

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie
des Universitätsklinikums Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. W. Mittelmeier

**Etablierung eines In-vivo-Modells zur
molekularbiologischen Untersuchung von
Stoffwechselmarkern bei der Knochenregeneration unter
intermittierender Parathormongabe**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von

Thordis Granitzka

aus Stralsund

Rostock 2013

Dekan Prof. Dr. med. E. C. Reisinger

Gutachter:**1. Gutachter:**

Priv. Doz. Dr. med. Ralf Skripitz,
Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr.med. Andreas Niemeier
Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Universitätsklinikum Hamburg-
Eppendorf

3. Gutachter:

Prof. Dr. med. Brigitte Müller-Hilke
Institut für Immunologie, Universität Rostock

Datum der Einreichung: 24. April 2013

Datum der Verteidigung: 26. Februar 2014

Meinen Eltern

Inhalt

1. Zielsetzung	7
2. Einleitung	8
2.1 Bau und Funktion des knöchernen Skeletts.....	8
2.2 Knochenzellen	9
2.2.1 Osteoblasten.....	10
2.2.2 Osteozyten.....	10
2.2.3 Osteoklasten.....	11
2.3 Remodeling.....	11
2.4. RANK-RANKL-OPG-System	15
2.4.1 Physiologischer Regelkreis des RANK-RANKL-OPG-Systems	16
2.4.2 Regulation des RANK-RANKL-OPG-Systems durch Mediatoren	17
2.5 Parathormon (PTH)	20
2.5.1 Biosynthese und Metabolismus	20
2.5.2 Physiologische Wirkungen	22
2.5.3 Wirkung des Parathormon auf den Knochenmetabolismus.....	25
2.5.4 Klinischer Einsatz der osteoanabolen Eigenschaften des PTH- Fragments (1-34)	27
3. Material und Methoden	29
3.1 Tiere, Rasse, Alter und Geschlecht	29
3.2 Tierversuchsgenehmigung	29
3.3 Tierhaltung und Ernährung.....	29
3.4 Versuchsaufbau	30
3.5 Geräte und Chemikalien Implantation.....	30
3.6 Geräte und Chemikalien Probenauswertung.....	31
3.7 Herstellung der Injektionslösungen	34

3.8 Herstellung der Implantate.....	34
3.9 Implantation der Titanschrauben	35
3.9.1 Präoperative Phase	35
3.9.2 Narkose und OP-Vorbereitungen.....	35
3.9.3 Einsetzen der Implantate.....	36
3.9.4 Postoperatives Verfahren	38
3.9.5 Entnahme der Implantate	39
3.10 Aufbereitung der Proben	39
3.10.1 RNS-Isolation mittels QIAGEN RNeasy ® Micro Kit.....	40
3.10.2 Bestimmung der RNS-Konzentration	40
3.10.3 Reverse Transkription (RT-PCR)	40
3.10.4 Quantitative Echtzeit-PCR – Real-Time-PCR (TaqMan®).....	41
3.10.5 Statistische Auswertung.....	45
4. Ergebnisse	46
4.1 Implantation und postoperativer Verlauf	46
4.2 Gewichtsentwicklung der Versuchstiere unter PTH- oder	
NaCl-Applikation.....	46
4.3 Explantation und Gewebeentnahme	47
4.4 RNS-Isolation aus Knochengewebe	49
4.5 Ergebnisse der quantitativen Real-Time-PCR	49
5. Diskussion.....	52
5.1 Wirkung der PTH-Applikation auf das RANK-	
RANKL-OPG-System	52
5.1.1 Wirkung der PTH-Applikation auf des RANK-RANKL-OPG-System	
unter physiologischen Bedingungen	52
5.1.2 PTH-Wirkung auf das RANK-RANKL-OPG- System im	
regenerierenden bzw. periimplantären Knochen	56
5.2 PTH-Wirkung auf Regenerationsprozesse.....	57

5.2.1 PTH-Wirkung auf die Frakturheilung.....	57
5.2.2 PTH-Wirkung auf die Implantatintegration.....	58
5.3 Erhöhung der RANK-Expression – mögliche Ursachen.....	61
5.4 Alternative Signalwege des Knochenmetabolismus	63
5.5 Mögliche Ursachen für den fehlenden PTH-Effekt auf die Stoffwechselmarker am regenerierenden/ periimplantären Knochen im Knochenkammermodell.....	64
5.5.1 Geschlecht.....	64
5.5.2 Einfluss mechanischer Belastung und Versuchsdauer auf die PTH-Wirkung.....	65
5.5.3 PTH-Wirkung auf verschiedene Knochenkompartimente	65
5.5.4 Tiermodell Ratte und Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen	67
5.6 Steigerung der Genexpression der Knochenmarker in Abhängigkeit von der Versuchszeit	69
5.7 Methodische Überlegungen zum Einwachsverhalten	72
5.8 Altersabhängigkeit der PTH-Wirkung.....	72
5.9 Methodische Überlegungen zu Dosis und Dauer der PTH-Applikation	73
5.10 Unbedenklichkeit der PTH-Nutzung als Therapeutikum in der Humanmedizin	74
5.11 Folgeversuch.....	75
5.12 Schlussfolgerung und Ausblick	76
6. Zusammenfassung.....	78
7. Abbildungsverzeichnis	80
8. Tabellenverzeichnis	81
9. Abkürzungsverzeichnis.....	81
10. Literaturverzeichnis.....	85
11. Danksagung.....	105
12. Eidesstattliche Versicherung.....	106

1. Zielsetzung

Lange bevor das anabole Potential des Parathormons (PTH) entdeckt wurde, kannte man lediglich dessen katabole Eigenschaften auf den Knochenstoffwechsel als Kontrollhormon der Kalziumhomöostase. Der genaue Mechanismus der anabolen PTH-Wirkung und deren Effekte auf Osteoprotegerin und RANKL sind noch nicht vollständig geklärt. Indes ist der anabole Wirkungsmechanismus des PTH einer der zentralen Forschungsschwerpunkte des Knochenstoffwechsels und vielversprechender Hoffnungsträger zur Verbesserung der Frakturheilung (Andreassen et al., 1999; Manabe et al., 2007; Aspenberg et al., 2010), Osteoporosetherapie (Cosman et al., 2001; Black et al., 2003; Hodsman et al., 2005; Finkelstein et al., 2006) und Optimierung der Implantatintegration (Gabet et al., 2006; Aspenberg et al., 2008; Skripitz et al., 2009). Es existieren zwar Betrachtungen zur PTH-Wirkung auf die Implantatintegration und auch Studien über Auswirkung einer intermittierenden PTH-Applikation auf die Expression der Knochenmarker des RANK-RANKL-OPG-Systems, dennoch gibt es nur sehr geringfügige Informationen über die Auswirkung von intermittierend verabreichtem PTH im Hinblick auf die Genexpression der Knochenmarker im regenerierenden und durch PTH stimulierten Gewebe. Die Studien, welche sich mit dem unterschiedlichen Vorkommen der Knochenmarker OPG, RANK und RANKL in periimplantären Bereichen beschäftigen, richten ihr Hauptaugenmerk zumeist auf deren Rolle bei periimplantären Entzündungen und der aseptischen Prothesenlockerung. Ziel dieser Tierversuchsstudie war es, anhand der Modifizierung eines Knochenkammermodells (Skripitz et al., 2000; Aspenberg et al., 1996) durch die Kombination mit der Genexpressionsanalyse die Expression der Knochenmarker OPG, RANK und RANKL unter intermittierender PTH-Applikation im regenerierenden periimplantären Knochen zu untersuchen. Es sollten so Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus von PTH im Zusammenhang mit der Optimierung des primären Implantat-Knochen-Kontaktes gewonnen werden. Dadurch sollte ein besseres Verständnis der Funktionsweise und Effizienz von PTH mit dem Ausblick der PTH-Applikation zur Verbesserung der Implantatintegration und zur Erhöhung der Standzeiten von endoprothetischen Dauerimplantaten erzielt werden.

2. Einleitung

2.1 Bau und Funktion des knöchernen Skeletts

Der Knochen stellt das Binde- und Stützgewebe des Körpers dar und besteht aus spezialisierten Knochenzellen und mineralisierter sowie unmineralisierter Extrazellulärmatrix. Die noch nicht mineralisierte Grundsubstanz, welche von Osteoblasten gebildet wird, trägt den Namen Osteoid. Mineralisierte Extrazellulärmatrix setzt sich zu 45 % aus anorganischen Bestandteilen (Hydroxylapatit und Kalziumkarbonat), zu 30 % aus organischen Verbindungen wie Kollagenen und Glykosaminglykanen und zu 25 % aus Wasser zusammen. Diese spezielle Verbindung aller Bestandteile macht den Knochen, abgesehen von Dentin und Zahnschmelz, zum härtesten Gewebe des Körpers (Lüllmann-Rauch, 2006). Der Aufbau des Knochens folgt einem übergeordneten Prinzip: dem Minimum-Maximum-Prinzip (Roux, 1895). Es beschreibt die Bauweise des Knochens, durch welche mit einem Minimum an Knochensubstanz ein Maximum an Festigkeit erreicht wird. Man nennt es auch Leichtbauprinzip. Umgesetzt bedeutet das, dass nur außen ein kompakter Knochen existiert (Kompakta), während im Inneren Spongiosa und Knochenmark den Hohlraum ausfüllt. Die Spongiosatrabekel sind dabei derart ausgerichtet, dass sie den Trajektorien des Knochens folgen. Das heißt, dass sie stets nur Druck- oder Zugbelastung standhalten müssen, nie aber Biegebeanspruchung. Äußerlich ist der Knochen mit Periost bedeckt, welches sowohl aus straffem Bindegewebe, als auch aus *bone lining cells* besteht. Die Innenseite der Knochenoberfläche ist mit Endost bedeckt, einer bindegewebigen Schicht aus unmineralisierten Kollagenfasern und *bone lining cells*. Somit können unter anderem auch alle mit Endost oder Periost bekleideten Knochenoberflächen durch die Anwesenheit der *bone lining cells* Ausgangspunkt für Knochenauf- und Umbauprozesse sein (Lüllmann-Rauch, 2006).

Der Knochen erfüllt nicht nur strukturelle, sondern auch metabolische Funktionen. Seine Rolle als Stützorgan und als Ansatzpunkt für Muskeln und Bänder ist bedeutsam für die Erhaltung der Körperform, zum Schutz der inneren Organe und weiterhin für Motorik und Atmung. Für den Metabolismus ist der Knochen vor allem aufgrund seiner Funktion als Kalzium- und Phosphationenspeicher besonders wichtig. Falls nötig, kann die extrazelluläre Kalziumkonzentration über die Anpassung von Knochenresorption oder -aufbau reguliert werden. Weiterhin beherbergt der Knochen Großteile des hämatopoetischen Systems.

Das Skelett des Menschen ist ständig Umbauprozessen unterworfen. Die Spongiosa erfährt jährlich einen Umbau von 20% und die Kompakta von 5 %. Zusammengenommen entspricht das einer durchschnittlichen Erneuerung von ca. 10 % des gesamten Skeletts pro Jahr (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil et al., 2006). Dieser Vorgang wird auch „Remodeling“ genannt. Das Remodeling dient vor allem der Verhütung von Materialermüdung, der Instandsetzung von durch Mikroschäden beeinträchtigtem Knochen, der Veränderung der Spongiosaarchitektur zur Anpassung an veränderte mechanische Ansprüche und zur schnellen Freisetzung von im Knochen gebundenen Kalzium. Besonders wichtig ist hierbei eine ausgewogene Bilanz des Knochenumsatzes. Diese wird von zwei gegensätzlich arbeitenden Zelltypen gewährleistet, die von verschiedenen endogenen und exogenen Faktoren beeinflusst werden und Stoffwechselprozessen unterliegen. Dieses Gleichgewicht ist empfindlich und kann gestört werden.

2.2 Knochenzellen

Zu den Knochenzellen zählen die Osteoblasten, die Knochensubstanz aufbauenden Zellen. Diese können im Laufe ihres Lebens zu Osteozyten reifen. Die Osteoklasten sind die „Gegenspieler“ der Osteoblasten, da sie in der Lage sind, Knochenmatrix abzubauen. Diese Zelltypen stehen in gegenseitiger Wechselwirkung. In Abb. 1 ist die Differenzierung verschiedener Knochenzellen dargestellt.

