auf der Untersuchung von miRNA basierende

Serumanalyse kosteneffizienter und die Handhabung der Proben wäre einfach, einschließlich der Abnahme der Blutprobe sowie ihre weitere Aufbereitung im Labor. Dadurch könnte der Patient öfter zur Blutentnahme gebeten werden und die miRNA als Serummarker zur Verlaufskontrolle dienen.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung spezifisch regulierter miRNAs im Serum von Patienten mit Osteoporose. Dabei haben sich veränderte Level zirkulierender miRNAs ergeben, die es ermöglichen könnten, Fälle von Osteoporose aufzudecken. Ferner waren fünf dieser erhöhten miRNAs auch im Knochen von Osteoporotikern detektierbar. Somit kann angenommen werden, dass die Dysregulation des miRNA-Gehaltes im Serum mit der Deregulierung der miRNA im osteoporotischen Knochen in Verbindung steht. Dies könnte eine Erklärung dafür darstellen, woher die zirkulierenden miRNAs stammen, und bildet die Grundlage für weitere Forschung auf dem Feld der Osteoporose. Das Ergebnis stellt eine gute Voraussetzung für die Entwicklung eines neuen Tests in der Diagnostik der Osteoporose dar. Um das Qualitätsmaß der jeweiligen signifikant hochregulierten miRNAs zu bewerten, wurden Grenzwertoptimierungskurven erstellt und die jeweilige AUC berechnet. Um einen Zufallsprozess auszuschließen, sollte die optimale AUC einen Wert zwischen 0,5 und 1 haben, was für alle neun von uns gemessenen miRNAs zutrifft. Da sich hierdurch mehrere miRNAs ergeben, die als diagnostischer Marker in Betracht kämen, könnte das Zusammenlegen von mehreren miRNAs die diagnostische Sicherheit noch weiter erhöhen. Bei optimalem Grenzwert ergibt sich die beste Sensitivität bzw. Spezifität für die miRNAs miR-93, miR-122a und miR-125b. Daher würde sich eine Untersuchung in diesem Triplet besonders eignen, um falsch positive Resultate auszuschließen.

Bisher gibt es nur wenige Studien bezüglich regulierter miRNAs bei Osteoporose. miR-133a und miR-422a werden als potentielle Biomarker bei postmenopausaler Osteoporose genannt, da diese in zirkulierenden Monozyten von zehn Frauen in der Postmenopause mit geringer Knochendichte erhöht waren (Wang et al. 2012, Cao et al. 2014). Mit dem von uns genutzten Array konnte miR-133a im Serum der Probanden nicht

detektiert werden, miR-422a war nicht im Array enthalten. Eine andere Studie verweist auf die Herunterregulierung von miR-21 bei Osteoporose durch Östrogenmangel, welche durch eine Supprimierung von TNF $\alpha$  erklärt wird (Yang et al. 2013). Wie auch schon in der zuvor genannten Publikation handelt es sich hierbei um die Untersuchung nur eines Zelltyps. In diesem Fall wurden mesenchymale Stammzellen im Mausmodell verwendet. Wir konnten hingegen im humanen Serum und Knochen von Patienten mit Osteoporose eine signifikante Erhöhung von miR-21 feststellen. Ein weiterer regulatorischer Effekt bestimmter miRNAs bei Osteoporose ist durch He et al. am Tiermodell beschrieben worden. Er identifizierte miR-10b, miR-22, miR-31 und miR-210, welche bei der Entwicklung von altersabhängiger Osteoporose im Knochen von Mäusen reguliert waren (He et al. 2013). Unsere Studie kann diese Ergebnisse nicht bestätigen, zumal es sich hierbei auch um eine andere Spezies handelt. Eine weitere Untersuchung postuliert den negativen regulatorischen Effekt von miR-141-3p auf die Differenzierung von Osteoblasten aus humanen mesenchymalen Stammzellen (Qiu and Kassem 2014). Diese miRNA konnte in unserem mit Serumproben durchgeführten Array ebenfalls nicht detektiert werden.

Zusammengenommen kann man sagen, dass in dieser Studie als Erste eine Hochregulierung verschiedener miRNAs im humanen Serum und Knochen identifiziert werden konnte. All diese hochregulierten miRNAs zielen auf verschiedene Gene ab, welche in der Organentwicklung oder biologischen Basisreaktionen wie z.B. Zellkommunikation, DNA-Replikation und Zelltod beziehungsweise -überleben eine Rolle spielen.

Bis auf zwei ist aktuell für alle von uns identifizierten hochregulierten miRNAs in der Literatur ein Einfluss auf die an der Knochenentwicklung beteiligten Zellen beschrieben. Ausnahmen bilden hierbei miRNA miR-25, welche in unserer Studie im osteoporotischen Knochen signifikant erhöht war, bisher aber nicht in Publikationen im Zusammenhang mit Osteogenese auftaucht. Überdies findet miR-122a, welche im Serum der Osteoporotiker erhöht war und insbesondere mit Hepatitis C in Verbindung steht (Lee et al. 2014), bis dato keine Erwähnung in Zusammenhang mit dem Knochenstoffwechsel.

Sugatani et al. zeigen 2011 den Einfluss von miR-21 auf die RANKL induzierte Osteoklastogenese. MiR-21 inhibiert das Protein PDCD4, was zur verminderten Hemmung von c-Fos führt. Dieser stellt einen wichtigen Transkriptionsfaktor für die Differenzierung von Osteoklasten dar. Zusätzlich erhöht RANKL-induziertes c-Fos die Level von miR-21 und führt somit zu einem positiven Feedback-Mechanismus (Sugatani et al. 2011). Folglich fördert miR-21 indirekt die Osteoklastogenese und kann somit zur Bildung von Osteoporose beitragen. Daneben führt Östrogen zu einer Supprimierung von miR-21, was wiederum die Transkription des Gens FasL ansteigen lässt. Dieses leitet die Apoptose der Osteoklasten ein (Sugatani and Hruska 2013). Demgemäß verhindert das Vorhandensein von Östrogen die Osteoklastogenese und kann unter anderem das Auftreten von Osteoporose Typ I in der Postmenopause erklären. Im Umkehrschluss würde eine Erhöhung von miR-21, wie es bei unseren Patienten mit Osteoporose sowohl im Serum als auch Knochen feststellbar war, für eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten sprechen und mit dem Krankheitsbild der Osteoporose vereinbar sein.

RUNX2 ist ein essentieller Transkriptionsfaktor im Rahmen der Differenzierung von Osteoblasten. Hassan et al. schildern eine Herunterregulierung dieses Transkriptionsfaktors durch einen Cluster bestehend aus miR-23a, miR-27a und miR-24-2. Dies resultiert in einer Inhibition der Differenzierung von Osteoblasten (Hassan et al. 2010). Bei den Patienten mit Osteoporose war eine mit diesen Ergebnissen vereinbare Hochregulierung von miR-23a und miR-24 im Serum und Knochen detektierbar. Eine Überexpression von miR-24 ist in der Literatur auch als inhibitorischer Faktor für die Zellproliferation des Osteosarkoms genannt, indem es die Expression von LPAAT $\beta$  herunterreguliert (Song et al. 2013). Die Hochregulierung von miR-24 könnte demzufolge auch als Inhibitor der Knochenmatrixbildung, wie sie vom Osteosarkom ausgeht, interpretiert und als Faktor für eine Osteopenie angesehen werden.

