

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Experimentelle Unfallchirurgie

des Klinikums rechts der Isar

# **Die Ätiopathogenese der Charcot- Arthropathie**

Laurens Christian Gassel

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. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Dr. M. van Griensven

2. Prof. Dr. A. B. Imhoff

Die Dissertation wurde am 20.02.2018 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 10.10.2018 angenommen

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....                   | <b>5</b>  |
| <b>1. Einleitung</b> .....                           | <b>8</b>  |
| 1.1 Diabetes mellitus.....                           | 8         |
| 1.1.1 Definition.....                                | 8         |
| 1.1.2 Epidemiologie.....                             | 8         |
| 1.2 Knochenbiologie .....                            | 12        |
| 1.2.1 Grundlagen der Knochenbiologie.....            | 12        |
| 1.2.2 Extrazelluläre Matrix .....                    | 12        |
| 1.2.3 Zelluläre Organisation .....                   | 13        |
| 1.3 Charcot-Arthropathie .....                       | 20        |
| 1.3.1 Definition.....                                | 20        |
| 1.3.2 Epidemiologie.....                             | 20        |
| 1.3.3 Klassifikation.....                            | 21        |
| 1.3.4 Pathogenese .....                              | 22        |
| 1.3.4.1 RANKL/ RANK/ OPG-Signalweg .....             | 22        |
| 1.3.4.2 Wnt-Signalweg.....                           | 23        |
| 1.3.5 Therapie .....                                 | 26        |
| <b>2. Material und Methoden</b> .....                | <b>27</b> |
| 2.1 Material .....                                   | 27        |
| 2.1.1 Geräte.....                                    | 27        |
| 2.1.2 Verbrauchsmaterial.....                        | 29        |
| 2.1.3 Software.....                                  | 30        |
| 2.2 Methoden .....                                   | 31        |
| 2.2.1 Gewinnung von Probenmaterial .....             | 31        |
| 2.2.1.1 Gewinnung humaner Blutproben .....           | 31        |
| 2.2.1.2 Gewinnung humaner Knochenproben.....         | 31        |
| 2.2.1.2.1 Knochenproben gesunder Spender.....        | 31        |
| 2.2.1.2.2 Knochenproben diabeteskranker Spender..... | 32        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 2.2.1.2.3 | Knochenproben von Spendern mit Charcot-Arthropathie .....      | 33        |
| 2.2.2     | Demographie .....  | 34        |
| 2.2.3     | RNA-Isolierung .....   | 35        |
| 2.2.4     | RNA-Messung .....  | 36        |
| 2.2.5     | cDNA .....   | 37        |
| 2.2.6     | qRT-PCR .....  | 38        |
| 2.2.7     | Proteinisolation .....   | 43        |
| 2.2.8     | Proteinmessung nach Lowry .....                                | 45        |
| 2.3       | Statistik .....  | 46        |
| <b>3.</b> | <b>Ergebnisse .....</b>  | <b>47</b> |
| 3.1       | Genexpressionsanalysen von Patientenspongiosa .....            | 47        |
| 3.1.1     | Ergebnisse qRT-PCR TCF7L2 .....                                | 48        |
| 3.1.2     | Ergebnisse qRT-PCR $\beta$ -Catenin .....                      | 48        |
| 3.1.3     | Ergebnisse qRT-PCR LRP5 .....                                  | 50        |
| 3.1.4     | Ergebnisse qRT-PCR Wnt3a .....                                 | 50        |
| 3.1.5     | Ergebnisse qRT-PCR Wnt5a .....                                 | 52        |
| 3.1.6     | Ergebnisse qRT-PCR Osteocalcin .....                           | 53        |
| 3.1.7     | Ergebnisse qRT-PCR COL1A1 .....                                | 54        |
| 3.1.8     | Ergebnisse qRT-PCR FN .....                                    | 55        |
| 3.1.9     | Ergebnisse qRT-PCR Adiponectin .....                           | 55        |
| 3.1.10    | Ergebnisse qRT-PCR ALK5 .....                                  | 57        |
| 3.1.11    | Ergebnisse qRT-PCR GSK3B .....                                 | 57        |
| 3.1.12    | Ergebnisse qRT-PCR OPG .....                                   | 59        |
| 3.1.13    | Ergebnisse qRT-PCR RANK .....                                  | 59        |
| 3.1.14    | Ergebnisse qRT-PCR RANKL .....                                 | 61        |
| 3.1.15    | Ergebnisse qRT-PCR RUNX2 .....                                 | 61        |
| 3.1.16    | Ergebnisse qRT-PCR TCF4 .....                                  | 63        |
| 3.1.17    | Ergebnisse qRT-PCR TGFB1 .....                                 | 64        |
| <b>4.</b> | <b>Diskussion .....</b>  | <b>65</b> |
| 4.1       | Interpretation der Genexpressionsanalysen <i>in vivo</i> ..... | 66        |
| 4.2       | Ausblick .....   | 74        |

|                                   |           |
|-----------------------------------|-----------|
| <b>5. Zusammenfassung.....</b>    | <b>75</b> |
| <b>6. Danksagung .....</b>        | <b>77</b> |
| <b>Literaturverzeichnis .....</b> | <b>78</b> |

# Abkürzungsverzeichnis

|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| °C                                    | Grad Celsius   |
| μ                                     | Mikro  |
| A                                     | Arteria  |
| Abb                                   | Abbildung  |
| ALK5                                  | Activin Receptor-Like Kinase 5   |
| ANOVA                                 | analysis of variance (dt. einfaktorielle Varianzanalyse)                       |
| APS                                   | Ammoniumpersulfat  |
| Aqua a.i.                             | Aqua ad iniectabilia   |
| BMI                                   | body-mass-index  |
| BMU                                   | bone multicellular unit  |
| BSA                                   | bovine serum albumin   |
| CA                                    | Charcot-Arthropathie   |
| cDNA                                  | complementary deoxyribonucleic acid (dt. komplementäre Desoxyribonukleinsäure) |
| cm                                    | Zentimeter   |
| COL1A1/ 2                             | collagen type 1 alpha 1/ 2   |
| CuSO <sub>4</sub>                     | Kupfersulfat   |
| CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O | Kupfersulfat-Pentahydrat   |
| ddH <sub>2</sub> O                    | doppelt destilliertes Wasser   |
| dH <sub>2</sub> O                     | destilliertes Wasser   |
| Dkk                                   | Dickkopfprotein  |
| dl                                    | Deziliter  |
| DM                                    | Diabetes mellitus  |
| DMSO                                  | Dimethylsulfoxid   |
| DNA                                   | deoxyribonucleic acid (dt. Desoxyribonukleinsäure)                             |
| DOC                                   | Desoxycholsäure  |
| dt                                    | deutsch  |
| DVL                                   | dishevelled-Protein  |

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| ECL                             | enhanced chemiluminescence (dt. gesteigerte Chemilumineszenz) |
| ECM                             | extracellular matrix (dt. extrazelluläre Matrix)              |
| EDTA                            | Ethylendiamintetraessigsäure                                  |
| FN                              | Fibronectin   |
| g                               | Gramm   |
| GSK3B                           | Glykogensynthase Kinase 3 B                                   |
| HbA <sub>1c</sub>               | glykosyliertes Hämoglobin A                                   |
| HCl                             | Salzsäure   |
| HRP                             | horseradish peroxidase (dt. Meerrettich Peroxidase)           |
| IDF                             | Internationale Diabetes Föderation                            |
| IL-1beta                        | Interleukin-1 beta  |
| IQA                             | Interquartilsabstand  |
| l                               | Liter   |
| LAP                             | Latenz-assoziiertes Peptid                                    |
| LEF                             | lymphoid enhancer-binding factor                              |
| LN <sub>2</sub>                 | Flüssigstickstoff   |
| LRP                             | low-density lipoprotein receptor-related protein              |
| M                               | Molar   |
| m                               | milli   |
| M-CSF                           | macrophage colony-stimulating factor                          |
| MRI                             | Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München      |
| mRNA                            | messenger ribonucleic acid (dt. Boten-RNA)                    |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | Natriumcarbonat   |
| Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> | Natriumorthovanadat   |
| NaCl                            | Natriumchlorid  |
| NaOH                            | Natriumhydroxid   |
| NF-κB                           | Nuklearfaktor-κ B   |
| NP40                            | Nonidet P40   |
| OI                              | Osteogenesis Imperfecta                                       |
| OPG                             | Osteoprotegerin   |
| OPPG                            | Osteoporose-Pseudogliom-Syndrom                               |

|              |   |
|--------------|---|
| PMSF         | Phenylmethylsulfonylfluorid   |
| qRT-PCR      | quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (dt. Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion) |
| RANK         | Rezeptor-Aktivator-von-Nuklearfaktor- $\kappa$ B  |
| RANKL        | Rezeptor-Aktivator-von-Nuklearfaktor- $\kappa$ B Ligand   |
| RFU          | relative fluorescence units   |
| RIPA         | radio-immunoprecipitation assay   |
| RNA          | ribonucleic acid (dt. Ribonukleinsäure)   |
| RNase        | Ribonuklease  |
| RUNX2        | Runt Related Transcription Factor 2   |
| SD           | standard deviation (dt. Standardabweichung)   |
| SDS          | sodium dodecyl sulfate (dt. Natriumdodecylsulfat)   |
| SDS-PAGE     | SDS-polyacrylamid gel electrophoresis (dt. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)                       |
| SLC          | small latent complex  |
| T1DM         | Diabetes mellitus Typ 1   |
| T2DM         | Diabetes mellitus Typ 2   |
| Tab          | Tabelle   |
| TBS          | TRIS-buffered-saline  |
| TBS-T        | TBS-Tween-20  |
| TCF4/ 7L2/ 7 | T-cell factor 4/ 7L2/ 7   |
| TEMED        | Tetramethylethylendiamin  |
| TGF- $\beta$ | transforming growth factor-beta   |
| TNF          | Tumornekrosefaktor  |
| TRIS         | Trishydroxymethylaminomethan  |
| WNT3A        | Wingless Int-Gen 3A   |
| WNT5A        | Wingless Int-Gen 5A   |
| WIF 1/ 2     | Wnt-Inhibitor-Faktor 1/ 2   |

# **1. Einleitung**

## **1.1 Diabetes mellitus**

### **1.1.1 Definition**

Der Diabetes mellitus (DM) umfasst mehrere Krankheitsbilder mit metabolischen Störungen, die als Gemeinsamkeit und wesentliches Merkmal eine Erhöhung des Blutzuckers (Hyperglykämie) zur Folge haben (Craig et al. 2014). Die wichtigsten und mit Abstand häufigsten Formen des DM sind der Diabetes mellitus Typ 1 (T1DM) und der Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM). Der T1DM ist auf einen Zelluntergang der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas und somit ausbleibender Insulinproduktion zurückzuführen. Der T2DM hingegen ist sowohl durch eine verminderte Insulinproduktion, als auch durch eine verminderte Insulinwirkung in der Peripherie (Insulinresistenz) gekennzeichnet (Kerner et al. 2014). Der DM muss dabei im Kontext des metabolischen Syndroms gesehen werden. Als metabolisches Syndrom wird eine Symptomkonstellation aus Hypertonie, abdomineller Adipositas, Dyslipidämie und Hyperglykämie bezeichnet (Alberti and Zimmet 1998). Das metabolische Syndrom ist mit einer Vielzahl von Erkrankungen, vornehmlich aus dem kardiovaskulären Formenkreis, assoziiert (Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus 1997).

### **1.1.2 Epidemiologie**

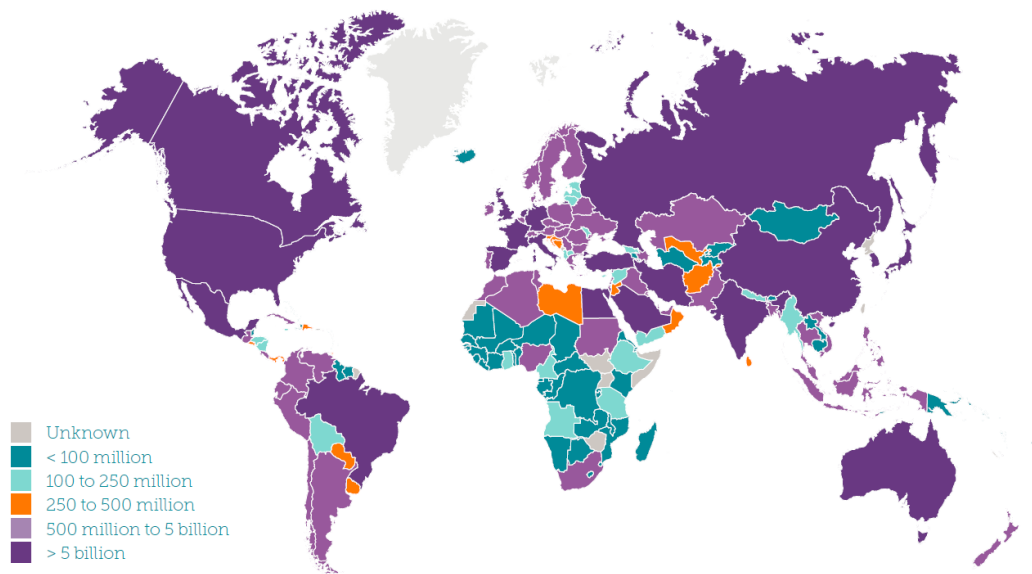
DM ist eine der weltweit am schnellsten zunehmenden Erkrankungen. Die weltweite Prävalenz des DM wird schon jetzt auf etwa 8,8 % geschätzt, was einer Zahl von etwa 415 Millionen Menschen entspricht. Zusätzlich geht man davon aus, dass aktuell etwa 193 Millionen Menschen mit DM nicht diagnostiziert sind, was also nochmal etwa 47 % aller aktuell bereits diagnostizierten T2DM-Patienten entspricht. Schnelle sozioökonomische Entwicklungen sowie demographische Verschiebungen lassen dabei einen weiterhin anhaltenden Prävalenzanstieg vermuten. Es wurde für das Jahr 2040 eine weltweite Prävalenz für DM von 10,4 % vorausgesagt, was etwa 642 Millionen Menschen bedeutet (International Diabetes Federation 2015).



Die geographische Verteilung weist dabei große Unterschiede auf, wobei einzelne Areale auf eine Prävalenz von bis zu 30 % kommen. Besonders deutlich macht die Bedeutung des DM auch die Untersuchung von Sterberaten in Populationen mit diagnostiziertem DM: Hier liegt die Sterberate im Vergleich zu Populationen ohne DM um etwa das Doppelte höher (Ferdinand and Nasser 2015; Centers for Disease Control and Prevention 2014).

Die Gesundheitsbelastung und die damit assoziierte Mortalität des DM beruht vor allem auf dessen makro- sowie mikrovaskulären Komplikationen. Lange Krankheitsdauer sowie inadäquate Therapie mit hohen Blutzuckerspiegeln tragen maßgeblich zur Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen sowie diabetischer Retinopathie, Nephropathie und Neuropathie bei (Eschwege et al. 1985; Kostiuik and Zubkova 1993). Hauptursache für die hohe Mortalität sind dabei kardiovaskuläre Erkrankungen (Morrish et al. 2001). Im Jahr 2015 sind etwa 5 Millionen Menschen, in der Altersgruppe zwischen 20 und 79 Jahren, weltweit an den Folgen des DM verstorben. Dies entspricht etwa einem Todesfall durch DM alle 6 Sekunden. Dabei ist etwa die Hälfte der an DM Verstorbenen unter 60 Jahre alt. Besondere Bedeutung bekommt diese Zahl im Vergleich zur Mortalität anderer Erkrankungen, die als Todesursache ebenfalls häufig sind: Im Jahr 2013 starben etwa 1,5 Millionen Menschen an Tuberkulose, etwa 1,5 Millionen an den Folgen von HIV/AIDS und etwa 0,6 Millionen an Malaria (International Diabetes Federation 2015). Die Einschätzung der Mortalitätsraten des DM sind dabei mit Vorsicht zu betrachten. Die vielfältigen Folgeerkrankungen werden häufig nicht der zugrundeliegenden Erkrankung des DM zugeschrieben. Studien zeigten, dass Statistiken, die auf der reinen Auswertung von Totenscheinen basieren, die Zahl der Toten durch DM etwa um das Vier- bis Fünffache unterschätzen (Fuller et al. 1983).

Die ökonomischen Folgen des DM sind ebenfalls beachtlich und beinhalten unter anderem den Verlust der Produktivität, Kosten für mögliche Invalidität sowie die Beanspruchung des Gesundheitssystems. Weltweit wurden im Jahr 2015 etwa 935 Milliarden US Dollar zur Behandlung von DM und dessen Folgen ausgegeben. Das waren in Deutschland 35 Milliarden US Dollar (aktuell etwa 31,2 Milliarden EURO) und entspricht damit in etwa den Kosten, die im selben Zeitraum durch alle Krebsentitäten zusammen in Deutschland angefallen sind, siehe Abb. 1-1 (Luengo-Fernandez et al. 2013). Schätzungen der International Diabetes Federation (IDF) zufolge werden diese Kosten im Jahr 2040 auf etwa 1,1 Billionen US Dollar weltweit steigen (International Diabetes Federation 2015).



**Abbildung 1-1: Gesundheitskosten des Diabetes mellitus nach Region pro Jahr in US-Dollar.** Aus: (International Diabetes Federation 2015)

Eine erhöhte Morbidität und Mortalität wird jedoch auch aufgrund einer verminderten Knochenstabilität mit erhöhter Frakturrate beobachtet. Das Risiko, eine Knochenfraktur zu erleiden, steigt bei gleichzeitig diagnostiziertem DM deutlich an. Abhängig von Frakturlokalisation, Krankheitsdauer und Studiendesign liegt dieser Anstieg bei 20 bis hin zu 300 % (Antonopoulou et al. 2013). Hier muss allerdings erwähnt werden, dass sich in der Literatur teilweise widersprüchliche Angaben zum Frakturrisiko bei DM finden (van Daele et al. 1996; Napoli et al. 2014). Dieser Umstand ist wohl der Komplexität des DM mit seinen zahlreichen Folgeerkrankungen und Auswirkungen auf den menschlichen Organismus geschuldet. Nicht nur die gesundheitlichen Konsequenzen jedoch, sondern auch die ökonomischen Aspekte der Knochenfraktur als Folge des DM unterstreichen die Bedeutung dieser Komplikation. In den USA betragen die, durch Knochenfrakturen entstandenen Kosten, bereits jetzt mehr als 20 Milliarden US-Dollar jährlich (Moseley 2012; Tosteson et al. 2008; Melton et al. 2003). Eine Zahl, die in den nächsten Jahren, angesichts der oben genannten Prävalenzraten für DM weiter steigen wird.

Dabei wird die Gesamtheit der pathologischen Veränderungen des Knochens im Zusammenhang mit dem DM als „diabetic bone disease“ bezeichnet (Bouillon 1991; Retzepi and Donos 2010). So ist bei Diabetes-Patienten nicht nur eine erhöhte Frakturrate, sondern auch eine schlechte Knochenheilung mit vermindertem Knochenregenerationspotential, eine erhöhte Osteoporoserate sowie ein verringertes Längenwachstum in der Pubertät zu

verzeichnen (Vestergaard 2014; Cozen 1972; Salerno et al. 1997; Retzepi and Donos 2010). Die Dauer der Frakturheilung ist im Vergleich zu gesunden Populationen um bis zu 87 % verlängert (Loder 1988; Bibbo et al. 2001; Xu et al. 2016). Zudem wurde eine erhöhte Rate an Pseudarthrosenbildung, Redislokationen sowie Wundinfektionen nach Frakturen bei Diabetes-Patienten beobachtet (Stuart and Morrey 1990; Papa et al. 1993; Tisdell et al. 1995).

Eine Verringerung der Knochendichte, hingegen, zeigt sich, im Vergleich zu gesunden Populationen, nur bei T1DM-Patienten. Bei T2DM-Patienten wurde dagegen eine erhöhte Knochendichte festgestellt, wobei auch der höhere body-mass-index (BMI) berücksichtigt wurde (Oei et al. 2015; Vestergaard 2014). Diese Gegensätzlichkeit wird auf die ungleichen Insulinkonzentrationen bei T1DM und T2DM, i.e. Hypoinsulinämie vs. Hyperinsulinämie, zurückgeführt (Thraill et al. 2005). Die ätiopathologischen Veränderungen liegen im Bereich der Balance zwischen Auf- und Abbau des Knochens. In entsprechenden *in vivo* Studien konnte eine verminderte Aktivität von Osteoblasten (siehe unten) bei T1DM festgestellt werden (Verhaeghe et al. 1990; Botolin et al. 2005). Studien, die auf histomorphologischen Untersuchungen von unbehandeltem T1DM in Rattenmodellen basieren, bestätigten diese Erkenntnisse (Goodman and Hori 1984; Verhaeghe et al. 1990). Es zeigte sich weiterhin eine verminderte Sekretion von Osteoid, welches zudem nur unzureichend kalzifiziert war (Retzepi and Donos 2010). Diese Veränderungen konnten auch in Biopsien von humanem T1DM-Knochen nachgewiesen werden (Krakauer et al. 1995).

Neben der Veränderung der Knochendichte, spielt in der „diabetic bone disease“ auch eine veränderte Mikroarchitektur des Knochens, mit verminderter Absorptionsfähigkeit von Energie, verminderter Steifigkeit und erhöhter Fragilität eine Rolle (Dixit and Ekstrom 1980). Dies führt in Knochen von T2DM-Patienten bei gleichzeitig erhöhter Knochendichte dennoch zu einer erhöhten Frakturrate. Im Rattenmodell zeichnete sich dieser Knochen durch minderwertige Vernetzung der Spongiosatrabekel sowie eine, um bis zu 48 % verminderte Kollageneinlagerung aus. Zudem kommt es durch Einlagerung von glykosylierten Endprodukten an Knochenproteine wie Kollagen-Typ-1 zu Funktionsverlusten. Diese Veränderungen konnten durch Insulingabe teilweise rückgängig gemacht werden (Einhorn et al. 1988; Hou et al. 1993; Suzuki et al. 2003; Spanheimer et al. 1988; Carnevale et al. 2014).

## 1.2 Knochenbiologie

### 1.2.1 Grundlagen der Knochenbiologie

Die Funktionalität eines Knochens wird über verschiedene Eigenschaften definiert. Zum einen müssen Knochen starr sein, um Lasten tragen zu können und als Hebel genutzt werden zu können. Zum anderen müssen Knochen flexibel sein, dies ermöglicht die Absorption von Energie durch Deformierung. So können Knochen verkürzt und gleichzeitig verbreitert, oder verlängert und gleichzeitig verjüngt werden. Zudem müssen Knochen möglichst leicht sein, um eine ökonomische Fortbewegung zu erlauben. Die Grundlage für diese Fähigkeiten bietet die Mikroarchitektur und Zusammensetzung des Knochengewebes (Seeman and Delmas 2006). Makroskopisch lässt sich eine äußere, dichte Schicht, die Kortikalis, von einer inneren, trabekulären Schicht, der Spongiosa, unterscheiden. Auf molekularer Ebene besteht Knochengewebe einerseits aus Zellen, andererseits aus der extrazellulären Matrix (ECM).

### 1.2.2 Extrazelluläre Matrix

Die ECM von Knochengewebe besteht zu etwa 90 % aus Kollagenen, vornehmlich Kollagen-Typ-I. Weitere Bestandteile sind Elastin, Fibronectin, Laminin sowie diverse andere Proteoglykane und Glykosaminoglykane (Baron 2000; Alford et al. 2015). Die Zusammensetzung und Anzahl der Verknüpfungen der Kollagenfibrillen spielen eine wichtige Rolle im Erhalt der Knochenfunktion. Hauptaufgabe der Kollagenfibrillen ist das Absorbieren von Energie. Bei einer zu geringen Anzahl an Verknüpfungen kann es dabei zur Auflösung der Kollagenhelices kommen. Ist die Anzahl der Verknüpfungen andererseits zu hoch, nimmt die Fähigkeit der Energieabsorption ab (Baron 2000). Zusätzlich wird die nötige Steifigkeit des Knochens über die Einlagerung von Kalzium in Form von Hydroxyapatitkristallen ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ) gewährleistet. Ist die Kalzifizierung des Kollagens dabei übermäßig hoch, so verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen Flexibilität und Steifigkeit. Dieser Knochen zeichnet sich zwar durch eine besondere Festigkeit aus, die fehlende Absorption von Energie führt jedoch zu Frakturen. Es bilden sich zunächst Mikrobrüche, die als Abwehrmechanismus die vollständige Fraktur des Knochens verhindern. Kollagen-Typ-I ist ein fibrillär organisiertes Protein. Diese Bezeichnung leitet sich von den supramolekularen Aggregaten ab, die diese Proteine bilden, den sogenannten Fibrillen (Tsipouras and Ramirez 1987). Für die Funktion des Kollagens im Knochengewebe

ist dessen extrazelluläre Organisation entscheidend. Kollagene lagern sich zu Tripel-Helices zusammen, was ihnen Stabilität verleiht. Um diese Struktur zu ermöglichen, bestehen Kollagen-Proteine aus jeweils zwei pro- $\alpha$ -1 Ketten und einer pro- $\alpha$ -2 Kette. Jede  $\alpha$ -Kette wiederum enthält zwei terminale Propeptide sowie das zentrale  $\alpha$  Segment. Dieses wird auch Tripel-Helix-Domäne genannt, denn es besteht aus einer Aminosäurekette mit einem Glycin an jeder dritten Position (Gly-X-Y), welches die Verformung zu einer seilähnlichen Struktur ermöglicht. Die Zusammenlagerung der drei  $\alpha$ -Ketten zu einer Tripel-Helix erfolgt schließlich über die Interaktion hydrophober und hydrophiler Aminosäuren. Die Quervernetzung der Helices untereinander wird schließlich durch eine Lysinoxidase katalysiert (Tsipouras and Ramirez 1987; Valadares et al. 2014; Minor 1980). Die  $\alpha$ -Ketten des Kollagen-Typ-I werden durch die Gene „*collagen type 1 alpha 1*“ (COL1A1) und „*collagen type 1 alpha 2*“ (COL1A2) determiniert (Liu et al. 2016). Die herausragende Funktion des Kollagen-Typ-I im Knochengewebe wird anhand der heterogenen Gruppe von Kollagen-Typ-I-Gendefekten deutlich. Die Mutation des COL1A1-Genes manifestiert sich im klinischen Erscheinungsbild der Osteogenesis imperfecta (OI). Diese Patienten haben unter normalerweise alltäglichen Belastungsansprüchen des Knochenskeletts eine stark erhöhte Wahrscheinlichkeit, Knochenbrüche zu erleiden (Van Dijk and Sillence 2014). Grundlage sind dabei Abweichungen in der Struktur des Kollagen-Typ-I, welche zu einer pathologischen Organisation der Kollagene untereinander und zur übrigen ECM führen. Dies impliziert auch, dass vor allem qualitative Veränderungen des Kollagens für das klinische Erscheinungsbild der OI verantwortlich sind, während quantitative Veränderungen eher zweitbedeutend sind (Rauch and Glorieux 2004; Baljet 2002). Dabei ist bemerkenswert, dass sogar Mutationen, die eine Bildung der Tripel-Helix noch ermöglichen, ebenfalls mit einer erhöhten Frakturrate einhergehen (Marini et al. 2007). Saito et al konnten am Tiermodell eine Einschränkung der enzymatischen Quervernetzung der ossären Kollagenfibrillen bei DM aufzeigen, was bei gleicher Anzahl an Kollagenfibrillen eine deutliche Einschränkung der Knochenstabilität und somit ein erhöhtes Frakturrisiko birgt (Saito et al. 2006; Saito et al. 2014).

### **1.2.3 Zelluläre Organisation**

Osteozyten bilden die Mehrheit der zellulären Komponente des Knochengewebes. Osteozyten gehen aus Osteoblasten hervor, die durch neu formierte Knochenmatrix eingemauert worden sind. Der Bereich, in denen Osteozyten zu finden sind, nennt man

Lakunen. Zahlreiche dendritische Fortsätze verknüpfen Osteozyten im Knochenetzwerk untereinander, so spielen sie als Mechanotransduktoren eine zentrale Rolle im Knochenumbauprozess (Marini et al. 2007). Über mechanosensible Ausstülpungen der Osteozyten werden Veränderungen in der Beanspruchung des Knochens detektiert. Die genaue Lokalisation dieser Signaldetektion ist bisher nicht bekannt (Compton and Lee 2014). Durch die Sekretion von Zytokinen und den Eingriff in die Signalwege der Knochenhomöostase (siehe unten) wird anschließend der Knochenumbau initiiert (Baron 2000).

Die Bestandteile der ECM werden größtenteils durch Osteoblasten sezerniert. Diese stammen von mesenchymalen Vorläuferzellen ab. Ein zentraler Transkriptionsfaktor in der Differenzierung von Osteoblasten ist der „*Runt Related Transcription Factor 2*“ (RUNX2) (Haxaire et al. 2016; Meyer et al. 2014; Long 2012). RUNX2 wird als „master gene of osteoblast differentiation“ bezeichnet (Guo et al. 2015). Die Bedeutung dieses Transkriptionsfaktors wird durch die Auswirkungen von Mutationen dieses Gens deutlich. Die cleidocranielle Dysplasie ist eine autosomal-dominante Erbkrankheit, die mit einer Aplasie der Klavikula, offenstehenden Fontanellen, fehlerhafter Zahnentwicklung, Kleinwuchs und weiteren skelettalen Veränderungen einhergeht (Lee et al. 1997; Mundlos et al. 1997). Diese Erkrankung konnte auf verschiedene Mutationen im RUNX2 Gen zurückgeführt werden. RUNX2 ist jedoch nicht nur in der Embryonalentwicklung essentiell, sondern auch postnatal an der Regulation der Osteoblastenfunktion beteiligt. Genetische Veränderungen mit nur teilweise verminderter Expression von RUNX2 im Mausmodell führten zu verringerter Osteoblastenaktivität mit Entwicklung einer Osteopenie (Xiao et al. 2005). Etwa 15 % aller reifen Osteoblasten differenzieren im weiteren Verlauf zu Osteozyten (Baron 2000).

Osteoklasten stehen den Osteoblasten funktionell gegenüber und sind verantwortlich für die Resorption von Knochen. Es handelt sich um knochenspezifische Makrophagen, welche aus hämatopoetischen Stammzellen hervorgehen und zu mehrkernigen Riesenzellen fusionieren. Die beiden wichtigsten Mediatoren dieser Differenzierung sind Makrophagenkoloniestimulierender-Faktor (M-CSF) sowie Rezeptor-Aktivator-von-Nuklearfaktor- $\kappa$  B Ligand (RANKL), welche größtenteils durch Osteoblasten und Osteozyten sezerniert werden (Charles and Aliprantis 2014; Florencio-Silva et al. 2015).