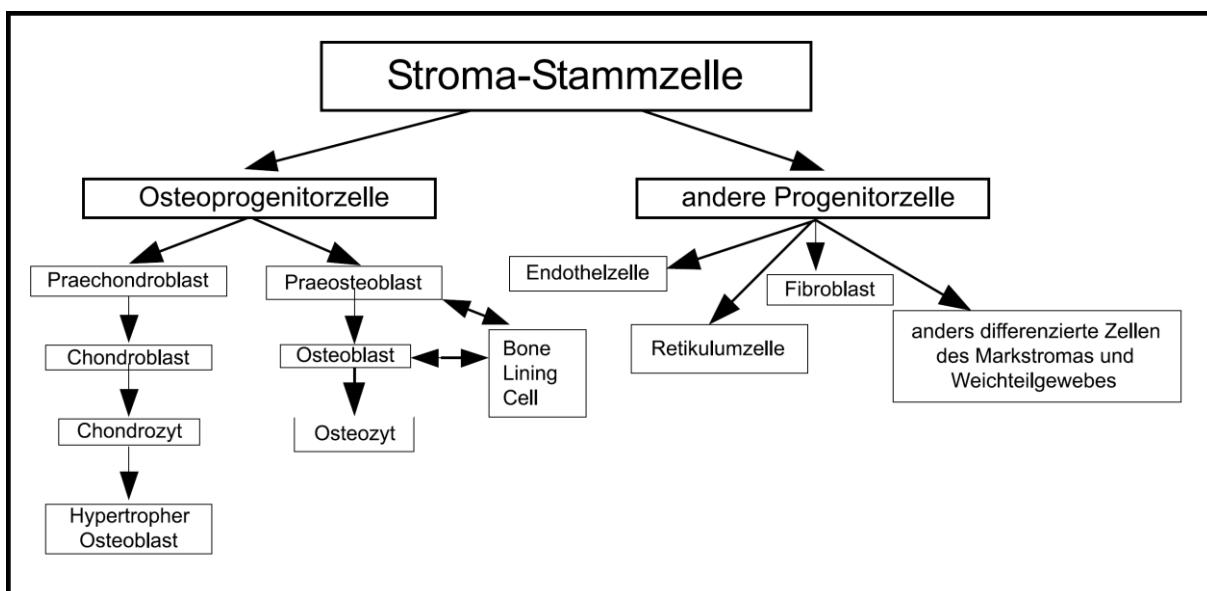


Abb. 1: Differenzierung der Knochenzellen (aus: Marks, Popoff, 1988, S. 20)

2.2.1 Osteoblasten

Die Osteoblasten sind die knochenaufbauenden Zellen. Sie sind verantwortlich für die Kollagensynthese und steuern die Mineralisation des Knochens. Weiterhin sind die Osteoblasten in der Lage, Osteoklasten in ihrer Aktivität zu beeinflussen. So können sie die Knochenresorption regulieren. Die reifen Osteoblasten entwickeln sich aus einer Reihe von Vorstufen. Aus mesenchymalen Stammzellen entstehen zunächst Osteoprogenitorzellen. Durch das Einwirken verschiedener lokaler Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel dem Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2), und Hormonen entstehen Prä-Osteoblasten. Diese reifen weiter zu Osteoblasten und beschließen ihre Entwicklung schließlich als Bone lining cells oder Osteozyten (Lüllmann-Rauch, 2006). Die Aufgabe von reifen Osteoblasten ist es, neue Knochenmatrix zu synthetisieren und zu mineralisieren. Dies geschieht nur auf der Grundlage präformierter Knochensubstanz. Dort lagern sich die Osteoblasten an der freien Knochenoberfläche als einschichtige Lage an. Dennoch werden sie durch das von ihnen selbst produzierte Osteoid, einer noch nicht mineralisierten Kollagenfibrillenlage, von der bereits mineralisierten Knochenmatrix abgegrenzt. Das Osteoid stellt das Grundgerüst für die entstehende Knochenlamelle dar. Nachdem die Mineralisation der Knochenlamellen vollendet ist, folgt der letzte Schritt der Osteoblastenentwicklung: Ein Teil der Zellen wird zu Osteozyten, indem sie von ihrer eigenen mineralisierten Matrix eingeschlossen werden oder von anderen Osteoblasten regelrecht „eingemauert“ werden. Etliche Zellen verfallen in Apoptose. Ein weiterer Teil der Zellen geht wieder in den inaktiven Zustand über. Sie lagern sich wieder an das Endost an, wo sie zusammen mit mesenchymalen Stammzellen, Osteoprogenitorzellen und Osteoklasten die Bone Lining Cells bilden und auf die nächste Aufgabe warten.

2.2.2 Osteozyten

Wie bereits beschrieben, sind die Osteozyten gänzlich von mineralisierter Knochensubstanz umgeben. Sie liegen zwischen den Knochenlamellen in Lakunen, von wo aus sie über Knochenkanälchen (Canalliculi) durch Ausläufer mit anderen Osteozyten und Osteoblasten in Verbindung stehen. Perizellulär der Osteozyten befindet sich eine nicht-mineralisierte Zone, welche lediglich mit Kollagenfibrillen und insterstitieller Flüssigkeit gefüllt ist (Lüllmann-Rauch, 2006). So sind alle Osteozyten über ein Netz aus Canalliculi untereinander und nach außen verbunden und somit auch für Diffusion erreichbar. Ihre genaue Aufgabe im

Knochenstoffwechsel ist noch unklar, aber es besteht die Vermutung, dass die Osteozyten mit Hilfe von Botenstoffen über Gap junctions Informationen bezüglich mechanischer Belastung, Zustand und Erneuerungsbedarf der Knochensubstanz an das Endost senden (Lüllmann-Rauch, 2006; Aguirre et al., 2006).

2.2.3 Osteoklasten

Osteoklasten sind in der Lage, mineralisierten Knochen, aber auch kalzifizierten Knorpel und Dentin abzubauen. Es sind große, mehrkernige Zellen, welche unter dem Einfluss des macrophage-colony-stimulating factor (M-CSF) durch die Fusion einkerniger Vorläuferzellen der hämatopoetischen Reihe entstehen. Die aktiven Osteoklasten liegen an der Knochenoberfläche und resorbieren an Knochentrabekeln mineralisierte Matrix, bis so genannte Howship-Lakunen entstehen. Die Kompakta wird in Form von Bohrkanälen resorbiert. Hierzu befähigt wird der Osteoklast durch eine Protonen-ATPase-Aktivität, welche es ermöglicht, Protonen in die Resorptionslakune zu pumpen und so einen pH von 4,5 zu erzeugen. Der niedrige pH erhöht die Löslichkeit der verkalkten Knochenmatrix und bietet den lysosomalen Enzymen (u.a. Cathepsin K) des Osteoklasten optimale Voraussetzungen zur Lyse der organischen Grundsubstanz, welche hauptsächlich aus Kollagen 1 besteht. Die verbleibenden Bestandteile werden per Endozytose vom Osteoklasten resorbiert (Teitelbaum, 2006). Die resorbierter Knochenmasse muss im Folgenden durch Osteoblasten wieder ersetzt werden. So spielen beide Zellarten in Wechselwirkung eine wichtige Rolle in Wachstum und Remodeling des Knochens sowie in der Kalziumhomöostase.

2.3 Remodeling

Der Knochen ist ein metabolisch hochaktives Organ und unterliegt einem kontinuierlichen Umbau („remodeling“). Durch das Remodeling wird die Anpassung an wechselnde Beanspruchung und das Erfüllen der metabolischen Funktion des Knochens als Kalzium- und Phosphatreservoir gewährleistet. Initiiert wird der Umbau beispielsweise durch Mikrotraumata, als Antwort auf Änderungen der mechanischen Belastung, durch hormonelle Faktoren und als Reaktion auf eine Veränderung in der Kalzium- und Phosphathomöostase (Raisz, 2005). Das Remodeling betrifft jährlich 20 % der Spongiosa und 5 % der Kompakta, was bedeutet, dass ca. 10 % der Gesamtknochenmasse jährlich erneuert wird (Fernández-

Tresguerres-Hernández-Gil et al., 2006). Dies findet in einem dynamischen und streng regulierten Gleichgewicht statt, welches Abfolge und Ausmaß der Knochenresorption durch Osteoklasten und der Knochenformation durch Osteoblasten koordiniert. So wird gewährleistet, dass außer dem physiologischen Altersverlust kein Knochenmasseverlust auftritt.

Der Mensch verfügt wie alle Primaten über ein sogenanntes osteonales Remodeling. Die ausführenden Zellen des Remodelings organisieren sich zu *Bone multicellular Units* (BMUs) (Parfitt, 2002). Dieser Zellverband besteht aus knochenresorbierenden Osteoklasten an der Spitze und knochenformierenden Osteoblasten im Gefolge. Der kontinuierliche Nachschub an Progenitorzellen wird durch ebenfalls zum Zellverband gehörende, einsprießende Kapillaren gewährleistet. Auf diese Art und Weise wird eine größtmögliche Effizienz des Knochenumbaus erreicht.

Der Umbau läuft in aufeinander abgestimmten Schritten ab. Sie gliedern sich in Initiation, Aktivierung, Resorption, Reversal und Formation. Bei der Initiation werden primär durch lokale und systemische Faktoren Prä-Osteoblasten, Osteozyten und Bone Lining Cells aktiviert. Der Remodeling-Zyklus wird initiiert, indem Osteoblasten mit osteoklastären Vorläuferzellen interagieren (z.B. hämatopoetische Monozyten) und diese zur Fusion zu reifen mehrkernigen Osteoklasten anregen. In Folge beginnen die Osteoklasten mit der Resorption der mineralisierten Knochenmatrix durch direkte Anlagerung an die Knochenoberfläche, wo sie an der der Matrix zugewandten Seite eine so genannte „ruffled border“ ausbilden. Dieser dient der Vergrößerung der Plasmamembranoberfläche und dem Schaffen eines abgeschlossenen Reaktionsraumes zur Lösung der Kalzium-Verbindungen und zur Zersetzung der organischen Grundsubstanz. Die so durch den Osteoklasten geschaffene Resorptionshöhle wird auch Howship-Lakune genannt. Die lokale Erhöhung der Kalzium-Konzentration scheint die osteoklastäre Apoptose zu triggern und so den Resorptionsprozess zu begrenzen (Mentaverri et al., 2003). Auf die Resorption folgt die Reversal-Phase, in der sich mononukleäre Zellen an die Oberfläche der Howship-Lakune anlagern und dort zusammen mit Osteoklasten die Knochenformation triggern. Dies geschieht vermutlich über die Produktion von Wachstumsfaktoren oder deren Freisetzung aus der Knochenmatrix (z.B. IGF-1, TGF- β) (Raisz, 2005). Bei der nun folgenden Formation differenzieren sich aus einwandernden mesenchymalen Stammzellen reife Osteoblasten, die die Resorptionslakunen mit Osteoid Lamelle für Lamelle auffüllen. Im weiteren Verlauf wird diese organische Grundsubstanz mineralisiert und so zu reifem Knochengewebe (Manolagas, 2000).

Die Osteoblasten einer Lamelle werden durch Osteoblasten, welche die folgende Lamelle synthetisieren, eingemauert und differenzieren sich in der mineralisierten Knochensubstanz zu Osteozyten, wo sie vermutlich als Mechanosensoren fungieren (Lanyon, 1993). Andere gehen in die Apoptose über. Nur die Osteoblasten, die an der Synthese der oberflächlichsten Knochenlamelle beteiligt waren, differenzieren sich an der Knochenoberfläche zu Bone Lining Cells, wo sie inaktiv auf den nächsten Remodeling-Zyklus warten (Raisz, 2005). Der Ablauf des Remodelings ist in Abb. 2 dargestellt. Zuletzt ist noch zu bemerken, dass die Resorption mit einigen Wochen einen wesentlich kürzeren Zeitraum in Anspruch nimmt als die Formation, bei der eine vollständige Resynthese mehrere Monate dauern kann. Dieser Umstand bewirkt, dass pathologisch vermehrter Umbau zu Knochenmasseverlust führen kann (Raisz, 2005), was erklärt, warum vor allem die Aktivierung und Differenzierung der Osteoklasten einer strengen Regulierung bedarf. Das zentrale Zytokin-System, welches diese Aufgabe erfüllt und somit den ganzen Knochenstoffwechsel kontrolliert, ist das RANK-RANKL-OPG-System.

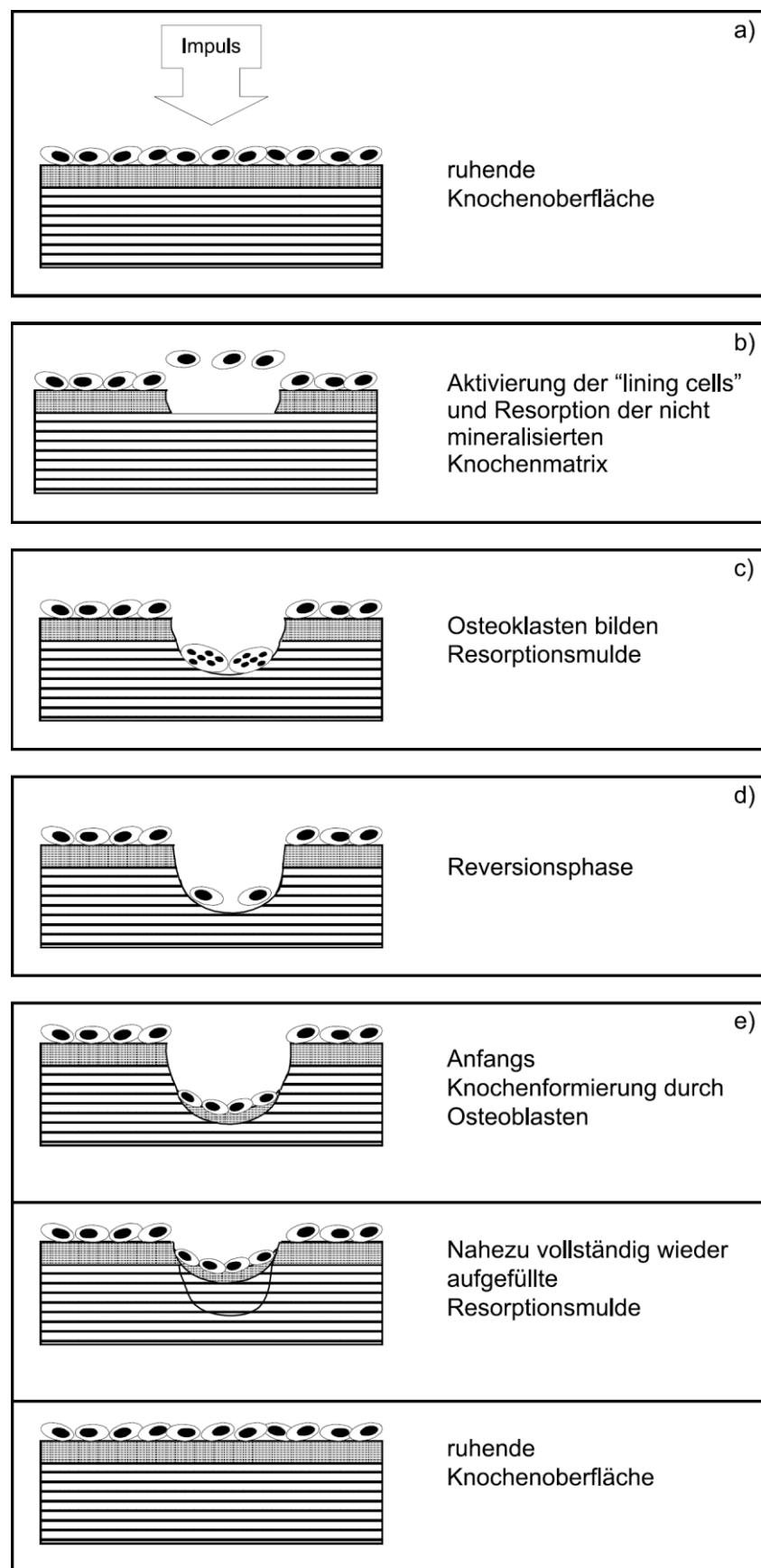


Abb. 2: Bone-Remodeling (modifiziert nach einem Schema aus: Bubeck, 1994, S.4)

2.4. RANK-RANKL-OPG-System

Der wichtigste Mechanismus zur Regulation und Steuerung des Remodelings ist das RANK-RANKL-OPG-System. Es handelt sich hierbei um ein Zytokinsystem, bestehend aus RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor-kB Ligand), RANK (Receptor Activator of Nuclear factor-kB) und OPG (Osteoprotegerin). Sie alle sind Mitglieder der Tumornekrosefaktor-Superfamilie (TNF-Superfamilie) und bilden zusammen das System, welches die Differenzierung und Aktivität der Osteoklasten kontrolliert und somit die Balance zwischen Knochenresorption und Knochenformation sichert. Außerdem nimmt man an, dass das RANK-RANKL-OPG-System nicht nur für die Steuerung des Knochenstoffwechsels von Bedeutung ist, sondern auch bei der Regulation von Immunprozessen (Teitelbaum et al., 2000; Kong et al., 2000; Schoppet et al., 2007) und der vaskulären Homöostase eine wichtige Rolle spielt (Golledge et al., 2004; Dhore et al., 2001; Collin-Osdoby et al., 2001; Zannettino et al., 2005).