Yang et al. zeigen in ihrer Studie über Knochenmineralisation, dass miR-93 während der Mineralisation durch Osteoblasten die am stärksten herunterregulierte miRNA ist. Mit von Mäusen gewonnenen Osteoblasten ist

bei einer Überexpression von miR-93 wiederum eine abgeschwächte Mineralisation feststellbar. Nachweislich dafür verantwortlich ist die Interaktion von miR-93 mit dem Transkriptionsfaktor Osterix (OSX) (Yang et al. 2012). Dieses Ergebnis ist vereinbar mit einer starken Hochregulierung von miR-93, wie sie im Serum unserer Patienten mit Osteoporose nachweisbar ist. Osterix stellt einen der wichtigsten Transkriptionsfaktoren im Rahmen der Osteoblastendifferenzierung und Knochenbildung dar (Cao et al. 2005). MiR-93 reduziert direkt die Expression dieses Transkriptionsfaktors und inhibiert somit die Differenzierung der Osteoblasten. Eine Überexpression von OSX wiederum vermindert die Transkription von miR-93 im Sinne einer regulatorischen Feedback-Schleife (Yang et al. 2012). Kongruent mit diesem Fund ist die Expression von OSX in den Knochenproben der von uns untersuchten Osteoporotiker vermindert.

Daneben ist miR-100 eine der fünf miRNAs, die sowohl im Serum als auch im Knochen der Patientengruppe mit Osteoporose hochreguliert war. Erhöhte miR-100-Spiegel haben einen bereits beschriebenen inhibierenden Effekt auf die osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen. Dies erklärt sich durch den direkten Effekt von miR-100 auf das Zielgen *BMPR2*, welches für die BMP-Rezeptoren kodiert (Zeng et al. 2012). Die Familie der zugehörigen BMP-Liganden ist eine Gruppe von Wachstumsfaktoren u.a. im Rahmen der Knochenentwicklung, die eine wichtige Rolle bezüglich der Reparatur und Regeneration von Knochengewebe spielen (Wang et al. 2011). *BMPR2* weist in den von uns untersuchten Knochenproben der Osteoporotiker eine Herunterregulierung auf, welche jedoch statistisch nicht signifikant war.

MiR-124a war in den Experimenten im Serum von Patienten mit Osteoporose signifikant erhöht. In der Literatur wird diese miRNA in Zusammenhang mit Knochengewebe als runterreguliert im Osteosarkom und dessen Zelllinien beschrieben (Geng et al. 2014). Lee et al. publizierten daneben die Rolle von miR-124 als Regulator der Osteoklastendifferenzierung. In dieser spielt NFATc1 eine Schlüsselrolle als Transkriptionsfaktor, welcher von miR-124 supprimiert wird. Dies wurde an mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen, welche aus dem Knochenmark von Mäusen stammten (Lee et al. 2013). In

mesenchymalen Stammzellen des menschlichen Knochenmarks wiederum wird gezeigt, dass miR-124 neben anderen miRNAs die Genexpression reguliert, welche wichtig für die Differenzierung dieser humanen Stammzellen ist. Zu den regulierten Genen gehört auch Aggrecan, welches im Rahmen der Knorpelentwicklung eine wichtige Rolle spielt (Laine et al. 2012). Aggrecan kodiert für das Protein mit demselben Namen, welches als Proteoglykan den größten Anteil im Knorpelgewebe ausmacht (U.S. National Library of Medicine 2012). Diese Beobachtung war Anlass, weitere dem Knochen zugehörige Proteoglykane bzw. deren Gene zu untersuchen. Dabei kann in den Knochenproben der osteoporotischen Patienten eine geringere Expression des Genes Versican (VCAN) festgestellt werden im Vergleich zur Gruppe ohne Osteoporose. Dieses Gen kodiert für ein großes Chondroitinsulfatproteoglykan, welches einen Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix des Knorpels darstellt. Das genannte Protein ist weiterhin involviert in essentielle biologische Funktionen wie Zelladhäsion, Proliferation, Migration und Angiogenese und somit unabdingbar für die Gestaltung und Aufrechterhaltung des Gewebes (Weizmann Institute of Science 2014). Proteoglykane sind des Weiteren ein essentieller Baustein der organischen Matrix des Knochens. Eine möglicherweise durch miR-124a hervorgerufene geringere Expression von VCAN könnte folglich mit einer Hemmung der Osteoidentstehung einhergehen und somit mit der Entwicklung von Osteoporose vergesellschaftet sein (Robey et al. 1993).