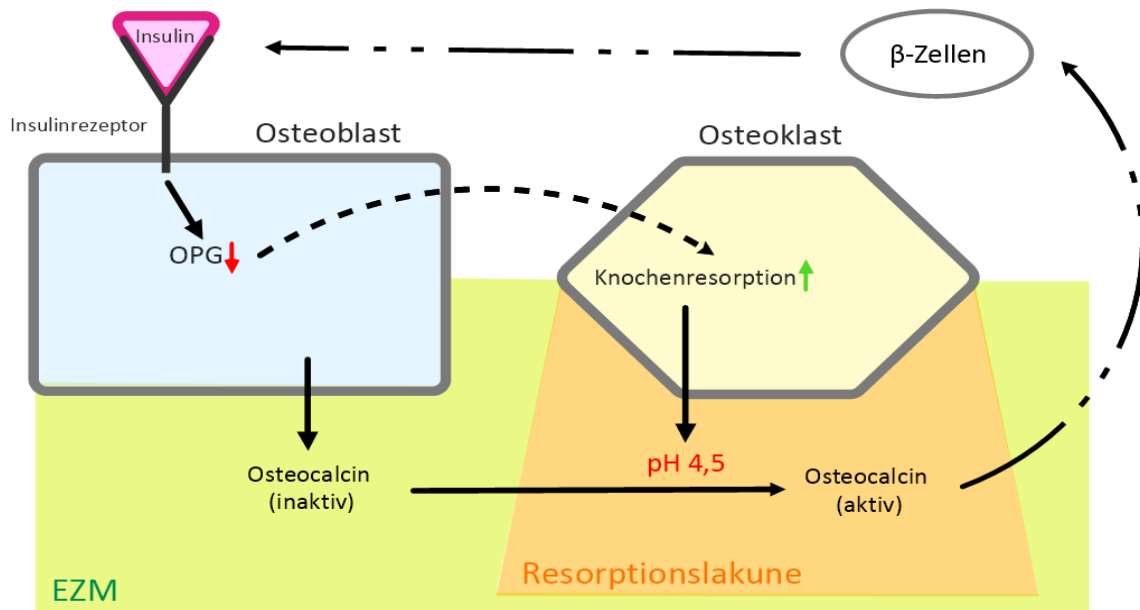
Wiederholte Belastungen des Knochenskeletts sind Teil der normalen Alltagsbelastung und führen dennoch zur Anhäufung kleinster Mikrotraumen im Knochengewebe. Um dem skelettalen System des Körpers eine dauerhafte Stabilität zu gewährleisten, unterliegt das Knochengewebe daher einem stetigen, dynamischen Umbauprozess. Die zellulären Mechanismen dieses Umbaus nennt man „*Modeling*“ (dt. Aufbau) und „*Remodeling*“ (dt. Umbau) des Knochens (Seeman and Delmas 2006). Primäres Ziel ist in der Wachstumsphase dabei das Erreichen einer möglichst stabilen Knochenstruktur. Im Erwachsenenalter hingegen liegt die Aufgabe in der Optimierung der Knochenbelastbarkeit bei gleichzeitig möglichst geringer Knochenmasse. Das Zusammenspiel aus Osteozyten, Osteoklasten und Osteoblasten gewährleistet dabei die simultane Resorption sowie Neuf ormation von Knochengewebe, wobei Osteoklasten und Osteoblasten in sogenannten „*basic multicellular units*“ (BMU) zusammenarbeiten (Florencio-Silva et al. 2015; McArdle et al. 2015; Niedzwiedzki and Filipowska 2015). Osteoklasten bilden zunächst ein saures Milieu an der Knochenoberfläche. So werden proteolytische Enzyme aktiviert, welche die Knochenmatrix anschließend resorbieren (Baron 2000). Diese werden durch eine Reihe dichter Podosomen an der apikalen Membran der Osteoklasten von der umgebenden Knochenstruktur separiert (Boyle et al. 2003; Charles and Aliprantis 2014; McArdle et al. 2015; Schlesinger et al. 1997). Dabei werden in der Knochenmatrix eingelagerte Zytokine freigesetzt, die Teil der nicht-kollagenen ECM sind. Hier ist vornehmlich „*transforming growth factor-beta*“ (TGF- $\beta$ ) zu nennen. TGF- $\beta$  ist ein im menschlichen Körper ubiquitär vorkommendes Polypeptid, welches regulierende Eigenschaften in der Proliferation, Differenzierung, Migration und weiteren Funktionen von Zellen übernimmt. Es ist im Knochen maßgeblich an der Regulierung von Knochenaufbau und –Resorption beteiligt (Massague 1990; Sporn et al. 1986). Es sind drei Isoformen von TGF- $\beta$  bekannt: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3. Im Knochengewebe ist TGF- $\beta$ 1 die vorherrschende Isoform. Es wird dort größtenteils als „*small latent complex*“ (SLC) gespeichert (Janssens et al. 2005). Der SLC besteht aus TGF- $\beta$ 1 sowie einem daran gebundenen Latenz-assoziierten Peptid (LAP) (Poniatowski et al. 2015). Die Abspaltung von TGF- $\beta$ 1 aus der Bindung mit LAP führt zu dessen Aktivierung. Im Knochengewebe scheint diese Spaltung durch das saure Milieu der Osteoklasten, welches während der Remodellierung geschaffen wird, katalysiert zu werden (Oreffo et al. 1989). Sobald TGF- $\beta$ 1 aktiviert ist, wirkt es über zwei verschiedene Rezeptorformen auf die Zielzelle. Über die Bindung an den Typ-II-Rezeptor kommt es zunächst zur Rekrutierung und sodann Bindung der Typ-I-Rezeptoren und somit Ausbildung eines trinären Komplexes. Typ-I-Rezeptoren werden auch als „*activin receptor-like kinases*“ (ALK) bezeichnet

(Janssens et al. 2005; Nakano et al. 2014). Im Knochengewebe ist ALK5 der einzige vorkommende Typ-I-Rezeptor. Schlussendlich führt die Aktivierung des TGF- $\beta$ 1-Signalweges im Knochen unter anderem zur Osteoklastogenese, zur Expression von RUNX2 sowie zur Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten, was sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden konnte. *In vitro*-Modelle sind allerdings stark abhängig von Differenzierung, Zelldichte, TGF- $\beta$ 1-Konzentration sowie anderen Kulturbedingungen (Pilkington et al. 2001). Die TGF- $\beta$ 1-Aktivität wird über negative Feedback-Regelkreise durch direkte Zielgene des TGF- $\beta$ -Signalweges reguliert. Ergebnisse von Mausmodellen konnten die Bedeutung von TGF- $\beta$ 1 im Knochen *in vivo* deutlich machen. Dies gelang mittels gezielter Deletion des TGF- $\beta$ 1-Genabschnittes im Erbgut von Mäusen. Dieses sogenannte Tgfb1-Knockout-Mausmodell konnte ein vermindertes Längenwachstum sowie ein Verlust der Kalzifizierung nachweisen (Geiser et al. 1998). Histologisch konnte weiterhin eine stark verminderte Osteoblastenzahl, ein Verschieben des Verhältnisses zwischen Knochenaufbau und -Resorption sowie eine verminderte Belastbarkeit des Knochengewebes nachgewiesen werden (Atti et al. 2002; Janssens et al. 2005). In der Pathogenese der Camurati-Engelmann Krankheit spielt hingegen eine Überfunktion von TGF- $\beta$ 1 die entscheidende Rolle. Durch eine gain-of-function Mutation in der Gensequenz von TGF- $\beta$ 1 kommt es zu einer Überaktivität von Osteoblasten, während die Osteoklastogenese eingeschränkt ist. Die Betroffenen weisen eine pathologisch vermehrte Knochensubstanz mit Sklerosierung der Diaphyse langer Röhrenknochen sowie der Schädelbasis auf (Janssens et al. 2000; Sparkes and Graham 1972). Die Rolle des TGF- $\beta$ 1-Signalweges im Zusammenhang mit der Knochenstabilität von Patienten mit T2DM ist bislang nicht eindeutig geklärt. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe deuten jedoch auf einen Zusammenhang zwischen verminderter TGF- $\beta$ 1-Expression bei vermindertem Insulinangebot und Glukoseexposition von Osteoblasten hin (Haug et al. 2016). Xu et al. konnten diese verminderte Expression von TGF- $\beta$ 1 bei diabetischer Stoffwechsellage *in vivo* bestätigen (Xu et al. 2016).

Die resorbierende Aktivität einer BMU dauert im adulten Knochen etwa drei Wochen (Sims and Martin 2014). Im Anschluss sezernieren Osteoblasten den organischen Teil der ECM, welcher zunächst als Osteoid bezeichnet wird. In einem weiteren Schritt wird dieses, wie oben genannt, durch Kalzifizierung stabilisiert. Die Neuformation des Knochens nimmt etwa 3 bis 4 Monate in Anspruch. So werden jährlich etwa 10 % der Knochenmasse eines Menschen erneuert, womit nach etwa 10 Jahren das gesamte Knochenskelett ersetzt ist.



Osteocalcin ist ein weiteres Protein, welches eine Verbindung zwischen Energie- und Knochenstoffwechsel darstellt. Osteocalcin ist das häufigste der nicht-kollagenen Proteine der ECM und wird von Osteoblasten sezerniert (Hauschka et al. 1989). Hervorzuheben sind seine Funktionen sowohl im Insulin- und Glukosemetabolismus, als auch im Knochenstoffwechsel (Clemens and Karsenty 2011). Osteoblasten verfügen über funktionelle Insulinrezeptoren. Insulin stimuliert hier unter anderem die Synthese von Kollagen-Typ-I (Kream et al. 1985). Auch die Sekretion von Osteocalcin wird stimuliert und ermöglicht dem Insulin-Signaling, neben diesen knochenspezifischen Funktionen, vermutlich außerdem die Verbindung zwischen Knochen- und Energiestoffwechsel im menschlichen Organismus. Anhand von Mausmodellen mit Defekt des osteoblastären Insulinrezeptors konnte die Wirkung des Osteocalcins auf den Energiestoffwechsel gezeigt werden. Im Modell entwickelten die Tiere eine Verringerung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas, der  $\beta$ -Zellproliferation sowie der intrazellulären Insulinmenge. Die Folgen waren Hyperglykämie, insuffiziente Insulinspiegel sowie eine pathologische Glukosetoleranz (Ferron et al. 2010; Lee et al. 2007). Um die Glukosehomöostase des menschlichen Organismus zu beeinflussen, reicht die alleinige insulinvermittelte Sekretion des carboxylierten Osteocalcins jedoch nicht aus. Denn Osteocalcin liegt nach Sekretion in der Knochenmatrix zunächst als inaktive, carboxylierte Form, an Hydroxyapatitkristallen gebunden, vor. Erst durch Decarboxylierung löst sich Osteocalcin aus der Knochenmatrix und ermöglicht so eine Regulation im systemischen Glukosemetabolismus (Clemens and Karsenty 2011). Die Decarboxylierung wird durch das saure Milieu, welches während der Knochenresorption durch Osteoklasten gebildet wird, ermöglicht. Tatsächlich konnte durch *in vivo*-Mausmodelle gezeigt werden, dass Insulin-Signaling in Osteoblasten zu einer funktionellen Inhibition von Osteoprotegerin (OPG) führt. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Knochenresorption durch Osteoklasten und folglich zu einer vermehrten Freisetzung von Osteocalcin. Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass bei eingeschränkter Fähigkeit zur Knochenresorption auch die Möglichkeit der Regulation des Glukosestoffwechsels eingeschränkt ist (Ferron et al. 2010). Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass das Insulin-Signaling zu einer vermehrten Osteocalcin-Synthese und -Sekretion der Osteoblasten führt. Außerdem kommt es durch die Aktivierung von Osteoklasten zu einer vermehrten Knochenresorption mit Aktivierung des Osteocalcins. Dieses wiederum führt zu einer erhöhten Insulinsensitivität in peripheren Zielorganen und stimuliert die Insulinfreisetzung aus  $\beta$ -Zellen des Pankreas (s. Abb. 1-2).



**Abbildung 1-2 Insulin-Signaling in humanen Osteoblasten.** EZM: Extrazelluläre Matrix, OPG: Osteoprotegerin. In Anlehnung an: Ferron et al. 2010

Im menschlichen Organismus konnten in Studien ähnliche Effekte des Osteocalcins aufgezeigt werden. Erhöhte Serumosteocalcinwerte wurden mit einer verbesserten Glukosetoleranz assoziiert (Hwang et al. 2009). Ebenso korreliert der Serumosteocalcinspiegel invers mit dem Nüchternblutzucker, dem glykosylierten Hämoglobin A (HbA<sub>1c</sub>) und der Insulinresistenz (Maddaloni et al. 2014; Movahed et al. 2012; Pittas et al. 2009).

Die Veränderung der Insulinsensitivität durch Osteocalcin scheint wiederum, zumindest teilweise, durch erhöhte Adiponectinserumspiegel induziert zu werden (Lee et al. 2007). Adiponectin wird zu den Adipokinen gezählt, einer Gruppe von Proteinen, die im Fettgewebe sezerniert werden und auf unterschiedliche Weise den Stoffwechsel beeinflussen (Matsuzawa et al. 1999). Im Mausmodell konnte bei dauerhafter Osteocalcinaktivierung eine Erhöhung der Adiponectinexpression um das Zwei- bis Dreifache festgestellt werden (Lee et al. 2007). Verminderte Adiponectinserumspiegel korrelieren sowohl mit Übergewicht, als auch mit DM (Arita et al. 1999; Hu et al. 1996). Ebenso konnten im Mausmodell Hyperglykämie sowie Insulinresistenz durch exogene Zufuhr von Adiponectin rückgängig gemacht werden. Adiponectin wurde in der Literatur als „*insulin-sensitizer*“ beschrieben (Kadowaki and Yamauchi 2005). Osteoblasten besitzen Adiponectinrezeptoren. Eine Aktivierung dieser Rezeptoren führt zu

Osteoblastenproliferation und stimuliert hier die Sekretion von Osteocalcin sowie Kollagen-Typ-I (Kanazawa 2015; Luo et al. 2005). Zudem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Adiponectin, über die vermehrte Expression von RANKL und die verminderte Expression von OPG, zu einer Stimulation der Osteoklastenaktivität führt. Dieser Effekt konnte durch eine Blockade der osteoblastären Adiponectinrezeptoren rückgängig gemacht werden (Luo et al. 2006). Eine Verdopplung des Adiponectinserumspiegels geht mit einer Reduktion der Knochendichte um 2-3 % einher. Dabei wurden potentielle Risikofaktoren wie Alter, BMI, Nikotinkonsum und Hormonersatztherapie berücksichtigt (Richards et al. 2007). Ebenso zeigte sich, dass hohe Adiponectinserumspiegel mit einem erhöhten Risiko für Knochenfrakturen einhergehen (Barbour et al. 2011). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Adiponectin eine entscheidende Rolle in der Bedeutung des Knochens als endokrines Organ spielt.

Fibronectin (FN) ist ein weiteres nicht-kollagenes Protein der ECM des Knochens (Al-Qattan et al. 2014). Es spielt, unter anderem, eine wichtige Rolle in der Adhäsion, Migration, Differenzierung, Proliferation sowie der embryonalen Entwicklung von Zellen (Steffensen et al. 2011). FN-knockout Mäuse verenden noch im embryonalen Stadium (George et al. 1993). Besondere Bedeutung hat FN im adulten Stadium während der Knochenheilung. Es hat diverse Zell-Matrix-bindende Domänen und ermöglicht so eine Verankerung von Zellen an der Oberfläche neu gebildeter Knochenmatrix (Moursi et al. 1996; Ripamonti and Reddi 1992). Diese Bindung wird über Integrinrezeptoren, die auf der Zelloberfläche präsentiert werden, ermöglicht. Integrine erlauben ein Outside-In-Signaling, was, neben der reinen Verankerungsfunktion, weitere Auswirkungen auf die Zellfunktion möglich macht. *In vitro* Versuche konnten zeigen, dass die Bindung von FN ein möglicher Initiator der Differenzierung von Osteoblasten ist. Unter Blockade des osteoblastären Integrinrezeptors, welcher FN bindet, nahm die Expression von Kollagen-Typ-I ab. Zudem war die Expression von Osteocalcin, ein wichtiger Marker der späten osteoblastären Differenzierung, vermindert. Weiterhin konnte die Bedeutung von FN auf ausgereifte Osteoblasten gezeigt werden. Die Zugabe von FN-Antikörper zu ausgereiften Osteoblasten *in vitro* führte zu deren Apoptose (Globus et al. 1998). Neben dieser zellulären Form des FN existiert das lösliche Plasma-FN, welches in der Leber produziert wird. Inwieweit dieses lösliche FN eine Rolle im Knochenstoffwechsel einnimmt ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt (Hynes 1990; Bentmann et al. 2010).

## **1.3 Charcot-Arthropathie**

### **1.3.1 Definition**

Der Begriff der Charcot Arthropathie (CA) ist bisher nicht umfassend definiert. Vielmehr umfasst er ein komplexes Syndrom, welches als aseptische Inflammation beginnt und schließlich chronisch progressiv, in variabler Ausprägung, mit Destruktion von Knochen- und Gelenkanteilen verläuft. Der (partielle) Verlust der schützenden, sensorischen Innervation ist dem Krankheitsbild regelhaft vorausgehend. Die diabetische Neuropathie ist dabei die häufigste Ätiologie dieses Innervationsverlustes (Rogers et al. 2011; Jeffcoate 2015). Die CA im Rahmen des DM betrifft fast ausschließlich den Fuß, es finden sich in der Literatur jedoch auch einzelne Fallberichte anderer Lokalisationen. So wurden bereits über eine CA der Handgelenke, der Knie, der Hüfte und der Wirbelkörper berichtet (Phillips et al. 1995; Caglayan et al. 2013; Allo Miguel et al. 2015; Berg 1997).

J.K. Mitchell hatte 1831 erstmals den Zusammenhang zwischen einer Rückenmarksverletzung und der Entwicklung einer Arthropathie beschrieben. Benannt ist das Krankheitsbild jedoch nach dem französischen Neurologen Jean-Martin Charcot. Dieser hatte das klinische Bild einer Arthropathie der unteren Extremität als Komplikation einer Neurosyphilis erstmals 1868 präsentiert. 1936 wurde die CA erstmals als Komplikation des DM beschrieben, was heute weltweit als häufigste Ursache angenommen wird (Molines et al. 2010; Rajbhandari et al. 2002; Sanders 2004; Sanders et al. 2013).

### **1.3.2 Epidemiologie**

Die Erkrankung scheint keine geschlechtsspezifische Verteilung zu haben und zeigt einen Manifestationsgipfel zwischen der fünften und sechsten Lebensdekade. In einer der größten publizierten Studien bezüglich der CA, wurde, zwischen 1947 und 1970, in einer Population von 68000 Diabetespatienten eine Inzidenz von 0,01 % pro Jahr angegeben (Sinha et al. 1972). Eine im Jahr 1947 veröffentlichte Studie an der Joslin Clinic in Boston gab unter Diabetespatienten eine Inzidenz von circa 0,2 % pro Jahr an (Bailer and Root 1947). Eine neuere Studie zeigte bereits eine Inzidenz von etwa 0,3 %: 30 aus 10000 Patienten mit DM pro Jahr (Fabrin et al. 2000; Fauzi et al. 2016; Frykberg and Belczyk 2008; Rajbhandari et al. 2002).

Die Angaben zur Prävalenz der CA variieren in verschiedenen Studien und liegen zwischen 1 und 13 % in Populationen von Diabetikern. Es wird angenommen, dass die Variabilität in den häufig fehlenden Symptomen in frühen Stadien, nicht eindeutigen Diagnosekriterien sowie der relativen Seltenheit der Erkrankung begründet ist. Auch eine unzureichende Kenntnis und Wahrnehmung der Erkrankung innerhalb behandelnder Berufsgruppen spielt hier eine Rolle, was impliziert, dass die wahre Prävalenz noch deutlich höher liegt (Mascarenhas and Jude 2014).

### **1.3.3 Klassifikation**

Die CA wird üblicherweise radiologisch diagnostiziert und wird deshalb anhand der radiographischen Darstellung nach Eichenholtz klassifiziert. Stadium I wird auch als Fragmentationsstadium bezeichnet. Es zeichnet sich durch einen Verlust der Integrität des betroffenen Knochen- und Knorpelgewebes aus. Es kommt zu Osteopenie, Fragmentation sowie Subluxation oder Dislokation. Klinisch imponiert das betroffene Gelenk durch Rötung, Überwärmung, Schwellung sowie vermehrte Laxität. Der Übergang in Stadium II kann mehrere Wochen dauern. Es kommt dann zur Organisation der entstandenen Knochendefekte. Knochenrümpfer sklerosieren und verschmelzen ungeordnet, ektope Knochenneubildung findet statt. Das klinische Bild ist durch einen Rückgang der Rötung, der Schwellung sowie der Überwärmung und eine vermehrte Stabilität des betroffenen Gelenkes gekennzeichnet. Den Abschluss des stadienhaften Krankheitsverlaufes beschreibt das Stadium III. Durch Rekonstruktionsvorgänge kommt es zum Abbau von sklerotischen Strukturen, Abrundung von Knochenfragmenten sowie knöcherner und fibrotischer Ankylosierung. Dies führt zwar zu Stabilität des betroffenen Gelenkes, jedoch gleichfalls zu massiver Funktionseinschränkung mit deformierter Gelenkarchitektur. Stadium III wird auch als Rekonstruktionsstadium bezeichnet. Klinisch stellt sich dieses Stadium mit Deformation, Vergrößerung sowie Fixierung des betroffenen Gelenkes dar (Chantelau and Grutzner 2014; Gouveri and Papanas 2011; Rosenbaum and DiPreta 2015; Stefansky and Rosenblum 2005). Die Validität der Eichenholtz-Klassifikation wurde zuletzt, vor dem Hintergrund neuerer, genauerer bildgebenden Untersuchungsmethoden, wie der Magnetresonanztomographie, in Frage gestellt. Insbesondere frühe Stadien der CA können ohne radiographisch sichtbare Veränderungen einhergehen. Dennoch ist sie, in der klinischen Diagnostik der CA, die am häufigsten verwendete Klassifikation (Hofstaetter and Trieb 2015).

### **1.3.4 Pathogenese**

Die Pathogenese der CA konnte bis zum aktuellen Zeitpunkt nur unzureichend geklärt werden. Die CA des Fußes kann nicht auf einen einzigen Auslöser allein zurückgeführt werden. Vielmehr sind es zahlreiche Faktoren, die bei der Prädisposition und Entstehung des Krankheitsbildes eine Rolle spielen. Momentan wird davon ausgegangen, dass eine verlängerte, unkontrollierte Inflammation des betroffenen Gelenkes das Voranschreiten der Erkrankung unterhält. So kommt es schließlich zu Osteolyse, Destruktion und Dislokation (Jeffcoate 2015; Rogers et al. 2011).

Die ursprüngliche Beschreibung des Krankheitsbildes durch Jean-Martin Charcot bezog sich auf Patienten mit tertiärer Syphilis und Tabes dorsalis. Weiterhin wird das Auftreten der Charcot Arthropathie auch bei Patienten mit vorbestehender toxisch, infektiös oder traumatisch bedingter Neuropathie beschrieben (Rogers et al. 2011). Der DM ist also keine grundsätzliche Voraussetzung zur Entstehung der Erkrankung, wohl aber ein Verlust der protektiven peripheren Sensibilität. Dieser Verlust erhöht zunächst die Wahrscheinlichkeit für Mikrotraumen im Bereich des Fußes, die vom Betroffenen unbemerkt bleiben. Knochenläsionen führen sodann, unabhängig ihrer Ätiologie, zur Expression proinflammatorischer Zytokine, insbesondere Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Kon et al. 2001).

#### **1.3.4.1 RANKL/ RANK/ OPG-Signalweg**

Die Expression dieser Zytokine ermöglicht über die Ausreifung von Osteoklasten den ossären Umbauprozess, der zur Knochenheilung notwendig ist. Diese Ausreifung wird über das RANKL/ RANK/ OPG-System vermittelt. Die vermehrte Zytokinfreisetzung führt zu einem Anstieg der Expression des Rezeptor-Aktivator-von-Nuklearfaktor- $\kappa$  B Liganden (RANKL). RANKL wird von zahlreichen Zellen exprimiert, unter anderem von Osteoblasten, T-Lymphozyten, dendritischen Zellen, Endothelzellen und Fibroblasten. RANKL wiederum führt über die Bindung an Rezeptor-Aktivator von Nuklearfaktor- $\kappa$  B (RANK), einem Transmembranprotein der TNF-Familie, zu einer vermehrten Expression von Nuklearfaktor- $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B). NF- $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor, welcher schließlich die Ausreifung von Osteoklasten begünstigt (Boyce and Xing 2008; Jeffcoate et al. 2005; Kon et al. 2001). Dieser Zytokinanstieg mit nachfolgender Signalkaskade ist physiologisch und normalerweise relativ kurz. Durch den fehlenden Schmerzreiz bei (diabetischer)

Neuropathie kann es jedoch zu anhaltender Belastung des betroffenen Fußes mit weiterer Traumafolge und somit anhaltender Zytokinexpression kommen.

Gleichzeitig führt die Expression von NF- $\kappa$ B jedoch auch zu einer vermehrten Freisetzung des Glykoproteins Osteoprotegerin (OPG) aus Osteoblasten (Boyce and Xing 2008). OPG wirkt auf RANKL ähnlich eines Abfangrezeptors und vermindert so dessen begünstigende Wirkung auf die Osteoklastogenese. Durch diesen ausbalancierten Prozess wird die kontinuierliche Remodellierung des Knochens ermöglicht. In verschiedenen Studien konnte bisher gezeigt werden, dass eine Veränderung dieses RANKL/ OPG-Quotienten bei diversen Knochenerkrankungen eine zentrale Rolle spielt (Hofbauer and Schoppet 2004). So konnte eine erhöhte RANKL-Expression in Patientinnen mit postmenopausaler Osteoporose gezeigt werden (Eghbali-Fatourehchi et al. 2003), wohingegen die Produktion von OPG in Osteoblasten durch Östrogen stimuliert werden konnte (Hofbauer et al. 1999). Locklin et al. konnten eine Erhöhung des RANKL/ OPG-Quotienten um das 25-fache durch Anhebung der Parathormon-(PTH)-Konzentration, wie sie beim primären Hyperparathyreoidismus vorkommt, zeigen (Locklin et al. 2003). Die Rolle des Zusammenspiels zwischen RANKL, RANK und OPG ist bezüglich der CA noch nicht hinreichend geklärt. Die oben genannten pathophysiologischen Überlegungen legen jedoch einen Zusammenhang zwischen der CA und einer Veränderung des RANKL/OPG-Quotienten nahe. Die Interpretation von Forschungsergebnissen bezüglich dieses Signalweges ist jedoch deshalb erschwert, weil vermutlich weitere, RANKL-unabhängige Signalwege in der Knochenremodellierung eine Rolle spielen.

#### **1.3.4.2 Wnt-Signalweg**

Einer dieser weiteren Signalwege, die in der Knochenmodulation eine Rolle spielen, ist die Signalkaskade des Wnt. Diese wurde erstmals 1980 in Brusttumorzellen in Kleintierversuchen entdeckt (Nusse and Varmus 1982). Der Wnt-Signalweg spielt in zahlreichen biologischen Prozessen in embryonalen, postnatalen sowie ausgereiften Geweben eine Rolle. Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Zellfunktion und Apoptose werden durch Wnt-Signale koordiniert (Logan and Nusse 2004). Wnts übermitteln ihre Signale über intrazelluläre Transduktionswege. Um diese zu verstehen, muss zwischen kanonischem und nicht-kanonischem Wnt-Signalweg unterschieden werden.

Als kanonischer Signalweg wird der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg bezeichnet (Monroe et al. 2012). Der entscheidende Mechanismus dieses Signalweges besteht in der Stabilisierung des

intrazellulären Effektormoleküls  $\beta$ -Catenin. Ohne Aktivierung des Wnt-Signalweges wird  $\beta$ -Catenin durch Glykogensynthase Kinase 3 beta (GSK3B) phosphoryliert, anschließend ubiquitiniert und schließlich proteosomal abgebaut. Eine vermehrte Zielgenexpression bleibt aus. Binden Wnt-Liganden, wie Wnt3a, an den Frizzled-Rezeptor und einen der Korezeptoren, die „*low-density lipoprotein receptor-related Proteine*“ 5 (LRP5) sowie LRP6, so wird der Abbau von  $\beta$ -Catenin verhindert. Durch Freisetzung von „*dishevelled-Protein*“ (DVL) wird GSK3B inhibiert (Hardt and Sadoshima 2002). Anschließend kann  $\beta$ -Catenin in den Nukleus transloziert werden und dort im Transkriptionskomplex mit dem „*T-cell-factor*“/„*lymphoid enhancer-binding factor*“ (TCF/LEF) verschiedene Zielgene regulieren. TCF sind eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle in der intrazellulären Regulation des kanonischen Wnt-Signalweges spielen. In Abwesenheit des Wnt-Signals wirken TCF4/TCF7L2 sowie TCF7 als Repressor der Wnt-Zielgene.  $\beta$ -Catenin selbst bindet nicht direkt an die Ziel-DNA, sondern wirkt erst über die Bindung an TCF/LEF als zweigliedriger Transkriptionskomplex (Clevers 2006; Ye et al. 2009; Grant et al. 2006). Die Bedeutung des TCF/LEF Transkriptionskomplexes in der Regulation der Knochenhomöostase wird im Zusammenhang mit der Glukokortikoid-induzierten Ausbildung von Osteoporose deutlich. In großen Studien konnte der Zusammenhang zwischen der Einnahme von Glukokortikoiden und der Ausbildung von Osteoporose mit folglich erhöhter Frakturwahrscheinlichkeit belegt werden (Eom et al. 2011; Hansen et al. 2014; Van Staa et al. 2000). Smith et al. konnten diesen Effekt auf eine Aktivitätsminderung von TCF/LEF zurückführen (Smith and Frenkel 2005). In Kohortenstudien konnte zudem gezeigt werden, dass Polymorphismen im TCF7L2-Genlocus mit dem Risiko, einen T2DM zu entwickeln, einhergehen (Sladek et al. 2007; Zhang et al. 2006). Eine extrazelluläre Regulation des kanonischen Wnt-Signalweges erfolgt über Sklerostin, Dickkopfproteine (Dkk), Wnt-Inhibitor-Faktor 1/ 2 (Wif-1/ 2) sowie sezernierte „*frizzled-related Proteine*“ (SFRP). Sklerostin und Dkk-1 binden an LRP 5/ 6 und verhindern so kompetitiv die Fortleitung des Wnt-Signals (Bafico et al. 2001). SFRP und Wif-1/ 2 binden direkt an den Wnt-Ligand und machen so eine Bindung an Frizzled-Rezeptor und LRP 5/ 6 unmöglich (Kim et al. 2013). In der Knochenhomöostase spielt der kanonische Wnt-Signalweg eine entscheidende Rolle. So werden verschiedene Mutationen dieser Signalkaskade mit Veränderungen im Knochenum- und Aufbau assoziiert. In Osteoblasten führt  $\beta$ -Catenin zu einer erhöhten Genexpression von OPG. Wei et al. konnten zeigen, dass eine verminderte Wnt-Aktivierung mit erniedrigten  $\beta$ -Catenin-Spiegeln in osteoklastischen Zellreihen zu einer beschleunigten Osteoklastogenese sowie osteoporotischem Phänotyp führt (Wei et al.



2011). Qiang et al. gelang es in *in vitro* Versuchen, die Osteoklastogenese mittels Wnt3a mit folglich erhöhten  $\beta$ -Catenin-Spiegeln zu supprimieren (Qiang et al. 2010). Dies bedeutet, dass die Aktivierung des Wnt-Signalweges zu einer Inhibition der Osteoklastogenese führt. Besonders deutlich konnte der Einfluss des Wnt-Signalweges auf den Knochenumsatz anhand des Osteoporose-Pseudogliom-Syndroms (OPPG) aufgezeigt werden. Diese autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung führt zu einer früh einsetzenden Osteoporose mit geringer Knochendichte. Gong et al. gelang es, diese Erkrankung auf eine loss-of-function Mutation des LRP5-Gens zurückzuführen (Gong et al. 2001). Es gelang andererseits, die Ausprägung eines Phänotyps mit besonders hoher Knochendichte auf eine gain-of-function Mutation des LRP5-Gens zurückzuführen (Boyden et al. 2002).

Der nicht-kanonische Wnt-Signalweg ist weniger genau charakterisiert. Zudem gibt es hier verschiedene Signaltransduktionswege. Die zwei wichtigsten sind der kalziumabhängige Signalweg und der Signalweg der Zellpolarität. Ersterer ermöglicht über eine Aktivierung des Frizzled-Rezeptors durch Bindung eines Wnt-Liganden, wie Wnt5a, über ein nachgeschaltetes G-Protein eine intrazelluläre Kalziumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum. Es kommt schließlich zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie NF- $\kappa$ B (De 2011). Der Signalweg der Zellpolarität reguliert über die Aktivierung von Frizzled-Rezeptoren und nachfolgend GTPase das Zytoskelett und somit Zellmigration, Zellmotilität und Zellteilung (Rao and Kuhl 2010). Der nicht-kanonische Wnt-Signalweg spielt bezüglich der Pathogenese und des therapeutischen Potentials von Knochenerkrankungen bisher nur eine untergeordnete Rolle.