Beim Remodeling folgt nach Osteoklastenmigration und –aktivierung die Resorption von Knochenmasse und nachfolgend die Apoptose der Osteoklasten. Schlussendlich kommt es zu Knochenneubildung durch Osteoblasten. Der Schlüssel zur Kontrolle des Knochenstoffwechsels ist die Osteoklastendifferenzierung und –aktivität, welche durch das RANK-RANKL-OPG-System reguliert wird. Um zu garantieren, dass auf jede Knochenresorption auch eine quantitativ gleichwertige Knochenneubildung folgt, steht die Formation und Aktivierung der Osteoklasten über das RANK-RANKL-OPG-System unter strenger Kontrolle der Osteoblasten („coupling“). Der Kontakt von membrangebundenem RANKL des Osteoblasten mit seinem Rezeptor RANK auf den Osteoklasten, der die osteoklastäre Knochenresorption erlaubt, hinterlässt auch beim Osteoblasten ein Signal, welches für kompensatorische Knochenneubildung sorgt. Dieser Mechanismus scheint bei bestimmten pathologischen Prozessen gestört zu sein, sodass es ohne Zellkontakt zu einer Aktivierung der Osteoklastogenese kommt. Entkoppelte Osteoklastogenese kann zum Beispiel durch inflammatorische Zytokine (IL-1, TNF- α) oder durch von T-Lymphozyten exprimierte RANKL stimuliert werden und zu Knochenmasseverlust führen („uncoupling“) (Takahashi et al., 2002).

Dass Osteoblastogenese und Osteoklastogenese eng miteinander verknüpft sind, zeigt auch der Umstand, dass für eine korrekte Exprimierung des Osteoklastendifferenzierungsfaktors RANKL durch den Osteoblasten der Osteoblastendifferenzierungsfaktor Cbfa1 (*C-modul binding faktor A1*) benötigt wird (Gao et al., 1998).

2.4.1 Physiologischer Regelkreis des RANK-RANKL-OPG-Systems

Das System besteht aus den Faktoren RANKL (Lacey et al., 1998; Yasuda et al., 1998a; Wong et al., 1997b; Anderson et al., 1997), dem dazugehörigen zellulären Rezeptor RANK (Anderson et al., 1997) und einem löslichen *decoy-receptor* für RANKL, das OPG (Simonet et al., 1997; Yasuda et al., 1998b; Kwon et al., 1998; Tan et al., 1997). RANKL, das größtenteils membrangebunden auf den Osteoblasten exprimiert wird, greift über seinen osteoklastären Rezeptor RANK auf den Osteoklastenvorläuferzellen an. Der durch diese Bindung ausgelöste Signalweg soll an dieser Stelle stark vereinfacht beschrieben werden. Die Interaktion von RANK und RANKL hat die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionsmechanismen zur Folge: Zunächst fungiert ein Adapterprotein namens TRAF 6 (TNF receptor associated factor 6) als Second messenger und aktiviert diverse Proteinkinase-abhängige Signalwege und Transkriptionsfaktoren wie das NF- κ B (nuclear factor- κ B). In den Nucleus des Osteoklasten transloziert, regelt das soeben aktivierte NF- κ B die Expression von c-fos herauf. Durch die Interaktion von c-fos mit dem nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT-c1) wird die Transkription von osteoklastären Genen induziert (Kearns et al., 2008). Es gibt außerdem Anhalt für einen weiteren interzellulären Signalweg des Osteoblasten, den wnt/ β -catenin-Signalweg. Die Ergebnisse einiger Studien lassen vermuten, dass die Osteoblasten mit seiner Hilfe möglicherweise über die Koordination der Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten in die Knochenmasseregulation eingreifen. Hierbei bedienen sie sich zur Kontrolle der Osteoklastenaktivität des RANK-RANKL-OPG-Systems (Glass et al., 2006; Holmen et al., 2005). Auch M-CSF, der *Macrophage-colony-stimulating factor*, der sich frei oder ebenfalls membrangebunden auf Osteoblasten befindet, spielt eine Rolle bei der Osteoklastendifferenzierung. Er bindet an den C-Fms-Rezeptor auf den Osteoklastenvorläuferzellen (Arai et al., 1999) und stimuliert zusammen mit RANKL die Entwicklung der Vorläuferzellen zu reifen Osteoklasten. So greift RANKL in die Osteoklastenfunktion ein, indem es die Anzahl und Aktivität der Osteoklasten steigert, sodass es zu einer Förderung der Knochenresorption kommt (Li et al. 2000).

Indem der lösliche Scheinrezeptor OPG, der ebenfalls von Osteoblasten sezerniert wird, RANKL bindet, wirkt er als Antagonist und beugt so übermäßigem Knochenmasseverlust vor. Die Abb. 3 verdeutlicht den physiologischen Regelkreis des RANK-RANKL-OPG-Systems. Mit zunehmender Differenzierung der Osteoblasten reduziert sich durch Steigerung der OPG- und Senkung der RANKL-Produktion deren Fähigkeit, die Osteoklastogenese zu initiieren und zu unterstützen. (Gori et al., 2000) Dieser Verlust hat einen praktischen Grund und steht

im Zusammenhang mit der Veränderung der Funktion der Osteoblasten während ihrer Differenzierung. Frühen Osteoblasten fällt die Aufgabe zu, im Knochenmark die Osteoklastendifferenzierung und die Knochenresorption zu koordinieren, wohingegen reife Osteoblasten dem Osteoid anlagern und es somit kontraproduktiv wäre, dort die Knochenresorption zu begünstigen (Khosla, 2001).

Auf diese Weise bilden RANK, RANKL und OPG ein essentielles System zur Regulierung des Knochenstoffwechsels, welches in der Lage ist, in Differenzierung, Aktivierung, Fusion und Apoptose der Osteoklasten einzutreten (Suda et al., 1999; Hofbauer et al., 2000; Wong et al., 1999b; Nakamichi et al., 2007; Gardner et al., 2007).

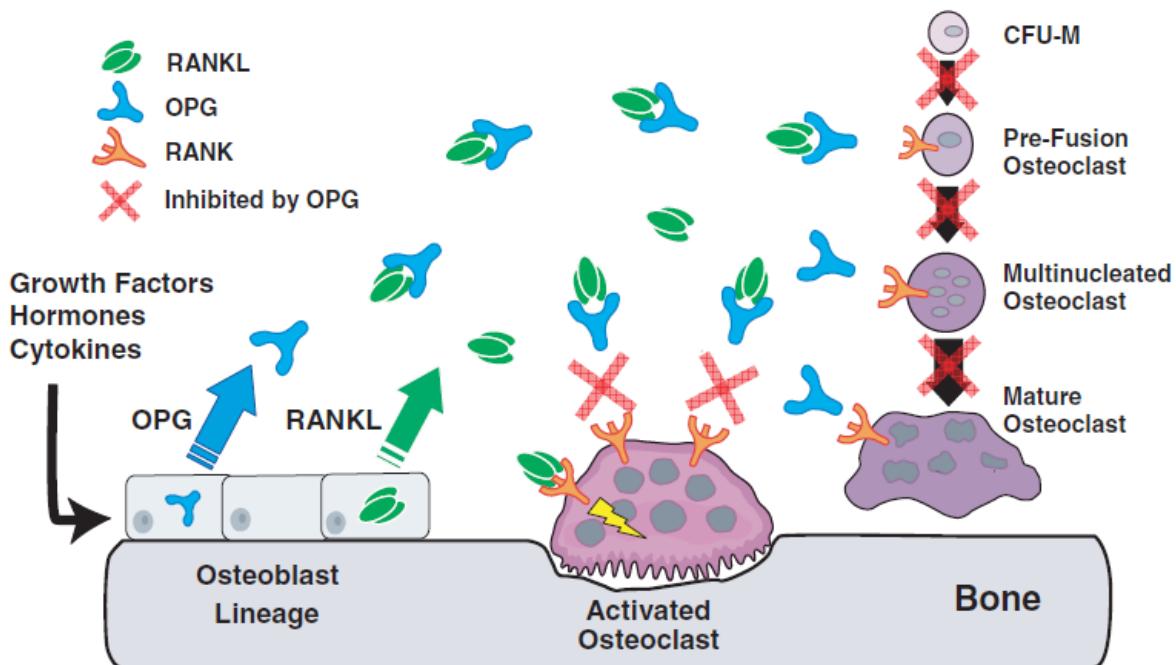


Abb. 3: Regulatorische Mechanismen des RANK-RANKL-OPG-Systems im Bone-Remodeling (aus Kearns et al., 2008) Sowohl OPG als auch RANKL werden von Zellen der Osteoblastenzelllinie exprimiert. OPG ist als löslicher Scheinrezeptor in der Lage, RANKL zu binden und so dessen Effekte am Osteoklasten zu unterbinden. In der Abwesenheit von OPG wird ein Rezeptor namens RANK, welcher sich auf Osteoklasten und deren Vorläuferzellen befindet, aktiviert. RANK vermittelt die Wirkung von RANKL, wie die Rekrutierung von Osteoklastenvorläuferzellen und Förderung ihrer Fusion zu reifen Osteoklasten, Osteoklastenaktivierung und Hemmung ihrer Apoptose.

2.4.2 Regulation des RANK-RANKL-OPG-Systems durch Mediatoren

Da das RANK-RANKL-OPG-System der grundlegende Mechanismus zur Regulation der Osteoklastentätigkeit und zum Erhalt der Skelettintegrität ist, wirken viele Zytokine, Hormone und Wachstumshormone über dieses System auf den Knochenstoffwechsel ein. Eine Zusammenfassung der regulatorischen Einflüsse, denen das RANK-RANKL-OPG-

System unterworfen wird, ist in Tabelle 1 zusammengefasst. Angriffspunkte dieser Regulationsmechanismen sind zumeist RANKL und OPG, wobei die RANK-Expression nur minimal involviert ist, da über die Kontrolle der RANKL- und OPG- Expression ein ausreichend effektives Mittel zur Stoffwechselregulation geschaffen ist (Kearns et al., 2008). Ziel dieser Mechanismen ist stets eine Herauf- beziehungsweise Herunterregulierung der Expression von RANKL oder OPG. Hierbei ist die reziproke Regulation dieser beiden Knochenmarker im Sinne der Heraufregulierung von RANKL und der Verminderung der Expression von OPG ein vielfach beobachtetes Prinzip, welches den Zweck einer Verstärkung von proresorptiven Signalen haben könnte (Nagai & Sato, 1999; Nakagawa et al., 1999). Die Ergebnisse zahlreicher Studien weisen darauf hin, dass vor allem das Verhältnis zwischen OPG und RANKL (RANKL-OPG-Ratio) eine wichtige Komponente in der Regulation der Knochenresorption darstellt (Lee & Lorenzo, 1999; Fazzalari et al., 2001; Ma et al., 2001; Grimaud et al., 2003). Indem die Relation von RANKL und OPG zueinander verändert wird, wird auch die Osteoklastendifferenzierung und -aktivität modifiziert. Verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten des RANKLs durch Steigerung der RANKL- oder Senkung der OPG-Expression, wird die Knochenresorption gefördert. Umgekehrt kann die Knochenresorption inhibiert und die Knochenformation gefördert werden, indem die RANKL-Produktion gehemmt und die OPG-Produktion gesteigert wird. Mediatoren, die eine Förderung der Osteoklastogenese bewirken, steigern also über verschiedene Signalkaskaden die RANKL-Expression auf Osteoblasten und inhibieren außerdem oft auch deren OPG-Produktion.

Ein Beispiel für die reziproke Regulation findet sich im PTH (Parathormon) und im PTHrP (Parathyroid hormone-related protein). Sie greifen über den Parathormonrezeptor 1 an der cAMP/PKA-Kaskade und am Phospholipase C-Signalweg an und fördern so die RANKL-Produktion und inhibieren simultan die OPG-Produktion (Lee et al., 1999). Die cAMP/PKA-Kaskade wird auch von Prostaglandin E2 (PGE 2) über Prostaglandin E-Rezeptor 2 und 4 (EP 2 und EP 4) zur Stimulation der Knochenresorption genutzt (Suzawa et al., 2000; Brändström et al., 1998). Inflammatorische Zytokine besitzen ebenfalls positiven Einfluss auf die Osteoklastogenese. Interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-11, IL-17 und TNF- α wirken in Gegenwart von 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ und PGE-2 ebenfalls über eine Erhöhung der RANKL-Produktion und einer Senkung der OPG-Bildung, was durch Nakashima et al. (2000) gezeigt wurde. Weiterhin existiert der gp130/STAT-Signalweg (Glycoprotein 130/ *Signal transducer and activator of transcription*-Signalweg).