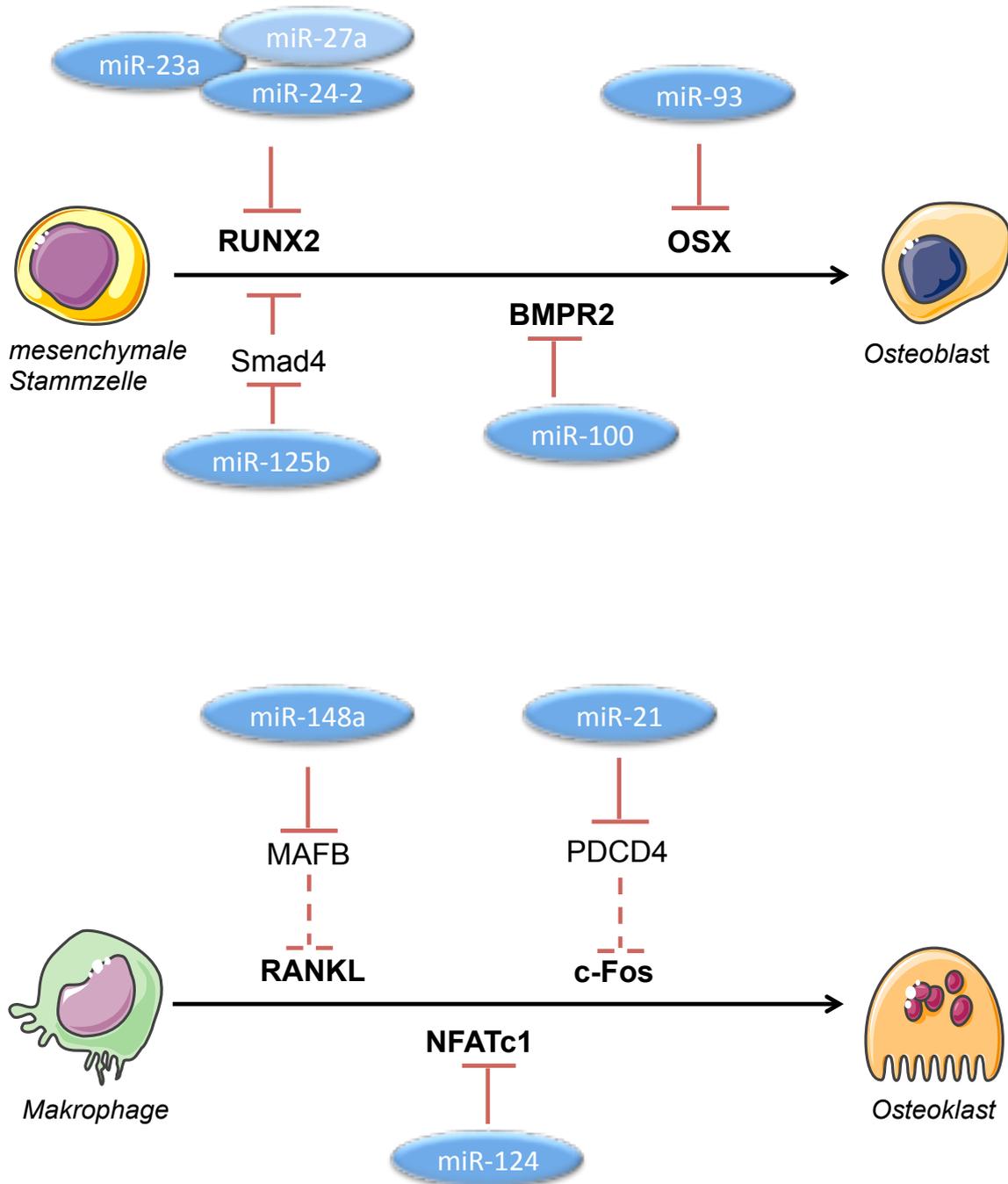
MiR-125b, welche sowohl im analysierten Serum als auch Knochen der osteoporotischen Patienten hochreguliert war, verhindert die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten, indem es die Zellproliferation herunterreguliert (Mizuno et al. 2008). Lu et al. vermuten für dieses Phänomen als Zielgen Smad4. Dieses ist bei einer Überexpression von miR-125b herunterreguliert, was zu einer Inhibition der alkalischen Phosphatase und RUNX2 führt (Lu et al. 2013). Auch in unserer Untersuchung war mit diesen Ergebnissen übereinstimmend die Expression von RUNX2 bei Patienten mit Osteoporose im Vergleich zu Nicht-Osteoporotikern herunterreguliert. Diese Erkenntnis wäre mit dem Auftreten von Osteopenie vereinbar. Auch eine weitere Studie geht davon aus, dass die

osteogene Differenzierung von humanen Fettstammzellen von miRNAs beeinflusst wird. Das untersuchte miRNA Expressionsprofil zeigt dabei unter anderem eine Herunterregulierung von miR-125b vor bzw. nach der Differenzierung der osteogenen Zelllinie (Zhang et al. 2012). Im Umkehrschluss könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass bei einer Hochregulierung derselben miRNA die Formation von Osteoblasten aus Stammzellen des Fettgewebes gestört ist.

Schließlich war auch miR-148a im Serum der kranken Patientengruppe erhöht. Solch eine Überexpression, beobachtet von Cheng et al., begünstigt die Osteoklastogenese aus CD14<sup>+</sup> Zellen des Blutes, welche durch M-CSF und RANKL induziert wird. Als Zielgen unterdrückt miR-148a dabei V-maf MAFB, welches eigentlich die durch RANKL hervorgerufene Osteoklastogenese inhibiert. Als Resultat ist eine geringere Knochendichte bei erhöhten miR-148a-Spiegeln in CD14<sup>+</sup> PBMCs durch gesteigerte Knochenresorption beschrieben, was zur Pathologie der Osteoporose beiträgt (Cheng et al. 2013). Mit diesen Ergebnissen kongruent ist unser Befund einer leichten Hochregulierung der RANKL Genexpression im untersuchten osteoporotischen Knochenmaterial im Vergleich zu Knochen von nicht-Osteoporotikern. Dies unterstreicht nochmal die deregulierte Osteoklastogenese, die mit einer Osteoporose einhergeht. Eine weitere Studie unterstützt die Vermutung, dass miR-148a eine Rolle in der Pathogenese der Osteoporose spielt, indem sie eine Hochregulierung von miR-148a während der Osteoklastogenese konstatiert (van Wijnen et al. 2013). Daneben ist miR-148a Teil eines regulatorischen Netzwerks, welches die Entwicklung von Osteoblasten aus humanen mesenchymalen Stammzellen beeinflusst (Vimalraj and Selvamurugan 2014).

Diese Ergebnisse zeigen, dass neben der erhöhten Aktivität der Osteoklasten auch die Differenzierung der Osteoblasten durch deregulierte miRNA-Expressionsprofile bei Osteoporotikern gestört ist. Dennoch suggerieren die Ergebnisse der Messung der alkalischen Phosphatase bei Patienten mit und ohne Osteoporose eine ähnliche Aktivität der Osteoblasten bei beiden Gruppen. Dies lässt die Vermutung zu, dass vor allem ein Ungleichgewicht zwischen Osteoblasten und Osteoklasten zugunsten der Osteoklasten zum

Krankheitsbild der Osteoporose führt. Eine Zusammenschau der hochregulierten miRNAs und ihre Rolle in der Knochenentwicklung findet sich in Abbildung 4-1 (S.80).



**Abbildung 4-1:** Die Rolle regulierter miRNAs in der Entwicklung von Osteoblasten und Osteoklasten. Literaturrecherchen ergaben einen Einfluss von miR-21, miR-148a und miR124 auf die Osteoklastogenese sowie der miR-23a, miR-24-2, miR-27a, miR-93, miR-100 und miR-125b auf die Bildung von Osteoblasten. Die fett geschriebenen Moleküle haben einen direkten Einfluss auf die Osteoblasto- (RUNX2, OSX und BMPR2) bzw. Osteoklastogenese (RANKL, c-Fos und NFATc1) und werden selbst durch die Wirkung von Smad4, MAFB und PDCD4 gesteuert (indirekter Einfluss dieser Moleküle auf die Generierung von Osteoblasten und Osteoklasten). Mit freundlicher Unterstützung von SERVIER.