Die Beeinträchtigung des Wnt-Signalweges bei Patienten mit T2DM konnte in Studien bereits dargelegt werden. Unabhängig von Alter und Geschlecht wurden erhöhte Sklerostin-Level in T2DM-Patienten nachgewiesen. Dabei war der Anstieg abhängig von Krankheitsdauer und HbA1c-Wert (Garcia-Martin et al. 2012). Durch Behandlung mit Sklerostin-Antikörpern konnte in Versuchen an Kleintieren mit T2DM eine Verbesserung der Knochendefektregeneration erreicht werden (Jahn et al. 2012). Es konnte zudem ein Zusammenhang zwischen T1DM, verminderter Sklerostin-Expression und vermehrter Osteozytenapoptose gezeigt werden (Portal-Nunez et al. 2010). Die Rolle des Wnt-Signalweges im Zusammenhang mit der CA ist bis zum aktuellen Zeitpunkt in nur einer Studie untersucht worden. Folestad et al. konnten eine, im Vergleich zu DM-Patienten, verminderte Expression von Sklerostin und Dkk-1 in CA-Patienten feststellen (Folestad et

al. 2015). Hier wird eine vermehrte Aktivierung des Wnt-Signalweges in Zusammenhang mit der Pathogenese der CA gebracht.

### **1.3.5 Therapie**

Die Behandlung der CA besteht zum größten Teil aus einer symptomatischen Therapie: Betroffene werden erst nach klinisch apperentem Auftreten der Erkrankung behandelt ohne dass die physiologische Ursache der Erkrankung therapiert wird. Neben der medikamentösen Behandlung stehen dabei die orthopädischen sowie chirurgischen Therapiemöglichkeiten im Vordergrund. Ein allgemeiner Therapiealgorithmus ist dabei nicht definiert, es hat sich allerdings eine entlastende Therapie, die oft von einer chirurgischen Intervention gefolgt wird, durchgesetzt.

Die initiale Behandlung beinhaltet zunächst eine Entlastung des betroffenen Gelenk- und Skelettabschnittes sowie die Schienung desselben in einer orthopädischen Einfassung. Dies reduziert die mechanische Belastung, das Knochenödem sowie die Inflammation und reduziert häufig auch die resultierende skelettale Deformität. Um einen Therapieerfolg zu erzielen kommt es dabei auf eine umgehende und möglichst frühzeitige Entlastung des betroffenen Gelenkabschnittes an (Chantelau et al. 2007).

Sobald der betroffene Gelenkabschnitt einen stabilen Zustand erreicht hat, was dem Stadium III der Klassifikation nach Eichenholtz entspricht, kommen chirurgische Therapieoptionen in Betracht. Das Ziel ist hier vornehmlich Folgeschäden durch Gelenkfehlstellungen zu vermeiden sowie eine Versorgung, zum Beispiel durch orthopädisches Schuhwerk, zu ermöglichen. Hierbei kommen verschiedene Osteotomien sowie interne und externe Fixationsmethoden zur Anwendung (Smith and Moore 2012; Alrashidi et al. 2017).

In der pharmakologischen Therapie steht die Anwendung von Bisphosphonaten im Vordergrund, welche zusätzlich zu oben genanntem Therapieschema verabreicht werden können. Der Wirkungsnachweis in der CA ist allerdings unzureichend (Richard et al. 2012; Petrova and Edmonds 2013).

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

*Tabelle 2.1-1: Auflistung der für diese Arbeit benötigten Geräte.*

| Gerät  | Typ                               | Firma  |
|--|-----------------------------------|--|
| <b>-20°C Tiefkühlschrank,<br/>+8°C Kühlschrank</b> |                                   | Liebherr GmbH, Biberach<br>an der Riß, Deutschland     |
| <b>-80°C Tiefkühlschrank</b>                       | Forma 905                         | ThermoFisher Scientific<br>Inc., Waltham, USA          |
| <b>Biophotometer</b>                               | BioPhotometer 6131                | Eppendorf AG, Hamburg,<br>Deutschland                  |
| <b>ChemiDoc</b>                                    | ChemiDoc MP Universal<br>Hood III | Bio-Rad Laboratories, Inc.,<br>Hercules, USA           |
| <b>Eismaschine</b>                                 | AF80                              | Hubbard Systems, Inc.,<br>Birmingham (Alabama),<br>USA |
| <b>Feinwaage</b>                                   | Abs 220-4                         | Kern & Sohn GmbH,<br>Balingen-Frommern,<br>Deutschland |
| <b>Mikro-Messzelle</b>                             | 105.800                           | Hellma GmbH & Co. KG,<br>Müllheim, Deutschland         |
| <b>Mikroplatten-Reader</b>                         | FLUOstar Omega                    | BMG LABTECH GmbH,<br>Ortenberg, Deutschland            |

|                            |                             |   |
|----------------------------|-----------------------------|---|
| <b>Mikrozentrifuge</b>     | 5415 R                      | Eppendorf AG, Hamburg,<br>Deutschland         |
| <b>PCR-Cycler</b>          | Mastercycler S nexus        | Eppendorf AG, Hamburg,<br>Deutschland         |
| <b>pH-Meter</b>            | PB-11                       | Sartorius AG, Göttingen,<br>Deutschland       |
| <b>Realtime-PCR-Cycler</b> | CFX 96 Touch                | Bio-Rad Laboratories, Inc.,<br>Hercules, USA  |
| <b>Reinluftwerkbank</b>    | SB 1800                     | BDK GmbH, Sonnenbühl,<br>Deutschland          |
| <b>Schüttelmaschine</b>    | ST-5                        | CAT M. Zipperer GmbH,<br>Staufen, Deutschland |
| <b>Schwingmühle</b>        | MM 400                      | RETSCH GmbH, Haan,<br>Deutschland             |
| <b>Thermomixer</b>         | Thermomixer Compact<br>5350 | Eppendorf AG, Hamburg,<br>Deutschland         |
| <b>Vortexmischer</b>       | Vortex Genie 2 G-560E       | Scientific Industries, Inc.,<br>Bohemia, USA  |
| <b>Zentrifuge</b>          | 5810 R                      | Eppendorf AG, Hamburg,<br>Deutschland         |

## 2.1.2 Verbrauchsmaterial

*Tabelle 2.1-2: Auflistung der für diese Arbeit benötigten Verbrauchsmaterialien.*

| <b>Material</b>  | <b>Hersteller</b>                           |
|--|---|
| <b>96-well PCR-Platten, ohne Rahmen</b>                  | BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland  |
| <b>ALLProtect Tissue Reagent</b>                         | Qiagen                                      |
| <b>EDTA-Röhrchen S-Monovette 2,7; 9ml</b>                | SARSTEDT AG, Hamburg, Deutschland           |
| <b>Luer-Knochenzange FO518R, steril</b>                  | Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland        |
| <b>Multiwellplatten</b>                                  | PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich         |
| <b>PAXgene Blood DNA Tube</b>                            | PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, Schweiz    |
| <b>PCR-Reaktionsgefäße Multiply® -Strip</b>              | SARSTEDT AG, Nümbrecht, Deutschland         |
| <b>Pipettenspitzen</b>                                   | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland          |
| <b>Polypropylenröhrchen (Falcon Tube) 15 &amp; 50 ml</b> | SARSTEDT AG, Nümbrecht, Deutschland         |
| <b>Reaktionsgefäße 0,5; 1,5; 2 ml</b>                    | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland          |
| <b>Safety-Multifly 21G</b>                               | SARSTEDT AG, Nümbrecht, Deutschland         |
| <b>Serile Einmalpinzetten, anatomisch, 14 cm</b>         | PAUL HARTMANN AG, Heidenheim, Deutschland   |
| <b>Serumröhrchen S-Monovette 9ml</b>                     | SARSTEDT AG, Hamburg, Deutschland           |
| <b>Sterile Einmalskalpelle, Nr. 10</b>                   | FEATHER Safety Razor Co., Ltd, Osaka, Japan |

**Sterile Operationshandschuhe, leicht gepudert** Sempermed GmbH, Wien, Österreich

**Verschlussfolie Microseal® „B” 96-well** Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA

---

### 2.1.3 Software

*Table 2.1-3: Auflistung der für diese Arbeit benötigten Software.*

| <b>Software</b>                                  | <b>Hersteller</b>                         |
|--|---|
| <b>CFX Manager, Version 3.1</b>                  | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA |
| <b>EndNote X7, Version 7.3.1</b>                 | Thomson Reuters, New York, USA            |
| <b>GraphPad Prism, Version 5.01</b>              | GraphPad Software Inc., La Jolla, USA     |
| <b>ImageLab, Version 5.1.1.0</b>                 | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA |
| <b>Microsoft Excel, Version 2013</b>             | Microsoft Corporation, Redmond, USA       |
| <b>Microsoft Word, Version 2013</b>              | Microsoft Corporation, Redmond, USA       |
| <b>OMEGA Software für FLUOstar, Version 1.10</b> | BMG Labtech, Offenburg, Deutschland       |

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Gewinnung von Probenmaterial**

Die Entnahme humanen Probenmaterials erfolgte grundsätzlich nur nach ausführlicher Aufklärung sowie Einwilligung des Spenders in Anlehnung an die Deklaration von Helsinki. Ein positives Votum der Ethikkommission der Technischen Universität München wurde zuvor eingeholt.

#### **2.2.1.1 Gewinnung humaner Blutproben**

Zur Entnahme der Blutproben wurden potentielle Spender im Rahmen einer ambulanten Behandlung in der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie im Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München ausgewählt. Bei simultaner Entnahme von Spongiosafragmenten (siehe unten) wurden die Blutproben präoperativ entnommen. Die Blutentnahmen erfolgten peripher venös mittels Sarstedt Multifly®-Kanüle. Es wurden jeweils eine Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) S-Monovette®, sowie zwei Serum S-Monovetten® befüllt. Diese Proben wurden anschließend bei 450 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde zu jeweils 1 ml in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80°C aufbewahrt. Zudem wurde zur Routinekontrolle und zur Erfassung potentieller Ausschlusskriterien eine Blutabnahme mit der Erfassung von Kalium, Natrium, Kreatinin, Harnstoff-N, Kalzium, HbA1c, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin, Triglyceride, Cholesterin sowie gegebenenfalls Nüchtern glukose durchgeführt.

#### **2.2.1.2 Gewinnung humaner Knochenproben**

##### **2.2.1.2.1 Knochenproben gesunder Spender**

Alle Spender der Kontrollgruppe wurden im Rahmen von Operationen mit Knochenresektion in der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie sowie in der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München gewonnen. Voraussetzung zur Aufnahme in die Nicht-Diabetische Kontrollgruppe war dabei, die Kriterien zur Diagnose eines T1DM oder T2DM nicht zu erfüllen. Dabei betrug das Alter der Patienten größer oder gleich 60 Jahre um einen noch nicht manifesten T2DM bei gegebener genetischer Disposition auszuschließen. Ausschlusskriterien waren weiterhin Ursachen einer sekundären Osteoporose (i.e.

Neoplasien, Leberinsuffizienz, Niereninsuffizienz, Organtransplantation, Malabsorptionssyndrom, Hyperthyreoidismus, Hyperparathyreoidismus), Infektionen (lokal an Knochenprobenentnahmestelle oder systemisch), sowie die Einnahme eines oder mehrerer der folgenden Medikamente: Glukokortikoide, Anti-Epileptika, Immunsuppressiva. Keiner der Spender in der Kontrollgruppe hatte im Zeitraum von einem Jahr vor der Probenentnahme eine Operation im Bereich der Knochen oder Gelenke. Die intraoperativ entnommenen Knochenresektate wurden unmittelbar anschließend mittels Luer-Knochenzange unter sterilen Bedingungen einer Reinluftwerkbank in etwa kirschkernegroße Fragmente zerkleinert und in 15 ml Tubes überführt. Diese wurden mit 2-3 ml „Allprotect Tissue Reagent“ befüllt, welches die Spongiosafragmente vollständig bedeckte. Die Tubes wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

#### **2.2.1.2.2 Knochenproben diabeteskranker Spender**

Alle Spender der Diabetes-Gruppe wurden im Rahmen von Operationen mit Knochenresektion in der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie sowie in der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München gewonnen. Voraussetzung zur Aufnahme in die DM-Gruppe war dabei entweder die vollständige Ausprägung eines Metabolischen Syndroms mit abdomineller Adipositas (Taillenumfang  $\geq 94$  cm [männlich] bzw.  $\geq 80$  cm [weiblich] (Kerner et al.)), einer Hypertriglyceridämie ( $> 150$  mg/dl), einem HDL-Cholesterinwert von  $< 40$  mg/dl [m] bzw.  $< 50$  mg/dl [w], sowie einer Hypertonie (RR  $\geq 140/90$  mm/Hg), oder aber ein bereits diagnostizierter T2DM gemäß WHO-Kriterien (WHO 2006). Die Ausschlusskriterien umfassten auch hier die Ursachen einer sekundären Osteoporose (i.e. Neoplasien, Leberinsuffizienz, Niereninsuffizienz, Organtransplantation, Malabsorptionssyndrom, Hyperthyreoidismus, Hyperparathyreoidismus), Infektionen (lokal an Knochenprobenentnahmestelle oder systemisch), sowie die Einnahme eines oder mehrerer der folgenden Medikamente: Glukokortikoide, Anti-Epileptika, Immunsuppressiva. Die intraoperativ entnommenen Knochenresektate wurden unmittelbar anschließend mittels Luer-Knochenzange unter sterilen Bedingungen in etwa kirschkernegroße Fragmente zerkleinert und in 15 ml Tubes überführt wurden. Diese wurden mit 2-3 ml „Allprotect Tissue Reagent“ befüllt, welches die Spongiosafragmente vollständig bedeckte. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Tubes bei -80°C aufbewahrt.



### **2.2.1.2.3 Knochenproben von Spendern mit Charcot-Arthropathie**

Knochenresektate wurden im Rahmen von Operationen der CA des Fußes am Schön-Klinikum Harlaching in München entnommen. Die Spongiosafragmente wurden aus unmittelbar betroffenen Arealen entnommen. Voraussetzung zur Einteilung in die Charcot-Gruppe war, zusätzlich zu den oben genannten Einschlusskriterien der T2DM-Gruppe, die Erfüllung der Diagnosekriterien der CA. Diese sind, in der vorausgegangenen akuten Phase der CA eine Schwellung des betroffenen Gelenkes, eine Überwärmung des betroffenen Hautareals mit einer Hauttemperaturdifferenz  $> 2^{\circ}\text{C}$ , sowie ein radiologischer Nachweis der skelettalen Destruktionen gemäß Eichenholtz-Klassifikation. Die Ausschlusskriterien umfassten auch hier die Ursachen einer sekundären Osteoporose (i.e. Neoplasien, Leberinsuffizienz, Niereninsuffizienz, Organtransplantation, Malabsorptionssyndrom, Hyperthyreoidismus, Hyperparathyreoidismus), Infektionen (lokal an Knochenprobenentnahmestelle oder systemisch), sowie die Einnahme mindestens eines der folgenden Medikamente: Glukokortikoide, Antiepileptika, Immunsuppressiva. Die intraoperativ entnommenen Knochenresektate wurden unmittelbar anschließend mittels Luer-Knochenzange unter sterilen Bedingungen in etwa 5mm kirschkernegroße Fragmente zerkleinert und in 15 ml Tubes überführt. Diese wurden mit 2-3 ml „Allprotect Tissue Reagent“ befüllt, welches die Spongiosafragmente vollständig bedeckte. Die Tubes wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

## 2.2.2 Demographie

Die demographische Verteilung sowie weitere Patientencharakteristika können Tabelle 2.2-1 entnommen werden.

**Tabelle 2.2-1: Patientencharakteristika. Es handelt sich um Mittelwerte unter Angabe der Standardabweichung. Abkürzungen:** BMI = Body Mass Index, CA = Charcot-Arthropathie, DM = Diabetes mellitus, HbA<sub>1c</sub> = glykosyliertes Hämoglobin A, m = männlich, OE = obere Extremität, SD = Standardabweichung, UE = untere Extremität, w = weiblich

|                            | Kontrollen   | DM           | CA           |
|----------------------------|--------------|--------------|--------------|
| N                          | 49           | 62           | 7            |
| Geschlecht                 | m            | 18           | 20           |
|                            | w            | 31           | 42           |
| Alter [Jahre (Min-Max)]    | 72,2 (60-98) | 74,3 (56-99) | 65,1 (52-71) |
| Lokalisation Fraktur       | UE           | 39           | 41           |
|                            | OE           | 10           | 21           |
| HbA <sub>1c</sub> [%]      | 5,35 ± 0,36  | 6,10 ± 0,69  |              |
| Triglyceride [mg/dl]       | 129 ± 71     | 197 ± 97     |              |
| HDL-Cholesterin [mg/dl]    | 65 ± 22      | 54 ± 18      |              |
| LDL - Cholesterin [mg/dl]  | 118 ± 43     | 125 ± 51     |              |
| Lipoprotein A [mg/dl]      | 53 ± 71      | 57 ± 75      |              |
| Cholesterin gesamt [mg/dl] | 198 ± 46     | 205 ± 46     |              |

### 2.2.3 RNA-Isolierung

*Tabelle 2.2-2: Materialien zur Durchführung der RNA-Isolation.*

| <b>Material</b>             | <b>CAS-Nummer</b> | <b>Hersteller</b> |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Aqua ad iniectabilia</b> |                   | Apotheke MRI      |
| <b>Chloroform</b>           | 67-66-3           | Roth              |
| <b>dH<sub>2</sub>O</b>      | 7732-18-5         | MRI               |
| <b>Ethanol 70%</b>          |                   | Apotheke MRI      |
| <b>Isopropanol</b>          |                   | Apotheke MRI      |
| <b>Natriumhydroxid 1M</b>   | 1310-73-2         | Roth              |
| <b>TRI-Reagenz</b>          |                   | Sigma             |

Eine der heute am häufigsten angewandten Methoden zur Isolierung von Ribonukleinsäuren (RNA) aus Zellen und Gewebe ist die Phenol-Chloroform-Extraktion in Verbindung mit der Ethanol-Ausfällung. Während proteinhaltige Inhaltsstoffe in der organischen Phase präzipitieren, verbleiben RNA-Stränge in der wässrigen Phase und können so isoliert werden (Chomczynski 1993). Dieses Prinzip wurde zur Isolierung der RNA aus den zuvor gewonnenen Spongiosafragmenten genutzt. Zur Herstellung einer Natriumhydroxid- (NaOH-) Lösung mit einer Konzentration von 10 mM wurden zunächst 500 µl 1 M NaOH mit 49,5 ml destilliertem H<sub>2</sub>O (dH<sub>2</sub>O) vermischt. Um eine möglichst feine Zerkleinerung der Spongiosafragmente in der Schwingmühle zu ermöglichen, wurden die Fragmente in gefrorenem Zustand verarbeitet. Zunächst wurde ein etwa 5 mm großes Spongiosafragment mittels Schwingmühle zermahlen. Der Container der Mühle wurde, mit enthaltenem Spongiosafragment, zunächst über zwei Minuten in Flüssigstickstoff (LN<sub>2</sub>) gekühlt. Das Mahlen selbst erfolgte anschließend für 30 Sekunden bei einer Frequenz von 30 Hertz. Es wurde 1 ml TRI-Reagenz hinzugefügt und die Lösung anschließend in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Vor erneuter Verwendung der Schwingmühle wurde dessen Container mittels Wasser und Seife, sowie 10 mM NaOH gereinigt. Dies diente der

Inaktivierung von RNasen. Nach Inkubation der Suspension für fünf Minuten auf Eis wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt. Nach Vermengung auf dem Vortexmischer (ca. 1 Sekunde, Stufe 10) folgte die Inkubation der Suspension für zehn Minuten auf Eis, sowie anschließend die Zentrifugation (14000 x g, 10 Minuten, 4°C). Die so gewonnene wässrige, obere Phase, mit enthaltener RNA, wurde in ein mit 500 µl Isopropanol befülltes 2-ml-Reaktionsgefäß abpipettiert. Es folgte erneut die Inkubation der Suspension für zehn Minuten auf Eis, sowie anschließend die Zentrifugation (14000 x g, 10 Minuten, 4°C). Somit verblieb der gewonnene RNA-Rückstand als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes und der Überstand konnte abgekippt werden. Mittels 1 ml 70% Ethanol erfolgte das Waschen und Zentrifugieren (14000 x g, 10 Minuten, 4°C) des RNA-Pellets. Dieser Schritt wurde einmalig wiederholt, bevor zuletzt das Pellet mittels 30 ml Aqua ad iniectabilia (a.i.) resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt wurde.

## 2.2.4 RNA-Messung

*Tabelle 2.2-3: Materialien zur Durchführung der RNA Messung*

| <b>Material</b>             | <b>Hersteller</b> |
|-----------------------------|-------------------|
| <b>Aqua ad iniectabilia</b> | Apotheke MRI      |

Vor der weiteren Prozessierung der RNA-Proben wurde deren RNA-Gehalt gemessen. Es wurde dabei das Biophotometer Typ 6131 der Firma Eppendorf AG in Kombination mit der Spezialeküvette „Hellma TrayCell“ der Firma Hellma Analytics verwendet. Hierbei wurde der Absorptionswert der Lösung bei einer Wellenlänge von 260, 280 sowie 320 nm verwendet. Das Absorptionsverhältnis  $A_{260}/A_{280}$  wurde zur Bestimmung der Probenverunreinigung herangezogen. Zunächst erfolgte eine Leerwertmessung mittels 2 µl Aqua ultra-pure. Sodann erfolgte die Messung von 2 µl Probenmaterial in einer Verdünnung von 1:49 µl mittels eines 0,2 mm Deckels. Es wurde nach den Anwendungshinweisen der Firma Hellma Analytics vorgegangen. Zwischen jeder Messung wurde die Spezialeküvette mittels Ethanol gereinigt.

## 2.2.5 cDNA

*Tabelle 2.2-4: Materialien zur Herstellung von cDNA.*

| <b>Material</b>                                  | <b>Hersteller</b> |
|--|-------------------|
| <b>Aqua ad iniectabilia</b>                      | Apotheke MRI      |
| <b>First Strand cDNA Synthesis Kit:</b>          | Fermentas         |
| <b>1. Oligo (dT)<sub>18</sub> Primer</b>         |                   |
| <b>2. 5fach Reaktionspuffer</b>                  |                   |
| <b>3. Ribolock™ RNase Inhibitor (20 U/μl)</b>    |                   |
| <b>4. 10 mM dNTP Mix</b>                         |                   |
| <b>5. M-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/μl)</b> |                   |

Zur weiteren Prozessierung der zuvor isolierten RNA-Stränge wurden zunächst komplementäre DNA (cDNA)-Stränge hybridisiert. Hierzu wurden der Eppendorf MasterCycler S sowie das „First Strand cDNA Synthesis Kit“ der Firma Fermentas genutzt. Durch Anellierung eines universalen Primers an die zuvor isolierten RNA-Stränge und deren anschließender Transkription mittels reverser Transkriptase werden so cDNA-Stränge synthetisiert (Wiame et al. 2000). Entsprechend des zuvor gemessenen RNA-Gehalts wurden maximal 5 μg RNA einer Probe mit 1 μl oligo(dT)<sub>18</sub> Primer in einem Eppendorf-PCR-Gefäß vermengt. Das Gefäß wurde während des gesamten Vorganges auf einem Rack eisgekühlt. Der Ansatz wurde mit Aqua a.i. auf ein Volumen von 11 μl aufgefüllt und im MasterCycler S für fünf Minuten bei 65°C denaturiert sowie für den anschließenden Arbeitsschritt auf 4°C abgekühlt. Es folgte die Zugabe von 4 μl 5X Reaktionspuffer, 1 μl RiboLock™ RNase Inhibitor (20 U/μl), 2 μl dNTP Mix (10mM), sowie 2 μl M-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/μl). Das Gesamtvolumen betrug somit 20 μl pro Ansatz. Es wurde während des ersten Temperaturzyklus im MasterCycler S ein Mastermix mit den oben genannten Komponenten angesetzt. In zwei weiteren Schritten erfolgte nun die Synthese von cDNA im MasterCycler. Zunächst erfolgte die Inkubation des Reaktionsproduktes für 60 Minuten bei 37°C. Durch Erhitzen auf 70°C für fünf Minuten wurde die Reaktion

anschließend terminiert. Nach Abkühlen der cDNA-Stränge auf 4°C konnten diese durch Zugabe von Aqua a.i. auf eine Konzentration von 10 ng/µl verdünnt werden. Bis zu weiteren Verarbeitung wurden die synthetisierten cDNA-Stränge bei -20°C gelagert.

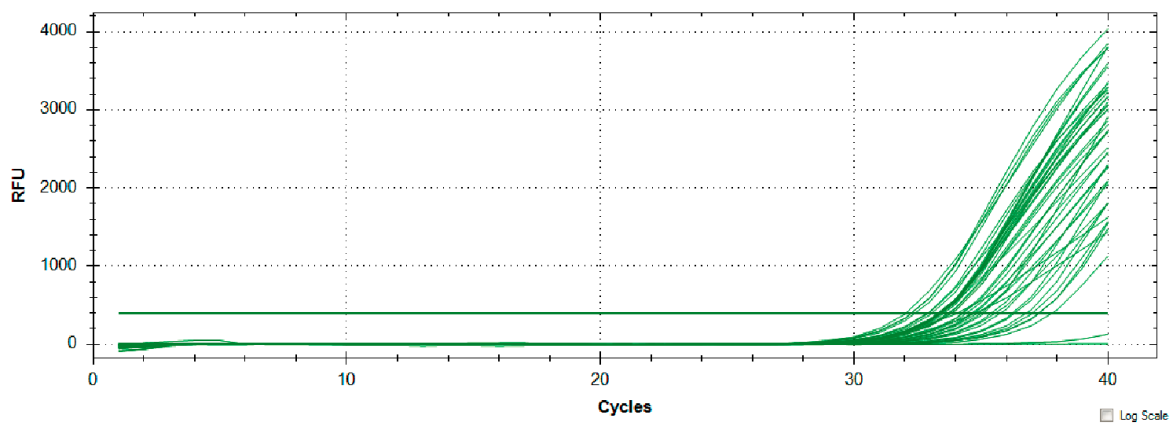
## 2.2.6 qRT-PCR

*Tabelle 2.2-5: Materialien zur Durchführung der quantitativen reverse Transcriptase Polymerasekettenreaktion.*

| <b>Material</b>                        | <b>Hersteller</b> |
|--|-------------------|
| <b>2fach SsoFast EvaGreen Supermix</b> | BioRad            |
| <b>Aqua ad iniectabilia</b>            | Apotheke MRI      |
| <b>Forward Primer</b>                  | MWG Eurofins      |
| <b>Reverse Primer</b>                  | MWG Eurofins      |

Die „*quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction*“ (qRT-PCR) ermöglicht es, tatsächliche Veränderungen im Genexpressionsmuster der zuvor gewonnenen Spongiosaprobe zu detektieren. Das grundsätzliche Prinzip der PCR besteht aus drei Schritten. Zunächst wird durch Erhitzen auf 95°C ein Aufspalten der Doppelstrang-DNA erreicht. Im Zweiten Schritt erfolgt das Anlagern der spezifischen Primer. Die optimale Anlagerungstemperatur („*annealing temperature*“) der verwendeten Primer lag zwischen 56°C und 60°C und wurde zunächst für jeden der verwendeten Primer ermittelt. Die Sequenzen sowie optimalen Anlagerungstemperaturen der verwendeten Primer können Tabelle 2.2-3 entnommen werden. Im dritten Schritt erfolgt mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) die Hybridisierung der Komplementärstränge. Diese Taq-Polymerase entstammt dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* und synthetisiert die DNA entlang der Region zwischen den oben genannten Primern (Chien et al. 1976). Mittels des fluoreszierenden Farbstoffes „*SYBR Green I*“, welcher ausschließlich an Doppelstrang-DNA bindet und somit die DNA-Konzentration direkt messbar macht, ist in der quantitativen PCR (qPCR) der Konzentrationsanstieg je PCR-Zyklus darstellbar (Morin and Smith 1995). In unserem Fall wurde der Farbstoff „EvaGreen“ verwendet. Es wurden je PCR-Ansatz 40 Zyklen prozessiert, um die Reaktion im exponentiellen Teil des

Konzentrationsanstiegs Messen zu können. Die relative Expression der Gensequenzen wurde durch die Anzahl der durchlaufenen Zyklen bestimmt. Zur Normierung der Expressionslevel wurde das, in der Literatur als suffizient beschriebene, Housekeeper-RNA-Molekül  $\beta$ -Actin verwendet. Die CT-Daten des PCR-Cyclers wurden mit Hilfe der Software Excel von Microsoft™ und der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode aufgearbeitet. Diese ermöglichte es, die relative Expression von Zielgenen, die mit der qRT-PCR detektiert wurden, anzugeben (Livak and Schmittgen 2001). Untersucht worden sind Adiponectin, ALK5,  $\beta$ -Catenin, COL1A1, FN, GSK3B, LRP5, LRP6, OPG, Osteocalcin, RANK, RANKL, RUNX2, TCF4, TCF7, TCF7L2, TGFB1, WNT3A sowie WNT5A. Abbildung 2-1 zeigt beispielhaft die Amplifikationskurve für ALK5.



**Abbildung 2-1:** *Amplifikationskurve ALK5 für diverse Knochenproben.* RFU: “relative fluorescence units“.

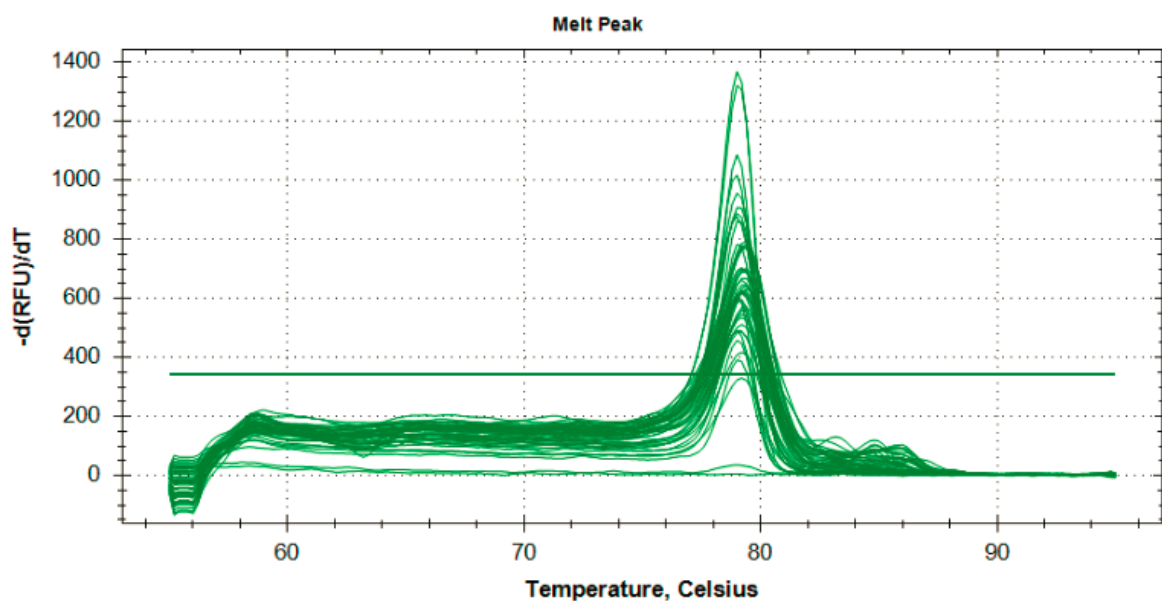
Es wurden 96-well Platten verwendet, welche während des Pipettiervorgangs auf einem Rack eisgekühlt wurden. Es wurde zunächst ein Mastermix erstellt, welcher folgende Reagenzien enthielt und mit der jeweiligen Probenanzahl multipliziert wurde: 10  $\mu$ l 2fach SsoFast EvaGreen Supermix, 0,8  $\mu$ l Forward Primer (5  $\mu$ M), 0,8  $\mu$ l Reverse Primer (5  $\mu$ M). Für die Untersuchung von ALK5 sowie TGFB1 wurden jeweils 3  $\mu$ l der cDNA-Probe hinzugegeben. Für die Untersuchung von COL1A1, FN, OPG, Osteocalcin, RANK, RANKL, sowie, WNT5A wurden jeweils 5  $\mu$ l der cDNA-Probe hinzugegeben Für die Untersuchung von Adiponectin,  $\beta$ -Catenin, GSK3B, LRP5, LRP6, RUNX2, TCF4, TCF7, TCF7L2, sowie WNT3A wurden jeweils 7  $\mu$ l der cDNA-Probe hinzugegeben. Um pro Reaktionsansatz auf ein Volumen von 20  $\mu$ l zu kommen, wurde der Mastermix entsprechend mit Aqua a.i. aufgefüllt. Nachdem der Pipettiervorgang abgeschlossen worden war, wurde

die 96-well-Platte mit einer selbstklebenden Verschlussfolie abgedichtet, kurz zentrifugiert und anschließend in den PCR-Cycler gegeben.