Über ihn werden die Wirkungen von Oncostatin, IL-6, IL-11 und Oncostatin M übermittelt (O'Brien et al., 1999; Palmqvist et al., 2002). Überdies wird die Osteoklastogenese von M-CSF gefördert, der die RANK-Expression der Osteoklasten und Osteoklastenvorläuferzellen steigert (Arai et al., 1999). Zu weiteren osteoklastogenesefördernden Substanzen gehören Glukokortikoide (Hofbauer et al., 1999a) und Immunsuppressiva (Hofbauer et al., 2001), indem diese die RANKL-Sekretion fördern und die OPG-Ausschüttung inhibieren. Dieser Umstand könnte auch eine Erklärung für deren osteoporotische Wirkung bei Langzeiteinnahme bieten. Über die Bindung von Calcitriol ($1\alpha,25\text{-}(\text{OH})_2\text{D}_3$) an den Vitamin-D-Rezeptor (VDR) kann die RANKL- und ebenfalls die OPG-Bildung angehoben werden (Tsukii et al., 1998; Hofbauer et al., 1998; Kitazawa et al., 1999). Zusätzlich führen erhöhte extrazelluläre Kalzium-Konzentrationen zu einer Induktion der RANKL- und auch der OPG-Expression (Takami et al., 2000).

Weiterhin existieren auch Substanzen, die die Osteoklastogenese inhibieren. Zu ihnen gehören beispielsweise Lipopolysaccharid (LPS) (Nagasaki et al., 2002) und Thrombopoietin (Chagraoui et al., 2003), welche durch Erhöhung der OPG-Produktion die Osteoklastendifferenzierung hemmen. Weiterhin stimuliert Estrogen die osteoblastäre OPG-Ausschüttung und wirkt so osteoprotektiv (Hofbauer et al., 1999b; Saika et al., 2001). Weitere Effekte von Estrogen sind die Initiierung der Apoptose von Osteoklasten (Hughes et al., 1996) und über die Beeinträchtigung der RANK-Signalkette eine Inhibierung der Osteoklastendifferenzierung (Shevede et al., 2000; Srivastava et al., 2001). Auch Calcitonin wirkt osteoprotektiv durch die Reduktion der RANKL-vermittelten Effekte auf die Osteoklastogenese durch direktes Angreifen am Osteoklasten (Nicholson et al., 1986; Gardner et al., 2007). Vasoaktives intestinales Peptid (VIP) inhibiert die Expression von RANKL und RANK und bewirkt zusätzlich eine Erhöhung der OPG-Expression (Mukohiyama et al., 2000). Nakashima et al. (2002) zeigten in ihren Versuchen, dass im Beisein von $1\alpha,25\text{-Dihydroxyvitamin D}_3$ und PGE-2 die Zytokine Interferon (IFN)- γ und IL-13 in der Lage waren, die Expression von RANKL zu inhibieren. Weiterhin stellten sie heraus, dass über den *tumor growth factor* (TGF)- β 1 die zuvor durch $1\alpha,25\text{-Dihydroxyvitamin D}_3$ und PGE-2 inhibierte Produktion von OPG wieder gesteigert werden konnte. Außerdem ist TGF- β 1 in der Lage, die RANK-Expression auf Osteoklastenvorläuferzellen zu steigern, also die Rezeptorendichte für RANKL zu erhöhen, und so die Empfindlichkeit der Osteoklasten für RANKL heraufzusetzen (Yan et al., 2001).

	OPG	RANKL	RANK
1,25-dihydroxyvitamin D Hormones	↑ ↓	↑	↑
Estrogen	↑	↓ /—	
Testosterone	↑ ↓	—	
Glucocorticoid	↓	↑	
PTH	↓	↑	
PTHRP	↓	↑	
Cytokines			
IL-1	↑ ↓	↑	↑
IL-4			↓ /—
IL-7		↑	
IL-13	↑ ↓	↓	—
IL-17	↓	↑	—
TNF α		↑	—
Interferon γ	↑	↑	↑
Prostaglandin E2	↓	↑	
Growth factors			
TGF β	↑	↑ ↓	—
Bone morphogenetic protein 2	↑		—

Tab. 1: Regulatoren der Expression von RANK, RANKL und OPG

(modifiziert nach einer Tabelle aus Kearns et al., 2008)

2.5 Parathormon (PTH)

2.5.1 Biosynthese und Metabolismus

Das Parathormon (PTH) stellt einen Hauptfaktor zur Regulation des Knochenstoffwechsels dar. Es ist ein Produkt der Nebenschilddrüsen, der so genannten Epithelkörperchen. Im Zusammenspiel mit Calcitonin und aktiviertem Vitamin D3 ist es für die Kalzium- und Phosphathomöostase zuständig. PTH ist ein Einzelstrang-Polypeptid, bestehend aus 84 Aminosäuren. Seine Synthese durchläuft mehrere Schritte. Zunächst entsteht am rauen endoplasmatischen Retikulum der Hauptzellen der Nebenschilddrüse das primäre Transskriptionsprodukt, das Prä-Pro-PTH, welches aus 115 Aminosäuren besteht (Habener et al., 1978; Vasicek et al., 1983). Innerhalb von Sekunden wird diese Vorstufe zu Pro-PTH (90 Aminosäuren) konvertiert. Schlussendlich muss im Golgi-Apparat durch proteolytische Enzyme ein N-terminales Hexapeptid abgespalten werden, um reifes PTH mit einer Sequenz von 84 Aminosäuren (PTH (1-84)) zu bilden. Dieser Vorgang ist in Abb. 4 dargestellt. Der

Haupttrigger zur Exozytose von PTH ist das Absinken der extrazellulären Kalziumkonzentration. Da eine Speicherung in den Epithelkörperchen nur in begrenztem Ausmaß stattfindet, muss demnach eine kontinuierliche Synthese erfolgen (Löffler, Petrides, 2007).

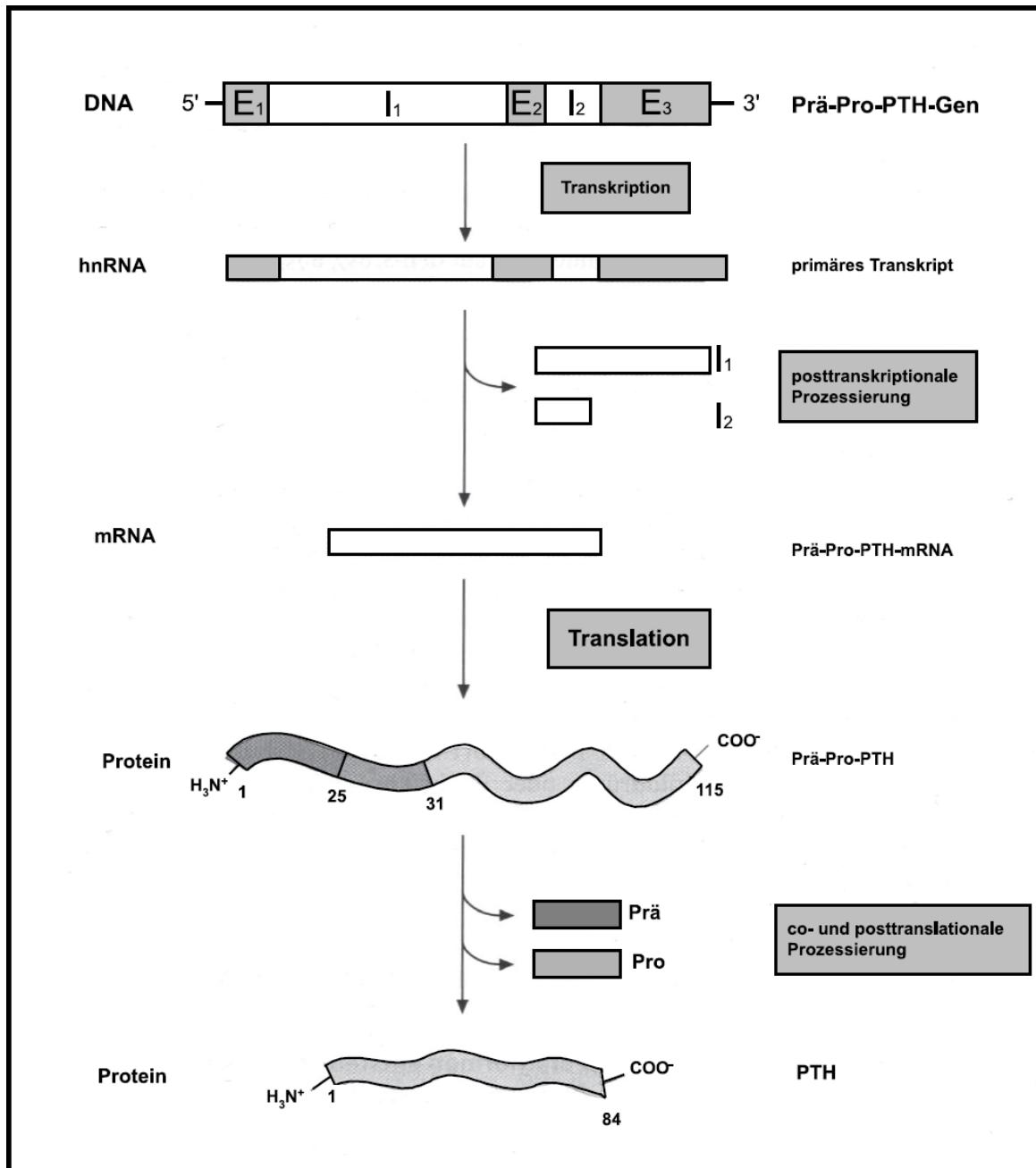


Abb. 4: Das Prä-Pro-PTH-Gen und die Prozessierung seines Transkriptions- und Translationsproduktes (aus: Löffler, Petrides, 2007, S. 935)

Im Blutkreislauf weist PTH lediglich eine Halbwertszeit von wenigen Minuten auf (Bringhurst et al., 1988), bis es in der Nebenschilddrüse selbst, aber vor allem in der Leber und zu geringen Teilen in der Niere abgebaut wird. Die kalziumsensitive Elimination schon in der Nebenschilddrüse ist sinnvoll, da so eine optimale Anpassung an die extrazellulären Verhältnisse erfolgt (Habener et al., 1975). Wie schon erwähnt, findet die Hauptverstoffwechselung in der Leber, genauer den kupfferschen Sternzellen, statt (Serge et al., 1981). Bei einer ersten proteolytischen Spaltung zwischen den Aminosäuren 33 bis 43 entstehen ein C-terminales und ein N-terminales PTH-Fragment mit einer Länge von 34 - 43 Aminosäuren (MacGregor et al., 1986). Hierbei ist zu bemerken, dass für eine Stimulation der verschiedenen PTH-Rezeptoren ein rekombinantes N-terminales PTH-Fragment mit der Länge von 34 Aminosäuren (rhPTH (1-34)) genügt (Mannstadt et al., 1999). Überdies zeigte Stanislaus (2000), dass *in vivo* sowohl auf molekularer Ebene, als auch im Bezug auf den Knochenstoffwechsel keine Wirkunterschiede zwischen intaktem PTH (1-84) und dem PTH-Bruchstück (1-34) aufzuweisen waren. Die inaktiven C-terminalen und die noch voll biologisch aktiven N-terminalen PTH-Bruchstücke rezirkulieren gleichermaßen, bevor sie in der Niere eliminiert werden. Letztere und auch intaktes PTH lassen sich, anders als das C-terminale Fragment, welches durch eine längere Halbwertszeit über Stunden im Serum messbar ist, nur in geringem Ausmaß detektieren (Habener et al., 1984). Die Aminosäuresequenz des PTH scheint hoch konserviert zu sein und weist unter verschiedenen Spezies eine hohe Homologie auf. Nur wenige Aminosäuren bilden den Unterschied, wobei auffällt, dass vor allem in der N-terminalen Region (AS 1-38) ein besonders großer Homologiegrad von ca. 95 % vorliegt, was auf die Bedeutung dieses Abschnittes für die biologische Aktivität hinweist (Potts et al., 1982).

2.5.2 Physiologische Wirkungen

Die Hauptaufgabe des PTH besteht in der Sicherstellung der Kalzium- und Phosphathomöostase. In den Kalzium-Phosphat-Haushalt greift es ein, indem es extrazellulär den Kalziumspiegel erhöht und den Phosphatspiegel senkt. Eine enge Regulation des physiologischen Kalzium-Plasmaspiegels, der im Zusammenwirken von PTH, Calcitonin und 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ konstant zwischen 2,1–2,6 mmol/l gehalten wird, ist notwendig, da Kalzium im lebenden Organismus eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von Prozessen spielt.

Zu ihnen gehören die Blutgerinnung, die neurale Erregung, die muskuläre Kontraktion, der Glykogenstoffwechsel oder als „second-messenger“. PTH vermittelt seine Wirkung über den PTH-Rezeptor, von dem drei verschiedene (PTH1R, PTH2R, PTH3R) in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen werden konnten (Murray et al., 2005). Die Tabelle 2 zeigt die Verteilung der PTH-Rezeptoren in verschiedenen Geweben. Bei den Bedeutendsten von ihnen, dem PTH1- und PTH2-Rezeptor, handelt es sich um klassische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Der PTH1-Rezeptor aktiviert intrazellulär sowohl den Signalweg der Adenylatcyclase, als auch den Phospholipase C-Signalweg. Im Gegensatz dazu ist der PTH2-Rezeptor lediglich in der Lage, den Adenylatcyclase-Signalweg zu initiieren (Schluter, 1999). Der PTH1-Rezeptor findet sich vor allem an Zielzellen der Niere und des Knochens, wo er die PTH-abhängigen Regulationsmechanismen zur Sicherstellung der Kalzium- und Phosphathomöostase vermittelt (Mannstadt et al., 1999).

Gewebe	Menge
Knochen	++
Nieren	++++
Leber	++
Lunge	++
Testes	++
Brustdrüse	+
Ileum	+
Haut	+
Uterus	+
Skelettmuskel	+
Myokard	+
Ovar	+
Schilddrüse	-
Hypophyse	-
Prostata	-

Tab. 2: Vorkommen von Rezeptoren für PTH (aus: Löffler, Petrides, 1998, S. 862)

Im Falle einer Hypokalzämie wird innerhalb von Sekunden PTH sezerniert (Habener et al., 1977). Die PTH-Sekretion wird durch einen negativen „Feedback-Mechanismus“ gesteuert. Wie bereits erwähnt, besteht der Haupttrigger für die PTH-Sekretion in einem Absinken des extrazellulären Kalziumspiegels, welcher über einen Calcium-Sensing-Rezeptor registriert wird (Brown et al., 1993). Die PTH-Sekretion unterliegt einer reziproken Regulation in Abhängigkeit von der Serumkalziumkonzentration (Brent et al., 1988). Das bedeutet, dass nicht nur bei einem niedrigen extrazellulären Kalziumspiegel PTH ausgeschüttet wird, sondern auch eine Hemmung der PTH-Sekretion stattfindet, sobald eine erhöhte Kalziumkonzentration auftritt (negative Rückkopplung). Durch einen verminderten Kalzium-Plasmaspiegel kommt es über eine vermehrte Transkription außerdem zu einer erhöhten PTH-Syntheserate, um die langfristige Kalziumhomöostase zu sichern (Naveh-Many et al., 1989). Umgekehrt wird sowohl die PTH-Sekretion als auch die PTH-Synthese durch einen erhöhten Kalziumspiegel gehemmt (Habener et al., 1984).