## 10 Konklusion

Osteoporose ist nicht nur ein wachsendes medizinisches Problem, sondern zieht auch sozioökonomische Folgen mit sich. Unsere Bevölkerung wird zunehmend älter und damit wird auch der Knochenschwund als eine Erkrankung des alten Menschen immer häufiger. Die Lebensqualität dieser Menschen sinkt drastisch mit dem Erleiden einer Fraktur und kann sogar tödlich sein. 2010 wurden in der EU 22 Millionen Frauen und 5,5 Millionen Männer mit der Erkrankung Osteoporose gezählt. 3,5 Millionen Mal wurde die Diagnose einer osteoporose-bedingten Fraktur gestellt. Die Kosten, die sich auf diese Knochenbrüche beziehen, beliefen sich im Jahre 2010 auf ca. 37 Billionen Euro und sollen laut Schätzungen bis zum Jahr 2025 nochmals um 25% steigen (Abobului et al. 2015). Dies macht noch einmal deutlich, wie wichtig die Früherkennung der Osteoporose und somit die Prävention von Frakturen ist.

Man sollte kritisch überdenken, dass Osteoporose gegenwärtig hauptsächlich mittels DEXA-Methode diagnostiziert wird (vgl. 5.1.5.1, S.14). Diese Untersuchung geht mit Strahlenbelastung für den Patienten einher und wird meist erst bei entsprechenden klinischen Korrelaten, z.B. nach einer Fraktur ohne adäquates Trauma, angeordnet. Solche Frakturen entsprechen meist aber schon einem fortgeschrittenen Stadium der Krankheit. Frühe Formen der Osteoporose werden meist aufgrund mangelnder Krankheitssymptome und dem Fehlen von geeigneten empfindlichen Biomarkern nicht erkannt. Ein therapeutisches Eingreifen ist damit oft in Verzug. Demzufolge haben die von uns identifizierten hochregulierten miRNAs das Potential, möglicherweise als neue Biomarker für Osteoporose zu dienen. Die Kosten einer laborchemischen Untersuchung wären gering und die Handhabung der Proben einfach. Somit könnte man die Blutentnahme sowie Untersuchung auf entsprechende mit Osteoporose assoziierten miRNAs ab einem bestimmten Alter in jeden Gesundheits-Check-up integrieren. Diese neue diagnostische Herangehensweise könnte eine erhebliche Rolle in der Prävention von osteoporose-assoziierten Frakturen spielen und einen neuen Standard in der Frühdiagnostik des Knochenschwundes darstellen.

## 11 Ausblick

Die Forschungsergebnisse unterstreichen neben anderen Studien die Notwendigkeit, den biologischen Ursprung und die Funktion von miRNAs in Bezug auf Ätiologie und Pathogenese vieler Erkrankungen zu eruieren. Die Resultate sollen insbesondere dazu anregen, die Rolle frei zirkulierender miRNAs in Bezug auf das Krankheitsbild Osteoporose weiter zu erforschen. Durch die von uns entdeckten hochregulierten miRNAs bei Patienten mit Osteoporose, die zu einer Herunterregulierung spezifischer Gene führen, soll diese Studie als Grundlage für weitere Experimente angesehen werden.

Mutmaßlich verursacht der prägnante Unterschied im miRNA-Expressionsprofil bei Patienten mit Osteoporose neben einer Unausgeglichenheit der Aktivität von Osteoklasten und Osteoblasten eine geminderte Knochenmineralisation. Zu bedenken gilt allerdings, dass die Überprüfung nur einer miRNA der Diagnostik der Osteoporose bzw. der Evaluation der Schwere dieser Erkrankung nicht gerecht wird, sodass die Testung mehrere miRNAs im Rahmen der Diagnostik in Betracht gezogen werden sollte. Somit bieten die mit der Studie identifizierten fünf miRNAs aus Knochen und Serum eine gute Grundlage für die weitere Erforschung eines diagnostischen Werkzeugs für das Krankheitsbild der Osteoporose. Dennoch möchte ich hiermit betonen, dass mehr Studien notwendig sein werden, um die diagnostische Aussagekraft der zirkulierenden miRNAs bei einem größeren Patientenkollektiv zu untersuchen. Des Weiteren gilt zu beachten, dass die meisten Probanden, deren Serum und Knochen in der Studie untersucht wurde, bereits eine Fraktur erlitten hatten und somit einem Patientengut mit einem fortgeschrittenen Stadium der Osteoporose angehören. Es stehen noch Untersuchungen aus, die bestätigen, dass dieselben miRNAs auch bei Patienten mit einem frühen Stadium der Osteoporose detektierbar sind.

Nichtsdestotrotz zeigt diese Studie deutlich, dass das miRNA-Profil von Osteoporotikern offenkundig verändert ist im Vergleich zum

nicht-osteoporotischen Kontrollkollektiv. Somit können miRNAs eine wichtige Rolle in der Früherkennung der Erkrankung spielen.

Weiterhin präsentieren diese Ergebnisse einen innovativen Denkanstoß in der zukünftigen Entwicklung von Medikamenten in der Behandlung von Osteoporose. Dabei könnte man nicht nur durch Manipulation des Knochanauf- und umbaus den Knochen stärken und somit Frakturen vermeiden (vgl. 5.1.6, S.19), sondern in Form einer gezielten Therapie mit den betreffenden miRNAs als Angriffspunkt punktgenau an einer möglichen Ursache der Pathologie eingreifen und somit eine individuelle Behandlung für jeden Patienten je nach entsprechendem miRNA-Profil ermöglichen.

## 12 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann man sagen, dass mit dieser Studie spezifische miRNA-Signaturen identifiziert werden konnten, die mit der Pathogenese der Osteoporose in Verbindung stehen. Im Serum von 30 getesteten Patienten mit Osteoporose konnten wir im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Osteoporose mittels miRNA PCR bei der Validierung neun verschiedene miRNAs identifizieren, die signifikant erhöht waren. Diese waren namentlich miR-21, miR-23a, miR-24, miR-93, miR-100, miR-122a, miR-124a, miR-125b und miR-148a. Diese Ergebnisse gaben für uns den Anlass, auch das Knochenmaterial von Patienten mit Osteoporose zu untersuchen. Bei den untersuchten 20 Patienten fanden wir hier verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe sechs miRNAs, die signifikant höher exprimiert waren. Dazu gehörten miR-21, miR-23a, miR-24, miR-25, miR-100 und miR-125b. Somit waren in unseren Untersuchungen die fünf miRNAs miR-21, miR-23a, miR-24, miR-100 und miR-125b sowohl im Serum als auch im Knochen von Osteoporotikern signifikant erhöht exprimiert. Diese miRNAs wiesen weiterhin aussagekräftige Sensitivität und Spezifität auf in Bezug auf die Differenzierung von Patienten mit Osteoporose.

*In conclusion, this study profiled specific miRNA signatures that are associated with the pathogenesis of osteoporosis. Using miRNA PCR we could identify nine different miRNAs during validation studies in the blood serum of 30 examined patients with osteoporosis in comparison to a control group without osteoporosis with significantly increased levels. These were in particular miR-21, miR-23a, miR-24, miR-93, miR-100, miR-122a, miR-124a, miR-125b and miR-148a. The results gave reason to investigate also the bone tissue of patients with osteoporosis. With 20 examined patients in comparison to a control group we found six significantly up-regulated miRNAs. Therefore, in our study we could identify all together five miRNAs, namely miR-21, miR-23a, miR-24, miR-100 and miR-125b, that were simultaneously up-regulated in the serum as well as in the bone samples of osteoporotic patients. Those miRNAs showed meaningful sensitivity and specificity in distinguishing patients with osteoporosis.*

## 13 Literatur

Abobului, M., F. Berghea, V. Vlad, A. Balanescu, D. Opris, V. Bojinca, A. Kosevoi Tichie, D. Predeteanu and R. Ionescu (2015). "Evaluation of adherence to anti-osteoporosis treatment from the socio-economic context." *J Med Life* 8 Spec Issue: 119-123.