Für Adiponectin, ALK5,  $\beta$ -Catenin, COL1A1, FN, GSK3B, LRP6, Osteocalcin, RANKL, RUNX2, TCF4, TCF7, TCF7L2, TGFB1, WNT3A, WNT5A wurden folgende Reaktionsbedingungen festgelegt:

1. Erhitzen der Proben auf 98°C für drei Minuten
2. 98°C für 10 Sekunden
3. Abkühlen auf 60°C für 15 Sekunden
4. Fotodetektion.
5. Die Schritte 2. Bis 4. wurden daraufhin 39 mal wiederholt.
6. Schmelzkurve: 55°C zu 95°C für 10 Sekunden und Fotodetektion

Abbildung 2-2 zeigt beispielhaft die Schmelzkurve für ALK5.



**Abbildung 2-2:** Schmelzkurve ALK5 für diverse Spongiosaproben. RFU: „relative fluorescence units“.

Die Reaktionsbedingungen für LRP5, OPG und RANK wurden wie folgt festgelegt:

1. Erhitzen der Proben auf 95°C für 3 Minuten
2. 95°C für 10 Sekunden
3. Abkühlen auf 56°C für 10 Sekunden
4. Fotodetektion
5. Die Schritte 2. bis 4. wurden daraufhin 39 mal wiederholt.



6. 95°C für 10 Sekunden

Schmelzkurve: 55°C zu 95°C für 10 Sekunden und Fotodetektion

*Tabelle 2.2-4: Primer der untersuchten Zielgene.*

| <b>Primer</b>      | <b>Vorwärtssequenz</b>                   | <b>Rückwärtssequenz</b>                | <b>Annealing-Temperatur<br/>[°C]</b> |
|--------------------|--|--|--------------------------------------|
| <b>Adiponectin</b> | 5'-TGG TTC TGA TTC<br>CAT ACC AGA G-3'   | 5'-GCC CTG ATG TCA<br>GGA GTT TC-3'    | 60                                   |
| <b>ALK5</b>        | 5'-GCA GAC TTA GGA<br>CTG GCA GTA AG-3'  | 5'-AGA ACT TCA GGG<br>GCC ATG T-3'     | 60                                   |
| <b>β-Catenin</b>   | 5'-GCT TTC AGT TGA<br>GCT GAC CA-3'      | 5'-CAA GTC CAA GAT<br>CAG CAG TCT C-3' | 60                                   |
| <b>COL1A1</b>      | 5'-GGG ATT CCC TGG<br>ACC TAA AG-3'      | 5'-GGA ACA CCT CGC<br>TCT CCA-3'       | 60                                   |
| <b>FN</b>          | 5'-CTG GCC GAA AAT<br>ACA TTG TAA A - 3' | 5'-CCA CAG TCG GGT<br>CAG GAG-3'       | 60                                   |
| <b>GSK3B</b>       | 5'-GAC ATT TCA CCT<br>CAG GAG TGC-3'     | 5'-GTT AGT CGG GCA<br>GTT GGT GT-3'    | 60                                   |
| <b>LRP5</b>        | 5'-GCC AAG ACA GAC<br>AAG ATC GAG-3'     | 5'-CAG CGT GAA CCC<br>AAA AAT G-3'     | 56                                   |
| <b>LRP6</b>        | 5'-AGA ACG CGA<br>GAA GGG AAG AT-3'      | 5'-TGT TTG CAT AAA<br>GCA ACA AAG G-3' | 60                                   |
| <b>OPG</b>         | 5'-GAA GGG CGC TAC<br>CTT GAG AT-3'      | 5'-GCA AAC TGT ATT<br>TCG CTC TGG-3'   | 56                                   |
| <b>Osteocalcin</b> | 5'-TGA GAG CCC TCA<br>CAC TCC TC-3'      | 5'-ACC TTT GCT GGA<br>CTC TGC AC-3'    | 60                                   |

|               |  |  |    |
|---------------|--|--|----|
| <b>RANK</b>   | 5'-CAT CAT GGG ACA<br>GAG AAA TCC-3'           | 5'-GGC AAG TAA ACA<br>TGG GGT TC-3'      | 56 |
| <b>RANKL</b>  | 5'-TGA TTC ATG TAG<br>GAG AAT TAA ACA<br>GG-3' | 5'-GAT GTG CTG TGA<br>TCC AAC GA-3'      | 60 |
| <b>RUNX2</b>  | 5'-CAG TGA CAC CAT<br>GTC AGC AA-3'            | 5'-GCT CAC GTC GCT<br>CAT TTT G-3'       | 60 |
| <b>TCF4</b>   | 5'-CAC GGA GAG CCC<br>CTT CTC-3'               | 5'-GTC CCT AAG GCA<br>GCC ATT C-3'       | 60 |
| <b>TCF7</b>   | 5'-CTG GCC TTC CAG<br>GAT GAA-3'               | 5'-GTT CAC GAG CGA<br>CGA CTT G-3'       | 60 |
| <b>TCF7L2</b> | 5'-TTG ACC GAC AGA<br>CTT TAT GGT G-3'         | 5'-TGT ATG TAG CGA<br>ACG CAC TTT T-3'   | 60 |
| <b>TGFB1</b>  | 5'-ACT ACT ACG CCA<br>AGG AGG TCA C-3'         | 5'-TGC TTG AAC TTG<br>TCA TAG ATT TCG-3' | 60 |
| <b>WNT3A</b>  | 5'-AAC TGC ACC ACC<br>GTC CAC-3'               | 5'-AAG GCC GAC TCC<br>CTG GTA-3'         | 60 |
| <b>WNT5A</b>  | 5'-ATT GTA CTG CAG<br>GTG TAC CTT AAA<br>AC-3' | 5'-CCC CCT TAT AAA<br>TGC AAC TGT TC-3'  | 60 |

## 2.2.7 Proteinisolation

*Tabelle 2.2-5: Materialien zur Durchführung der Proteinisolation.*

| Material                            | CAS-Nummer | Hersteller   |
|-------------------------------------|------------|--------------|
| „Complete“ Minitablette             |            | Roche        |
| Desoxycholsäure (DOC)               | 83-44-3    | Sigma        |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | 60-00-4    | Roth         |
| Isopropanol                         |            | Apotheke MRI |
| Natriumchlorid                      | 7647-14-5  | Sigma        |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)          | 151-21-3   | Roth         |
| Natriumorthovanadat                 | 13721-39-6 | Sigma        |
| Nonidet P40 (NP40)                  | 9016-45-9  | Sigma        |
| Pefabloc®                           | 30827-99-7 | Roth         |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)  | 329-98-6   | Sigma        |
| Trishydroxymethylaminomethan (TRIS) | 77-86-1    | Sigma        |

Es wurde zudem die Isolation von Protein aus den Spongiosaproben durchgeführt. Anwendung fand hier das Prinzip des Radio-Immunoprecipitation Assay (RIPA). Dies ermöglicht die Extraktion von zytoplasmatischen, membrangebundenen als auch nukleären Proteinen. Zur Herstellung einer RIPA-Lösung wurden zunächst 0,605 g Trishydroxymethylaminomethan (TRIS) mit 1,45 g Natriumchlorid (NaCl), 2000 µl Nonidet P40 (NP40), 0,3 g Desoxycholsäure (DOC), 0,372 g EDTA sowie 100 mg Natriumdodecylsulfat (SDS) vermengt und in 50 ml H<sub>2</sub>O aufgelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 7,6 angepasst. Das Gesamtvolumen wurde mit H<sub>2</sub>O auf 50 ml aufgefüllt. Zudem

wurde eine „Complete“-Proteaseinhibitorlösung erstellt, indem eine „Complete“-Tablette in 1,5 ml H<sub>2</sub>O gelöst wurde. Eine Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)-Lösung wurde durch Auflösen von 87,1 mg PMSF in 10 ml Isopropanol erstellt. Diese diente als Serin- und Zysteininhibitor. Zur Herstellung einer Pefabloc®-Lösung, welche als Serinproteaseinhibitor diente, wurden 100 mg Pefabloc® in 8,34 ml H<sub>2</sub>O gelöst. Als Phosphataseinhibitor diente aktiviertes Natriumorthovanadat. Es wurden 551,76 mg Natriumorthovanadat (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) in 24 ml zweifach destilliertem H<sub>2</sub>O (ddH<sub>2</sub>O) gelöst. Der pH-Wert dieser Lösung wurde mittels Salzsäure (HCl) und 10 M NaOH auf 10,0 eingestellt und anschließend auf 100°C erhitzt, so dass sich die Farbe der Lösung von gelb auf farblos änderte. Nach Abkühlung wurde der pH-Wert erneut, wie oben beschrieben, auf 10,0 eingestellt. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis sich die Färbung dauerhaft von gelb auf farblos geändert hatte. Im ersten Schritt der Proteinisolation wurde nun die RIPA-Lösung mit den Blocklösungen vermischt. Es wurde 1 ml der RIPA-Lösung mit 40 µl „Complete“-Lösung, 20 µl Pefabloc®-Lösung, 20 µl PMSF-Lösung sowie 10 µl Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Lösung vermischt. Ähnlich der RNA-Isolation wurde, nach Hinzugabe des RIPA-Puffers, jeweils ein etwa 5 mm großes Spongiosafragment im Container der Schwingmühle für drei Minuten mittels LN<sub>2</sub> tiefgefroren und im Anschluss gemahlen. Es folgte das Überführen der Suspension in ein 2 ml großes Reaktionsgefäß sowie die Zentrifugation (10000 g, eine Minute, 4°C). Der Überstand, welcher die Proteine enthielt, konnte anschließend mittels Pipette in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Die Proteinproben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

## 2.2.8 Proteinmessung nach Lowry

*Tabelle 2.2-6: Materialien zur Determinierung der Proteinmenge.*

| Material                            | CAS-Nummer | Hersteller |
|-------------------------------------|------------|------------|
| <b>1 M Natriumhydroxid</b>          | 7647-01-0  | Roth       |
| <b>Di-Natriumcarbonat</b>           | 497-19-8   | Sigma      |
| <b>Di-Natriumtartratdihydrat</b>    | 6106-24-7  | Merck      |
| <b>Folinreagenz</b>                 |            | 47641      |
| <b>Kupfersulfat-Pentahydrat</b>     | 7758-99-8  | Sigma      |
| <b>Rinderserumalbumin<br/>(BSA)</b> | 9048-46-8  | Sigma      |

Zur Determinierung der Proteinmenge in den isolierten Proben kam das hochsensitive Verfahren nach Lowry zum Einsatz. Hierbei wurde der „*platereader*“ der Firma BMG Labtech verwendet. Das Verfahren nach Lowry basiert auf zwei Schritten. Eine kupferhaltige Lösung bildet einen Komplex mit, in den Proben enthaltenen, Peptidbindungen. Im zweiten Schritt wird ein Folinreagenz in Abhängigkeit der Kupfer-Peptid-Komplexe zu Molybdenblau reduziert. Unter Zuhilfenahme einer Standardkurve lassen sich so quantitative Aussagen zur Proteinmenge machen (Lowry et al. 1951). Zur Erstellung der Standardkurve wurde Rinderserumalbumin (BSA)-Lösung mit einer Konzentration von 10 µg/µl verwendet. Es wurden zunächst 50 mg BSA in 5 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst. Zur Herstellung einer di-Natriumtartrat-Lösung wurden 2 g Di-Natriumtartrat-Dihydrat in 100 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst. Zur Herstellung einer Kupfersulfat (CuSO<sub>4</sub>-) Lösung wurden 1 g Kupfersulfat-Pentahydrat (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) in 100 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst. Zur Herstellung einer Natriumcarbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-) Lösung wurden 20 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> mit 100 ml 1 M NaOH-Lösung in 900 ml ddH<sub>2</sub>O vermengt. Anschließend wurden folgende Reaktionslösungen angesetzt: Für die kupferhaltige Reaktionslösung wurden 20 µl der di-Natriumtartrat-Lösung mit 20 µl der CuSO<sub>4</sub>-Lösung und 1,96 ml der Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung vermengt. Zur Herstellung der Folinlösung wurden 500 µl Folinreagenz mit 1000 µl ddH<sub>2</sub>O vermengt. Es wurde mit 96-well-Platten gearbeitet. Zunächst wurden die Proteinproben auf

Eis aufgetaut. Währenddessen wurden 2 µl der BSA-Lösung je Reaktionsansatz hinzu pipettiert. Anschließend wurden je Reaktionsansatz 2 µl der Proteinprobe hinzu pipettiert. Weiterhin erfolgten die Hinzugabe von jeweils 150 µl der kupferhaltigen Lösung sowie die Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden jeweils 30 µl der Folinlösung hinzugegeben und die 96-well-Platte auf der Schüttelmaschine bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 60 Minuten wurde die Adsorption mit Hilfe des „*platereader*“ bei 750 nm gemessen. Die Darstellung erfolgte mit Hilfe der Software Omega der Firma BMG Labtech. Um testbedingte Abweichungen gering zu halten, wurden mit jeder Probe jeweils drei Reaktionsansätze („*triplicates*“) durchgeführt und gemessen. Auf jeder 96-well-Platte erfolgte zudem die gleichzeitige Messung sieben verschiedener Proteinkonzentrationen mit aufsteigender, jeweils bekannter Proteinmenge. Dies ermöglichte später die Erstellung einer Standardkurve und somit die Kalkulation der, in den Proben gesuchten, Proteinquantität.

## **2.3 Statistik**

Die Auswertung der generierten Daten erfolgte mittels GraphPad Prism. Für Daten mit mehr als zwei unabhängigen Datengruppen wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Als Konfidenzintervall wurde 95% festgelegt. Als statistisch signifikanter p-Wert galt ein Wert kleiner 0,05. Die graphische Darstellung erfolgte als Balkendiagramm des Medians unter Angabe des Quantilsabstandes.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Genexpressionsanalysen von Patientenspongiosa**

Um den Einfluss des T2DM sowie der CA auf die mRNA-Expression in spongiösem Knochen zu untersuchen und so die Situation *in vivo* darstellen zu können, wurden RT-q-PCR durchgeführt. Es wurde dabei zwischen drei Gruppen differenziert: Kontrollgruppe, Diabetikergruppe und Charcotgruppe. Weitere Patientencharakteristika können Tab. 2.2-1 entnommen werden. Es erfolgte zudem ein geschlechts- sowie alterskorreliertes „*matching*“ zwischen den Charcot- und Kontrollproben sowie zwischen den Diabetes- und Kontrollproben.

### 3.1.1 Ergebnisse qRT-PCR TCF7L2

Die Auswertung der qRT-PCR Ergebnisse für TCF7L2 ergab für die Diabetikergruppe eine Verminderung der Expression um 60 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (Median: 2,5; Interquartilsabstand (IQA): 3,9). Für die Charcotgruppe ergab die Expressionsanalyse eine Verminderung um 15 % (Median: 0,3; IQA: 1,35) im Vergleich zur Kontrolle. Die Ergebnisse erwiesen sich als statistisch signifikant (Abb. 3-1).

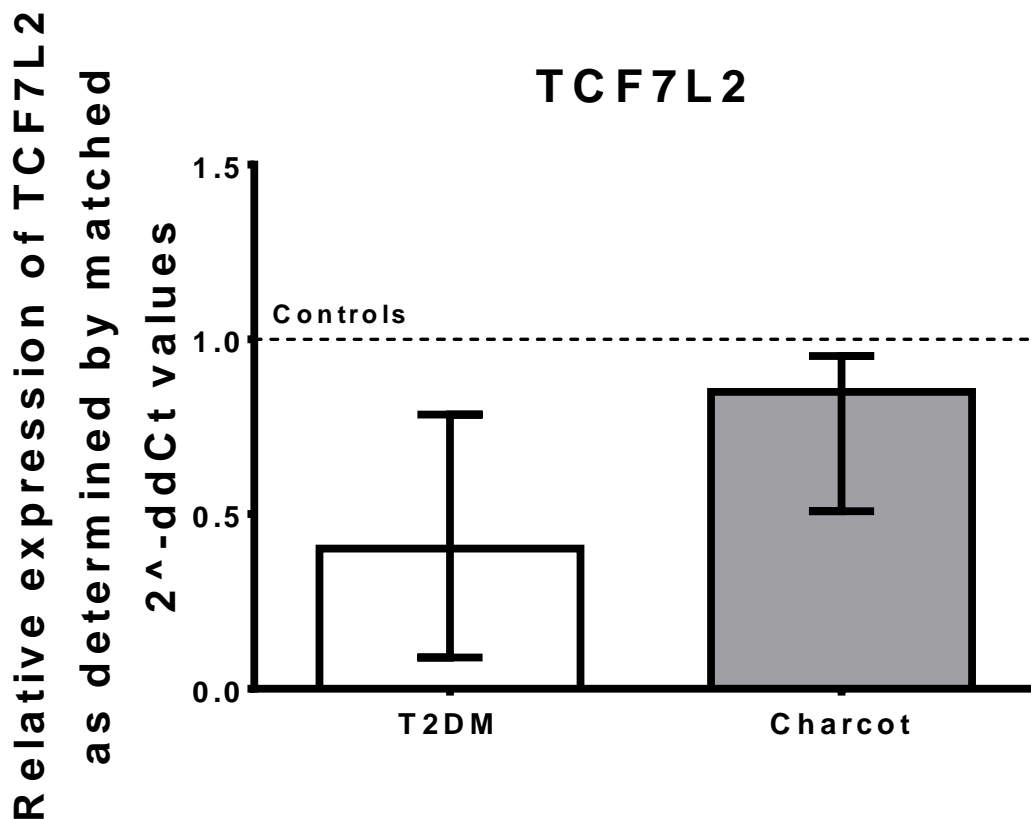


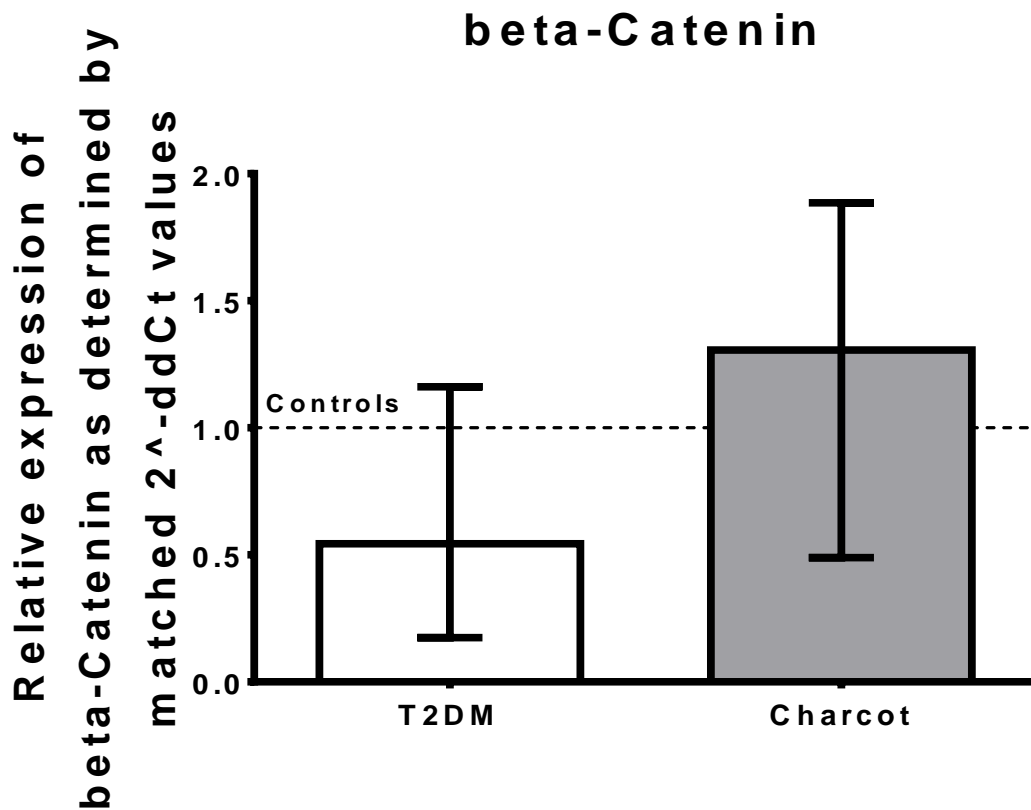
Abbildung 3-1: Genexpressionsanalyse von TCF7L2. Dargestellt ist der Median mit Interquartilsabstand. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA), bezugnehmend auf die Kontrollgruppe;  $p \leq 0,05$ .  $N=45$ ,  $n \geq 2$ . T2DM: Diabetes mellitus Typ 2; controls: Kontrollgruppe.

### 3.1.2 Ergebnisse qRT-PCR $\beta$ -Catenin

Die Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR bezüglich  $\beta$ -Catenin zeigte eine Verminderung der Expression in der Diabetikergruppe um 46 % (Median: 0; IQA: 2,3). Hingegen zeigte sich in der Charcotgruppe eine um 30 % (Median: -1,39; IQA: 3,29) erhöhte



Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Ergebnisse erwiesen sich als statistisch nicht signifikant, eine klare Tendenz zeichnete sich jedoch ab (Abb. 3-2).



*Abbildung 3-2: Genexpressionsanalyse von beta-Catenin. Dargestellt ist der Median mit Interquartilsabstand.* Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA), bezugnehmend auf die Kontrollgruppe;  $p > 0,05$ .  $N=45$ ,  $n \geq 2$ . T2DM: Diabetes mellitus Typ 2; controls: Kontrollgruppe.

### 3.1.3 Ergebnisse qRT-PCR LRP5

Die Auswertung der qRT-PCR-Ergebnisse bezüglich LRP5 ergab eine um 20 % (Median: -5,77; IQA: 16,39) verminderte Expression von LRP5 in der Diabetikergruppe im Vergleich zu Kontrollgruppe. In der Charcotgruppe wurde, im Vergleich zur Kontrollgruppe, eine Expressionsverminderung von 98 % (Median: -5,78; IQA: 5,76) gemessen. Die Ergebnisse erwiesen sich als statistisch nicht signifikant (Abb. 3-3).

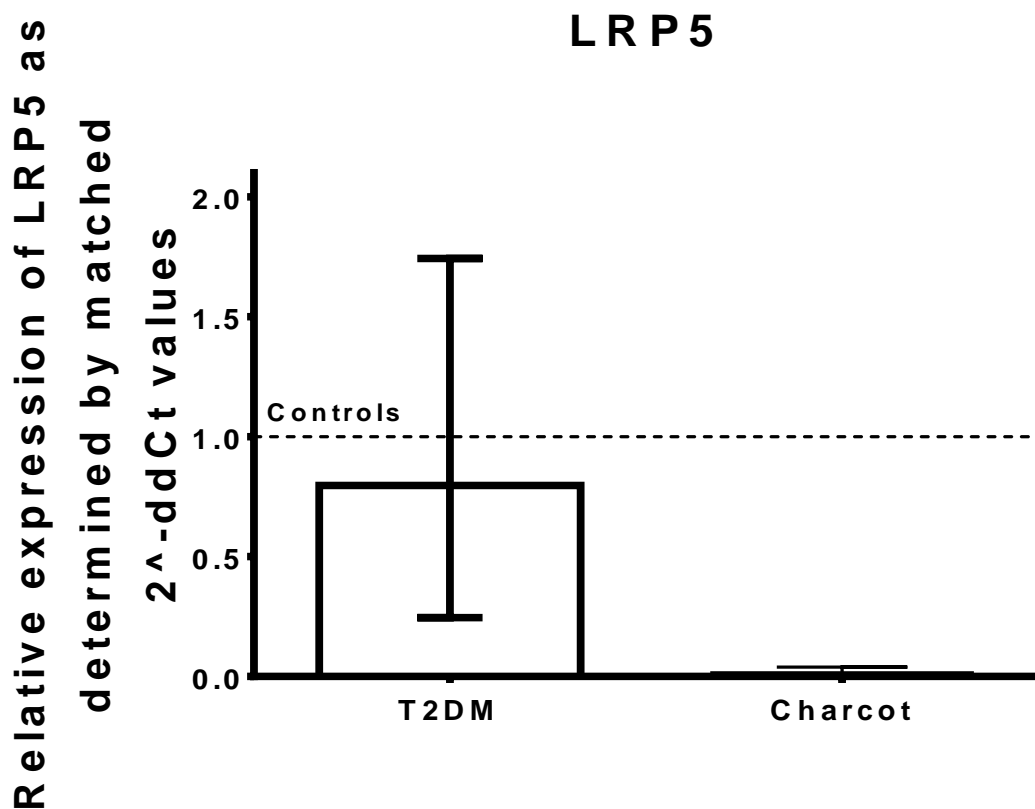
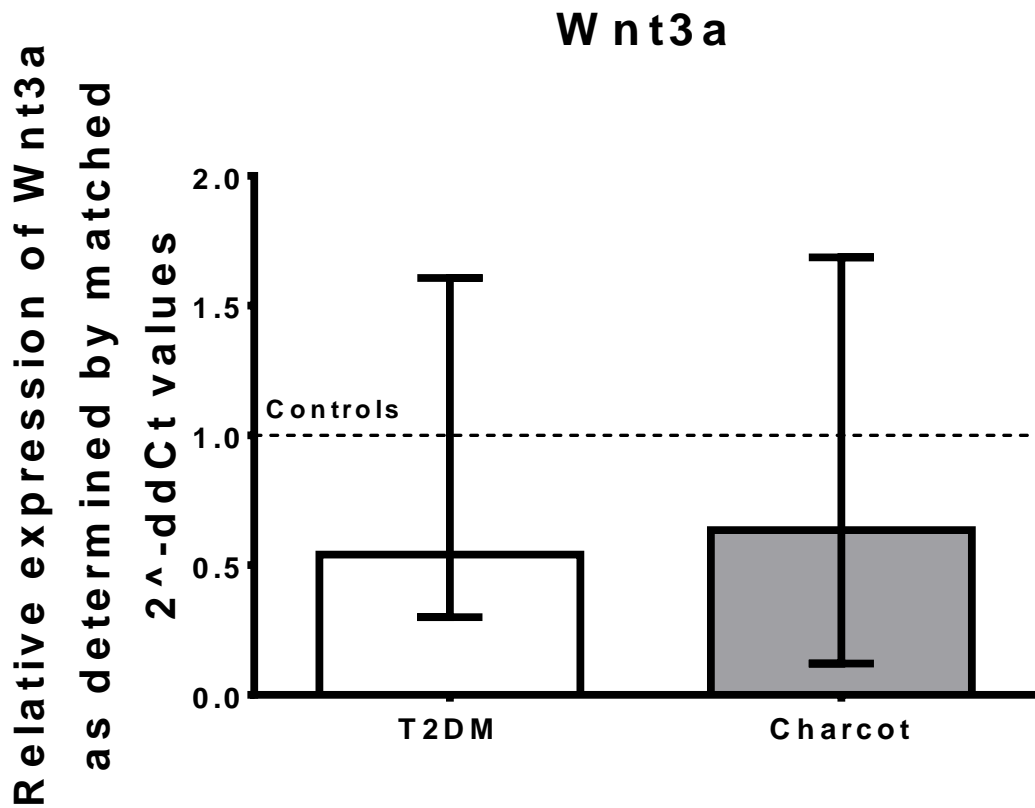


Abbildung 3-3: Genexpressionsanalyse von LRP5. Dargestellt ist der Median mit Interquartilsabstand. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA), bezugnehmend auf die Kontrollgruppe;  $p > 0,05$ .  $N=45$ ,  $n \geq 2$ . T2DM: Diabetes mellitus Typ 2; controls: Kontrollgruppe.

### 3.1.4 Ergebnisse qRT-PCR Wnt3a

Die Analyse von Wnt3a mittels qRT-PCR ergab eine Reduktion der Expression in der Diabetikergruppe um 46 % (Median: -5,64; IQA: 2,94) gegenüber der Kontrollgruppe. Auch in der Charcotgruppe zeigte sich eine Reduktion der Genexpression von Wnt3a im Vergleich

zur Kontrollgruppe. Diese lag bei 36 % (Median: -3,27; IQA: 4,42). Die Ergebnisse erwiesen sich als statistisch signifikant (Abb. 3-4).



*Abbildung 3-4: Genexpressionsanalyse von Wnt3a. Dargestellt ist der Median mit Interquartilsabstand.* Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA), bezugnehmend auf die Kontrollgruppe;  $p \leq 0,05$ .  $N=45$ ,  $n \geq 2$ . T2DM: Diabetes mellitus Typ 2; controls: Kontrollgruppe.

### 3.1.5 Ergebnisse qRT-PCR Wnt5a

Die Ergebnisse der qRT-PCR für Wnt5a zeigten eine um 44 % (Median: -7,0; IQA: 2,39) verminderte Expression in der Diabetikergruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe. In der Charcotgruppe konnte eine Verminderung der Expression von Wnt5a um 39 % (Median: -6,23; IQA: 11,24) gegenüber der Kontrollgruppe gezeigt werden. Diese Ergebnisse waren statistisch signifikant (Abb. 3-5).

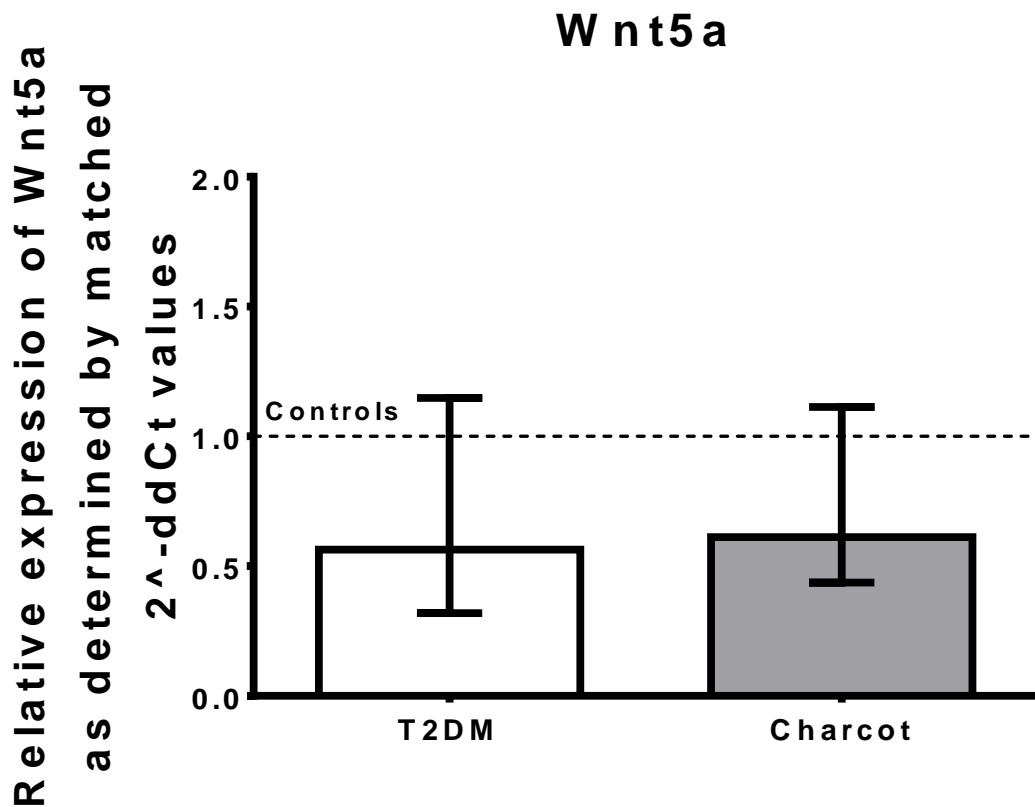


Abbildung 3-5: Genexpressionsanalyse von Wnt5a. Dargestellt ist der Median mit Interquartilsabstand. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA), bezugnehmend auf die Kontrollgruppe;  $p \leq 0,05$ .  $N=45$ ,  $n \geq 2$ . T2DM: Diabetes mellitus Typ 2; controls: Kontrollgruppe.