Zur schnellen Bereitstellung von Kalzium hat der Körper verschiedene Mechanismen entwickelt: Zum einen wird durch Stimulation von Osteoklasten und dem daraus folgenden Knochenabbau Kalzium aus dem Knochen, dem größten Speicher für mobilisierbares Kalzium, freigesetzt. Unter physiologischen Bedingungen entsteht hierbei keine negative Knochenbilanz. Interessanterweise ist bei intermittierender Gabe von PTH sogar eine anabole Wirkung zu beobachten (Andresen et al., 2008). Weiterhin kann in den distalen Tubuli der Niere die Rückresorption von Kalzium und die aktive Sekretion von Phosphat erhöht werden. In den proximalen Nierentubuli wird zudem die Phosphat-Rückresorption inhibiert, sodass es zu einer Phosphaturie kommt. Eine zusätzliche Wirkung des PTH besteht in der Stimulation der 1α -Hydroxylase der Niere, was zu einer gesteigerten 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Synthese führt. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ wiederum vermittelt an der Dünndarmmukosa eine Steigerung der intestinalen Kalzium-Absorption. Weiterhin vermindert PTH die Aktivität der 24-Hydroxylase, welche an der Inaktivierung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ beteiligt ist. Die PTH-Effekte an Knochen und Niere werden direkt über das Angreifen des PTH an den rezeptortragenden Zielzellen und an der Niere zusätzlich über die Wirkung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf den Kalzium- und Phosphattransport vermittelt.

Neben den schon genannten Funktionen ist PTH einer der wichtigsten Regulatoren des Knochenmetabolismus, indem es direkt auf das RANK-RANKL-OPG-System Einfluss nimmt (Yasuda et al., 1998).

2.5.3 Wirkung des Parathormon auf den Knochenmetabolismus

PTH wirkt in Abhängigkeit von Dosis und Dosisintervall entweder katabol oder auch anabol. Hierbei ergeben sich Effekte an allen Knochen des Organismus, wobei in Studien Ergebnisse gefunden wurden, die eine verstärkte Wirkung an regenerierendem Knochen, zum Beispiel nach Frakturheilung, vermuten lassen (Skripitz et al., 2000). Je nach Applikationsmodus resultieren über die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden unterschiedliche Gen-Expressions-Ergebnisse. Bei jeder Administration kommt es zur Exprimierung von 22 Genen. Im Gegensatz dazu werden bei intermittierender Applikation 19 weitere Gene und bei kontinuierlicher Gabe sogar 173 weitere Gene reguliert (Onyia et al., 2005).

Bei kontinuierlicher Gabe wirkt PTH katabol im Sinne einer Verminderung der Knochendichte und -masse (Ishizuya et al., 1997): Es aktiviert die Osteoblasten, fördert deren Differenzierung, vermindert ihre OPG- und erhöht deren RANKL-Produktion. RANKL wiederum stimuliert die Osteoklasten zur Knochenresorption, welche selbst keine PTH-Rezeptoren besitzen (Lee and Lorenzo, 1999; Teitelbaum, 2000; Fu et al., 2002). Auf diese Weise sorgt PTH dafür, dass im Knochen gebundenes Kalzium bereitgestellt wird. Das PTH stimuliert außerdem die osteoblastäre Expression von Kollagenase 3, einem Enzym, welches am Abbau von extrazellulärer Matrix beteiligt ist (Patridge et al., 1996). Diese katabolen PTH-Effekte wurden bereits bei Tiermodellen mit Ratten und Mäusen, aber auch bei Osteoporosepatienten beschrieben (Rosen and Bilezikian, 2001).

Intermittierende PTH-Applikation dagegen bewirkt einen anabolen Effekt, der sich durch eine Erhöhung der Knochenmasse und -dichte vor allem in der Spongiosa bemerkbar macht (Ejersted et al., 1993; Schiller et al., 1999; Andreassen et al., 1999; Iida-Klein et al., 2002). Im Tiermodell an Ratten konnte weiterhin festgestellt werden, dass intermittierende PTH-Gabe die Frakturheilung sowie Kallusbildung und Festigkeit sowohl bei gesunden, als auch bei osteoporotischen Ratten verbessert (Andreassen et al., 1999; Kim et al., 1999). Zugrunde liegen Veränderungen im Knochenmetabolismus, von denen noch nicht alle im Detail bekannt sind. Auf die Effekte, von denen man annimmt, dass sie für die anabole Wirkung von PTH auf den Knochen verantwortlich sind, wird im Folgenden eingegangen: Im Gegensatz zu einer kontinuierlichen PTH-Gabe, bei der RANKL hoch- und OPG herunterreguliert wird (Ma et al., 2001), bewirkte eine intermittierende PTH-Gabe lediglich eine schnelle, aber vorübergehende Veränderung der OPG-RANKL-Verhältnisse. Es konnte bereits nach einer Stunde ein Absinken der OPG- und ein Anstieg der RANKL-Expression registriert werden, welche allerdings lediglich drei Stunden anhielt. Möglicherweise werden hierdurch

Mechanismen induziert, welche die Differenzierung von Osteoprogenitorzellen triggern und so zum Knochenremodeling beitragen (Onyia et al., 2000). Zudem ist intermittierend gegebenes PTH in der Lage, die Anzahl und Aktivität von Osteoblasten zu steigern (Dobnig et al., 1995) und stimuliert gleichzeitig Osteoprogenitorzellen zur Proliferation und Differenzierung zu Osteoblasten (Nakajima et al., 2002). Weiterhin wird unter intermittierender PTH-Administration die Apoptose von reifen Osteoblasten verzögert (Jilka et al., 1999) und es kommt zu Reaktivierung bereits ruhender Bone Linig Cells (Dobnig et al., 1995). Eine weitere Versuchsgruppe konnte zeigen, dass der osteoanabole PTH-Effekt außerdem von der Anzahl der vorbestehenden Bone Lining Cells abhängt, da auch deren Aktivierung die Osteoblastenpopulation erhöht und somit zu einer positiven Knochenbilanz beiträgt (Qi et al., 1994). Zudem beobachteten Canalis et al. bereits 1989, dass unter intermittierendem PTH-Einfluss die Konzentration des *Insulin like Growth Factor-1* (IGF-1) angehoben wird. Die Anwesenheit von IGF-1 stellt einen für Osteoblasten förderlichen Faktor für Differenzierung und Überleben dar. Sein Inhibitor, das *Insulin like Growth Factor*-bindende Protein 4 (IGF-BP 4) dagegen wird bei kontinuierlicher Gabe vermehrt synthetisiert, während gleichzeitig die Expression von IGF-1 sinkt (Watson et al., 1999). Dieser Sachverhalt könnte eine Erklärung für die Abwesenheit einer anabolen Wirkung unter kontinuierlichem PTH-Einfluss bieten. Eine weitere Möglichkeit der Vermittlung der anabolen PTH-Wirkung könnte außerdem die erhöhte Expression des *fibroblast growth factor-2* (FGF-2) unter PTH-Einfluss sein. Dieser Wachstumsfaktor hat sowohl eine proliferative als auch eine anti-apoptotische Wirkung auf die Osteoblastenvorläuferzellen (Jilka, 2007). Belegt wird dieser Umstand durch die fehlende Steigerung des Spongiosavolumens unter PTH-Applikation bei FGF-2-null-Mäusen (Hurley et al., 2006). Des Weiteren hat auch FGF-2 allein den Effekt einer Steigerung der Spongiosatrabekelanzahl und deren dichterer Vernetzung, ganz im Gegensatz zu PTH, welches eine Verdickung der einzelnen Trabekel bewirkt (Lane et al., 2003). Onyia et al. (1995) stellten heraus, dass PTH, intermittierend verabreicht, außerdem die Expression von so genannten *Immediate Early Response Genes* heraufreguliert. Zu ihnen zählen Zytokine wie IL-6 und die Transkriptionsfaktoren *c-fos*, *c-jun*, and *c-myc*. Sie nehmen wichtige Funktionen bei Wachstum und Differenzierung verschiedener Zelltypen ein, zu denen auch Osteoblasten gehören. Der Effekt der Transkriptionssteigerung dieser *Immediate Early Response Genes* äußert sich in einer Heraufregulierung der Zelldifferenzierung und gleichzeitigem Herabsetzen der Zellproliferation des Knochens (Onyia et al., 1995).

2.5.4 Klinischer Einsatz der osteoanabolen Eigenschaften des PTH- Fragments (1-34)

Die bereits beschriebenen osteoanabolen Effekte machten PTH für die Behandlung von Osteoporose interessant. Im Jahr 2003 erfolgte in Deutschland die Zulassung von Teriparatid (humanes PTH-Fragment (1-34)) zur Therapie schwerer Osteoporose. Die Voraussetzung hierfür erbrachte eine klinische Studie von Neer et al. (2001) an Frauen mit postmenopausaler Osteoporose. In dieser wurde herausgestellt, dass Teriparatid in täglichen Dosen von 20 µg bzw. 40 µg PTH (1-34) über 21 Monate unter geringen Nebenwirkungen das Risiko vertebraler und nonvertebraler Frakturen senkt und gleichzeitig die vertebrale, femorale und Gesamtkörperknochendichte steigert (Neer et al., 2001). Die Ergebnisse waren in nachfolgenden Studien reproduzierbar und auch an männlichen Osteoporosepatienten konnten vergleichbare Resultate nachgewiesen werden (Cosman et al., 2001; Black et al., 2003; Hodsman et al., 2005; Finkelstein et al., 2006). Zudem zeigt Parathormons die Eigenschaft, den Knochenaufbau auch an bereits von Osteopenie gekennzeichneten Knochen zu stimulieren (Miyakoshi, 2004) und lässt es somit als besonders geeignet erscheinen. Aus der Hemmung der osteoklastären Knochenresorption, Erhöhung der Osteoblastenzahl und Verhinderung deren Apoptose (Jilka, 2007) resultiert eine positive Knochenbilanz und eine Steigerung des Knochenaufbaus, sowie ein belastbareres und stärker vernetztes Trabekelsystem (Bartl, 2008). Eine Senkung sowohl des vertebralen, als auch des non-vertebralen Frakturrisikos ist die Folge. Ebenso ist ein Knochendichtezuwachs des Gesamtskeletts zu verzeichnen. Besonders ausgeprägt findet er sich an Wirbelsäule und Femur (Neer et al., 2001). Parathormon wird häufig in Form einer subkutanen Injektion als Teriparatid verabreicht. Es handelt sich hierbei um ein rekombinantes humanes N-terminales PTH-Fragment mit der Länge von 34 Aminosäuren (rhPTH (1-34)), welches die gleichen Wirkungen hervorruft wie intaktes PTH. Besonders wichtig für den anabolen Effekt ist die intermittierende PTH-Applikation in niedriger Dosis, denn bei kontinuierlicher Gabe und hoher Dosierung überwiegen katabole Wirkungen. Zugelassen ist Teriparatid derzeit zur Behandlung der Osteoporose des Mannes mit hohem Frakturrisiko, der postmenopausalen sowie der Glucocorticoid-induzierten Osteoporose und bei Patienten bei denen andere Präparate wie Bisphosphonate nicht den gewünschten Therapieerfolg zeigen (Bartl, 2008; Dachverband Osteologie e.V, 2009).

Eine weitere Möglichkeit zur klinischen Anwendung von PTH befindet sich in der Erforschung. Histomorphometrische und mechanische Untersuchungen zur Knochenregeneration und künstlichen Gelenkimplantaten lassen vermuten, dass durch eine osteoanabole Behandlung mit PTH eine deutliche Verbesserung der Knochenregeneration und der damit verbundenen Primärstabilität von Implantaten in normalen und osteoporotischen Knochen zu erreichen ist (Seebach et al., 2004; Skripitz et al., 2005). Dies ist insofern relevant, als die aseptische Prothesenlockerung heute mit 50 % aller Knie- und 2/3 aller Hüft-Revisions-Operationen die häufigste Ursache von Revisionsoperationen darstellt (Sundfeldt et al., 2006). Man vermutet eine multifaktorielle Genese. Allerdings wird eine Verminderung des Implantat-Knochen-Kontaktes durch eine vermehrte Aktivierung von Osteoklasten als ursächlich angesehen, wobei der abgebaute Knochen durch Bindegewebe ersetzt wird. Durch Beeinflussung der Osteoklastenaktivität über PTH lässt sich eine bessere Primärstabilität erreichen, welche von entscheidender Bedeutung für das Erreichen der Sekundärstabilität beziehungsweise für das Eintreten einer späteren Prothesenlockerung ist (Ryd et al., 1995; Kärrholm et al., 1994; Aspenberg et al., 1998).

3. Material und Methoden

3.1 Tiere, Rasse, Alter und Geschlecht

Als Versuchstiere wurden 52 weibliche, nicht-ovarektomierte Ratten der Rasse Sprague Dawley gewählt. Diese wurden randomisiert in zwei Versuchsgruppen nach Applikationsform aufgeteilt. Pro Zeitpunkt wurden je 2 Ratten als unbehandelte Kontrolle gewählt. Die Ratten wurden von Charles River Laboratoires Deutschland, Sulfeld bezogen und waren zu Versuchsbeginn bereits ausgewachsen und erreichten ein mittleres Körpergewicht von 314 g \pm 13 g.