Adachi, T., M. Nakanishi, Y. Otsuka, K. Nishimura, G. Hirokawa, Y. Goto, H. Nonogi and N. Iwai (2010). "Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction." *Clin Chem* 56(7): 1183-1185.

Ambros, V., B. Bartel, D. P. Bartel, C. B. Burge, J. C. Carrington, X. Chen, G. Dreyfuss, S. R. Eddy, S. Griffiths-Jones, M. Marshall, M. Matzke, G. Ruvkun and T. Tuschl (2003). "A uniform system for microRNA annotation." *RNA* 9(3): 277-279.

Aumüller, G., G. Aust, A. Doll, J. Engele, J. Kirsch, S. Mense, D. Reißig, J. Salvetter, W. Schmidt, F. Schmitz, E. Schulte, K. Spaniel-Borowski, W. Wolff, L.J. Wurzinger and H.-G. Zilch. (2007). *Anatomie*. Stuttgart: Thieme.

Ballanti, P., S. Minisola, M. T. Pacitti, L. Scarnecchia, R. Rosso, G. F. Mazzuoli and E. Bonucci (1997). "Tartrate-resistant acid phosphate activity as osteoclastic marker: sensitivity of cytochemical assessment and serum assay in comparison with standardized osteoclast histomorphometry." *Osteoporos Int* 7(1): 39-43.

Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." *Cell* 116(2): 281-297.

Bartl, R. and B. Frisch (2009). *Osteoporosis - diagnosis, prevention, therapy*. Berlin: Springer.

Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz. "Ernährung und Krankheit." Retrieved from [http://www.vis.bayern.de/ernaehrung/ernaehrung/ernaehrung\\_krankheit/osteoporose.htm](http://www.vis.bayern.de/ernaehrung/ernaehrung/ernaehrung_krankheit/osteoporose.htm) on 22.06.2013

Bonnick, S. L. and L. Shulman (2006). "Monitoring osteoporosis therapy: bone mineral density, bone turnover markers, or both?" *Am J Med* 119(4 Suppl 1): S25-31.

Calin, G. A., C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich and C. M. Croce (2002). "Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24): 15524-15529.

Cao, Y., Z. Zhou, B. de Crombrughe, K. Nakashima, H. Guan, X. Duan, S. F. Jia and E. S. Kleinerman (2005). "Osterix, a transcription factor for osteoblast differentiation, mediates antitumor activity in murine osteosarcoma." *Cancer Res* 65(4): 1124-1128.

Cao, Z., B. T. Moore, Y. Wang, X. H. Peng, J. M. Lappe, R. R. Recker and P. Xiao (2014). "MiR-422a as a Potential Cellular MicroRNA Biomarker for Postmenopausal Osteoporosis." *PLoS One* 9(5): e97098.

Cheng, P., C. Chen, H. B. He, R. Hu, H. D. Zhou, H. Xie, W. Zhu, R. C. Dai, X. P. Wu, E. Y. Liao and X. H. Luo (2013). "miR-148a regulates osteoclastogenesis by targeting V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B." *J Bone Miner Res* 28(5): 1180-1190.

Committee on Musculoskeletal Imaging (2008). "ACR Practice Guideline for the Performance of Quantitative Computed Tomography (QCT) Bone Densitometry." Retrieved from <http://medi-guide.meditool.cn/ymtpdf/8CCE4B5A-913F-851B-389F-0F18B43F8FCE.pdf>

Cosman, F., S. J. de Beur, M. S. LeBoff, E. M. Lewiecki, B. Tanner, S. Randall and R. Lindsay (2014). "Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis." *Osteoporos Int* 25(10): 2359-2381.

Cummings, S. R., J. San Martin, M. R. McClung, E. S. Siris, R. Eastell, I. R. Reid, P. Delmas, H. B. Zoog, M. Austin, A. Wang, S. Kutilek, S. Adami, J. Zanchetta, C. Libanati, S. Siddhanti, C. Christiansen and F. Trial (2009). "Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis." *N Engl J Med* 361(8): 756-765.

Damilakis, J., J. E. Adams, G. Guglielmi and T. M. Link (2010). "Radiation exposure in X-ray-based imaging techniques used in osteoporosis." *Eur Radiol* 20(11): 2707-2714.

Del Fattore A, Teti A, Rucci N (2008). "Osteoclast receptors and signaling". *Biochem Biophys* 473(2): 147-60

Diagnostik- und Therapiezentrum München. "Osteoporose". Retrieved from <http://www.osteoporosezentrum.de/folgen-der-osteoporose-knochenbrueche-wirbeleinbruch-wirbelkoerperbrueche-oberschenkelhalsbruch-schenkelhalsbruch.html> on 23.06.2013

Duan, X. Q., Y. H. Li, X. Y. Zhang, Z. T. Zhao, Y. Wang, H. Wang, G. S. Li and L. Jing (2015). "Mechanisms of Intracellular Calcium Homeostasis in MC3T3-E1 Cells and Bone Tissues of Sprague-Dawley Rats Exposed to Fluoride." *Biol Trace Elem Res.* 170(2): 331-9

Dulinska, J., D. Gil, J. Zagajewski, J. Hartwich, M. Bodzioch, A. Dembinska-Kiec, T. Langmann, G. Schmitz and P. Laidler (2005). "Different effect of beta-carotene on proliferation of prostate cancer cells." *Biochim Biophys Acta* 1740(2): 189-201.

Ebeling, P. R. and R. G. Russell (2003). "Teriparatide (rhPTH 1-34) for the treatment of osteoporosis." *Int J Clin Pract* 57(8): 710-718.

Elovitz, M. A., A. G. Brown, L. Anton, M. Gilstrap, L. Heiser and J. Bastek (2014). "Distinct cervical microRNA profiles are present in women destined to have a preterm birth." *Am J Obstet Gynecol* 210(3): 221 e221-211.

Everything Health (2009). "Osteoporosis Testing with DEXA." Retrieved from <http://healthwise-everythinghealth.blogspot.de/2010/08/osteoporosis-testing-with-dxa.html>

Faculty of Biological Sciences, University of Leeds. "Cartilage, Bone & Ossification: The Histology guide." Retrieved from [http://www.histology.leeds.ac.uk/bone/bone\\_cell\\_types.php](http://www.histology.leeds.ac.uk/bone/bone_cell_types.php) on 18.06.2013

Garnero, P. (2014). "New developments in biological markers of bone metabolism in osteoporosis." *Bone* 66: 46-55.