### 3.1.6 Ergebnisse qRT-PCR Osteocalcin

Die Analyse der qRT-PCR-Ergebnisse ergab für Osteocalcin eine Reduktion der Expression um 65 % (Median: -3,75; IQA: 11,47) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Charcotgruppe zeigte im Vergleich zur Diabetesgruppe eine Steigerung der Expression um 118% (Median: 3,69; IQA: 2,08). Die Ergebnisse erwiesen sich als statistisch signifikant. (Abb. 3-6)

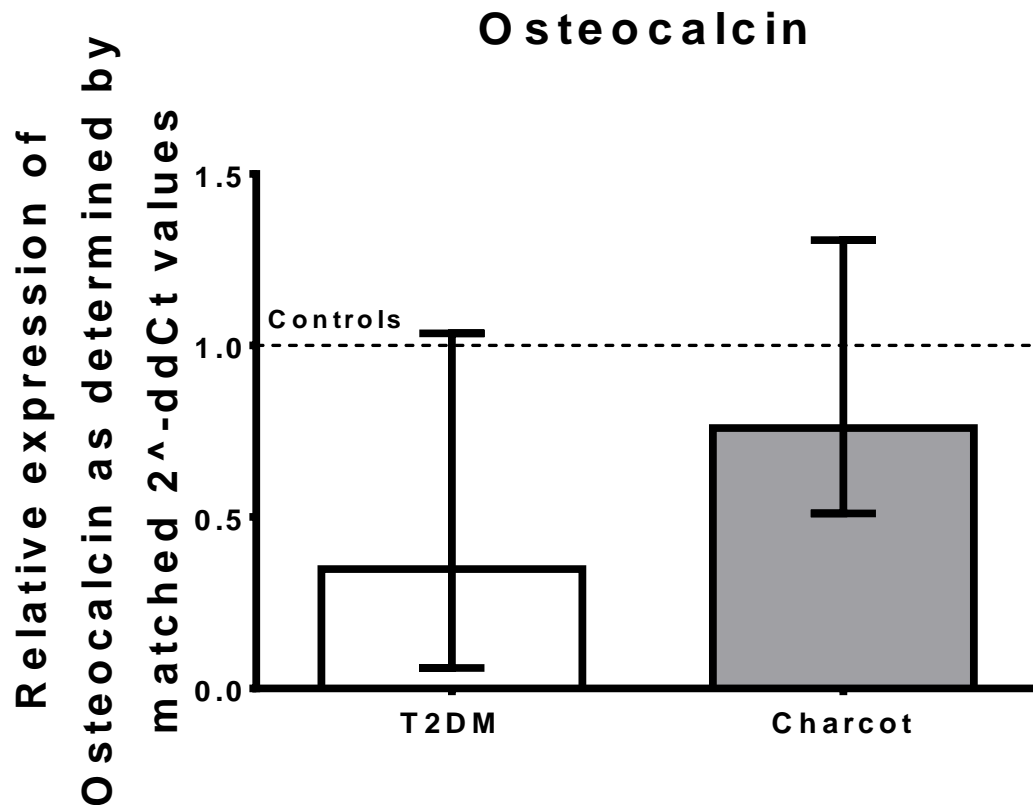


Abbildung 3-6: Genexpressionsanalyse für Osteocalcin. Dargestellt ist der Median mit Interquartilsabstand. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA), bezugnehmend auf die Kontrollgruppe;  $p \leq 0,05$ .  $N=45$ ,  $n \geq 2$ . T2DM: Diabetes mellitus Typ 2; controls: Kontrollgruppe.

### 3.1.7 Ergebnisse qRT-PCR COL1A1

Die Auswertung der qRT-PCR Ergebnisse bezüglich COL1A1 ergaben eine Reduktion des Expressionslevels um 52 % (Median: 5,58; IQA: 9,75) gegenüber der Kontrollgruppe. In der Charcotgruppe war eine Reduktion um 78 % (Median: 5,73; IQR: 10,29) zu verzeichnen. Die Ergebnisse erwiesen sich als statistisch signifikant. (Abb. 3-7)

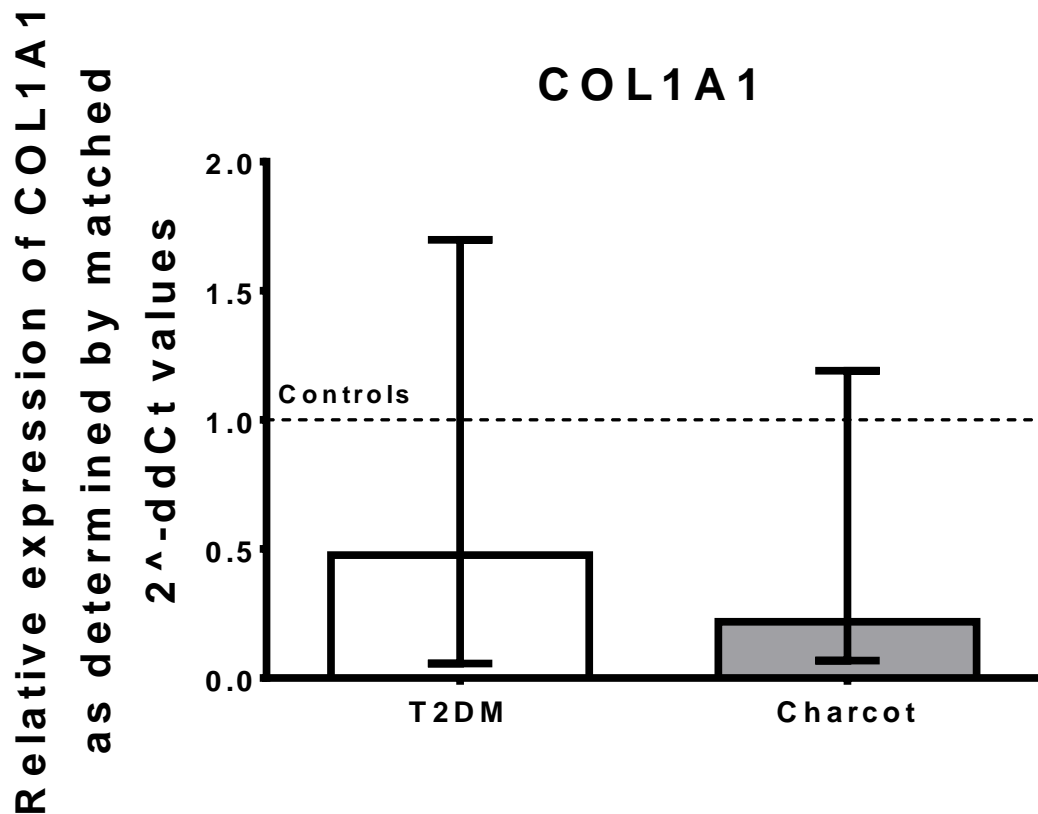


Abbildung 3-7: Genexpressionsanalyse für COL1A1. Dargestellt ist der Median mit Interquartilsabstand. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA), beziehend auf die Kontrollgruppe;  $p \leq 0,05$ . N=45, n $\geq$ 2. T2DM: Diabetes mellitus Typ 2; controls: Kontrollgruppe.

### 3.1.8 Ergebnisse qRT-PCR FN

Die Untersuchung der Genexpression von FN mittels qRT-PCR ergab eine Verminderung der Expression um 24 % (Median: 0,62; IQA: 11,99) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. In der Charcotgruppe war die Expression sogar um 75 % (Median: 2,37; IQA: 1,42) im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert. Die Ergebnisse erwiesen sich als statistisch signifikant. (Abb. 3-8)

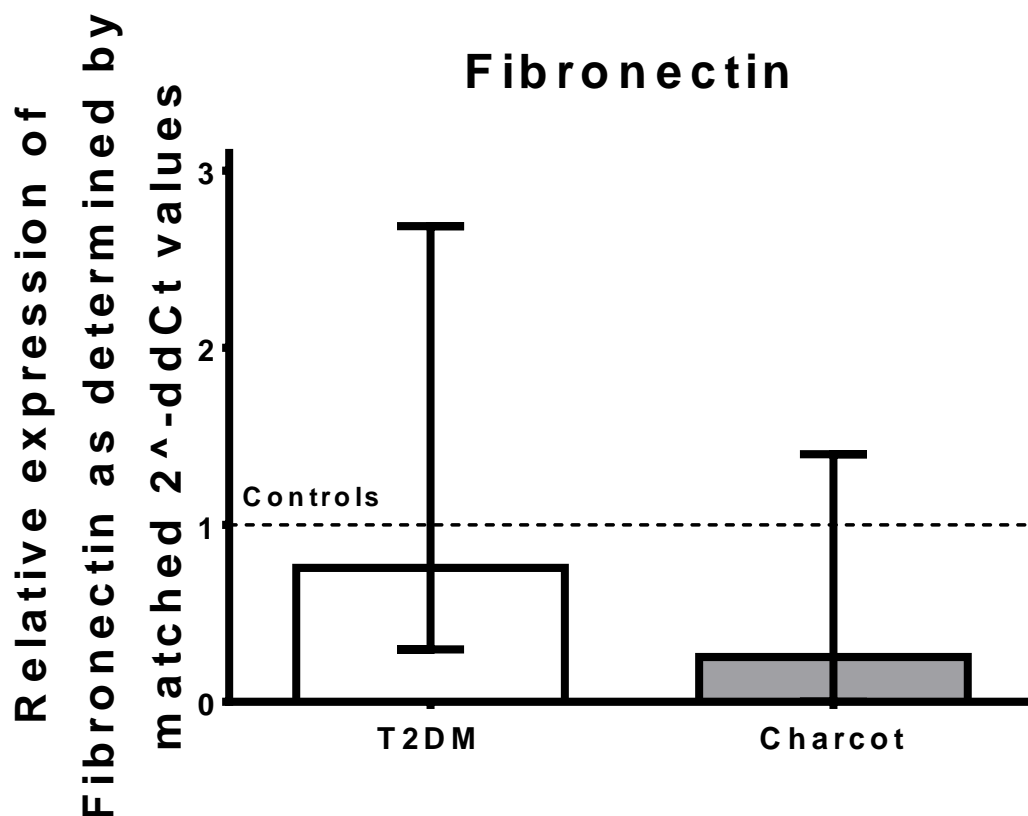
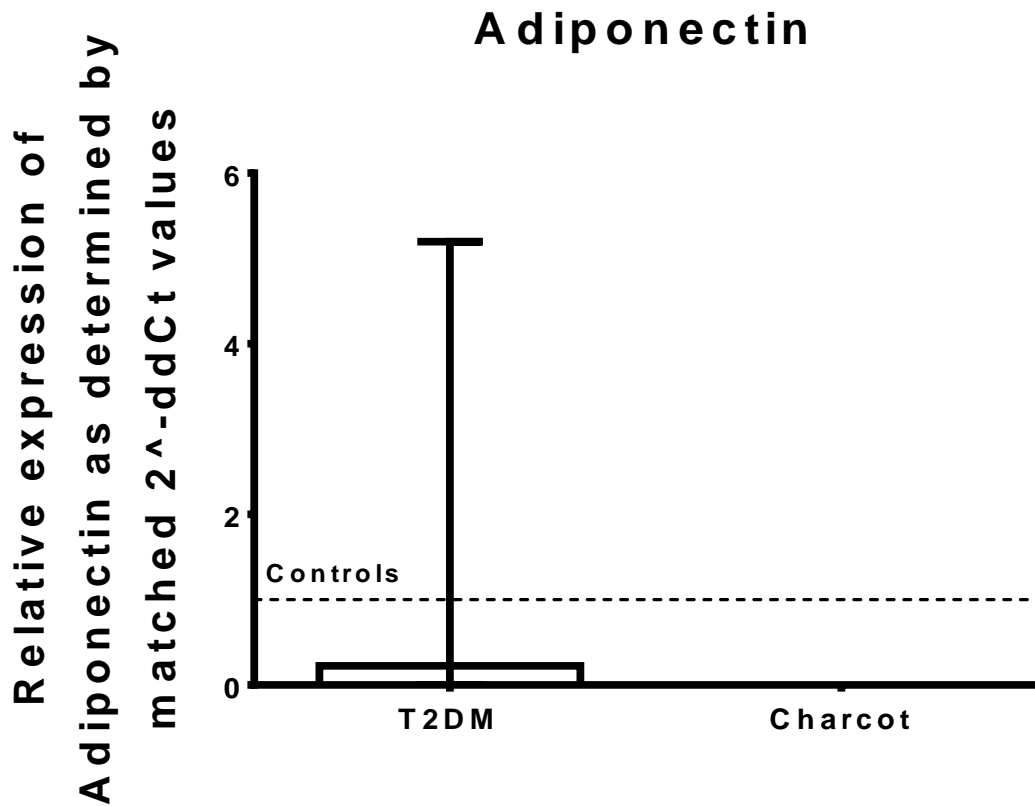


Abbildung 3-8: Genexpressionsanalyse von FN. Dargestellt ist der Median mit Interquartilsabstand. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA), bezugnehmend auf die Kontrollgruppe;  $p \leq 0,05$ .  $N=45$ ,  $n \geq 2$ . T2DM: Diabetes mellitus Typ 2; controls: Kontrollgruppe.

### 3.1.9 Ergebnisse qRT-PCR Adiponectin

Die Auswertung der qRT-PCR Ergebnisse bezüglich Adiponectin zeigte tendenziell eine Verminderung der Expression in der Diabetikergruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Verminderung betrug 77 % (Median: -12,89; IQA: 29,66). In der Charcotgruppe betrug

die Expression von Adiponectin 0 % (-6,94; IQA: 49,27). Die Ergebnisse erwiesen sich jedoch als statistisch nicht signifikant. (Abb. 3-9)



*Abbildung 3-9: Genexpressionsanalyse für Adiponectin. Dargestellt ist der Median mit Interquartilsabstand.* Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA);  $p > 0,05$ .  $N=45$ ,  $n \geq 2$ . T2DM: Diabetes mellitus Typ 2; controls: Kontrollgruppe.



### 3.1.10 Ergebnisse qRT-PCR ALK5

Die qRT-PCR Untersuchungen bezüglich ALK5 ergaben eine Verminderung der Genexpression in der Diabetikergruppe um 22 % (Median: -1,98; IQA: 1,69) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Hingegen zeigte sich in der Charcotgruppe ein Anstieg der Expression um 15 % (Median: -2,28; IQA: 0,72) gegenüber der gesunden Kontrollgruppe. Die Ergebnisse erwiesen sich als statistisch signifikant. (Abb. 3-10)

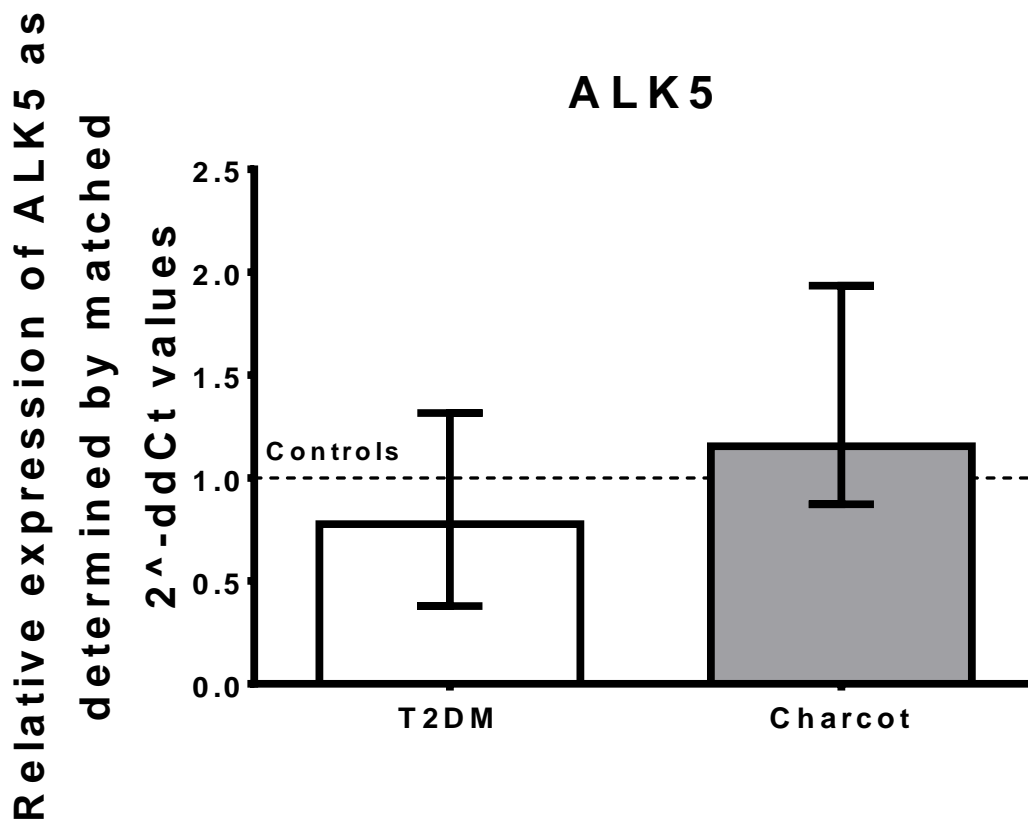
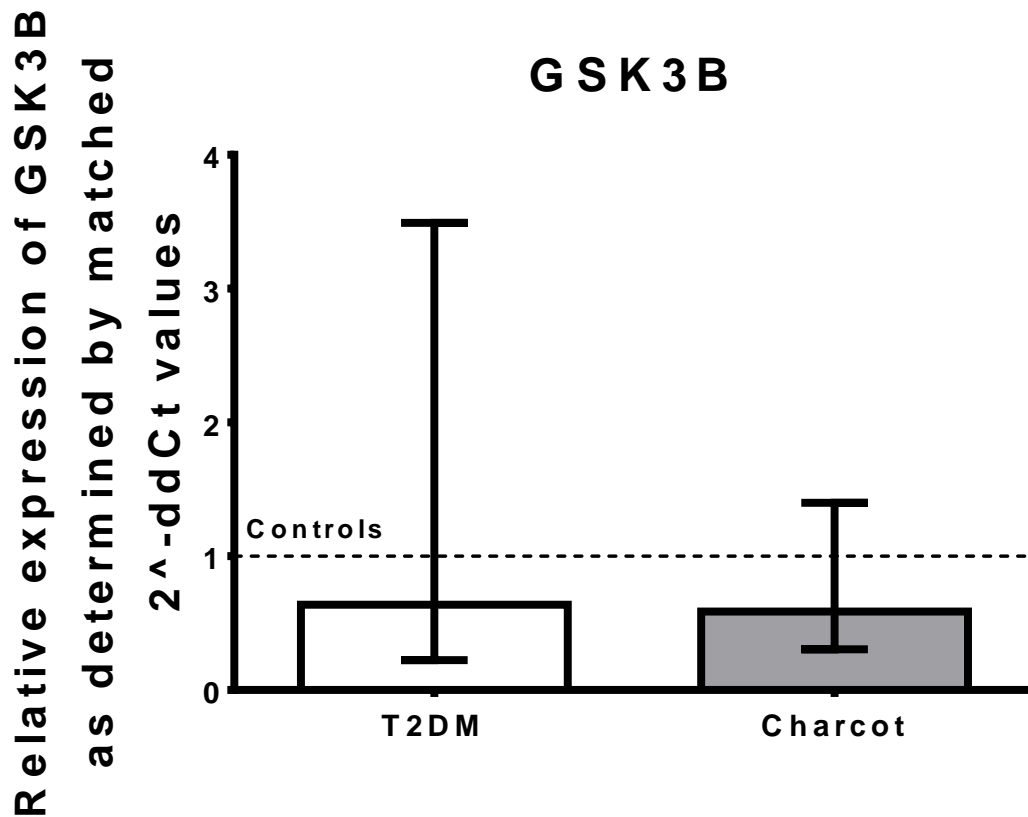


Abbildung 3-10: Genexpressionsanalyse für ALK5. Dargestellt ist der Median mit Interquartilsabstand. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA), bezugnehmend auf die Kontrollgruppe;  $p \leq 0,05$ .  $N=45$ ,  $n \geq 2$ . T2DM: Diabetes mellitus Typ 2; controls: Kontrollgruppe.

### 3.1.11 Ergebnisse qRT-PCR GSK3B

Die Auswertung der qRT-PCR Ergebnisse für GSK3B ergab eine Verminderung der Expression um 36 % (Median: 13,38; IQA: 10,05) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ähnliche Ergebnisse ergab die Auswertung der Charcotgruppe. Hier lag die Verminderung

der Genexpression bei 41 % (Median: 4,64; IQA: 10,78) gegenüber der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse erwiesen sich als statistisch signifikant. (Abb. 3-11)



*Abbildung 3-11: Genexpressionsanalyse für GSK3B. Dargestellt ist der Median mit Interquartilsabstand.* Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA), bezugnehmend auf die Kontrollgruppe;  $p \leq 0,05$ .  $N=45$ ,  $n \geq 2$ . T2DM: Diabetes mellitus Typ 2; controls: Kontrollgruppe.

### 3.1.12 Ergebnisse qRT-PCR OPG

Die Analyse des Expressionslevels von OPG mittels qRT-PCR ergab eine Verminderung der Expression um 60 % (Median: 0,0; IQA: 10,86) gegenüber der Kontrollgruppe. In der Charcotgruppe betrug die Verringerung der Expression von OPG 99 % (Median: 1,06; IQA: 2,20) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Obwohl hier ein klarer Trend erkennbar war, erwiesen sich die Ergebnisse jedoch als statistisch nicht signifikant. (Abb. 3-12)

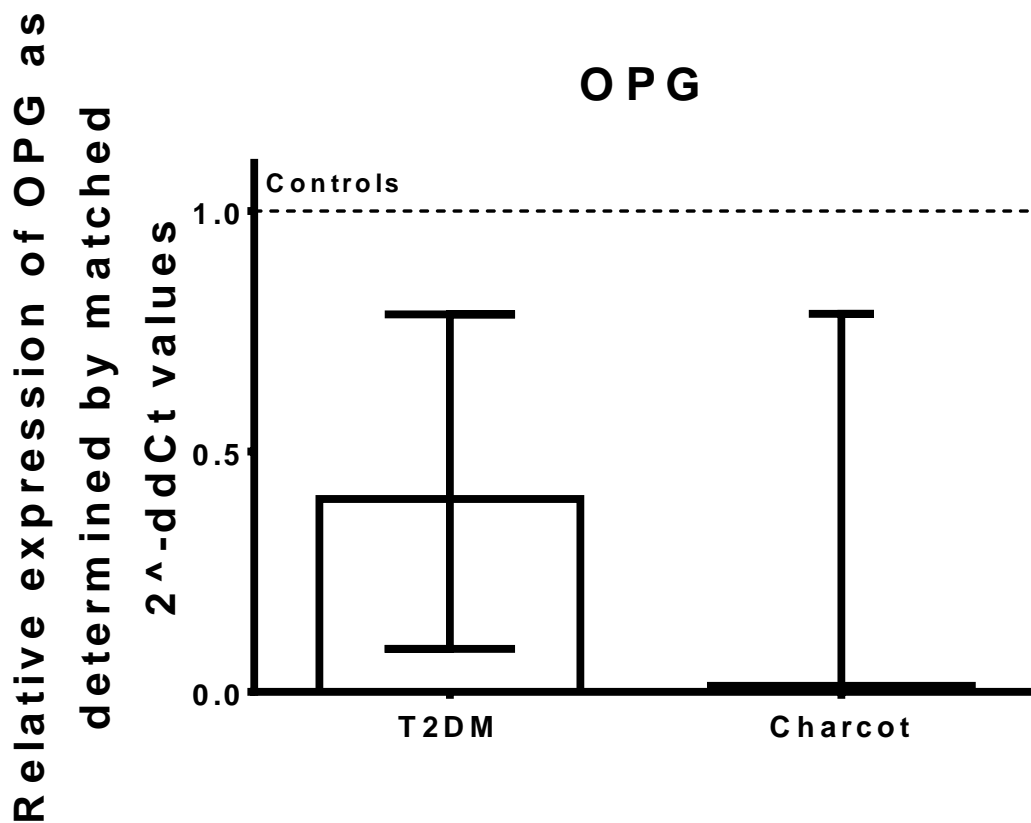
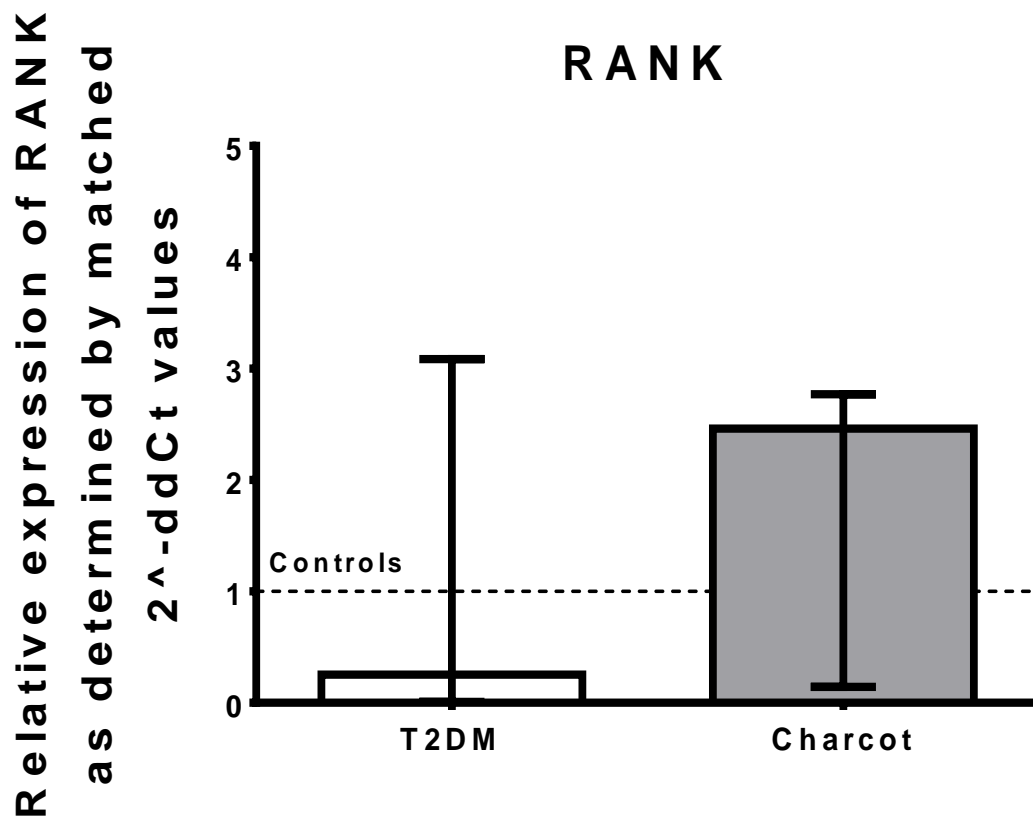


Abbildung 3-12: Genexpressionsanalyse für OPG. Dargestellt ist der Median mit Interquartilsabstand. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels einfaktorierter Varianzanalyse (ANOVA);  $p > 0,05$ .  $N=45$ ,  $n=1$ . T2DM: Diabetes mellitus Typ 2; controls: Kontrollgruppe.

### 3.1.13 Ergebnisse qRT-PCR RANK

Die Auswertung der qRT-PCR Ergebnisse bezüglich RANK ergaben in der Diabetikergruppe eine Verminderung der Expression um 75 % (Median: -18,55; IQA 28,81) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. In der Charcotgruppe ergab sich hingegen ein

Anstieg des Expressionslevels von RANK um 146 % (Median: 2,83; IQA: 1,58) gegenüber der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse erwiesen sich als statistisch signifikant. (Abb. 3-13)



*Abbildung 3-13: Genexpressionsanalyse für RANK. Dargestellt ist der Median mit Interquartilsabstand.* Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels einfaktorierter Varianzanalyse (ANOVA), bezugnehmend auf die Kontrollgruppe;  $p \leq 0,05$ .  $N=45$ ,  $n=1$ . T2DM: Diabetes mellitus Typ 2; controls: Kontrollgruppe.