3.2 Tierversuchsgenehmigung

Der Tierversuch wurde vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg Vorpommern - Abteilung Veterinärdienste, Ernährungswissenschaft und Tierzucht - mit Schreiben vom 04.01.2010 unter dem Aktenzeichen 034/09 und in dem Schreiben vom 05.09.2011 unter dem Aktenkennzeichen 061/11 durch Dr.M. Krey genehmigt.

3.3 Tierhaltung und Ernährung

Während des Versuches lebten die Tiere in Zweierhaltung in einem Makrolonkäfig Typ III (Bodenfläche 825 cm²) und hatten freien Zugang zu Wasser und einem Standardrattenfutter mit einem Kalziumgehalt von 1,0 %. Sie wurden bei einer Temperatur von ca. 22 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 60 % mit einem Tag-/Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gehalten. Die postoperative Schmerzbehandlung erfolgte unmittelbar nach der Operation mit 0,05 ml Metamizol i.m. und über die folgenden vier Tage durch die Gabe von 3 mg Metamizol pro Tag ins Trinkwasser.

3.4 Versuchsaufbau

Bei dem durchgeführten Versuch wurde das bereits 1996 von Aspenberg et al. beschriebene Modell zur Überprüfung von Knochenregeneration durch ein Kammerexperiment (Aspenberg et al., 1996) verwendet. Für die Überprüfung von Knochenregeneration und die anschließende Bestimmung der Knochendichte hat sich dieses Tiermodell bereits bewährt und wurde deshalb für den vorliegenden Versuch übernommen.

Unter Narkose wurden 48 Tieren Titanschrauben mit zylindrischem Innenraum in beide proximale Tibiametaphysen implantiert. Die Titanschraube besitzt Löcher, durch die das Einwachsen von Knochen ermöglicht wird, hierbei findet die Zellmigration durch die einseitige Lage dieser Löcher nur von der Knochenseite her statt.

Im Anschluss wurden die Ratten randomisiert in zwei Versuchsgruppen nach Applikationsform aufgeteilt. Die Versuchsgruppe erhielt postoperativ 60 µg/kg KG gewichtsadaptiert Parathormon s.c. pro Tag für drei oder sechs Wochen. Die Kontrollgruppe erhielt stattdessen das gleiche Volumen an 0,9 % NaCl-Injektionen von s.c. pro Tag. Das Gewicht der Tiere wurde jeweils einmal wöchentlich vor dem Spritzen ermittelt. Die Injektion erfolgte bei allen Tieren subkutan in die Nackenfalte alle 24 ± 2 Stunden.

3.5 Geräte und Chemikalien Implantation

Geräte

- Schermaschine
- Ohrlocher
- Handbohrer (2,00 mm)
- GFL Wasserbad Typ 1002
- Makrolonkäfig Typ III mit Edelstahldeckel erhöhte Ausführung, Bodenfläche 825 cm^2 , Ehret Labor- und Pharmatechnik
- Zentrifuge, Hettich Universal, Tuttlingen
- Pinzette, Nadelhalter; Braun Melsungen AG

Chemikalien und Verbrauchsmittel Implantation

- Biohit: Eppendorf-Gefäße
Proline Pipetten (50-200 µl/ 0,5-10 µl)
 - Braun Melsungen AG: NaCl, 0,9%
Skalpell, Kanülen, Spritzen
 - Ethicon: Nahtmaterial (Vicryl® 4-0)
 - Falcon: Biopsie-Behälter (25 ml, steril)
Pipetten (25 ml, steril)
 - Pfizer GmbH, Karlsruhe: Medetomidinhydrochlorid (150µg/kg KG) (Domitor ®)
 - Ratiopharm GmbH, Ulm: Novalmin-Sulfon
 - Eigene Herstellung: Rattenserum (inaktiviert)
 - Roche Consumer Health: Augensalbe (Bepanthen®)
 - Technische Abteilung
 - Universitätsklinik Lund,
 - Schweden: Knochenkammerschrauben, Titan
 - Durchmesser 3 mm, Länge 13 mm)
 -
 - PTH (1-34) human (Forsteo ®)
 - Streptomycin (12,5 mg/Tier)
 - Midazolam (200µg/kg KG)
 - Fentanyl (5µg/kg KG)
 - Atipamezol (750µg/kg KG)
 - Flumazenil (200µg/kg KG)
 - Naloxon (120µg/kg KG)
 - Phenobarbital-Natrium (80mg/kg KG)

3.6 Geräte und Chemikalien Probenauswertung

Allgemeine Labormaterialien

- Applied Biosystems: 96-Well Base, MicroAmp®
Biohit: Reaktionsgefäß 0,6 ml und 2,0 ml

Eppendorf:	Dual Filter Tips 0,1-1000µl
	Pipettenspitzen 0,1-1000 µl
	Reaktionsgefäße, 1,5 ml, steril
	Low Retention Filter Tips (10 µl, 100 µl)
Greiner:	sterile Pipetten, 5 ml
	Cellstar tubes, 50 ml und 15 ml
	Cryotubes, 2 ml
Invitrogen TM :	Qubit TM assay tubes
Molecular Bio Products:	RNAse AWAY
Sarstedt:	0,2 ml 96-Well Multiply® PCR-Platte & Adhesive Covers
	serologische Pipetten, 10 ml
QIAGEN:	QIAshredder spin column, 2 ml
	RNeasy Min Elute spin column

Geräte

Applied Biosystems:	ABIPrism 7000 Cycler
BINDER:	Brutschrank
Braun Melsungen AG:	Spatel, Pinzette
Carl Roth:	Mörser uns Stößel
Eppendorf:	Centrifuge 54815 D
	Centrifuge mini spin
	Thermomixer Comfort
	Eisblock
	Pipetten (0,5-10 µl; 1-20 µl; 10-200 µl; 200-1000 µl)
Dynatech:	Feinanalysenwaage Chyobalance JL 200
GFL:	Wasserbad
Heidolph REAX 2000:	Vortexer
Invitrogen TM :	Qubit®Fluorometer

Lösungen und Materialien für die PCR-Analyse

Air Liquid:	flüssiger Stickstoff
Applied Biosystems:	TaqMan® Universal PCR Mastermix
	High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (200 reactions)
Invitrogen™:	Quant-iT™ RNA Assay Kit, 5-100 ng
Merck:	β-Mercatoethanol
Sigma-Aldrich:	DEPC-H ₂ O
	Ethanol
QIAGEN:	QIAshredder™ (50) Kit
	RNeasy® Micro Kit (50)

Primer

Pre-Developed Taqman® Assay Reagents von Applied Biosystems:

Bestellnummern:

RANKL (Tnfsf11): Rn00589289_m1

OPG (Tnfrsf1): Rn00563499_m1

GAPDH: Rn99999916_s1

Selbst hergestellt mit dem Primer Design Tool von NCBI:

Sequenz RANK-Primer:

RANK_RN_2_F (Forward): 5'-TGAGCATCTTGGACGGTGGT-3'

RANK_RN_2_R (Reverse): 3'-GGTGGGAGTGCATTAGAAGACA-5'

RANK_RN_2_M: 6FAM-ATGCGAACCAAGGAAAGTA MGBNFQ

Software

Applied Biosystems:	7000 System Sequence Detection Software
Invitrogen™:	RQ Study Amplification
Microsoft:	Excel

3.7 Herstellung der Injektionslösungen

Rattenserum (inaktiviert):

Mit einem Serumröhrchen wurde den Versuchstieren Blut entnommen, zentrifugiert und anschließend eine Stunde bei 56 °C in einem Wasserbad inaktiviert.

Kontrollgruppen-Lösung (2 % Serum):

98,0 ml NaCl 0,9 % + 2,0 ml Rattenserum, inaktiviert

PTH (1-34) human-Lösung:

40,83 ml NaCl 0,9 %

2,0 ml Rattenserum, inaktiviert

5,0 mg PTH human (entspricht 120 µg PTH/ml)

3.8 Herstellung der Implantate

Die verwendeten Knochenkammern wurden in der technischen Abteilung der Universitätsklinik Lund (Schweden) im Auftrag von Dr. R. Skripitz hergestellt. Die implantierten Knochenkammerschrauben hatten eine Länge von 15 mm und einen Durchmesser von 5 mm. In der Literatur wurden die implantierten Knochenkammerschrauben auch oft als *Bone-Conduction-Chambers* bezeichnet.

Vor der Implantation wurden die Knochenkammern mehreren Reinigungsschritten unterzogen. Sie wurden zunächst in einem Ultraschallbad gereinigt und desweiteren bei 200°C für vier Stunden sterilisiert. Durch das Unternehmen für Medizintechnik DOT erfolgte die weitere abschließende Sterilisation.

Länge: 15 mm

Durchmesser: 3 mm

Kopfteil: 5 mm

Material: Titan

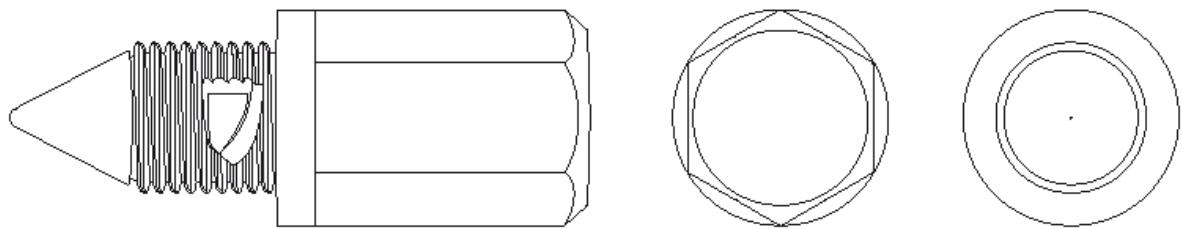


Abb. 5: Schematische Darstellung der Knochenkammerschraube

3.9 Implantation der Titanschrauben

3.9.1 Präoperative Phase

Direkt nach ihrer Lieferung wurden die Tiere klinisch untersucht und Gewicht sowie Temperatur kontrolliert. Es folgte eine siebentägige Eingewöhnungsphase ohne weitere Einflussnahme in Zweierhaltung bei 22°C und freiem Zugang zu Wasser und Standardrattenfutter. Am Tag 7 nach Lieferung wurden die Tiere vor der Operation mittels Randomisierung den Versuchsgruppen zugeteilt.

3.9.2 Narkose und OP-Vorbereitungen

Die Tiere wurden mit einer gewichtsadaptierten intramuskulären Mischinjektion von Medetomidin (150 µg/kg KG), Midazolam (200 µg/kg KG) und Fentanyl (5 µg/kg KG) narkotisiert. Zur perioperativen *single-shot*-Antibiotikaprophylaxe wurde allen Tieren 12,5mg Streptomycin i.m. verabreicht. Abb. 6 zeigt den Operationsarbeitsplatz und das verwendete Material. Zur Vorbereitung wurden den Tieren beide Hinterläufe geschoren. Anschließend wurde die Ratte mit den Hinterbeinen voran in einen sterilen Handschuh gesteckt, welcher dann eingeschnitten wurde, um die hinteren Extremitäten herauszuziehen. Die Hinterpfoten wurden mit steriles Klebeband abgeklebt und die Hinterläufe mit Hilfe eines iodhaltigen Antiseptikum desinfiziert. Die Operation dauerte ca. 15 Minuten pro Tier.



Abb. 6: Arbeitsplatz und OP-Material

3.9.3 Einsetzen der Implantate

Bei der Operation wurde der mediale Anteil der Tibiametaphyse mittels einer longitudinalen Inzision freigelegt. Dann wurde das Periost mit Hilfe eines Skalpells ventral des medialen Kollateralbandansatzes abgeschabt und mit einer Kanüle die Kortikalis perforiert. Dieses vorgebohrte Loch wurde dann mittels verschiedener Handbohrer in aufsteigenden Durchmessern erweitert, bis die Knochenkammerschrauben eingeschraubt werden konnten. Dies geschah in der Art, dass die Spitze der Schraube in der gegenüberliegenden Kortikalis zu liegen kam. Hierbei mussten sich die Löcher für die Zellmigration sicher in Höhe der Kortikalis befinden. Die Knochenkammer verblieb subkutan und der Schnitt wurde mittels fortlaufender intrakutaner Nahttechnik verschlossen. Die Abb. 7 zeigt eine schematische Darstellung einer eingebrachten Knochenkammerschraube. Die Abb. 8 und 9 illustrieren den Vorgang der Implantation. In Abb. 10 werden die Verhältnisse nach erfolgter Implantation. Zur Vermeidung von postoperativen Augenentzündungen wurden die Tiere lokal mit Bepanthen® behandelt. Nach Beendigung des operativen Eingriffs wurde die Anästhesie durch eine subkutane Verabreichung von Atipazol (750 µg/kg KG), Flumazenil (200 µg/kg KG) und Naloxon (120 µg/kg KG) antagonisiert. Eine weitere Wundbehandlung oder systemische Antibiose war nicht erforderlich.