Ge, W., D. C. Yu, Q. G. Li, X. Chen, C. Y. Zhang and Y. T. Ding (2014). "Expression of serum miR-16, let-7f, and miR-21 in patients with hepatocellular carcinoma and their clinical significances." *Clin Lab* 60(3): 427-434.

Geng, S., X. Zhang, J. Chen, X. Liu, H. Zhang, X. Xu, Y. Ma, B. Li, Y. Zhang, Z. Bi and C. Yang (2014). "The Tumor Suppressor Role of miR-124 in Osteosarcoma." *PLoS One* 9(6): e91566.

Gioe, T. J., C. Novak, P. Sinner, W. Ma and S. Mehle (2007). "Knee arthroplasty in the young patient: survival in a community registry." *Clinical orthopaedics and related research* 464: 83-87.

Greenspan, A. (2007). *Skelettradiologie*. München: Elsevier.

Griffiths-Jones, S., R. J. Grocock, S. van Dongen, A. Bateman and A. J. Enright (2006). "miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature." *Nucleic Acids Res* 34(Database issue): D140-144.

Grimson, A., K. K. Farh, W. K. Johnston, P. Garrett-Engele, L. P. Lim and D. P. Bartel (2007). "MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing." *Mol Cell* 27(1): 91-105.

Gruber, H. E., J. L. Ivey, E. R. Thompson, C. H. Chesnut, 3rd and D. J. Baylink (1986). "Osteoblast and osteoclast cell number and cell activity in postmenopausal osteoporosis." *Miner Electrolyte Metab* 12(4): 246-254.

Gupta, V., M. A. Shah, S. K. Shah and J. M. Shah (2012). "Osteoanabolics." *Indian J Endocrinol Metab* 16(3): 349-357.

Hassan, M. Q., J. A. Gordon, M. M. Beloti, C. M. Croce, A. J. van Wijnen, J. L. Stein, G. S. Stein and J. B. Lian (2010). "A network connecting Runx2, SATB2, and the miR-23a~27a~24-2 cluster regulates the osteoblast differentiation program." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(46): 19879-19884.

He, X., W. Zhang, L. Liao, X. Fu, Q. Yu and Y. Jin (2013). "Identification and characterization of microRNAs by high through-put sequencing in mesenchymal stem cells and bone tissue from mice of age-related osteoporosis." *PLoS One* 8(8): e71895.

Herold, G. (2014). *Innere Medizin*. Köln: Gerd Herold.

Iniguez-Ariza, N. M. and B. L. Clarke (2015). "Bone biology, signaling pathways, and therapeutic targets for osteoporosis." *Maturitas* 82(2): 245-55

Johnell, O. and P. Hertzman (2006). *What evidence is there for the prevention and screening of osteoporosis?* Copenhagen: WHO Regional Office for Europe.

Knippers, R. (2006). *Molekulare Genetik*. Stuttgart: Thieme.

- Kobayashi, T., J. Lu, B. S. Cobb, S. J. Rodda, A. P. McMahon, E. Schipani, M. Merckenschlager and H. M. Kronenberg (2008). "Dicer-dependent pathways regulate chondrocyte proliferation and differentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(6): 1949-1954.
- Kong, L., J. Zhu, W. Han, X. Jiang, M. Xu, Y. Zhao, Q. Dong, Z. Pang, Q. Guan, L. Gao, J. Zhao and L. Zhao (2011). "Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study." *Acta Diabetol* 48(1): 61-69.
- Kosaka, N., H. Iguchi and T. Ochiya (2010). "Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis." *Cancer Sci* 101(10): 2087-2092.
- Krum, S. A., G. A. Miranda-Carboni, P. V. Hauschka, J. S. Carroll, T. F. Lane, L. P. Freedman and M. Brown (2008). "Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival." *EMBO J* 27(3): 535-545.
- Laine, S. K., J. J. Alm, S. P. Virtanen, H. T. Aro and T. K. Laitala-Leinonen (2012). "MicroRNAs miR-96, miR-124, and miR-199a regulate gene expression in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells." *J Cell Biochem* 113(8): 2687-2695.
- Lee, C. H., J. H. Kim and S. W. Lee (2014). "The role of microRNAs in Hepatitis C Virus replication and related liver diseases." *J Microbiol* 52(6): 445-451.
- Lee, Y., H. J. Kim, C. K. Park, Y. G. Kim, H. J. Lee, J. Y. Kim and H. H. Kim (2013). "MicroRNA-124 regulates osteoclast differentiation." *Bone* 56(2): 383-389.
- Legiran, S. and M. L. Brandi (2012). "Bone mass regulation of leptin and postmenopausal osteoporosis with obesity." *Clin Cases Miner Bone Metab* 9(3): 145-149.
- Lips, P. (2001). "Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications." *Endocr Rev* 22(4): 477-501.
- Liu, Y. Z., V. Dvornyk, Y. Lu, H. Shen, J. M. Lappe, R. R. Recker and H. W. Deng (2005). "A novel pathophysiological mechanism for osteoporosis suggested by an in vivo gene expression study of circulating monocytes." *J Biol Chem* 280(32): 29011-29016.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* 25(4): 402-408.
- Lu, X., M. Deng, H. He, D. Zeng and W. Zhang (2013). "miR-125b regulates osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells by targeting Smad4." *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 38(4): 341-346.
- Marie, P. J., P. Ammann, G. Boivin and C. Rey (2001). "Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone." *Calcif Tissue Int* 69(3): 121-129.

MiRBase. The microRNA database. Retrieved from <http://mirbase.org/> on 26.06.2013

Miyaki, S. and H. Asahara (2012). "Macro view of microRNA function in osteoarthritis." *Nat Rev Rheumatol* 8(9): 543-552.

Mizoguchi, F., Y. Izu, T. Hayata, H. Hemmi, K. Nakashima, T. Nakamura, S. Kato, N. Miyasaka, Y. Ezura and M. Noda (2010). "Osteoclast-specific Dicer gene deficiency suppresses osteoclastic bone resorption." *J Cell Biochem* 109(5): 866-875.

Mizuno, Y., K. Yagi, Y. Tokuzawa, Y. Kanasaki-Yatsuka, T. Suda, T. Katagiri, T. Fukuda, M. Maruyama, A. Okuda, T. Amemiya, Y. Kondoh, H. Tashiro and Y. Okazaki (2008). "miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation." *Biochem Biophys Res Commun* 368(2): 267-272.

Morris K.V. (2008). *RNA and the regulation of gene expression*. Norfolk: Caister Academic Press.

Murata, K., M. Furu, H. Yoshitomi, M. Ishikawa, H. Shibuya, M. Hashimoto, Y. Imura, T. Fujii, H. Ito, T. Mimori and S. Matsuda (2013). "Comprehensive microRNA analysis identifies miR-24 and miR-125a-5p as plasma biomarkers for rheumatoid arthritis." *PLoS One* 8(7): e69118.