### 3.1.14 Ergebnisse qRT-PCR RANKL

Die Analyse der qRT-PCR Ergebnisse für RANKL ergab eine Verminderung der Expression in der Diabetikergruppe um 97 % (Median: -7,58; IQA: 22,89) im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Charcotgruppe war die Expression um 47 % (Median: 7,92; IQA: 13,24) gegenüber der Kontrollgruppe vermindert. Die Ergebnisse erwiesen sich als statistisch signifikant. (Abb. 3-14)

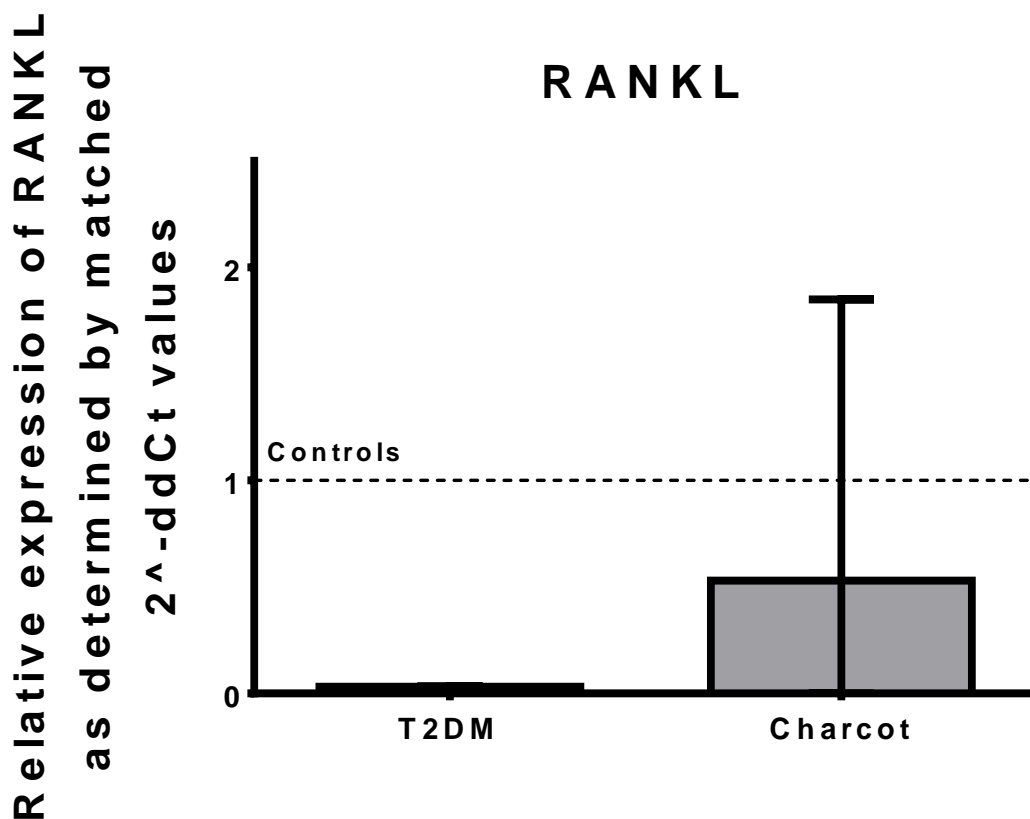
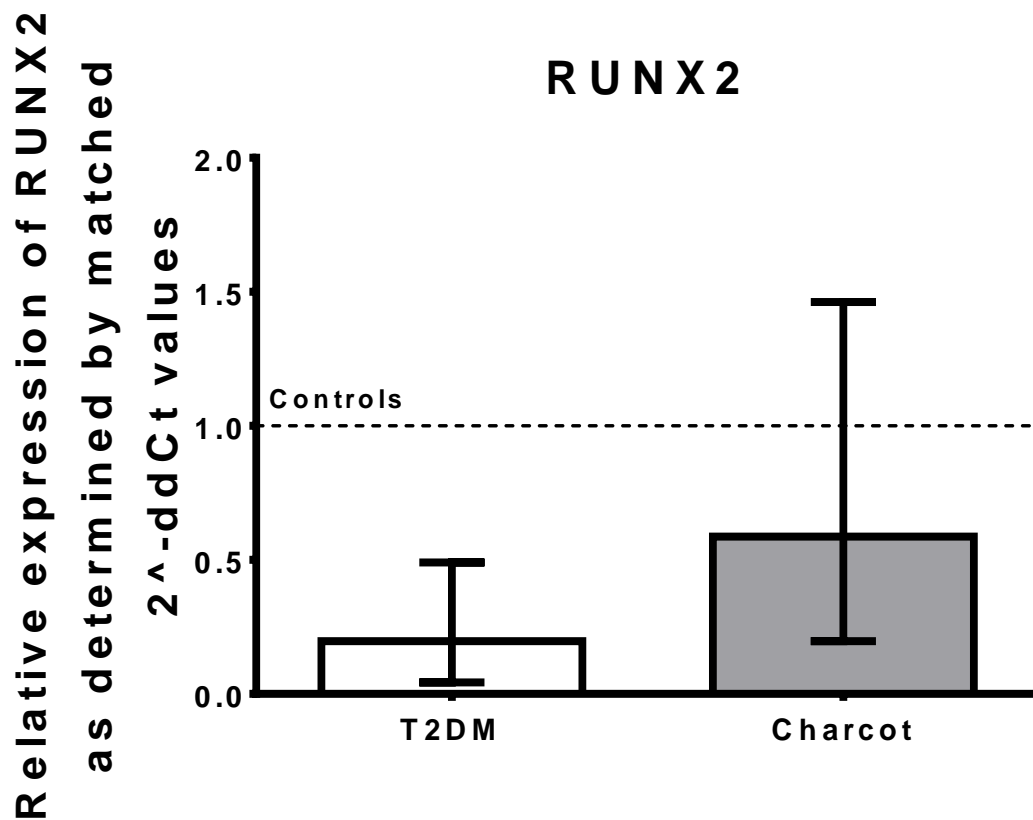


Abbildung 3-14: Genexpressionsanalyse für RANKL. Dargestellt ist der Median mit Interquartilsabstand. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA), bezugnehmend auf die Kontrollgruppe;  $p \leq 0,05$ .  $N=45$ ,  $n \geq 2$ . T2DM: Diabetes mellitus Typ 2; controls: Kontrollgruppe.

### 3.1.15 Ergebnisse qRT-PCR RUNX2

Die Analyse der Expressionslevel von RUNX2 mittels qRT-PCR ergab für die Diabetikergruppe eine Verminderung der Expression um 80 % (Median: 0,73; IQA: 1,68) gegenüber der Kontrollgruppe. In der Charcotgruppe zeigte sich eine Reduktion der

Expression um 41 % (Median: -1,60; IQA: 4,71). Es zeichnete sich hier eine klare Tendenz ab, die statistisch jedoch nicht signifikant war. (Abb. 3-15)



*Abbildung 3-15: Genexpressionsanalyse für RUNX2. Dargestellt ist der Median mit Interquartilsabstand.* Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA), bezugnehmend auf die Kontrollgruppe;  $p > 0,05$ .  $N=45$ ,  $n \geq 2$ . T2DM: Diabetes mellitus Typ 2; controls: Kontrollgruppe.

### 3.1.16 Ergebnisse qRT-PCR TCF4

Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigten in der Diabetikergruppe eine Verminderung des Expressionslevels von TCF4 um 42 % (Median: -2,14; IQA: 1,77) gegenüber der Kontrollgruppe. In der Charcotgruppe war die Expression von TCF4 um 28 % (Median: -3,78; IQA: 1,64) vermindert. Die Ergebnisse waren statistisch signifikant. (Abb. 3-16)

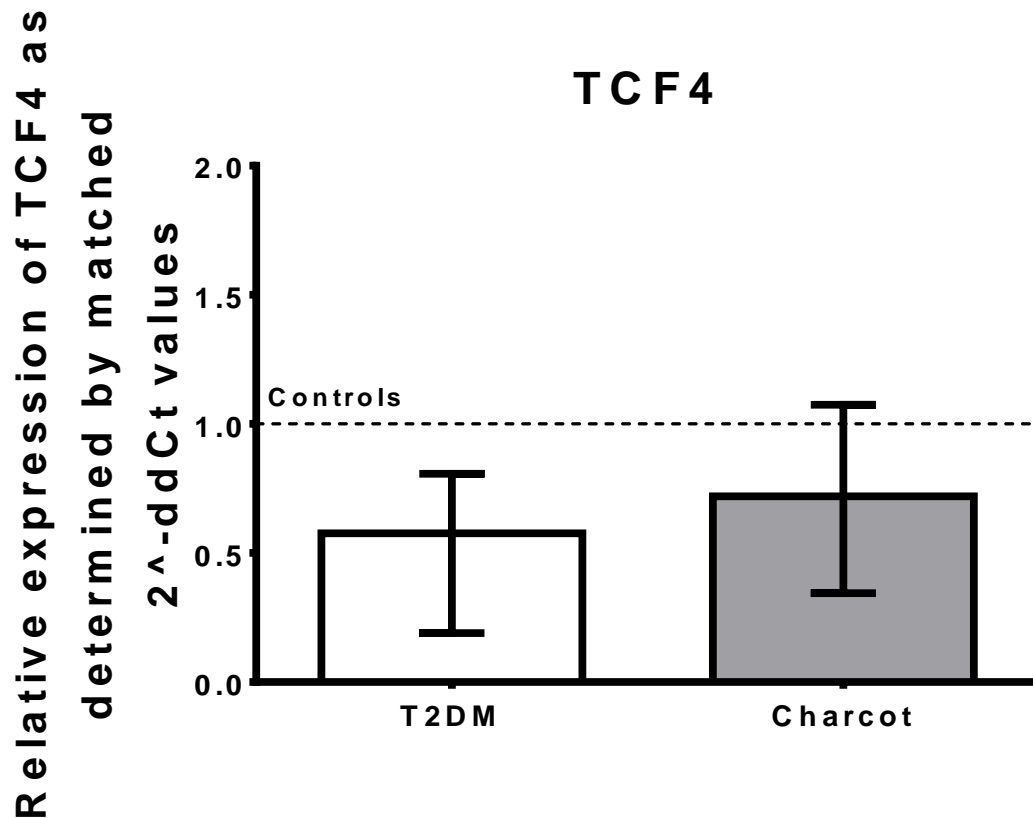


Abbildung 3-16: Genexpressionsanalyse für TCF4. Dargestellt ist der Median mit Interquartilsabstand. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA), beziehend auf die Kontrollgruppe;  $p \leq 0,05$ .  $N=45$ ,  $n \geq 1$ . T2DM: Diabetes mellitus Typ 2; controls: Kontrollgruppe.

### 3.1.17 Ergebnisse qRT-PCR TGFB1

Die Auswertung der qRT-PCR Ergebnisse für TGFB1 ergab eine Verminderung der Expression in der Diabetikergruppe um 71 % (Median: -2,21; IQA: 3,71) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. In der Charcotgruppe war die Expression von TGFB1 um 61 % (Median: -2,89; IQA: 2,04) gegenüber der Kontrollgruppe vermindert. Die Ergebnisse erwiesen sich jedoch statistisch als nicht signifikant. (Abb. 3-17)

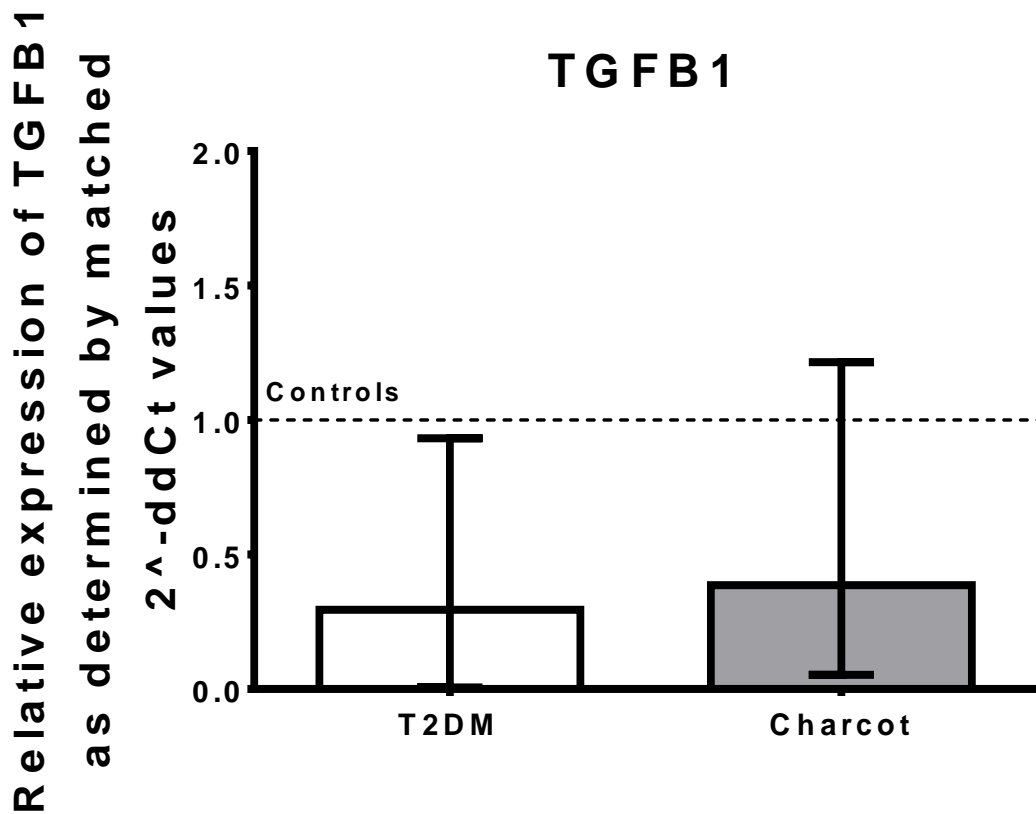


Abbildung 3-17: Genexpressionsanalyse für TGFB1. Dargestellt ist der Median mit Interquartilsabstand. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA);  $p > 0,05$ .  $N=45$ ,  $n \geq 2$ . T2DM: Diabetes mellitus Typ 2; controls: Kontrollgruppe.



## 4. Diskussion

Im Verlauf dieser Forschungsarbeit konnten ertragreiche Erkenntnisse zur Entwicklung der CA erlangt werden. Die CA als Folgeerkrankung des DM erhöht sowohl Morbidität als auch Mortalität der Betroffenen (Gazis et al. 2004). Eine Langzeit-follow-up-Studie konnte zeigen, dass eine anhaltende CA die Funktionalität und „quality of life“ der Betroffenen einschränkt (Pakarinen et al. 2009; Rajbhandari et al. 2002).

Trotz dieser Bedeutung für die Betroffenen und die Folgen für das Gesundheitssystem ist die Ätiopathogenese der CA bisher nicht hinreichend erklärt. Vor allem auf molekularbiologischer Ebene stecken die Erkenntnisse bezüglich der Krankheitsentstehung und Aufrechterhaltung noch in den Anfängen.

Bisherige Forschungsarbeiten konnten diesbezüglich signifikante Veränderungen im RANKL/ RANK/ OPG-Signalweg darstellen (Bruhn-Olszewska et al. 2017; Folestad et al. 2015; Ndip et al. 2011). Weiterhin wurden Veränderungen des Wnt-Signalweges in Verbindung mit der CA gebracht, wobei zahlreiche weitere Signaltransduktionswege und deren Mediatoren des Knochens im Hinblick auf die CA bisher noch keine Beachtung fanden (Folestad et al. 2015).

Der Hintergrund dieser Arbeit ist daher die Entwicklung der CA, auch im Hinblick auf den Zusammenhang mit der Pathogenese der diabetischen Knochenkrankheit des T2DM. In diesem Kontext sollte der Einfluss von T2DM und der CA auf den Knochenstoffwechsel vor dem Hintergrund der vorbeschriebenen Veränderungen des Knochenstoffwechsels *in vivo* untersucht werden. Dabei sollte, neben den oben genannten, vorbekannten Stoffwechseleränderungen, auch auf bisher in diesem Zusammenhang nicht untersuchte Mediatoren des Knochenstoffwechsels eingegangen werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert, wobei zunächst eine kritische Auseinandersetzung mit den Ergebnissen der Genexpressionsanalysen und deren Einordnung in die Knochenphysiologie bei T2DM sowie der CA erfolgt. Weiterhin soll der Wert der erhobenen Daten im Hinblick auf deren klinische Relevanz beurteilt werden sowie ein Ausblick auf die therapeutischen Chancen, die sich aus dieser Dissertation ergeben, vermittelt werden.

## 4.1 Interpretation der Genexpressionsanalysen *in vivo*

Als essenzielle Zytokine des Knochenstoffwechsels wurden RANKL und RANK untersucht. Die Rolle des RANKL/ RANK/ OPG-Signalweges ist hinsichtlich der Ätiopathogenese der CA bisher nur unzureichend analysiert, Vorarbeiten präsentierten zum Teil gegensätzliche Ergebnisse. Die Expression von RANK in der Charcot-Gruppe zeigte sich im Vergleich zur Diabetikergruppe deutlich gesteigert. Gleiches zeigte sich in der Expressionsanalyse für RANKL. Diese Ergebnisse sind kongruent zu denen von aktuellen Vorarbeiten von Folestad et al. und sprechen für eine hohe Aktivität im Knochenumbau in der Pathogenese der CA (Folestad et al. 2015). Das Expressionslevel von RANKL sollte jedoch im Zusammenhang mit dessen Antagonisten OPG gesehen werden (Young et al. 1993). Bis zum aktuellen Zeitpunkt gibt es nur zwei Studien, die hierzu in Bezug auf die CA Stellung nehmen. Während Folestad et al. ein Verhältnis von etwa 1 und somit keine Veränderung feststellen konnten, haben Ndip et al. einen erhöhten RANKL/ OPG-Quotienten bei CA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigen können (Folestad et al. 2015; Ndip et al. 2011). Diese Ergebnisse konnten wir in der vorliegenden Arbeit bestätigen. Während die gesunde Kontrollgruppe einen RANKL/OPG-Quotienten von 1,04 aufwies, betrug dieser in der Charcotgruppe 1,72. Die Expression des RANKL-Abfangrezeptors OPG zeigte sich hier gegenüber der T2DM-Gruppe tendenziell supprimiert. Ein erhöhter RANKL/ OPG-Quotient spricht in diesem Zusammenhang für einen Nettoverlust von Knochenmasse im betroffenen Knochengewebe bei insgesamt erhöhter Knochenstoffwechselaktivität. Dies entspricht dem klinischen Bild der frühen Phase der CA. Besondere Bedeutung bekommt der erhöhte Quotient im Vergleich zur Diabetikergruppe. Hier betrug der RANKL/ OPG-Quotient lediglich 0,43 und war somit im Vergleich zur Kontrollgruppe sogar vermindert. Während manche Autoren gegensätzliche Ergebnisse präsentierten (Conte et al. 2015; Tsentidis et al. 2016), sind unsere Ergebnisse bezüglich der Expressionslevel von RANKL bei T2DM-Patienten kongruent mit Vorarbeiten am Tiermodell. Dieses Modell war unserem Versuchsaufbau größtenteils ähnlich, da die untersuchten Spongiosaanteile aus der Nähe von frakturierten Arealen der unteren Extremität entstammten (de Amorim et al. 2008). Diese Ergebnisse deuten auf eine verminderte Osteoklastenrekutierung sowie Osteoklastendifferenzierung in diabetischer Stoffwechsellage hin. Tatsächlich konnten He et al. diese verminderte Osteoklastogenese bei T2DM im Tiermodell bestätigen (He et al. 2004). Dies steht im Einklang mit der bei T2DM-Patienten beobachteten unveränderten oder teilweise erhöhten Knochendichte (nach Berücksichtigung des BMI) bei gleichzeitig

erhöhter Frakturrate, während bei T1DM eine verminderte Knochendichte beobachtet wird (Sealand et al. 2013; Ma et al. 2012; Oei et al. 2015; Vestergaard 2014).

Weiterhin hat der RANKL/ OPG-Quotient eine Bedeutung in der Pathogenese der Mönckeberg-Mediasklerose. Die Mönckeberg-Mediasklerose betrifft häufig T2DM-Patienten, hier jedoch vornehmlich jene, die zudem an einer peripheren sensomotorischen Neuropathie leiden (Young et al. 1993). Ndip et al. konnten erhöhte Serumlevel für RANKL in Zellen aus kalzifizierten Anteilen der A. tibialis im Vergleich zu nichtkalzifizierten Anteilen feststellen. Die Veränderungen im RANKL/ OPG-Signalweg könnten hier einen Erklärungsansatz für das gehäufte Auftreten beider Erkrankungen liefern.

Interessanterweise zeigte sich weiterhin, dass das Differenzierungspotential von, aus peripherem Blut gewonnenen Monozyten zu reifen Osteoklasten bei CA-Patienten erhöht war. Gleichzeitig zeigte sich, im Vergleich zur Kontrollgruppe, nach Stimulation durch RANKL eine vermehrte Aggressivität und Aktivität in der Resorptionsfähigkeit der Osteoklasten bei den CA-Patienten. Zudem war die vermehrte Wirkung von RANKL nur partiell durch OPG, welches dem Kulturmedium hinzugefügt wurde, reversibel (Mabilleau et al. 2008), was auf die Beteiligung von RANKL-unabhängigen Signalwegen hindeutet.

In Vorarbeiten von Sealand et al. wurde Osteocalcin als ein Marker des Knochenstoffwechsels identifiziert. Eine Verminderung des Osteocalcins serumlevels in Diabetes-Patienten ist ebenso vorbeschrieben und mit dem Risiko der Erhöhung des Nüchternblutzuckers, des glykosylierten Hämoglobin A (HbA<sub>1c</sub>) sowie der Verstärkung der Insulinresistenz verbunden (Sealand et al. 2013; Maddaloni et al. 2014; Pittas et al. 2009; Movahed et al. 2012; Neumann et al. 2016). Kongruent hierzu konnten wir eine Verminderung der Osteocalcinexpression in dieser Patientengruppe feststellen. Im Vergleich hierzu zeigte sich in den CA-Patienten eine Steigerung der Osteocalcinexpression um 118%. Dies könnte den vermehrten Knochenumbauprozess bei CA-Patienten widerspiegeln, welcher vor allem im Stadium II der CA von Bedeutung ist. Durch o.g. Erhöhung des RANKL/ OPG-Quotienten kommt es durch vermehrte Osteoklastenaktivität zu gesteigerter Freisetzung des Osteocalcins aus dem Knochengewebe und folglich zu einer Steigerung der Osteocalcinexpression. Limitierend muss hier erwähnt werden, dass keine Differenzierung zwischen den Serumwerten des aktiven (decarboxylierten) und inaktiven (carboxylierten) Osteocalcins erfolgte. Insgesamt zeigte sich auch in der CA-Gruppe die Osteocalcinexpression im Vergleich zu Kontrollgruppe vermindert, was auf eine insgesamt

eingeschränkte Osteoblastenfunktion/ -anzahl hinweist, wenngleich diese durch eine gesteigerte Osteoblastenaktivität im Vergleich zur Gruppe der T2DM-Patienten angepasst werden könnte.

In unserer Arbeit konnten wir zudem zeigen, dass die Expression der Wnt-Liganden Wnt5a sowie Wnt3a zwischen der Gruppe der T2DM- sowie der CA-Patienten nahezu unverändert bleibt, jedoch in beiden Gruppen eine statistisch signifikante Expressionsreduktion gegenüber der Kontrollgruppe zeigt. Bisher liegt uns nur eine Studie vor, die zu dieser Assoziation Stellung nimmt. Lu et al. konnten ebenfalls eine Reduktion des Wnt5a-Plasmalevels in T2DM-Patienten zeigen, diese war jedoch nach Korrelation mit dem HbA1c-Wert statistisch nicht signifikant (Lu et al. 2013). Die Expression der Wnt-Liganden sollte indes im Zusammenhang mit der Expression weiterer Wnt-Signalwegproteine gesehen werden. Daher erfolgte die Bestimmung des Expressionslevels von  $\beta$ -Catenin. Die in unserer Arbeit gezeigte verminderte Expression des  $\beta$ -Catenin in T2DM-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen ist vorbeschrieben und deckt sich mit den Ergebnissen von Vorarbeiten (Gaudio et al. 2014; Folestad et al. 2015). Konträr dazu zeigt sich in der CA-Gruppe eine zur Kontrollgruppe gesteigerte Expression von  $\beta$ -Catenin. Dies wiederum deutet auf eine erhöhte Knochenstoffwechselaktivität, beziehungsweise vermehrte Knochenumbauprozesse in dieser Patientengruppe hin. Die bedeutende Rolle des  $\beta$ -Catenin-Signalweges in der Knochenregeneration konnten Chen et al. zeigen. Während der Frakturheilung zeigte sich die Transkription von  $\beta$ -Catenin im Knochengewebe verstärkt. Im Mausmodell mit stark verminderter  $\beta$ -Catenin-Expression zeigte sich die Frakturheilung hingegen verzögert. Durch aktive Inhibierung des  $\beta$ -Catenin-Signalweges konnte die Frakturheilung zudem artifiziell verzögert werden (Kim et al. 2007). Andererseits konnte die Frakturheilung durch lithiumaktiviertes  $\beta$ -Catenin wiederum beschleunigt werden (Chen et al. 2007). Die gesteigerte Expression von  $\beta$ -Catenin in der CA-Gruppe ist somit möglicherweise eine physiologische Folge der zuvor stattgefundenen knochendestruktiven Prozesse der CA und Ausdruck der stattfindenden Knochenheilung. Eine Erklärung könnten hier die physiologischen Antikörper des Wnt-Signalweges Dkk-1 sowie Sklerostin liefern, welche über Bindung an die Korezeptoren LRP5/6 die  $\beta$ -Catenin-Signalkaskade beeinflussen (Baron and Kneissel 2013). Tatsächlich konnte in Vorarbeiten eine verminderte Sklerostin-Expression in CA-Patienten aufgezeigt werden (Folestad et al. 2015). Hier muss jedoch limitierend erwähnt werden, dass die Expression dieser Antagonisten in der vorliegenden Arbeit nicht erfasst wurde. Insgesamt scheint der Wnt-/ $\beta$ -Catenin-Signalweg

bei der CA einen ausbalancierenden Effekt auf den RANKL-/ RANK-/ OPG-Signalweg zu haben. Eine Interaktion der beiden Signalwege scheint hier möglich. In einer Vorarbeit von Li et al. konnte im Mausmodell tatsächlich ein Hinweis auf diese Interaktion gefunden werden. So zeigte sich bei systemischer Überexpression von Dkk-1 (und somit Unterdrückung der  $\beta$ -Catenin-Wirkung) eine signifikante Verminderung der RANKL/ OPG-Ratio (Li et al. 2011). In unserer Arbeit zeigte sich in der Gruppe der CA-Patienten in analoger Weise eine erhöhte RANKL/ OPG-Ratio bei vermehrter  $\beta$ -Catenin-Expression. Zusammenfassend deutet dies auf eine, im Vergleich zu T2DM-Patienten, vermehrte Knochenremodellierung bei der CA hin.

In diesem Kontext wurde auch die Expression der Transmembranproteine LRP5 sowie LRP6 untersucht. Es zeigte sich interessanterweise eine besonders ausgeprägte Reduktion der Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. LRP5/6 wirken als Korezeptoren im Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalweg sowie als Bindungsstelle für Antagonisten wie Dkk-1 und Sklerostin. Wie einleitend genannt, wird vornehmlich LRP5 eine tragende Rolle in der Regulierung der Knochenhomöostase zugewiesen. Doch auch LRP6 konnte erst kürzlich eine bedeutende Rolle in der Frakturheilung zugewiesen werden. Bisher war bekannt, dass LRP6-Polymorphismen mit reduzierter Knochendichte sowie pathologischen Knochenfrakturen assoziiert sind (van Meurs et al. 2006). Im Mausmodell mit heterozygoten LRP6-Deletionen konnte kürzlich gezeigt werden, dass eine verminderte LRP6-Expression tatsächlich mit einer signifikant verminderten Knochendichte sowie -steifigkeit nach Knochenfrakturen einhergeht (Burgers et al. 2016). Die stark verminderte Expression von LRP5/6 kann im Rahmen dieser Arbeit als mitverursachender Faktor der CA gedeutet werden, da dies zu einer Beeinträchtigung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges führen könnte. Analog hierzu konnten La Fontaine et al. eine signifikante Verminderung der Trabekelanzahl in Knochen von CA-Patienten finden, während dies im Knochen von T2DM-Patienten nicht gegeben war (La Fontaine et al. 2011). Ein weiterer Aspekt, der in diesem Zusammenhang diskutiert werden sollte, ist die Rolle von LRP5/6 in der Mechanotransduktion. Dass LRP5 sowie LRP6 bei der Transduktion von mechanischer Einwirkung auf die Osteozyten in der Knochenremodellierung von Bedeutung sind, konnten diverse Vorarbeiten zeigen (Kubota et al. 2008; Kang and Robling 2014; Sawakami et al. 2006). Robling et al. führten dies auf eine, je nach Art der mechanischen Einwirkung, Veränderung der Sklerostinexpression zurück. Durch mechanische Entlastung konnte im Mausmodell eine vermehrte Expression von Sklerostin herbeigeführt werden (Robling et al. 2008). In der Therapie der akuten CA

wird ebenfalls die Entlastung des betroffenen Gelenkes herbeigeführt, was auch auf unser Patientenkollektiv angewandt wurde. Dies macht nachfolgend eine vermehrte Expression von Sklerostin und somit eine Antagonisierung von LRP5/6 möglich. Die Standardisierung der Dauer und Art der Entlastung war aufgrund der Akquirierung der Spongiosaprobe in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht möglich.

Weiterhin haben wir in der vorliegenden Arbeit die Expression von GSK3B gemessen. Wie oben genannt ist diese Proteinkinase in der nicht stimulierten Zelle aktiv und führt hier zur Phosphorylierung und somit zum proteosomalen Abbau des  $\beta$ -Catenin. Bisher gibt es nur wenige Studien, die zum Zusammenhang zwischen diabetischer Knochenkrankheit und GSK3B-Expressionlevel Stellung nehmen. Qi et al. konnten im Kleintiermodell eine verminderte GSK3B-Expression in diabetischer Stoffwechsellage mit folglich verminderter Knochenbildung zeigen. Gleichzeitig konnte durch eine Lithium-Inhibierung von GSK3B eine vermehrte Knochenbildung induziert werden (Qi et al. 2015). Bezüglich des Zusammenhangs der CA und GSK3B liegen uns zum aktuellen Zeitpunkt keine Studien vor. Die vermehrte  $\beta$ -Catenin-Expression in der Gruppe der CA-Patienten deutet jedoch auf eine verminderte GSK3B-Wirkung hin. Tatsächlich ergab sich für GSK3B ein signifikant vermindertes Expressionslevel in der Gruppe der CA-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Zusammenschau der erhöhten  $\beta$ -Catenin-Expression spricht dies für erhöhte Remodellierung im Knochen der CA-Patienten, möglicherweise als Folge der oben genannten destruktiven Knochenprozesse der CA.

Wird  $\beta$ -Catenin nicht phosphoryliert und abgebaut, so bindet es schließlich an Transkriptionsfaktoren. Einer dieser Transkriptionsfaktoren ist bei Säugetieren TCF4/TCF7L2 (MacDonald et al. 2009). Genomweite Studien konnte zeigen, dass Polymorphismen im TCF4-/TCF7L2-Genlocus eine der mit T2DM am stärksten korrelierenden Genomveränderungen überhaupt sind (Zhou et al. 2014). Veränderungen in der Expression von TCF4/TCF7L2 bei Patienten mit CA sind daher zu erwarten. Wie oben genannt, zeigt sich das Expressionsmuster für TCF4/TCF7L2 in der Charcotgruppe im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe vermindert. Es konnte bisher in diversen Vorarbeiten gezeigt werden, dass die Expression von TCF4/TCF7L2 durch Insulinspiegel beeinflussbar ist. In Adipozyten wird die Expression von TCF4/TCF7L2 durch Insulineinwirkung herunterreguliert. Yi et al. konnten eine durch Insulin gesteigerte Expression von TCF7L2 in intestinalen Zellreihen aufzeigen (Ahlzen et al. 2008; Columbus et al. 2010; Sun et al. 2010; Yi et al. 2008). Bisher liegen uns keine Studien vor, welche die

Auswirkung des Insulins auf die Expression von TCF4/TCF7L2 untersucht haben. Eine ähnliche Wirkung des Insulins auf die hier untersuchten Spongiosaanteile ist jedoch möglich und würde in diesem Kontext zu einer Abschwächung der beta-Catenin-Wirkung führen.

Als wichtigster Transkriptionsfaktor in der Differenzierung von Osteoblasten haben wir das Expressionslevel von RUNX2 untersucht. Es zeigte sich die oben genannte Expressionsreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Vorarbeiten unserer Forschungsgruppe konnten zeigen, dass eine *in vitro*-Stimulation von Osteoblasten mittels 5mM Insulin zu einem ähnlichen Expressionsabfall des RUNX2 führt. Im Kleintiermodell konnte dieser Expressionsabfall bei T2DM im Vergleich zu gesunden Kontrollen ebenfalls gezeigt werden (Hamann et al. 2011; Ehnert et al. 2015). Wir konnten diesen Expressionsabfall *in vivo* bei T2DM bestätigen, welcher eine eingeschränkte Osteoblastenfunktion in T2DM-Patienten und damit einen tiefgreifenden Einfluss des Insulins auf die Knochenhomöostase bestätigt. Besonders eindrücklich erscheint die reduzierte Expression des RUNX2 vor allem deshalb, da während der Knochenheilung sogar eine erhöhte RUNX2-Expression zu erwarten wäre (Lienau et al. 2010). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Fowlkes et al. *in vivo* in der Osteogenese beim T1DM (Fowlkes et al. 2008). Interessanterweise zeigt sich die Expression von RUNX2 in der Gruppe der CA-Patienten im Vergleich zu Gruppe der T2DM-Patienten um etwa 100% gesteigert. Dies könnte auf die oben angeführten vermehrten Remodellierungsprozesse im Knochen bei CA-Patienten zurückzuführen und gleichzeitig Ausdruck der stattfindenden Knochenheilung im Stadium II der CA sein.