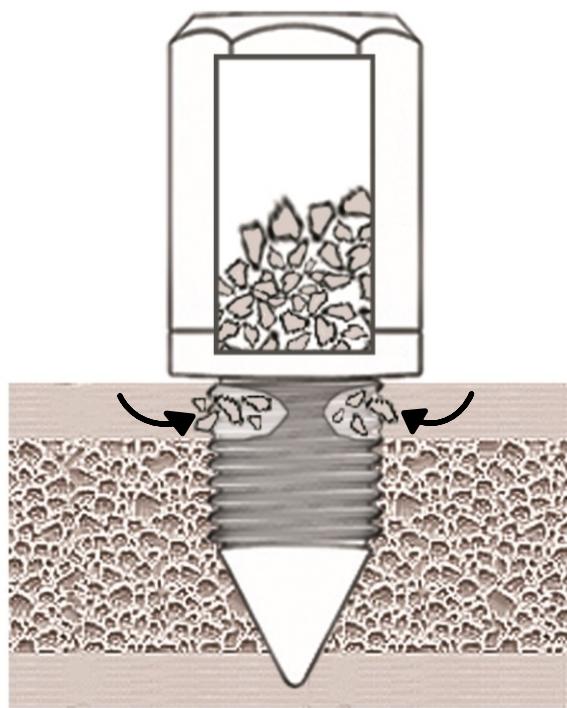


Abb. 7: Knochenkammer in Tibia eingebracht



Abb. 8: Implantation der Knochenkammerschraube



Abb. 9: implantierte Knochenkammerschraube

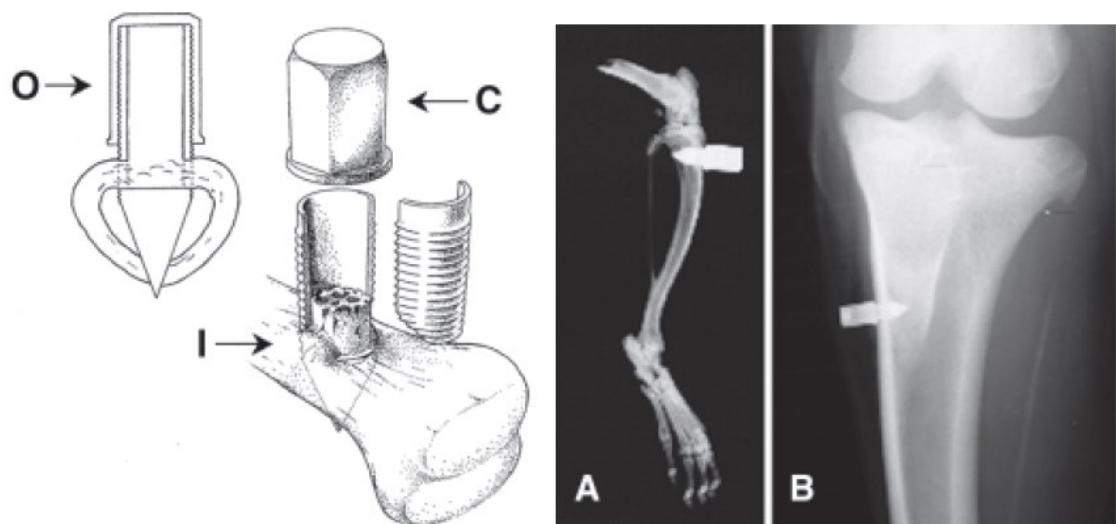


Abb. 10: schematische Ansicht und Röntgenaufnahme der implantierten Knochenkammerschraube
(aus: van der Donk et al., 2001)

3.9.4 Postoperatives Verfahren

Nach Beendigung der Operation wurden die Tiere in Zweierhaltung unter den oben genannten Bedingungen in der Zentralen Versuchstierhaltung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock gehalten. Die postoperative Schmerzbehandlung erfolgte unmittelbar nach der Operation durch 0,05 ml Novalminsulfon i.m. (Metamizol) und der Zugabe von 3 mg Novalminsulfon pro Tag ins Trinkwasser über 4 Tage. Postoperativ wurden alle Tiere täglich

untersucht und erhielten gemäß der randomisierten Zuteilung täglich zwischen 8.00 und 10.00 Uhr eine subkutane Injektion eines PTH-Serum-Gemisches in der Versuchsgruppe oder eines NaCl-Serum-Gemisches in der Kontrollgruppe. Die verabreichten Medikamentenvolumina waren identisch. Anästhesien oder eine weitere Schmerzbehandlung waren im weiteren Verlauf des Versuches nicht erforderlich.

3.9.5 Entnahme der Implantate

Vor Euthanasie der Tiere wurden diese ein letztes Mal einer klinischen Untersuchung unterzogen, sowie Körpertemperatur und Gewicht kontrolliert.

Drei bzw. sechs Wochen nach Implantation der Knochenkammern wurden die Tiere, wie durch den Tierversuchsantrag genehmigt, mittels einer Überdosis Phenobarbital-Natrium (80 mg/kg KG) getötet. Im Anschluss wurden die Implantate sowie das periimplantäre Knochenmaterial inklusive Kallusgewebe entnommen, von Weichteilen befreit, in Cryotubes zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -70 °C bis zur Auswertung verwahrt.

3.10 Aufbereitung der Proben

Für den Umgang mit RNS müssen Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden, um einer Kontamination der Proben durch RNasen vorzubeugen. Bei allen Arbeitsschritten wurden Latexhandschuhe getragen und die Verwendung von sterilen Einmalplastikmaterialien vorgezogen. Falls dies nicht möglich war, wurden die eventuell an den genutzten Glasmaterialien, Mörsern oder Metallspateln vorhandenen RNasen vor jedem Gebrauch durch vier Stunden bei 200 °C inaktiviert. Um andere Gebrauchsutensilien und den Arbeitsplatz ebenso von RNasen zu reinigen, wurde das Spray *RNAse AWAY* von *Molecular Bio Products* verwendet. Weiterhin wurden alle Lösungen, die die Zugabe von Wasser erforderten, mit DEPC (Diethylpyrocarbonat)-behandeltem Wasser angesetzt.

3.10.1 RNS-Isolation mittels QIAGEN RNeasy® Micro Kit

Für die RNS-Isolierung wurden die zuvor bei -70 °C gelagerten Knochenfragmente in einem mit flüssigem Stickstoff (N₂) vorgekühlten Mörser zermahlen. Das zerkleinerte Gewebe wurde mit Lysepuffer (RLT Puffer mit β-Mercaptoethanol im Verhältnis 100:1) versetzt. Dabei wurde das Volumen des RLT-Puffers je nach zu untersuchender Knochenmenge zwischen 350-700 µl variiert. Maximal 350 µl des entstandenen Gewebelysates wurde nach gründlichem Resuspendieren und Vortexen auf eine QIAshredder spin column überführt und 2 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Nach Zugabe von 590 µl RNase-freiem Wasser erfolgte die weitere Isolation nach dem Protokoll des QIAGEN RNeasy® Micro Kit. Anschließend wurde die eluierte RNS bei -80 °C gelagert.

3.10.2 Bestimmung der RNS-Konzentration

Um mit der Real-Time-PCR verlässlich die RNS eines bestimmten Genproduktes quantifizieren zu können, muss gewährleistet sein, dass hierfür immer die gleiche Ausgangsmenge an RNS zur Amplifizierung genutzt wird. In unserem Versuch betrug die für die Real-Time-PCR zu nutzende RNS-Menge 250 ng. Aus diesem Grund wurde die Konzentration der eluierten RNS bestimmt. Die RNS-Konzentration wurde fluorometrisch unter Verwendung eines Qubit® Fluorometers und mit Hilfe des Quant-iT™ RNS Assay Kit *5-100 ng gemessen. Vor jeder Messung wurde das Gerät nach Herstellerangaben kalibriert. Für die Konzentrationsbestimmung wurde 1 µl eluierte RNS verwendet.

Die Bestimmung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.10.3 Reverse Transkription (RT-PCR)

Der Begriff Reverse Transkription bezeichnet das Umschreiben von mRNS zu komplementärer DNS (complementary DNS, cDNS) mit Hilfe einer reversen Transkriptase und einer RNS-abhängigen DNS-Polymerase. Für die cDNS-Synthese werden Random Primers benötigt. Diese bestehen aus randomisierten Basenabfolgen und binden demnach an verschiedenen RNA-Sequenzen über das gesamte Transkriptom, sodass alle mRNA-Abschnitte in cDNA umgeschrieben werden können.

Für die RT-PCR wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* von Applied Biosystems verwendet. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C.

- 1.) Auftauen der RNS auf Eis, Auftauen der Kit-Komponenten bei Raumtemperatur
- 2.) Lösung von 250 ng RNS in RNase-freiem Wasser
- 3.) Für die Reverse Transkription wurden 250 ng RNS verwendet (Gesamtvolumen: 10 µl). Der Mastermix für eine Probe setzte sich folgendermaßen zusammen:

10x Buffer	2 µl
dNTPs	0,8 µl
Random Primers	2 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
Wasser	4,2 µl

- 4.) Jede RNS-Probe wurde mit 10 µl Mastermix versetzt und gut gemischt.

- 5.) Die Reverse Transkription lief in folgenden Schritten ab:

25 °C 10 min
37 °C 120 min
85 °C 15 sec

- 6.) Nach Ablauf der RT-PCR wurden alle Proben mit 20 µl Wasser verdünnt und bei -20 °C weggefroren.

3.10.4 Quantitative Echtzeit-PCR – Real-Time-PCR (TaqMan®)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) stellt ein Verfahren zur Klonierung bestimmter DNS-Segmente dar. Hierfür ist die Kenntnis von Teilen des zu amplifizierenden DNS-Abschnittes notwendig, um bestimmte DNS-Oligonukleotide zu synthetisieren, die so genannten Primer. Diese hybridisieren mit je einem der komplementären DNS-Stränge und grenzen somit den zu klonierenden DNS-Abschnitt ein und markieren den Beginn der DNS-Synthetisierung. Der eigentliche Amplifikationsvorgang lässt sich in drei Phasen einteilen: Denaturierung, Annealing und Polymerisation.

Bei der Denaturierung wird das Reaktionsgemisch, welches die Ursprungs-DNS, die Primer und die Taq-Polymerase enthält, auf 95 °C erhitzt, um die komplementären DNS-Stränge zu trennen. In der Phase des Annealings wird die Temperatur auf 55 °C reduziert, um so das Binden der Primer an den Beginn der Zielsequenzen auf den getrennten DNS-Strängen zu ermöglichen.

In Phase 3, der Polymerisation, dienen die hybridisierten Primer bei 70 °C als Startsequenz für die folgende DNS-Polymerase-Reaktion mittels Taq-Polymerase in 5'→3'-Richtung. Durch mehrere Zyklen dieser Abfolge kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der Ziel-DNS-Sequenz.

Die Real-Time-PCR erlaubt, die PCR-Produkte sequenzspezifisch zu quantifizieren, sodass Änderungen von Transkriptmengen detektiert werden können. Durch die Verwendung von konstitutiv exprimierten *house-keeping* Genen, z.B. Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) können zellspezifische Unterschiede in der Gesamtmenge der mRNS herausgerechnet werden. Die Quantifizierung wird durch Fluoreszenz-Messungen während der PCR-Zyklen ermöglicht, was der Methode auch den Namen Real-Time-PCR eintrug.

Das *TaqMan*-Prinzip verwendet Sonden, die an einem Ende einen Reporter (R) mit fluorometrischer Aktivität und am anderen Ende einen Quencher (Q) besitzen. Solange sich Reporter und Quencher in räumlicher Nähe zueinander befinden, wird die Fluoreszenzemission des Reporters vom Quencher absorbiert. Das Reaktionsgemisch enthält neben den *TaqMan*-Sonden auch cDNS, Primer und die Taq-Polymerase (*thermus aquaticus*) mit einer 5'-3'-Exonukleaseaktivität. Im Laufe der PCR lagern sich die Sonden spezifisch an den zu klonierenden DNS-Abschnitt an. Während der DNS-Synthese kommt es zur Abspaltung des Reporters durch die Taq-Polymerase. So vergrößert sich der Abstand zwischen den beiden Sonden-Komponenten und das Licht der Wellenlänge des Reporteremissionspektrums wird messbar. Da die Fluoreszenzintensität proportional zur Menge der abgespaltenen Reportermoleküle steigt, wird es möglich, die Menge der synthetisierten DNS zu quantifizieren. Die Messung wird nach der Polymerisationsphase jedes Zyklus durchgeführt. Dieses Prinzip ist in der Abb. 11 dargestellt.

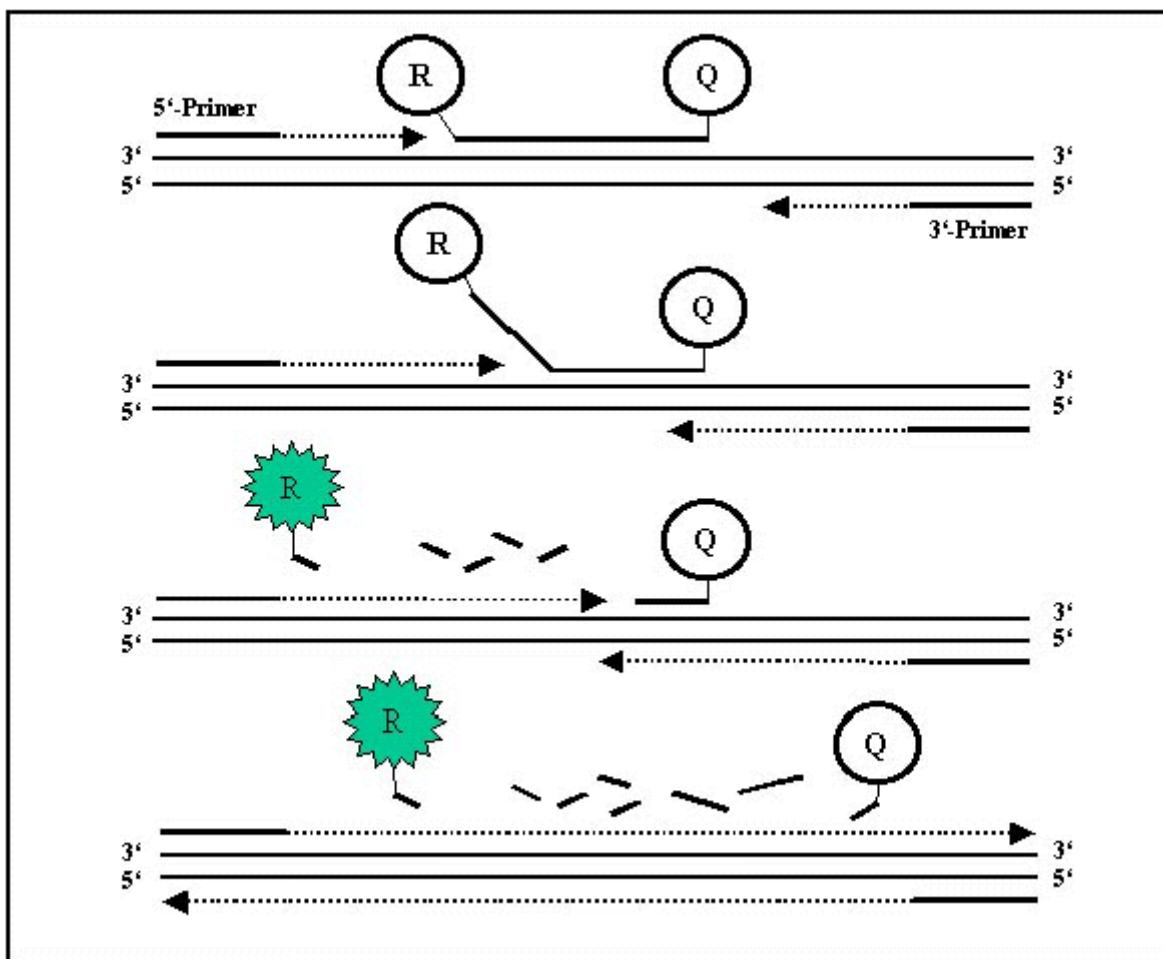


Abb. 11: Schematische Darstellung der quantitativen Echtzeit-PCR. (aus Schwartz et al., 2007) Sonden ausgestattet mit Reporter (R) und Quencher (Q) lagern sich spezifisch am zu klonierenden DNS-Abschnitt an. Die Quantifizierung wird durch die Abspaltung des Reporters im Zuge der DNS-Synthese ermöglicht. Die nicht mehr absorbierte Fluoreszenzemission wird somit messbar.