Narry Kim, V. (2005). "MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6: 376-385.

National Osteoporosis Foundation. "Bone Density Test, Osteoporosis Screening & T-score Interpretation." Retrieved from <http://nof.org/articles/743> on 23.06.2013

Netter, F. H. (2006). *Netters Allgemeinmedizin*. Stuttgart: Thieme.

Norton Lasley, E. (2010) *Genetics: The Emerging Science of Gene Expression and Mental Illness*.

Orthopädie am Fürstenhof. "Osteoporose Diagnostik und Therapie." Retrieved from <http://orthopaedie-am-fuerstenhof.de/html/content/osteoporose.html> on 22.06.2013

Papageorgiou, N., D. Tousoulis, E. Androulakis, G. Siasos, A. Briasoulis, G. Vogiatzi, A. M. Kampoli, E. Tsiamis, C. Tentolouris and C. Stefanadis (2012). "The role of microRNAs in cardiovascular disease." *Curr Med Chem* 19(16): 2605-2610.

Qiagen (2014) *miScript® SYBR® Green PCR Kit for Use with miScript miRNA PCR Arrays*.

Qiagen (2012). *miRNeasy Serum/Plasma Handbook*.

Qiu, W. and M. Kassem (2014). "miR-141-3p inhibits human stromal (mesenchymal) stem cell proliferation and differentiation." *Biochim Biophys Acta* 1843(9): 2114-2121.

Rachner, T. D., S. Khosla and L. C. Hofbauer (2011). "Osteoporosis: now and the future." *Lancet* 377(9773): 1276-1287.

- Raisz, L. G. (2005). "Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects." *J Clin Invest* 115(12): 3318-3325.
- Reszka, A. A. and G. A. Rodan (2003). "Mechanism of action of bisphosphonates." *Curr Osteoporos Rep* 1(2): 45-52.
- Reyes, C., M. Hitz, D. Prieto-Alhambra and B. Abrahamsen (2016). "Risks and Benefits of Bisphosphonate Therapies." *J Cell Biochem.* 117(1): 20-8
- Robey, P. G., N. S. Fedarko, T. E. Hefferan, P. Bianco, U. K. Vetter, W. Grzesik, A. Friedenstein, G. Van der Pluijm, K. P. Mintz, M. F. Young and et al. (1993). "Structure and molecular regulation of bone matrix proteins." *J Bone Miner Res* 8 Suppl 2: S483-487.
- Ruchholtz, S. and D. C. Wirtz (2012). *Orthopädie und Unfallchirurgie essentials: Intensivkurs zur Weiterbildung.* Stuttgart: Thieme.
- SABiosciences (2012). "miScript miRNA PCR Array." Retrieved from [http://www.sabiosciences.com/mirna\\_pcr\\_array.php](http://www.sabiosciences.com/mirna_pcr_array.php).
- Seeliger, C., E. R. Balmayor and M. van Griensven (2016). "miRNAs Related to Skeletal Diseases." *Stem Cells Dev* 25(17): 1261-1281.
- Seeliger, C., K. Karpinski, A.T. Haug, H. Vester, A. Schmitt, J.S. Bauer, M. van Griensven (2014). "Five freely circulating miRNAs and bone tissue miRNAs are associated with osteoporotic fractures." *J Bone Miner Res.* 29(8): 1718-28
- Shaffer, J., M. Schlumpberger and E. Lader (2012). *miRNA profiling from blood - challenges and recommendations.* Qiagen.
- Shen, H., Y. Ma, Y. Luo, X. Liu, Z. Zhang and J. Dai (2015). "Directed osteogenic differentiation of mesenchymal stem cell in three-dimensional biodegradable methylcellulose-based scaffolds." *Colloids Surf B Biointerfaces* 135: 332-338.
- Slack, F.J. (2011). *MicroRNAs in development and cancer.* London: Imperial College Press.
- Song, L., J. Yang, P. Duan, J. Xu, X. Luo, F. Luo, Z. Zhang, T. Hou, B. Liu and Q. Zhou (2013). "MicroRNA-24 inhibits osteosarcoma cell proliferation both in vitro and in vivo by targeting LPAATbeta." *Arch Biochem Biophys* 535(2): 128-135.
- Stępien, E. (2011) *Acceleration of New Biomarkers Development and Discovery in Synergistic Diagnostics of Coronary Artery Disease. Coronary Angiography - Advances in Noninvasive Imaging Approach for Evaluation of Coronary Artery Disease.* London: IntechOpen.
- Sugatani, T. and K. A. Hruska (2013). "Down-regulation of miR-21 biogenesis by estrogen action contributes to osteoclastic apoptosis." *J Cell Biochem* 114(6): 1217-1222.
- Sugatani, T., J. Vacher and K. A. Hruska (2011). "A microRNA expression signature of osteoclastogenesis." *Blood* 117(13): 3648-3657.
- Takahashi, P., D. J. Xavier, A. F. Evangelista, F. S. Manoel-Caetano, C. Macedo, C. V. Collares, M. C. Foss-Freitas, M. C. Foss, D. M. Rassi, E. A. Donadi, G. A. Passos and E. T. Sakamoto-Hojo (2014). "MicroRNA

expression profiling and functional annotation analysis of their targets in patients with type 1 diabetes mellitus." *Gene* 539(2): 213-223.

Torricelli, P., M. Fini, G. Giavaresi and R. Giardino (2002). "Human osteoblast cultures from osteoporotic and healthy bone: biochemical markers and cytokine expression in basal conditions and in response to 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>." *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 30(3): 219-227.

University of Washington. UW Courses Web Server. Retrieved from <http://courses.washington.edu/conj/bess/calcium/calcium.html> on 15.06.2013

U.S. National Library of Medicine (2012). "ACAN gene." Retrieved from <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ACAN>

van Wijnen, A. J., J. van de Peppel, J. P. van Leeuwen, J. B. Lian, G. S. Stein, J. J. Westendorf, M. J. Oursler, H. J. Im, H. Taipaleenmaki, E. Hesse, S. Riester and S. Kakar (2013). "MicroRNA functions in osteogenesis and dysfunctions in osteoporosis." *Curr Osteoporos Rep* 11(2): 72-82.

Velu, V. K., R. Ramesh and A. R. Srinivasan (2012). "Circulating MicroRNAs as Biomarkers in Health and Disease." *J Clin Diagn Res* 6(10): 1791-1795.

Vimalraj, S. and N. Selvamurugan (2014). "MicroRNAs expression and their regulatory networks during mesenchymal stem cells differentiation toward osteoblasts." *Int J Biol Macromol* 66: 194-202.

Wang, Q., C. Huang, M. Xue and X. Zhang (2011). "Expression of endogenous BMP-2 in periosteal progenitor cells is essential for bone healing." *Bone* 48(3): 524-532.