Weiterhin untersuchten wir das Expressionsmuster von COL1A1, dem Genlocus der  $\alpha$ -Kette des Kollagen Typ I, einem entscheidenden Bestandteil der ECM. Die herausragende Rolle des Kollagen-Typ-1 wurde oben anhand des Krankheitsbildes der OI erläutert. Eine Mutation des COL1A1-Gens führt hier zur Ausbildung einer vollständigen Knocheninstabilität. Das Expressionsmuster von COL1A1 wiederum steht unter Kontrolle durch RUNX2. In osteoblastären Vorläuferzellen triggert RUNX2 die Expression von COL1A1 und ist essenziell für die Ausbildung eines stabilen Knochengerstes. Um schließlich eine stabile COL1A1-Expression in ausgereiften Osteoblasten zu erreichen, ist hingegen eine Herunterregulierung von RUNX2 auf ein niedriges Expressionslevel notwendig (Komori 2010). Wie unsere Daten zeigen, ist die COL1A1-Expression bei T2DM sowie CA im Vergleich zur Kontrollgruppe stark vermindert. Dies ist vermutlich Folge der reduzierten RUNX2-Expression in beiden Gruppen und könnte als mitverursachender

Faktor für die reduzierte Knochenstabilität gelten. Insbesondere, da Kollagen-Typ-I etwa 90% der proteinhaltigen ECM ausmacht. Interessanterweise zeigt sich in der CA-Gruppe im Vergleich zu T2DM-Gruppe eine Expressionsreduktion des COL1A1 um ca. 50%. Dies steht zunächst im Widerspruch zur hier um 100% gesteigerten RUNX2-Expression. Lienau et al. konnten jedoch im Großtiermodell ein ähnliches Expressionsmuster für COL1A1 in Knochengewebe mit verzögerter Frakturheilung nachweisen. Somit wäre die verminderte COL1A1-Expression hier Folge der länger bestehenden Knochenläsionen der CA-Patienten. Jedoch wäre auch eine insgesamt reduzierte Anzahl an ausgereiften Osteoblasten im Knochengewebe der CA-Patienten als Auslöser denkbar.

Die Expression von RUNX2 steht unter dem regulierenden Einfluss des heilungsunterstützenden Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ 1, welcher ebenfalls eine herausragende Rolle in der Knochenheilung einnimmt. Diverse Vorarbeiten konnten physiologisch erhöhte TGF- $\beta$ 1-Expressionslevel während der Knochenheilung feststellen, sowie verminderte Serumlevel als Prädiktor für eine verzögerte Frakturheilung herausarbeiten (Sarahrudi et al. 2011; Zimmermann et al. 2005). Wie oben genannt, gelang Xu et al. der Nachweis einer verminderten TGF- $\beta$ 1-Expression im Knochen bei T2DM im Kleintiermodell (Xu et al. 2016). Diese Ergebnisse konnten wir nun in humanen Knochenproben bei T2DM bestätigen. Die Expression von TGF- $\beta$ 1 scheint auch hier durch T2DM vermindert zu werden, was sich auch auf nachfolgende Signalkaskaden, hier unter anderem durch RUNX2 repräsentiert, auswirkt. Hierbei konnten wir keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Gruppen der T2DM- sowie CA-Patienten feststellen, sodass die oben genannte erhöhte RUNX2-Expression wohl nicht auf eine vermehrte Expression des TGF- $\beta$ 1 zurückzuführen ist.

Die Wirkung des TGF- $\beta$ 1 wird im Knochengewebe unter anderem über dessen Typ-I-Rezeptor ALK5 vermittelt. Die intrazelluläre Fortleitung erfolgt sodann über Phosphorylierung von SMAD-Rezeptorproteinen. Diese agieren nach Translokation in den Nucleus als Transkriptionsfaktoren (Shi and Massague 2003; Zhao et al. 2008; Heldin et al. 1997). Die Rolle von ALK5 in der Knochenhomöostase bei T2DM ist bisher nicht geklärt. Ebenso wenig untersucht sind die Zusammenhänge der ALK5-Expression mit der CA. Interessanterweise zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine vermehrte ALK5-Expression in der Gruppe der CA-Patienten bei gleichzeitig verminderter TGF- $\beta$ 1-Expression. Möglicherweise reagieren Osteoblasten in der CA auf ein vermindertes TGF- $\beta$ 1-Angebot mit vermehrter Expression von ALK5. Dies hätte einen entsprechend angleichenden Effekt der verminderten TGF- $\beta$ 1-Expression zur Folge. Einen Hinweis auf den verstärkten Effekt



des TGF- $\beta$ 1 gibt auch die erhöhte RANKL-Expression in der Gruppe der CA-Patienten. Ehnert et al. konnten eine signifikant erhöhte RANKL-Expression in Osteoblasten durch Stimulation derselben mit TGF- $\beta$ 1 nachweisen. Das Einbringen (Transfektion) von dauerhaft aktiviertem ALK5 in die Osteoblasten führte zu ähnlichen Ergebnissen (Ehnert et al. 2010).

FN, als wichtiger nicht-kollagener Bestandteil der ECM, wird im Knochen überwiegend durch Osteoblasten gebildet, was wiederum durch TGF- $\beta$ 1 stimuliert wird (Sefat et al. 2014; Takeda et al. 2010). Es hat neben rein adhäsiven Funktionen auch eine Signalwirkung auf Osteoblasten. Wie oben genannt, existiert neben dem zellulären FN zudem das lösliche Plasma-FN, welches in der Leber synthetisiert wird. Während Hynes dem löslichen FN im Knochen keine Rolle beimisst, konnten Bentmann et al. zeigen, dass dieses an der Mineralisation sowie Gewährleistung der biomechanischen Belastbarkeit des Knochens beteiligt ist. Diese Ergebnisse zeigen zudem, dass sowohl die Anzahl als auch Funktionsfähigkeit von Osteoblasten durch FN beeinflusst wird (Bentmann et al. 2010; Hynes 1990). Zum aktuellen Zeitpunkt sind uns keine Vorarbeiten bekannt, die zum Zusammenhang der CA mit der Expression von FN Stellung nehmen. Bei T2DM ist im Kleintiermodell von verminderter FN-Expression im Knochen berichtet worden (Liu et al. 2015). Unsere Ergebnisse konnten zeigen, dass in der CA eine Verminderung der FN-Expression im Vergleich zur gesunden Kontrolle vorliegt. Somit wäre neben einer verminderten Mineralisation der ECM auch eine eingeschränkte Funktionsfähigkeit sowie verminderte Anzahl von Osteoblasten zu erwarten. Als wesentlicher Marker für Osteoblastenanzahl und -funktion konnte, wie oben genannt, in diversen Vorarbeiten Osteocalcin definiert werden (Hu et al. 2013; Hauschka et al. 1989; Wada et al. 2008). Tatsächlich zeigte sich in der vorliegenden Arbeit die oben genannte verminderte Osteocalcinexpression in der Gruppe der CA-Patienten. Dies könnte somit auf die verminderte FN-Expression zurückzuführen sein und auf eine verminderte Anzahl sowie Funktionsfähigkeit der Osteoblasten hinweisen. Unsere Ergebnisse beziehen sich allerdings ausschließlich auf Veränderungen der FN-Expression in Zellen des spongiösen Knochens und somit des zellulären FN. Zum aktuellen Zeitpunkt sind uns keine vergleichbaren Vorarbeiten bekannt.

## 4.2 Ausblick

Die vorliegende Arbeit konnte Veränderungen auf molekularer Ebene im Stoffwechsel des Knochens bei der Erkrankung der CA aufzeigen und diese in den Kontext der diabetischen Knochenkrankheit des T2DM stellen. Dabei waren die Veränderungen in der CA-Gruppe teilweise spezifisch und zu den Veränderungen in der T2DM-Gruppe entgegengesetzt. Dies spricht für eine tiefgreifende Einwirkung der Erkrankung auf den Knochenstoffwechsel. Letztlich lässt sich dabei in unserer Arbeit nicht immer eindeutig zwischen Auslöser und Auswirkung unterscheiden.

Gegenstand weiterer Untersuchungen sollte daher auch der zeitliche Verlauf der Expressionsveränderungen im stadienhaften Fortschritt der CA sowie die Auswirkungen derer auf die Synthese von Proteinen im Knochengewebe darstellen.

Weiterhin stellen die untersuchten Veränderungen der Knochenstoffwechselwege mögliche Angriffspunkte für eine pharmakologische Therapie dar. So könnte im RANKL/ RANK/ OPG-Signalweg auf bereits bekannte Inhibitoren zurückgegriffen werden, um eine vermehrte RANK-Aktivität zu vermeiden. Kritisch zu betrachten ist hier jedoch, dass der RANKL/ RANK/ OPG-Signalweg im menschlichen Organismus einen ubiquitär vorkommenden Stoffwechselweg darstellt. Hingegen könnte die Rolle des RUNX2 einen interessanten Ansatzpunkt liefern. Dies wird durch aktuelle experimentelle Forschungsarbeiten in der unfallchirurgischen Osteoporosebehandlung bestätigt. So konnten erste Tierversuche eine protektive Wirkung durch direkte Induktion von RUNX2-Expression im Knochengewebe via Muramyl Dipeptid auf osteoporotischen Knochen nachweisen (Park et al. 2017).

Als Anstoß zur Gewinnung von neuen pharmazeutische Erkenntnissen, welche zunächst meist mit einer hohen wirtschaftlichen Belastung einhergehen, ist eine relevante Problemstellung notwendig. Die Erkrankung des T2DM eignet sich hierzu mit ihrer besonders hohen Inzidenz sowie Morbidität, welche mit hohen volkswirtschaftlichen Kosten einhergehen, besonders. Hingegen wird die Folgekomplikation der CA im klinischen Alltag zu häufig noch vernachlässigt, was auch mit dem geringen Krankheitsverständnis zusammenhängt. Der Erkenntnisgewinn um dieses Krankheitsbild bietet daher umso größere Chancen auf innovative Entwicklungen und therapeutische Möglichkeiten.

## 5. Zusammenfassung

Einzelne Vorarbeiten adressieren die bisher ungeklärte Ätiopathogenese der CA. In diesen Studien werden signifikante Erkenntnisse in Stoffwechselwegen des Knochens beschrieben, welche auch an der Entwicklung der diabetischen Knochenkrankheit beteiligt sind. Es zeigt sich eine mögliche Mitbeteiligung des RANKL/ RANK/ OPG-Signalweges sowie des Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalweges, wobei hier teilweise gegensätzliche Ergebnisse publiziert wurden. Insgesamt ist die molekularpathologische Grundlage der Krankheitsentstehung noch weitestgehend ungeklärt. Besser bekannt sind hingegen die unspezifischen Knochenveränderungen im Rahmen des T2DM, der sogenannten Diabetischen Knochenkrankheit.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die vorbeschriebenen Veränderungen der oben genannten Signalwege *in vivo* nachzuvollziehen sowie weitere, an der CA möglicherweise beteiligte Transduktionswege und Mediatoren des Knochenstoffwechsels zu untersuchen und diese mit den Veränderungen bei T2DM zu vergleichen. Zum aktuellen Zeitpunkt liegt uns keine Arbeit vor, die eine Übersicht an Signalwegen und -transduktoren im Knochen von CA-Patienten untersucht hat.

Im ersten Schritt wurden daher Spongiosaprobe aus Knochen von Charcot-Patienten, T2DM-Patienten sowie gesunden Kontrollproben asserviert. Nach RNA-Isolierung sowie cDNA-Erstellung folgten schließlich diverse qRT-PCR-Messungen. So konnte eine Analyse der Expressionsmuster oben genannter Signalmediatoren *in vivo* erstellt werden.

Interessanterweise zeigte sich in der Expressionsanalyse des RANKL/ RANK/ OPG-Signalweges in der Gruppe der CA-Patienten ein erhöhtes Expressionslevel für RANK sowie RANKL wohingegen das Expressionslevel von OPG vermindert war. Ein gegensätzliches Bild zeigte sich in der Gruppe der T2DM-Patienten. Die RANKL/ OPG-Ratio betrug in der CA-Gruppe 1,72, in der Kontrollgruppe 1,04 und in der T2DM-Gruppe 0,43. Dies deutet auf einen Nettoverlust von Knochenmasse bei insgesamt erhöhter Knochenstoffwechselaktivität im betroffenen Knochen der CA-Patienten hin.

Weiterhin untersucht wurde der Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalweg. Hier zeigte sich in beiden Gruppen eine Expressionsreduktion von Wnt-Liganden gegenüber der Kontrollgruppe. Hingegen war die Expression des  $\beta$ -Catenin in der CA-Gruppe gegenüber der T2DM-

Gruppe deutlich gesteigert. Dies könnte als Ausdruck einer vermehrten Stoffwechselaktivität im Knochen der CA-Patienten zu werten sein.

Weiterhin zeigten sich Veränderungen in der Genexpression wesentlicher Komponenten der ECM, die als Auswirkung der Genexpressionsveränderungen der beschriebenen Veränderungen der Transkriptionsfaktoren interpretiert werden können. So zeigte sich eine Verminderung der Expression von Osteocalcin in der Gruppe der T2DM-Patienten, während die Expression in der Gruppe der CA-Patienten erhöht war. Hier ist eine vermehrte Freisetzung des Osteocalcins aus dem Knochengewebe als Ausdruck der genannten gesteigerten Osteoklastenaktivität denkbar. Folglich kommt es so zu einer gesteigerten Osteocalcinexpression. Weiterhin untersucht wurde die Expression von TCF7L2, LRP5, COL1A1, Fibronectin, Adiponectin, ALK5, GSK3B, RUNX2, TCF4 sowie TGFB1.

Die so gewonnenen Ergebnisse zeigen ein mögliches Gesamtbild der biomolekularen Grundlage der CA und setzen dieses dem besser bekannten Krankheitsbild der diabetischen Knochenkrankheit bei T2DM gegenüber. Gleichzeitig liefern unsere Ergebnisse neue Ansatzpunkte für innovative Entwicklungen zur Behandlung der CA und tragen zur Verbesserung des Verständnisses der Ätiopathologie dieses Krankheitsbildes bei.

## 6. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die mich auf vielfältige Weise unterstützt haben und so ihren Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben:

So gilt mein Dank zu allererst meinem Doktorvater Univ-Prof. Dr. med. Dr. rer. biol. hum. Martijn van Griensven für seine hervorragende wissenschaftliche Unterstützung, seine Geduld und sein unermüdliches Engagement.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. med. Alexander Haug für die sehr gute, äußerst zuverlässige Betreuung, die ausgezeichnete wissenschaftliche Ausbildung und für seinen Enthusiasmus, mit dem er mich immer wieder motiviert hat, bedanken. Die Zusammenarbeit war mir eine Freude.

Darüber hinaus danke ich sehr herzlich allen Mitarbeitern der Experimentellen Unfallchirurgie für die Unterstützung, die Hilfe und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Marina Unger für die hilfreichen Ratschläge und Hilfe beim Erlernen der Arbeitstechniken bedanken.

Auch möchte ich mich bei den Doktoranden der Experimentellen Unfallchirurgie für die gegenseitige Unterstützung, die Ratschläge und ihre Freundschaft bedanken.

Ich bedanke mich bei den Kollegen der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des Klinikums rechts der Isar unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Peter Biberthaler für die Unterstützung und die Bereitstellung sehr guter Rahmenbedingungen für diese Arbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. Christoph Volkering für die stets freundliche Unterstützung.

Abschließend danke ich meiner lieben Familie für die Unterstützung auf jeder Ebene. Ohne ihre kontinuierliche Motivation wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

# Literaturverzeichnis

- Ahlzen M, Johansson LE, Cervin C, Tornqvist H, Groop L, Ridderstrale M (2008) Expression of the transcription factor 7-like 2 gene (TCF7L2) in human adipocytes is down regulated by insulin. *Biochem Biophys Res Commun* 370 (1):49-52. doi:10.1016/j.bbrc.2008.03.006
- Al-Qattan MM, AlShomer F, Alqahtani A, Alhadlg A (2014) Fibronectin and craniofacial surgery. *Ann Plast Surg* 73 (6):716-720. doi:10.1097/SAP.0b013e3182858812
- Alberti KG, Zimmet PZ (1998) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15 (7):539-553. doi:10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S
- Alford AI, Kozloff KM, Hankenson KD (2015) Extracellular matrix networks in bone remodeling. *Int J Biochem Cell Biol* 65:20-31. doi:10.1016/j.biocel.2015.05.008
- Allo Miguel G, Garcia Fernandez E, Hawkins Carranza F (2015) Diabetic Charcot neuroarthropathy of the knee in a patient with type-1 diabetes mellitus. *Endocrine* 49 (3):863-864. doi:10.1007/s12020-014-0466-9
- Alrashidi Y, Hugle T, Wiewiorski M, Herrera-Perez M, Valderrabano V (2017) Surgical Treatment Options for the Diabetic Charcot Midfoot Deformity. *Clin Podiatr Med Surg* 34 (1):43-51. doi:10.1016/j.cpm.2016.07.006
- Antonopoulou M, Bahtiyar G, Banerji MA, Sacerdote AS (2013) Diabetes and bone health. *Maturitas* 76 (3):253-259. doi:10.1016/j.maturitas.2013.04.004
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257 (1):79-83
- Atti E, Gomez S, Wahl SM, Mendelsohn R, Paschalis E, Boskey AL (2002) Effects of transforming growth factor-beta deficiency on bone development: a Fourier transform-infrared imaging analysis. *Bone* 31 (6):675-684
- Bafico A, Liu G, Yaniv A, Gazit A, Aaronson SA (2001) Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol* 3 (7):683-686. doi:10.1038/35083081
- Bailer CC, Root HF (1947) Neuropathic foot lesions in diabetes mellitus. *N Engl J Med* 236 (11):397-401. doi:10.1056/NEJM194703132361103
- Baljet B (2002) Aspects of the history of osteogenesis imperfecta (Vrolik's syndrome). *Ann Anat* 184 (1):1-7. doi:10.1016/S0940-9602(02)80023-1

- Barbour KE, Zmuda JM, Boudreau R, Strotmeyer ES, Horwitz MJ, Evans RW, Kanaya AM, Harris TB, Bauer DC, Cauley JA (2011) Adipokines and the risk of fracture in older adults. *J Bone Miner Res* 26 (7):1568-1576. doi:10.1002/jbmr.361
- Baron R (2000) Anatomy and Ultrastructure of Bone - Histogenesis, Growth and Remodeling. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G et al. (eds) *Endotext*. South Dartmouth (MA),
- Baron R, Kneissel M (2013) WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med* 19 (2):179-192. doi:10.1038/nm.3074
- Bentmann A, Kawelke N, Moss D, Zentgraf H, Bala Y, Berger I, Gasser JA, Nakchbandi IA (2010) Circulating fibronectin affects bone matrix, whereas osteoblast fibronectin modulates osteoblast function. *J Bone Miner Res* 25 (4):706-715. doi:10.1359/jbmr.091011
- Berg EE (1997) Charcot arthropathy after acetabular fracture. *J Bone Joint Surg Br* 79 (5):742-745
- Bibbo C, Lin SS, Beam HA, Behrens FF (2001) Complications of ankle fractures in diabetic patients. *Orthop Clin North Am* 32 (1):113-133
- Botolin S, Faugere MC, Malluche H, Orth M, Meyer R, McCabe LR (2005) Increased bone adiposity and peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma2 expression in type I diabetic mice. *Endocrinology* 146 (8):3622-3631. doi:10.1210/en.2004-1677
- Bouillon R (1991) Diabetic bone disease. *Calcif Tissue Int* 49 (3):155-160
- Boyce BF, Xing L (2008) Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 473 (2):139-146. doi:10.1016/j.abb.2008.03.018
- Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP (2002) High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 346 (20):1513-1521. doi:10.1056/NEJMoa013444
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423 (6937):337-342. doi:10.1038/nature01658
- Bruhn-Olszewska B, Korzon-Burakowska A, Wegrzyn G, Jakobkiewicz-Banecka J (2017) Prevalence of polymorphisms in OPG, RANKL and RANK as potential markers for Charcot arthropathy development. *Sci Rep* 7 (1):501. doi:10.1038/s41598-017-00563-4
- Burgers TA, Vivanco JF, Zahatnansky J, Moren AJ, Mason JJ, Williams BO (2016) Mice with a heterozygous *Lrp6* deletion have impaired fracture healing. *Bone Res* 4:16025. doi:10.1038/boneres.2016.25
- Caglayan G, Kilic E, Ozcakar L (2013) Acute charcot arthropathy of the wrist in a diabetic patient. *Rheumatol Int* 33 (11):2959-2960. doi:10.1007/s00296-012-2514-1
- Carnevale V, Romagnoli E, D'Erasmus L, D'Erasmus E (2014) Bone damage in type 2 diabetes mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 24 (11):1151-1157. doi:10.1016/j.numecd.2014.06.013
- Centers for Disease Control and Prevention (2014) National Diabetes Statistics Report: Estimates of Diabetes and Its Burden in the United States. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, USA

- Chantelau E, Richter A, Ghassem-Zadeh N, Poll LW (2007) "Silent" bone stress injuries in the feet of diabetic patients with polyneuropathy: a report on 12 cases. *Arch Orthop Trauma Surg* 127 (3):171-177. doi:10.1007/s00402-006-0271-x
- Chantelau EA, Grutzner G (2014) Is the Eichenholtz classification still valid for the diabetic Charcot foot? *Swiss Med Wkly* 144:w13948. doi:10.4414/smw.2014.13948
- Charles JF, Aliprantis AO (2014) Osteoclasts: more than 'bone eaters'. *Trends Mol Med* 20 (8):449-459. doi:10.1016/j.molmed.2014.06.001
- Chen Y, Whetstone HC, Lin AC, Nadesan P, Wei Q, Poon R, Alman BA (2007) Beta-catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: implications for therapy to improve bone healing. *PLoS Med* 4 (7):e249. doi:10.1371/journal.pmed.0040249
- Chien A, Edgar DB, Trela JM (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127 (3):1550-1557
- Chomczynski P (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15 (3):532-534, 536-537
- Clemens TL, Karsenty G (2011) The osteoblast: an insulin target cell controlling glucose homeostasis. *J Bone Miner Res* 26 (4):677-680. doi:10.1002/jbmr.321
- Clevers H (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127 (3):469-480. doi:10.1016/j.cell.2006.10.018
- Columbus J, Chiang Y, Shao W, Zhang N, Wang D, Gaisano HY, Wang Q, Irwin DM, Jin T (2010) Insulin treatment and high-fat diet feeding reduces the expression of three Tcf genes in rodent pancreas. *J Endocrinol* 207 (1):77-86. doi:10.1677/JOE-10-0044
- Compton JT, Lee FY (2014) A review of osteocyte function and the emerging importance of sclerostin. *J Bone Joint Surg Am* 96 (19):1659-1668. doi:10.2106/JBJS.M.01096
- Conte A, Ghiraldini B, Casarin RC, Casati MZ, Pimentel SP, Cirano FR, Duarte PM, Ribeiro FV (2015) Impact of type 2 diabetes on the gene expression of bone-related factors at sites receiving dental implants. *Int J Oral Maxillofac Surg* 44 (10):1302-1308. doi:10.1016/j.ijom.2015.06.001
- Cozen L (1972) Does diabetes delay fracture healing? *Clin Orthop Relat Res* 82:134-140
- Craig ME, Jefferies C, Dabelea D, Balde N, Seth A, Donaghue KC, International Society for P, Adolescent D (2014) ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes* 15 Suppl 20:4-17. doi:10.1111/pedi.12186
- De A (2011) Wnt/Ca<sup>2+</sup> signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 43 (10):745-756. doi:10.1093/abbs/gmr079
- de Amorim FP, Ornelas SS, Diniz SF, Batista AC, da Silva TA (2008) Imbalance of RANK, RANKL and OPG expression during tibial fracture repair in diabetic rats. *J Mol Histol* 39 (4):401-408. doi:10.1007/s10735-008-9178-x



- Dixit PK, Ekstrom RA (1980) Decreased breaking strength of diabetic rat bone and its improvement by insulin treatment. *Calcif Tissue Int* 32 (3):195-199
- Eghbali-Fatourechi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL (2003) Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest* 111 (8):1221-1230. doi:10.1172/JCI17215
- Ehnert S, Baur J, Schmitt A, Neumaier M, Lucke M, Dooley S, Vester H, Wildemann B, Stockle U, Nussler AK (2010) TGF-beta1 as possible link between loss of bone mineral density and chronic inflammation. *PLoS One* 5 (11):e14073. doi:10.1371/journal.pone.0014073
- Ehnert S, Freude T, Ihle C, Mayer L, Braun B, Graeser J, Flesch I, Stockle U, Nussler AK, Pscherer S (2015) Factors circulating in the blood of type 2 diabetes mellitus patients affect osteoblast maturation - description of a novel in vitro model. *Exp Cell Res* 332 (2):247-258. doi:10.1016/j.yexcr.2014.12.011
- Einhorn TA, Boskey AL, Gundberg CM, Vigorita VJ, Devlin VJ, Beyer MM (1988) The mineral and mechanical properties of bone in chronic experimental diabetes. *J Orthop Res* 6 (3):317-323. doi:10.1002/jor.1100060303
- Eom CS, Park SM, Myung SK, Yun JM, Ahn JS (2011) Use of acid-suppressive drugs and risk of fracture: a meta-analysis of observational studies. *Ann Fam Med* 9 (3):257-267. doi:10.1370/afm.1243
- Eschwege E, Richard JL, Thibault N, Ducimetiere P, Warnet JM, Claude JR, Rosselin GE (1985) Coronary heart disease mortality in relation with diabetes, blood glucose and plasma insulin levels. The Paris Prospective Study, ten years later. *Horm Metab Res Suppl* 15:41-46
- Fabrin J, Larsen K, Holstein PE (2000) Long-term follow-up in diabetic Charcot feet with spontaneous onset. *Diabetes Care* 23 (6):796-800
- Fauzi AA, Chung TY, Latif LA (2016) Risk factors of diabetic foot Charcot arthropathy: a case-control study at a Malaysian tertiary care centre. *Singapore Med J* 57 (4):198-203. doi:10.11622/smedj.2016074
- Ferdinand KC, Nasser SA (2015) Racial/ethnic disparities in prevalence and care of patients with type 2 diabetes mellitus. *Curr Med Res Opin* 31 (5):913-923. doi:10.1185/03007995.2015.1029894
- Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, Teti A, Ducy P, Karsenty G (2010) Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell* 142 (2):296-308. doi:10.1016/j.cell.2010.06.003
- Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simoes MJ, Cerri PS (2015) Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* 2015:421746. doi:10.1155/2015/421746

- Folestad A, Alund M, Asteberg S, Fowelin J, Aurell Y, Gothlin J, Cassuto J (2015) Role of Wnt/beta-catenin and RANKL/OPG in bone healing of diabetic Charcot arthropathy patients. *Acta Orthop* 86 (4):415-425. doi:10.3109/17453674.2015.1033606
- Fowlkes JL, Bunn RC, Liu L, Wahl EC, Coleman HN, Cockrell GE, Perrien DS, Lumpkin CK, Jr., Thrailkill KM (2008) Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and RUNX2-related osteogenic genes are down-regulated throughout osteogenesis in type 1 diabetes mellitus. *Endocrinology* 149 (4):1697-1704. doi:10.1210/en.2007-1408
- Frykberg RG, Belczyk R (2008) Epidemiology of the Charcot foot. *Clin Podiatr Med Surg* 25 (1):17-28, v. doi:10.1016/j.cpm.2007.10.001
- Fuller JH, Elford J, Goldblatt P, Adelstein AM (1983) Diabetes mortality: new light on an underestimated public health problem. *Diabetologia* 24 (5):336-341
- Garcia-Martin A, Rozas-Moreno P, Reyes-Garcia R, Morales-Santana S, Garcia-Fontana B, Garcia-Salcedo JA, Munoz-Torres M (2012) Circulating levels of sclerostin are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 97 (1):234-241. doi:10.1210/jc.2011-2186
- Gaudio A, Privitera F, Pulvirenti I, Canzonieri E, Rapisarda R, Fiore CE (2014) The relationship between inhibitors of the Wnt signalling pathway (sclerostin and Dickkopf-1) and carotid intima-media thickness in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res* 11 (1):48-52. doi:10.1177/1479164113510923
- Gazis A, Pound N, Macfarlane R, Treece K, Game F, Jeffcoate W (2004) Mortality in patients with diabetic neuropathic osteoarthropathy (Charcot foot). *Diabet Med* 21 (11):1243-1246. doi:10.1111/j.1464-5491.2004.01215.x
- Geiser AG, Zeng QQ, Sato M, Helvering LM, Hirano T, Turner CH (1998) Decreased bone mass and bone elasticity in mice lacking the transforming growth factor-beta1 gene. *Bone* 23 (2):87-93
- George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, Rayburn H, Hynes RO (1993) Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development (Cambridge, England)* 119 (4):1079-1091
- Globus RK, Doty SB, Lull JC, Holmuhamedov E, Humphries MJ, Damsky CH (1998) Fibronectin is a survival factor for differentiated osteoblasts. *J Cell Sci* 111 ( Pt 10):1385-1393
- Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Juppner H, Kim CA, Kepler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B,

- Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML, Osteoporosis-Pseudoglioma Syndrome Collaborative G (2001) LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 107 (4):513-523
- Goodman WG, Hori MT (1984) Diminished bone formation in experimental diabetes. Relationship to osteoid maturation and mineralization. *Diabetes* 33 (9):825-831
- Gouveri E, Papanas N (2011) Charcot osteoarthropathy in diabetes: A brief review with an emphasis on clinical practice. *World J Diabetes* 2 (5):59-65. doi:10.4239/wjd.v2.i5.59
- Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, Helgason A, Stefansson H, Emilsson V, Helgadóttir A, Styrkarsdóttir U, Magnusson KP, Walters GB, Palsdóttir E, Jonsdóttir T, Gudmundsdóttir T, Gylfason A, Saemundsdóttir J, Wilensky RL, Reilly MP, Rader DJ, Bagger Y, Christiansen C, Gudnason V, Sigurdsson G, Thorsteinsdóttir U, Gulcher JR, Kong A, Stefansson K (2006) Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 38 (3):320-323. doi:10.1038/ng1732
- Guo YW, Chiu CY, Liu CL, Jap TS, Lin LY (2015) Novel mutation of RUNX2 gene in a patient with cleidocranial dysplasia. *Int J Clin Exp Pathol* 8 (1):1057-1062
- Hamann C, Goettsch C, Mettelsiefen J, Henkenjohann V, Rauner M, Hempel U, Bernhardt R, Fratzl-Zelman N, Roschger P, Rammelt S, Gunther KP, Hofbauer LC (2011) Delayed bone regeneration and low bone mass in a rat model of insulin-resistant type 2 diabetes mellitus is due to impaired osteoblast function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301 (6):E1220-1228. doi:10.1152/ajpendo.00378.2011
- Hansen KE, Kleker B, Safdar N, Bartels CM (2014) A systematic review and meta-analysis of glucocorticoid-induced osteoporosis in children. *Semin Arthritis Rheum* 44 (1):47-54. doi:10.1016/j.semarthrit.2014.02.002
- Hardt SE, Sadoshima J (2002) Glycogen synthase kinase-3beta: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. *Circ Res* 90 (10):1055-1063
- Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM (1989) Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev* 69 (3):990-1047
- Haxaire C, Hay E, Geoffroy V (2016) Runx2 Controls Bone Resorption through the Down-Regulation of the Wnt Pathway in Osteoblasts. *Am J Pathol* 186 (6):1598-1609. doi:10.1016/j.ajpath.2016.01.016
- He H, Liu R, Desta T, Leone C, Gerstenfeld LC, Graves DT (2004) Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinology* 145 (1):447-452. doi:10.1210/en.2003-1239
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390 (6659):465-471. doi:10.1038/37284

- Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL (1999) Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 140 (9):4367-4370. doi:10.1210/endo.140.9.7131
- Hofbauer LC, Schoppet M (2004) Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA* 292 (4):490-495. doi:10.1001/jama.292.4.490
- Hofstaetter SG, Trieb K (2015) [Diagnostic for Charcot foot]. *Orthopade* 44 (1):45-49. doi:10.1007/s00132-014-3052-1
- Hou JC, Zernicke RF, Barnard RJ (1993) Effects of severe diabetes and insulin on the femoral neck of the immature rat. *J Orthop Res* 11 (2):263-271. doi:10.1002/jor.1100110214
- Hu E, Liang P, Spiegelman BM (1996) AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271 (18):10697-10703
- Hu Y, Tang XX, He HY (2013) Gene expression during induced differentiation of sheep bone marrow mesenchymal stem cells into osteoblasts. *Genet Mol Res* 12 (4):6527-6534. doi:10.4238/2013.December.11.4
- Hwang YC, Jeong IK, Ahn KJ, Chung HY (2009) The uncarboxylated form of osteocalcin is associated with improved glucose tolerance and enhanced beta-cell function in middle-aged male subjects. *Diabetes Metab Res Rev* 25 (8):768-772. doi:10.1002/dmrr.1045
- Hynes RO (1990) Structure of Fibronectins. In: *Fibronectins*. Springer New York, New York, NY, pp 113-175. doi:10.1007/978-1-4612-3264-3\_6
- International Diabetes Federation (2015) *IDF Diabetes Atlas*. 7 edn., Brussels, Belgium
- Jahn K, Lara-Castillo N, Brotto L, Mo CL, Johnson ML, Brotto M, Bonewald LF (2012) Skeletal muscle secreted factors prevent glucocorticoid-induced osteocyte apoptosis through activation of beta-catenin. *Eur Cell Mater* 24:197-209; discussion 209-110
- Janssens K, Gershoni-Baruch R, Guanabens N, Migone N, Ralston S, Bonduelle M, Lissens W, Van Maldergem L, Vanhoenacker F, Verbruggen L, Van Hul W (2000) Mutations in the gene encoding the latency-associated peptide of TGF-beta 1 cause Camurati-Engelmann disease. *Nat Genet* 26 (3):273-275. doi:10.1038/81563
- Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W (2005) Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr Rev* 26 (6):743-774. doi:10.1210/er.2004-0001
- Jeffcoate WJ (2015) Charcot foot syndrome. *Diabet Med* 32 (6):760-770. doi:10.1111/dme.12754
- Jeffcoate WJ, Game F, Cavanagh PR (2005) The role of proinflammatory cytokines in the cause of neuropathic osteoarthropathy (acute Charcot foot) in diabetes. *Lancet* 366 (9502):2058-2061. doi:10.1016/S0140-6736(05)67029-8
- Kadowaki T, Yamauchi T (2005) Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 26 (3):439-451. doi:10.1210/er.2005-0005
- Kanazawa I (2015) Osteocalcin as a hormone regulating glucose metabolism. *World J Diabetes* 6 (18):1345-1354. doi:10.4239/wjd.v6.i18.1345

- Kang KS, Robling AG (2014) New Insights into Wnt-Lrp5/6-beta-Catenin Signaling in Mechanotransduction. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5:246. doi:10.3389/fendo.2014.00246
- Kerner W, Bruckel J, German Diabetes A (2014) Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 122 (7):384-386. doi:10.1055/s-0034-1366278
- Kim JB, Leucht P, Lam K, Luppen C, Ten Berge D, Nusse R, Helms JA (2007) Bone regeneration is regulated by wnt signaling. *J Bone Miner Res* 22 (12):1913-1923. doi:10.1359/jbmr.070802
- Kim JH, Liu X, Wang J, Chen X, Zhang H, Kim SH, Cui J, Li R, Zhang W, Kong Y, Zhang J, Shui W, Lamplot J, Rogers MR, Zhao C, Wang N, Rajan P, Tomal J, Statz J, Wu N, Luu HH, Haydon RC, He TC (2013) Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 5 (1):13-31. doi:10.1177/1759720X12466608
- Komori T (2010) Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res* 339 (1):189-195. doi:10.1007/s00441-009-0832-8
- Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (2001) Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res* 16 (6):1004-1014. doi:10.1359/jbmr.2001.16.6.1004
- Kostiuk E, Zubkova ST (1993) [Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes mellitus. The role of insulin resistance and hyperinsulinemia]. *Fiziol Zh* 39 (5-6):93-98
- Krakauer JC, McKenna MJ, Buderer NF, Rao DS, Whitehouse FW, Parfitt AM (1995) Bone loss and bone turnover in diabetes. *Diabetes* 44 (7):775-782
- Kream BE, Smith MD, Canalis E, Raisz LG (1985) Characterization of the effect of insulin on collagen synthesis in fetal rat bone. *Endocrinology* 116 (1):296-302. doi:10.1210/endo-116-1-296
- Kubota T, Michigami T, Sakaguchi N, Kokubu C, Suzuki A, Namba N, Sakai N, Nakajima S, Imai K, Ozono K (2008) Lrp6 hypomorphic mutation affects bone mass through bone resorption in mice and impairs interaction with Mesd. *J Bone Miner Res* 23 (10):1661-1671. doi:10.1359/jbmr.080512
- La Fontaine J, Shibuya N, Sampson HW, Valderrama P (2011) Trabecular quality and cellular characteristics of normal, diabetic, and charcot bone. *J Foot Ankle Surg* 50 (6):648-653. doi:10.1053/j.jfas.2011.05.005
- Lee B, Thirunavukkarasu K, Zhou L, Pastore L, Baldini A, Hecht J, Geoffroy V, Ducy P, Karsenty G (1997) Missense mutations abolishing DNA binding of the osteoblast-specific transcription factor OSF2/CBFA1 in cleidocranial dysplasia. *Nat Genet* 16 (3):307-310. doi:10.1038/ng0797-307

- Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G (2007) Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130 (3):456-469. doi:10.1016/j.cell.2007.05.047
- Li X, Grisanti M, Fan W, Asuncion FJ, Tan HL, Dwyer D, Han CY, Yu L, Lee J, Lee E, Barrero M, Kurimoto P, Niu QT, Geng Z, Winters A, Horan T, Steavenson S, Jacobsen F, Chen Q, Haldankar R, Lavallee J, Tipton B, Daris M, Sheng J, Lu HS, Daris K, Deshpande R, Valente EG, Salimi-Moosavi H, Kostenuik PJ, Li J, Liu M, Li C, Lacey DL, Simonet WS, Ke HZ, Babij P, Stolina M, Ominsky MS, Richards WG (2011) Dickkopf-1 regulates bone formation in young growing rodents and upon traumatic injury. *J Bone Miner Res* 26 (11):2610-2621. doi:10.1002/jbmr.472
- Lienau J, Schmidt-Bleek K, Peters A, Weber H, Bail HJ, Duda GN, Perka C, Schell H (2010) Insight into the molecular pathophysiology of delayed bone healing in a sheep model. *Tissue Eng Part A* 16 (1):191-199. doi:10.1089/ten.TEA.2009.0187
- Liu HY, Huang J, Wu D, Li T, Guo LJ, Guo QN, Wang HD, Wang RL, Wang Y (2016) Collagen Type I Alpha 1 Mutation Causes Osteogenesis Imperfecta from Mild to Perinatal Death in a Chinese Family. *Chin Med J (Engl)* 129 (1):88-91. doi:10.4103/0366-6999.172600
- Liu Z, Zhou W, Tangl S, Liu S, Xu X, Rausch-Fan X (2015) Potential mechanism for osseointegration of dental implants in Zucker diabetic fatty rats. *Br J Oral Maxillofac Surg* 53 (8):748-753. doi:10.1016/j.bjoms.2015.05.023
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25 (4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Locklin RM, Khosla S, Turner RT, Riggs BL (2003) Mediators of the biphasic responses of bone to intermittent and continuously administered parathyroid hormone. *J Cell Biochem* 89 (1):180-190. doi:10.1002/jcb.10490
- Loder RT (1988) The influence of diabetes mellitus on the healing of closed fractures. *Clin Orthop Relat Res* (232):210-216
- Logan CY, Nusse R (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:781-810. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126
- Long F (2012) Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13 (1):27-38. doi:10.1038/nrm3254
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 (1):265-275
- Lu YC, Wang CP, Hsu CC, Chiu CA, Yu TH, Hung WC, Lu LF, Chung FM, Tsai IT, Lin HC, Lee YJ (2013) Circulating secreted frizzled-related protein 5 (Sfrp5) and wingless-type MMTV integration site family member 5a (Wnt5a) levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev* 29 (7):551-556. doi:10.1002/dmrr.2426

- Luengo-Fernandez R, Leal J, Gray A, Sullivan R (2013) Economic burden of cancer across the European Union: a population-based cost analysis. *Lancet Oncol* 14 (12):1165-1174. doi:10.1016/S1470-2045(13)70442-X
- Luo XH, Guo LJ, Xie H, Yuan LQ, Wu XP, Zhou HD, Liao EY (2006) Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway. *J Bone Miner Res* 21 (10):1648-1656. doi:10.1359/jbmr.060707
- Luo XH, Guo LJ, Yuan LQ, Xie H, Zhou HD, Wu XP, Liao EY (2005) Adiponectin stimulates human osteoblasts proliferation and differentiation via the MAPK signaling pathway. *Exp Cell Res* 309 (1):99-109. doi:10.1016/j.yexcr.2005.05.021
- Ma L, Oei L, Jiang L, Estrada K, Chen H, Wang Z, Yu Q, Zillikens MC, Gao X, Rivadeneira F (2012) Association between bone mineral density and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Eur J Epidemiol* 27 (5):319-332. doi:10.1007/s10654-012-9674-x
- Mabilleau G, Petrova NL, Edmonds ME, Sabokbar A (2008) Increased osteoclastic activity in acute Charcot's osteoarthropathy: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. *Diabetologia* 51 (6):1035-1040. doi:10.1007/s00125-008-0992-1
- MacDonald BT, Tamai K, He X (2009) Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 17 (1):9-26. doi:10.1016/j.devcel.2009.06.016
- Maddaloni E, D'Onofrio L, Lauria A, Maurizi AR, Stollo R, Palermo A, Napoli N, Angeletti S, Pozzilli P, Manfrini S (2014) Osteocalcin levels are inversely associated with Hba1c and BMI in adult subjects with long-standing type 1 diabetes. *J Endocrinol Invest* 37 (7):661-666. doi:10.1007/s40618-014-0092-7
- Marini JC, Forlino A, Cabral WA, Barnes AM, San Antonio JD, Milgrom S, Hyland JC, Korkko J, Prockop DJ, De Paepe A, Coucke P, Symoens S, Glorieux FH, Roughley PJ, Lund AM, Kuurila-Svahn K, Hartikka H, Cohn DH, Krakow D, Mottes M, Schwarze U, Chen D, Yang K, Kuslich C, Troendle J, Dalglish R, Byers PH (2007) Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Hum Mutat* 28 (3):209-221. doi:10.1002/humu.20429
- Mascarenhas JV, Jude EB (2014) The Charcot foot as a complication of diabetic neuropathy. *Curr Diab Rep* 14 (12):561. doi:10.1007/s11892-014-0561-6
- Massague J (1990) The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6:597-641. doi:10.1146/annurev.cb.06.110190.003121
- Matsuzawa Y, Funahashi T, Nakamura T (1999) Molecular mechanism of metabolic syndrome X: contribution of adipocytokines adipocyte-derived bioactive substances. *Ann N Y Acad Sci* 892:146-154

- McArdle A, Marecic O, Tevlin R, Walmsley GG, Chan CK, Longaker MT, Wan DC (2015) The role and regulation of osteoclasts in normal bone homeostasis and in response to injury. *Plast Reconstr Surg* 135 (3):808-816. doi:10.1097/PRS.0000000000000963
- Melton LJ, 3rd, Gabriel SE, Crowson CS, Tosteson AN, Johnell O, Kanis JA (2003) Cost-equivalence of different osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 14 (5):383-388. doi:10.1007/s00198-003-1385-4
- Meyer MB, Benkusky NA, Pike JW (2014) The RUNX2 cisrome in osteoblasts: characterization, down-regulation following differentiation, and relationship to gene expression. *J Biol Chem* 289 (23):16016-16031. doi:10.1074/jbc.M114.552216
- Minor RR (1980) Collagen metabolism: a comparison of diseases of collagen and diseases affecting collagen. *Am J Pathol* 98 (1):225-280
- Molines L, Darmon P, Raccach D (2010) Charcot's foot: newest findings on its pathophysiology, diagnosis and treatment. *Diabetes Metab* 36 (4):251-255. doi:10.1016/j.diabet.2010.04.002
- Monroe DG, McGee-Lawrence ME, Oursler MJ, Westendorf JJ (2012) Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. *Gene* 492 (1):1-18. doi:10.1016/j.gene.2011.10.044
- Morin PA, Smith DG (1995) Nonradioactive detection of hypervariable simple sequence repeats in short polyacrylamide gels. *Biotechniques* 19 (2):223-228
- Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK, Fuller JH, Keen H (2001) Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia* 44 Suppl 2:S14-21
- Moseley KF (2012) Type 2 diabetes and bone fractures. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 19 (2):128-135. doi:10.1097/MED.0b013e328350a6e1
- Moursi AM, Damsky CH, Lull J, Zimmerman D, Doty SB, Aota S, Globus RK (1996) Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation. *J Cell Sci* 109 ( Pt 6):1369-1380
- Movahed A, Larijani B, Nabipour I, Kalantarhormozi M, Asadipooya K, Vahdat K, Akbarzadeh S, Farrokhnia M, Assadi M, Amirinejad R, Bargahi A, Sanjdideh Z (2012) Reduced serum osteocalcin concentrations are associated with type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome components in postmenopausal women: the crosstalk between bone and energy metabolism. *J Bone Miner Metab* 30 (6):683-691. doi:10.1007/s00774-012-0367-z
- Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR (1997) Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89 (5):773-779
- Nakano N, Maeyama K, Sakata N, Itoh F, Akatsu R, Nakata M, Katsu Y, Ikeno S, Togawa Y, Vo Nguyen TT, Watanabe Y, Kato M, Itoh S (2014) C18 ORF1, a novel negative regulator of transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 289 (18):12680-12692. doi:10.1074/jbc.M114.558981



- Napoli N, Strotmeyer ES, Ensrud KE, Sellmeyer DE, Bauer DC, Hoffman AR, Dam TT, Barrett-Connor E, Palermo L, Orwoll ES, Cummings SR, Black DM, Schwartz AV (2014) Fracture risk in diabetic elderly men: the MrOS study. *Diabetologia* 57 (10):2057-2065. doi:10.1007/s00125-014-3289-6
- Ndip A, Williams A, Jude EB, Serracino-Inglott F, Richardson S, Smyth JV, Boulton AJ, Alexander MY (2011) The RANKL/RANK/OPG signaling pathway mediates medial arterial calcification in diabetic Charcot neuroarthropathy. *Diabetes* 60 (8):2187-2196. doi:10.2337/db10-1220
- Neumann T, Lodes S, Kastner B, Franke S, Kiehntopf M, Lehmann T, Muller UA, Wolf G, Samann A (2016) Osteocalcin, adipokines and their associations with glucose metabolism in type 1 diabetes. *Bone* 82:50-55. doi:10.1016/j.bone.2015.04.017
- Niedzwiedzki T, Filipowska J (2015) Bone remodeling in the context of cellular and systemic regulation: the role of osteocytes and the nervous system. *J Mol Endocrinol* 55 (2):R23-36. doi:10.1530/JME-15-0067
- Nusse R, Varmus HE (1982) Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31 (1):99-109
- Oei L, Rivadeneira F, Zillikens MC, Oei EH (2015) Diabetes, diabetic complications, and fracture risk. *Curr Osteoporos Rep* 13 (2):106-115. doi:10.1007/s11914-015-0260-5
- Oreffo RO, Mundy GR, Seyedin SM, Bonewald LF (1989) Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 158 (3):817-823
- Pakarinen TK, Laine HJ, Maenpaa H, Mattila P, Lahtela J (2009) Long-term outcome and quality of life in patients with Charcot foot. *Foot Ankle Surg* 15 (4):187-191. doi:10.1016/j.fas.2009.02.005
- Papa J, Myerson M, Girard P (1993) Salvage, with arthrodesis, in intractable diabetic neuropathic arthropathy of the foot and ankle. *J Bone Joint Surg Am* 75 (7):1056-1066
- Park OJ, Kim J, Yang J, Yun CH, Han SH (2017) Muramyl Dipeptide, a Shared Structural Motif of Peptidoglycans, Is a Novel Inducer of Bone Formation through Induction of Runx2. *J Bone Miner Res* 32 (7):1455-1468. doi:10.1002/jbmr.3137
- Petrova NL, Edmonds ME (2013) Medical management of Charcot arthropathy. *Diabetes Obes Metab* 15 (3):193-197. doi:10.1111/j.1463-1326.2012.01671.x
- Phillips S, Williams AL, Peters JR (1995) Neuropathic arthropathy of the spine in diabetes. *Diabetes Care* 18 (6):867-869
- Pilkington MF, Sims SM, Dixon SJ (2001) Transforming growth factor-beta induces osteoclast ruffling and chemotaxis: potential role in osteoclast recruitment. *J Bone Miner Res* 16 (7):1237-1247. doi:10.1359/jbmr.2001.16.7.1237

- Pittas AG, Harris SS, Eliades M, Stark P, Dawson-Hughes B (2009) Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 94 (3):827-832. doi:10.1210/jc.2008-1422
- Poniatowski LA, Wojdasiewicz P, Gasik R, Szukiewicz D (2015) Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators Inflamm* 2015:137823. doi:10.1155/2015/137823
- Portal-Nunez S, Lozano D, de Castro LF, de Gortazar AR, Nogues X, Esbrit P (2010) Alterations of the Wnt/beta-catenin pathway and its target genes for the N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein in bone from diabetic mice. *FEBS Lett* 584 (14):3095-3100. doi:10.1016/j.febslet.2010.05.047
- Qi J, Hu KS, Yang HL (2015) Roles of TNF-alpha, GSK-3beta and RANKL in the occurrence and development of diabetic osteoporosis. *Int J Clin Exp Pathol* 8 (10):11995-12004
- Qiang YW, Chen Y, Brown N, Hu B, Epstein J, Barlogie B, Shaughnessy JD, Jr. (2010) Characterization of Wnt/beta-catenin signalling in osteoclasts in multiple myeloma. *Br J Haematol* 148 (5):726-738. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.08009.x
- Rajbhandari SM, Jenkins RC, Davies C, Tesfaye S (2002) Charcot neuroarthropathy in diabetes mellitus. *Diabetologia* 45 (8):1085-1096. doi:10.1007/s00125-002-0885-7
- Rao TP, Kuhl M (2010) An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res* 106 (12):1798-1806. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.219840
- Rauch F, Glorieux FH (2004) Osteogenesis imperfecta. *Lancet* 363 (9418):1377-1385. doi:10.1016/S0140-6736(04)16051-0
- Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (1997). *Diabetes Care* 20 (7):1183-1197
- Retzepi M, Donos N (2010) The effect of diabetes mellitus on osseous healing. *Clin Oral Implants Res* 21 (7):673-681. doi:10.1111/j.1600-0501.2010.01923.x
- Richard JL, Almasri M, Schuldiner S (2012) Treatment of acute Charcot foot with bisphosphonates: a systematic review of the literature. *Diabetologia* 55 (5):1258-1264. doi:10.1007/s00125-012-2507-3
- Richards JB, Valdes AM, Burling K, Perks UC, Spector TD (2007) Serum adiponectin and bone mineral density in women. *J Clin Endocrinol Metab* 92 (4):1517-1523. doi:10.1210/jc.2006-2097
- Ripamonti U, Reddi AH (1992) Growth and morphogenetic factors in bone induction: role of osteogenin and related bone morphogenetic proteins in craniofacial and periodontal bone repair. *Crit Rev Oral Biol Med* 3 (1-2):1-14
- Robling AG, Niziolek PJ, Baldridge LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, Mantila SM, Gluhak-Heinrich J, Bellido TM, Harris SE, Turner CH (2008) Mechanical stimulation of bone in

- vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem* 283 (9):5866-5875. doi:10.1074/jbc.M705092200
- Rogers LC, Frykberg RG, Armstrong DG, Boulton AJ, Edmonds M, Van GH, Hartemann A, Game F, Jeffcoate W, Jirkovska A, Jude E, Morbach S, Morrison WB, Pinzur M, Pitocco D, Sanders L, Wukich DK, Uccioli L (2011) The Charcot foot in diabetes. *Diabetes Care* 34 (9):2123-2129. doi:10.2337/dc11-0844
- Rosenbaum AJ, DiPrea JA (2015) Classifications in brief: Eichenholtz classification of Charcot arthropathy. *Clin Orthop Relat Res* 473 (3):1168-1171. doi:10.1007/s11999-014-4059-y
- Saito M, Fujii K, Mori Y, Marumo K (2006) Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats. *Osteoporos Int* 17 (10):1514-1523. doi:10.1007/s00198-006-0155-5
- Saito M, Kida Y, Kato S, Marumo K (2014) Diabetes, collagen, and bone quality. *Curr Osteoporos Rep* 12 (2):181-188. doi:10.1007/s11914-014-0202-7
- Salerno M, Argenziano A, Di Maio S, Gasparini N, Formicola S, De Filippo G, Tenore A (1997) Pubertal growth, sexual maturation, and final height in children with IDDM. Effects of age at onset and metabolic control. *Diabetes Care* 20 (5):721-724
- Sanders LJ (2004) The Charcot foot: historical perspective 1827-2003. *Diabetes Metab Res Rev* 20 Suppl 1:S4-8. doi:10.1002/dmrr.451
- Sanders LJ, Edmonds ME, Jeffcoate WJ (2013) Who was first to diagnose and report neuropathic arthropathy of the foot and ankle: Jean-Martin Charcot or Herbert William Page? *Diabetologia* 56 (9):1873-1877. doi:10.1007/s00125-013-2961-6
- Sarahrudi K, Thomas A, Mousavi M, Kaiser G, Kottstorfer J, Kecht M, Hajdu S, Aharinejad S (2011) Elevated transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) levels in human fracture healing. *Injury* 42 (8):833-837. doi:10.1016/j.injury.2011.03.055
- Sawakami K, Robling AG, Ai M, Pitner ND, Liu D, Warden SJ, Li J, Maye P, Rowe DW, Duncan RL, Warman ML, Turner CH (2006) The Wnt co-receptor LRP5 is essential for skeletal mechanotransduction but not for the anabolic bone response to parathyroid hormone treatment. *J Biol Chem* 281 (33):23698-23711. doi:10.1074/jbc.M601000200
- Schlesinger PH, Blair HC, Teitelbaum SL, Edwards JC (1997) Characterization of the osteoclast ruffled border chloride channel and its role in bone resorption. *J Biol Chem* 272 (30):18636-18643
- Sealand R, Razavi C, Adler RA (2013) Diabetes mellitus and osteoporosis. *Curr Diab Rep* 13 (3):411-418. doi:10.1007/s11892-013-0376-x
- Seeman E, Delmas PD (2006) Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med* 354 (21):2250-2261. doi:10.1056/NEJMra053077

- Sefat F, Denyer MC, Youseffi M (2014) Effects of different transforming growth factor beta (TGF-beta) isomers on wound closure of bone cell monolayers. *Cytokine* 69 (1):75-86. doi:10.1016/j.cyto.2014.05.010
- Shi Y, Massague J (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113 (6):685-700
- Sims NA, Martin TJ (2014) Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep* 3:481. doi:10.1038/bonekey.2013.215
- Sinha S, Munichoodappa CS, Kozak GP (1972) Neuro-arthropathy (Charcot joints) in diabetes mellitus (clinical study of 101 cases). *Medicine (Baltimore)* 51 (3):191-210
- Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshezhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P (2007) A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445 (7130):881-885. doi:10.1038/nature05616
- Smith E, Frenkel B (2005) Glucocorticoids inhibit the transcriptional activity of LEF/TCF in differentiating osteoblasts in a glycogen synthase kinase-3beta-dependent and -independent manner. *J Biol Chem* 280 (3):2388-2394. doi:10.1074/jbc.M406294200
- Smith WB, Moore CA (2012) A proposed treatment algorithm for midfoot Charcot arthropathy. *Foot Ankle Spec* 5 (1):60-64. doi:10.1177/1938640011433463
- Spanheimer RG, Umpierrez GE, Stumpf V (1988) Decreased collagen production in diabetic rats. *Diabetes* 37 (4):371-376
- Sparkes RS, Graham CB (1972) Camurati-Engelmann disease. Genetics and clinical manifestations with a review of the literature. *J Med Genet* 9 (1):73-85
- Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK (1986) Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. *Science* 233 (4763):532-534
- Stefansky SA, Rosenblum BI (2005) The Charcot foot: a clinical challenge. *Int J Low Extrem Wounds* 4 (3):183-187. doi:10.1177/1534734605280187
- Steffensen B, Chen Z, Pal S, Mikhailova M, Su J, Wang Y, Xu X (2011) Fragmentation of fibronectin by inherent autolytic and matrix metalloproteinase activities. *Matrix Biol* 30 (1):34-42. doi:10.1016/j.matbio.2010.09.004
- Stuart MJ, Morrey BF (1990) Arthrodesis of the diabetic neuropathic ankle joint. *Clin Orthop Relat Res* (253):209-211
- Sun J, Wang D, Jin T (2010) Insulin alters the expression of components of the Wnt signaling pathway including TCF-4 in the intestinal cells. *Biochim Biophys Acta* 1800 (3):344-351. doi:10.1016/j.bbagen.2009.12.007

- Suzuki K, Miyakoshi N, Tsuchida T, Kasukawa Y, Sato K, Itoi E (2003) Effects of combined treatment of insulin and human parathyroid hormone(1-34) on cancellous bone mass and structure in streptozotocin-induced diabetic rats. *Bone* 33 (1):108-114
- Takeda H, Inoue H, Kutsuna T, Matsushita N, Takahashi T, Watanabe S, Higashiyama S, Yamamoto H (2010) Activation of epidermal growth factor receptor gene is involved in transforming growth factor-beta-mediated fibronectin expression in a chondrocyte progenitor cell line. *Int J Mol Med* 25 (4):593-600
- Thraikill KM, Lumpkin CK, Jr., Bunn RC, Kemp SF, Fowlkes JL (2005) Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289 (5):E735-745. doi:10.1152/ajpendo.00159.2005
- Tisdell CL, Marcus RE, Heiple KG (1995) Triple arthrodesis for diabetic peritalar neuroarthropathy. *Foot Ankle Int* 16 (6):332-338
- Tosteson AN, Melton LJ, 3rd, Dawson-Hughes B, Baim S, Favus MJ, Khosla S, Lindsay RL, National Osteoporosis Foundation Guide C (2008) Cost-effective osteoporosis treatment thresholds: the United States perspective. *Osteoporos Int* 19 (4):437-447. doi:10.1007/s00198-007-0550-6
- Tsentidis C, Gourgiotis D, Kossiva L, Doulgeraki A, Marmarinos A, Galli-Tsinopoulou A, Karavanaki K (2016) Higher levels of s-RANKL and osteoprotegerin in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus may indicate increased osteoclast signaling and predisposition to lower bone mass: a multivariate cross-sectional analysis. *Osteoporos Int* 27 (4):1631-1643. doi:10.1007/s00198-015-3422-5
- Tsipouras P, Ramirez F (1987) Genetic disorders of collagen. *J Med Genet* 24 (1):2-8
- Valadares ER, Carneiro TB, Santos PM, Oliveira AC, Zabel B (2014) What is new in genetics and osteogenesis imperfecta classification? *J Pediatr (Rio J)* 90 (6):536-541. doi:10.1016/j.jpmed.2014.05.003
- van Daele PL, Seibel MJ, Burger H, Hofman A, Grobbee DE, van Leeuwen JP, Birkenhager JC, Pols HA (1996) Case-control analysis of bone resorption markers, disability, and hip fracture risk: the Rotterdam study. *BMJ* 312 (7029):482-483
- Van Dijk FS, Sillence DO (2014) Osteogenesis imperfecta: clinical diagnosis, nomenclature and severity assessment. *Am J Med Genet A* 164A (6):1470-1481. doi:10.1002/ajmg.a.36545
- van Meurs JB, Rivadeneira F, Jhamai M, Hagens W, Hofman A, van Leeuwen JP, Pols HA, Uitterlinden AG (2006) Common genetic variation of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6 genes determines fracture risk in elderly white men. *J Bone Miner Res* 21 (1):141-150. doi:10.1359/JBMR.050904
- Van Staa TP, Leufkens HG, Abenhaim L, Zhang B, Cooper C (2000) Use of oral corticosteroids and risk of fractures. *J Bone Miner Res* 15 (6):993-1000. doi:10.1359/jbmr.2000.15.6.993

- Verhaeghe J, van Herck E, Visser WJ, Suiker AM, Thomasset M, Einhorn TA, Faierman E, Bouillon R (1990) Bone and mineral metabolism in BB rats with long-term diabetes. Decreased bone turnover and osteoporosis. *Diabetes* 39 (4):477-482
- Vestergaard P (2014) Diabetes and bone fracture: risk factors for old and young. *Diabetologia* 57 (10):2007-2008. doi:10.1007/s00125-014-3338-1
- Wada Y, Yamamoto H, Nanbu S, Mizuno M, Tamura M (2008) The suppressive effect of enamel matrix derivative on osteocalcin gene expression of osteoblasts is neutralized by an antibody against TGF-beta. *J Periodontol* 79 (2):341-347. doi:10.1902/jop.2008.070197
- Wei W, Zeve D, Suh JM, Wang X, Du Y, Zerwekh JE, Dechow PC, Graff JM, Wan Y (2011) Biphasic and dosage-dependent regulation of osteoclastogenesis by beta-catenin. *Mol Cell Biol* 31 (23):4706-4719. doi:10.1128/MCB.05980-11
- WHO (2006) Definition and Diagnosis of Diabetes mellitus and Intermediate Hyperglycemia: Report of a WHO/ IDF Consultation. World Health Org. World Health Organization,
- Wiame I, Remy S, Swennen R, Sagi L (2000) Irreversible heat inactivation of DNase I without RNA degradation. *Biotechniques* 29 (2):252-254, 256
- Xiao Z, Awad HA, Liu S, Mahlios J, Zhang S, Guilak F, Mayo MS, Quarles LD (2005) Selective Runx2-II deficiency leads to low-turnover osteopenia in adult mice. *Dev Biol* 283 (2):345-356. doi:10.1016/j.ydbio.2005.04.028
- Xu MT, Sun S, Zhang L, Xu F, Du SL, Zhang XD, Wang DW (2016) Diabetes mellitus affects the biomechanical function of the callus and the expression of TGF-beta1 and BMP2 in an early stage of fracture healing. *Braz J Med Biol Res* 49 (1):e4736. doi:10.1590/1414-431X20154736
- Ye F, Chen Y, Hoang T, Montgomery RL, Zhao XH, Bu H, Hu T, Taketo MM, van Es JH, Clevers H, Hsieh J, Bassel-Duby R, Olson EN, Lu QR (2009) HDAC1 and HDAC2 regulate oligodendrocyte differentiation by disrupting the beta-catenin-TCF interaction. *Nat Neurosci* 12 (7):829-838. doi:10.1038/nn.2333
- Yi F, Sun J, Lim GE, Fantus IG, Brubaker PL, Jin T (2008) Cross talk between the insulin and Wnt signaling pathways: evidence from intestinal endocrine L cells. *Endocrinology* 149 (5):2341-2351. doi:10.1210/en.2007-1142
- Young MJ, Adams JE, Anderson GF, Boulton AJ, Cavanagh PR (1993) Medial arterial calcification in the feet of diabetic patients and matched non-diabetic control subjects. *Diabetologia* 36 (7):615-621
- Zhang C, Qi L, Hunter DJ, Meigs JB, Manson JE, van Dam RM, Hu FB (2006) Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and the risk of type 2 diabetes in large cohorts of U.S. women and men. *Diabetes* 55 (9):2645-2648. doi:10.2337/db06-0643

- Zhao H, Oka K, Bringas P, Kaartinen V, Chai Y (2008) TGF-beta type I receptor Alk5 regulates tooth initiation and mandible patterning in a type II receptor-independent manner. *Dev Biol* 320 (1):19-29. doi:10.1016/j.ydbio.2008.03.045
- Zhou Y, Park SY, Su J, Bailey K, Ottosson-Laakso E, Shcherbina L, Oskolkov N, Zhang E, Thevenin T, Fadista J, Bennet H, Vikman P, Wierup N, Fex M, Rung J, Wollheim C, Nobrega M, Renstrom E, Groop L, Hansson O (2014) TCF7L2 is a master regulator of insulin production and processing. *Hum Mol Genet* 23 (24):6419-6431. doi:10.1093/hmg/ddu359
- Zimmermann G, Henle P, Kusswetter M, Moghaddam A, Wentzensen A, Richter W, Weiss S (2005) TGF-beta1 as a marker of delayed fracture healing. *Bone* 36 (5):779-785. doi:10.1016/j.bone.2005.02.011