Wang, W. T., Y. N. Zhao, B. W. Han, S. J. Hong and Y. Q. Chen (2013). "Circulating microRNAs identified in a genome-wide serum microRNA expression analysis as noninvasive biomarkers for endometriosis." *J Clin Endocrinol Metab* 98(1): 281-289.

Wang, Y., L. Li, B. T. Moore, X. H. Peng, X. Fang, J. M. Lappe, R. R. Recker and P. Xiao (2012). "MiR-133a in human circulating monocytes: a potential biomarker associated with postmenopausal osteoporosis." *PLoS One* 7(4): e34641.

Weizmann Institute of Science (2014). "VCAN Gene." Retrieved from <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=VCAN>

WHO Scientific Group (2003). *Prevention and Management of osteoporosis*. Geneva: WHO.

Yang, L., P. Cheng, C. Chen, H. B. He, G. Q. Xie, H. D. Zhou, H. Xie, X. P. Wu and X. H. Luo (2012). "miR-93/Sp7 function loop mediates osteoblast mineralization." *J Bone Miner Res* 27(7): 1598-1606.

Yang, N., G. Wang, C. Hu, Y. Shi, L. Liao, S. Shi, Y. Cai, S. Cheng, X. Wang, Y. Liu, L. Tang, Y. Ding and Y. Jin (2013). "Tumor necrosis factor alpha suppresses the mesenchymal stem cell osteogenesis promoter miR-21 in estrogen deficiency-induced osteoporosis." *J Bone Miner Res* 28(3): 559-573.

Zaidi, M. (2007). "Skeletal remodeling in health and disease." *Nat Med* 13(7): 791-801.

Zeng, Y., X. Qu, H. Li, S. Huang, S. Wang, Q. Xu, R. Lin, Q. Han, J. Li and R. C. Zhao (2012). "MicroRNA-100 regulates osteogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells by targeting BMP2." *FEBS Lett* 586(16): 2375-2381.

Zhang, J. F., W. M. Fu, M. L. He, H. Wang, W. M. Wang, S. C. Yu, X. W. Bian, J. Zhou, M. C. Lin, G. Lu, W. S. Poon and H. F. Kung (2011). "MiR-637 maintains the balance between adipocytes and osteoblasts by directly targeting Osterix." *Mol Biol Cell* 22(21): 3955-3961.

Zhang, R., J. Ma and J. Yao (2013). "Molecular mechanisms of the cartilage-specific microRNA-140 in osteoarthritis." *Inflamm Res* 62(10): 871-877.

Zhang, Z. J., H. Zhang, Y. Kang, P. Y. Sheng, Y. C. Ma, Z. B. Yang, Z. Q. Zhang, M. Fu, A. S. He and W. M. Liao (2012). "miRNA expression profile during osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells." *J Cell Biochem* 113(3): 888-898.

## 14 Abstract

“Osteoporosis as a systemic skeletal disorder is characterized by increased bone fragility and the risk of fractures. According to the World Health Organization, osteoporosis is one of the 10 most common diseases and affects approximately 75 million people in Europe, the United States, and Japan. In this context, the identification of specific microRNA (miRNA) signatures is an important step for new diagnostic and therapeutic approaches. The focus of interest on miRNAs as biomarkers came with new publications identifying free circulating extracellular miRNAs associated with various types of cancer as well as circulatory disorders. This study aimed to identify specific miRNAs in patients with osteoporotic fractures compared to non-osteoporotic fractures. For the array analysis, miRNAs were isolated from the serum of 20 patients, transcribed and the samples were pooled into 10 osteoporotic and 10 non-osteoporotic specimens. With each pool of samples, human serum & plasma miRNA PCR Arrays were performed, which are able to identify 83 different miRNAs. Subsequently, a separate validation analysis of each miRNA found to be regulated in the array followed with miRNA samples isolated from the serum of 30 osteoporotic and 30 non-osteoporotic patients and miRNA samples isolated from the bone tissue of 20 osteoporotic and 20 non-osteoporotic patients. With the validation analysis of the regulated miRNAs, we identified 9 miRNAs, namely miR-21, miR-23a, miR-24, miR-93, miR-100, miR-122a, miR-124a, miR-125b and miR-148a, that were significantly up-regulated in the serum of patients with osteoporosis. In the bone tissue of osteoporotic patients, we identified that miR-21, miR-23a, miR—24, miR-25, miR-100 and miR-125b displayed a significantly higher expression. A total of 5 miRNAs display an up-regulation both in serum and bone tissue. This study reveals an important role for several miRNAs in osteoporotic patients and suggested that they may be used as biomarkers for diagnostic purposes and may be a target for treating bone loss and optimizing fracture healing in osteoporotic patients.” (Seeliger et al. 2014)

## 15 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt zu haben. Es wurden keine anderen Quellen benutzt, als jene, die im Literaturverzeichnis angeführt sind. Sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere, nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen zu haben. Zudem hat keine Person von mir geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der hier vorgelegten Dissertation stehen. Diese Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde zum Zwecke der Promotion vorgelegt. Ich habe keine früheren erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Berlin, den 01.10.2018



---

Katrin Karpinski

## 16 Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. Martijn van Griensven, der es mir überhaupt erst ermöglichte, diese Doktorarbeit zu erstellen. Auf seinen Beistand und konstruktive Kritik konnte ich jederzeit zählen. Ich danke auch ganz herzlich meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Claudine Seeliger, die mir stets für Fragen zur Verfügung stand und bei jedem Problem half. Ohne sie wäre die Erarbeitung dieser Studie nicht denkbar gewesen. Das ganze Team der experimentellen Unfallchirurgie des Klinikums rechts der Isar stand mir stets tatkräftig zur Seite und durch die gute Integration in die Arbeitsgruppe machte das Durchführen und Gestalten der Experimente stets Spaß. Zum Team zählen insbesondere auch Marina Unger, die mich in die ersten Schritte der Laborarbeit einführte, sowie Fritz Seidl, der mir bei Übersetzungen und Korrekturen half. Finanzielle Unterstützung bekam diese Arbeit teilweise durch die Elsbeth Bonhoff Stiftung. Für die Hilfe bei der Sammlung der humanen Proben danke ich Dr. med. Helen Vester, Dr. med. Andreas Schmitt und Alexander T. Haug sowie PD Dr. med. Jan Stefan Bauer für die Vermessung der Knochendichte unserer Proben.

Auch meinen Studienfreunden möchte ich hiermit für tolle sieben Jahre danken, sowie meinen Freunden außerhalb des Studiums, durch die ich immer wieder Kraft für neue Aufgaben schöpfen konnte.

Ganz herzlich danke ich zu guter Letzt meinen Eltern, Halina und Norbert Karpinski, die mich stets in meinen Zielen bestärkten, sowie meiner Schwester Julia, die mich immer wieder ermutigte weiterzumachen. Danke an meine ganze Familie, die ich allezeit hinter mir weiß.

## 17 Lebenslauf