Die Real-Time-PCR wurde mit dem *AbiPrism 7000 Cycler* und der dazugehörigen Software *ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System* (SDS) durchgeführt. Verwendet wurden „Assay-on-Demands“ mit einer für das zu untersuchende Gen spezifischen Sonde. In der vorliegenden Arbeit wurden *Pre-Developed Taqman ® Assay Reagents* (Applied Biosystems, Foster City, USA) für RANKL, OPG und GAPDH, sowie in Ermangelung vorgefertigter Primer für RANK ein mit Hilfe des Primer Design Tool von NCBI hergestellter Primer für RANK genutzt.

Bestellnummern:

RANKL (Tnfsf11): Rn00589289_m1

OPG (Tnfrsf1): Rn00563499_m1

GAPDH: Rn99999916_s1

Sequenz RANK-Primer:

RANK_RN_2_F (Forward): 5'-TGAGCATCTGGACGGTGGT-3'

RANK_RN_2_R (Reverse): 3'-GGTGGGAGTGCATTAGAAGACA-5'

RANK_RN_2_M: 6FAM-ATGCGAACCAAGGAAAGTA MGBNFQ

Die PCR verlief unter folgenden Bedingungen:

95 °C 10.00 min 1 x

95 °C 00:15 sec
60 °C 01 :00 min } 55 x

Für die Berechnung der relativen Expression des Zielgens im Vergleich zum *house-keeping* Gen (GAPDH) wurde folgende Formel verwendet:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{GapDH}}$$

Die relative Quantifizierung erfolgte nicht mit einer Eichreihe, sondern immer im Bezug zur unbehandelten Kontrolle:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Ziel}} - \Delta Ct_{\text{Kontrolle}}$$

Zuletzt wurde der $2^{\Delta\Delta Ct}$ für die relative Transkriptmenge im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gebildet.

3.10.5 Statistische Auswertung

Alle erhobenen Daten wurden gespeichert und mit Excel 2007 (Microsoft) ausgewertet und graphisch dargestellt. Die Daten sind präsentiert als Mittelwerte \pm SEM (standard error of the mean; Wurzel der Anzahl der Versuche als Dividend der Standardabweichung). Die statistischen Signifikanzen wurden mit SPSS 20.0.0 (IBM® SPSS®, Armonk, New York, USA) analysiert. Der Vergleich der Mittelwerte für die Genexpressionsanalysen wurde mit der Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen als Post-Hoc-Test (LSD) herangezogen. Alle p-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant eingestuft.

4. Ergebnisse

4.1 Implantation und postoperativer Verlauf

48 Tieren wurden bilateral Knochenkammern in die Kortikalis der proximalen Tibiametaphyse wie beschrieben implantiert. Bei 47 von ihnen zeigten sich stabile und demnach für den Versuch verwertbare Implantationsverhältnisse ohne Rötung oder Schwellung in der Umgebung. Ein Versuchstier in der 3-Wochengruppe verstarb im Zuge der Narkose. Wundheilung und postoperativer Verlauf gestalteten sich komplikationslos. Kein Tier ließ durch Fieber über 40 °C oder einem Gewichtsverlust von über 20 % des Körpergewichtes Anzeichen einer Infektion erkennen. In der drei- bzw. sechs-wöchigen Versuchsphase, erhielt die Versuchsgruppe s.c. täglich gewichtsadaptiert 60 µg/kg Körpergewicht Parathormon und die Kontrollgruppe 0,9 % NaCl-Injektionen von 0,6 ml.

4.2 Gewichtsentwicklung der Versuchstiere unter PTH- oder NaCl-Applikation

Die Abbildung 12 stellt den Gewichtsverlauf der Tiere während der Versuchphase nach PTH- und NaCl-Gabe aufgegliedert dar. Es ist erkennbar, dass in allen vier Gruppen ein Gewichtsverlust zu verzeichen ist, welcher sich auf durchschnittlich 2,6 % des Ausgangskörpergewichtes belief. Bis auf ein zufälliges, leicht differierendes Ausgangsgewicht zeigt sich der Kurvenverlauf des Gewichtsverlustes in den Gruppen nahezu kongruent und ist höchstwahrscheinlich auf den Operationsstress zurückzuführen. Ab der zweiten Woche kam es in allen Gruppen zu einer Gewichtszunahme, welche sich bis zum Zeitpunkt der Euthanasie fortsetzte. Die Versuchs- und Kontrollgruppe mit drei Wochen Standzeit zeigten ein nahezu identisches mittleres Endgewicht von 333,18 g in der PTH-Gruppe und 333,23 g in der NaCl-Gruppe. Die 6-Wochen-Versuchsgruppen verzeichneten bei unterschiedlichem Ausgangsgewicht eine nur leicht differierende Gewichtszunahme von 10,13 % in der PTH- und 8,12 % in der NaCl-Gruppe im Bezug zum Ausgangsgewicht. Somit konnte keine positive Wirkung des Parathormons auf die Gewichtsentwicklung beobachtet werden. Unsere Ergebnisse korrespondieren demnach mit denen anderer Studien, dass PTH keinen Einfluss auf das Körpergewicht der Versuchstiere ausübt (Skripitz et al., 2004; Seebach et al., 2002).

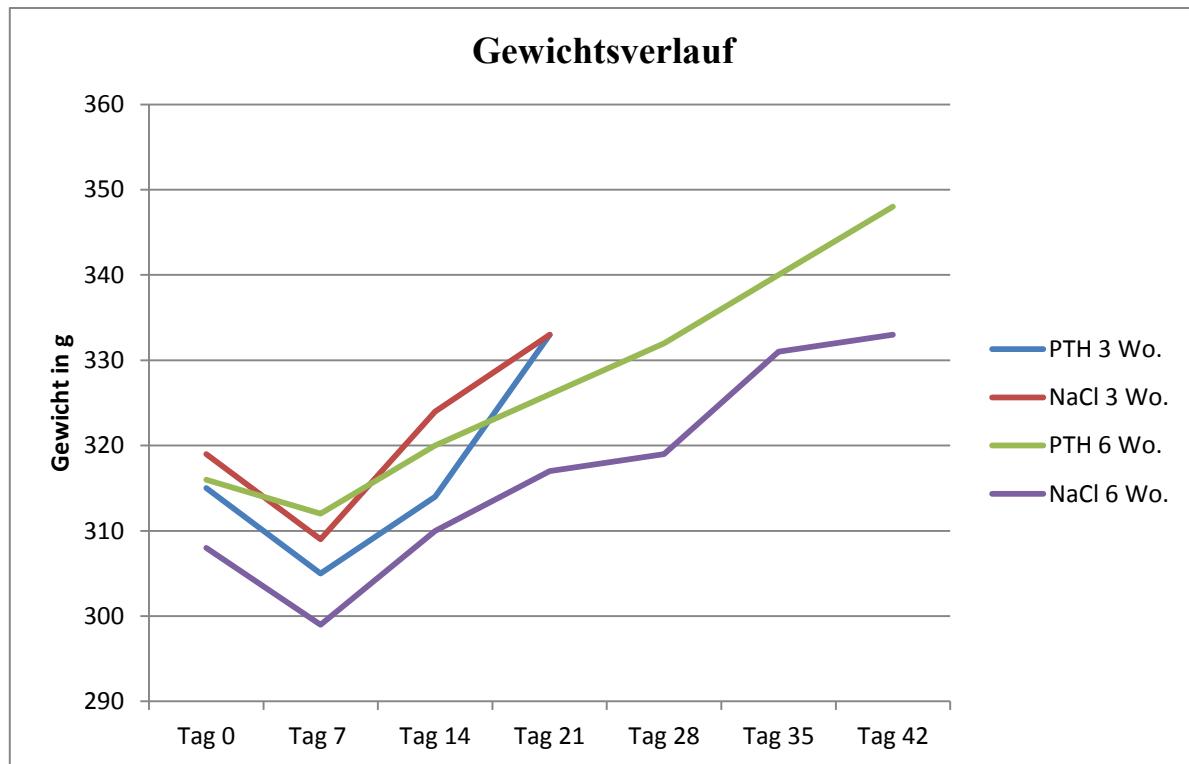


Abb. 12: Gewichtsverlauf der Versuchsgruppen aufgegliedert nach PTH- und NaCl-Gabe im Vergleich

4.3 Explantation und Gewebeentnahme

Nach Ablauf der Versuchszeit von 21 bzw. 42 Tagen wurden die Tiere euthanasiert und die Knochenkammerimplantate mit den neu eingewachsenen Knochengewebsproben entnommen und der Auswertung zugeführt. In fast in alle Knochenkammerschrauben war nur sehr wenig Knochenmaterial eingewachsen, sodass die gewonnene Menge nicht ausreichend für molekularbiologische Analyse war. Aus diesem Grund entschieden wir uns zusätzlich zur Entnahme des periimplantären Knochenmaterials inklusive des Kallusgewebes. Die Abbildungen 13 und 14 zeigen stabile Implantationsverhältnisse bei der Entnahme. Nebenbefundlich konnte eine vermehrte Kallusbildung bei den Tieren der PTH-Gruppe beobachtet werden.



Abb. 13: stabile Implantationsverhältnisse vor Explantation

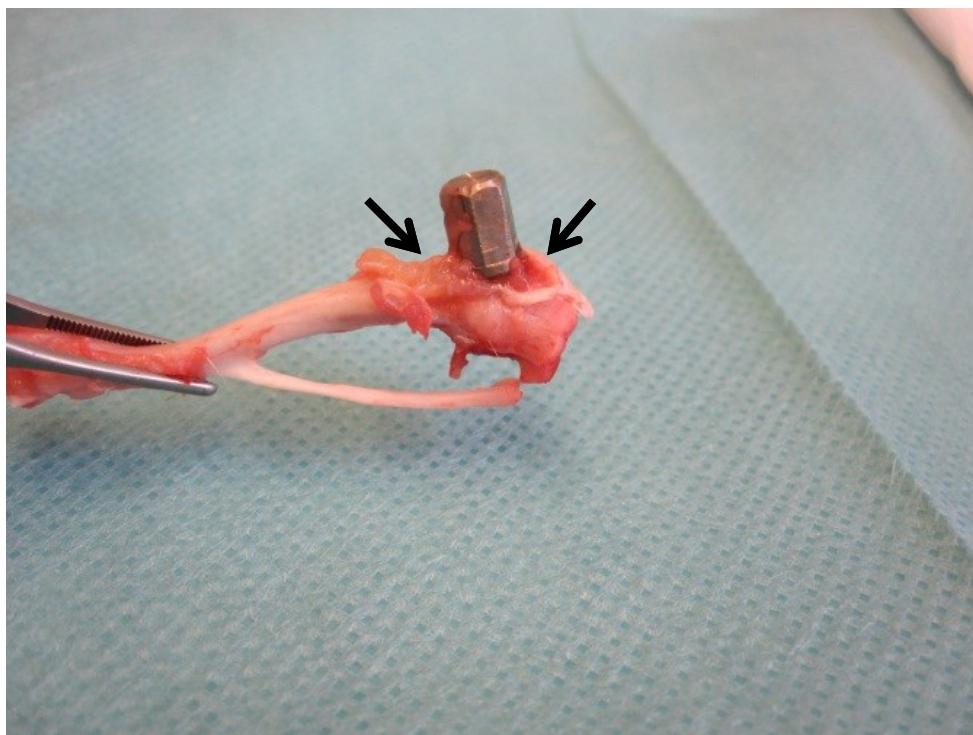


Abb. 14: fest verankerte Titanknochenkammer vor Probenentnahme mit Kallus (Pfeil)

4.4 RNS-Isolation aus Knochengewebe

Aus dem Knochenkammerinhalt und dem angrenzenden Knochengewebe wurde die RNS isoliert und anschließend deren Konzentration in den Probenansätzen bestimmt. Dies war notwendig, da die isolierte RNS im nächsten Arbeitsschritt mittels Reverser Transkription zu cDNS umgeschrieben werden sollte und hierfür eine RNS-Menge von 250 ng benötigt wurden. In allen Proben konnte eine für das Umschreiben zu cDNS ausreichende Menge RNS aus dem in das Implantat eingewachsenen und dem periimplantären Knochengewebe isoliert werden. Anschließend wurde mit Hilfe der Real-Time-PCR mit dem *AbiPrism 7000 Cycler* die cDNS zur sequenzspezifischen Quantifizierung der Knochenmarker verwendet.

4.5 Ergebnisse der quantitativen Real-Time-PCR

Die gewonnene cDNS konnte erfolgreich zur Quantifizierung der unter PTH-Einfluss exprimierten Knochenmarker mittels Real-Time-PCR verwendet werden. Auf der X-Achse werden die durchlaufenen Amplifikationszyklen im Verhältnis zu dem auf der Y-Achse abgetragenen normalized Reporter (Rn) dargestellt. Hierdurch wird die Fluoreszenzintensitätszunahme in Relation zu der Anzahl der durchlaufenen PCR-Zyklen abgebildet. In den ersten Zyklen ist nur eine geringe Veränderung der Fluoreszenzintensität zu detektieren, weshalb der Kurvenabschnitt bis zum ersten Zyklus, der den Schwellenwert übersteigt, auch Baseline genannt wird. Dieser erste Zyklus wird dementsprechend auch als *Threshold Cycle (C_T)* bezeichnet. Bei den Abb. 15 und 16 handelt es sich um Beispielkurven der relativen Quantifizierung der RANKL-Expression der 3-Wochen-Tiere.

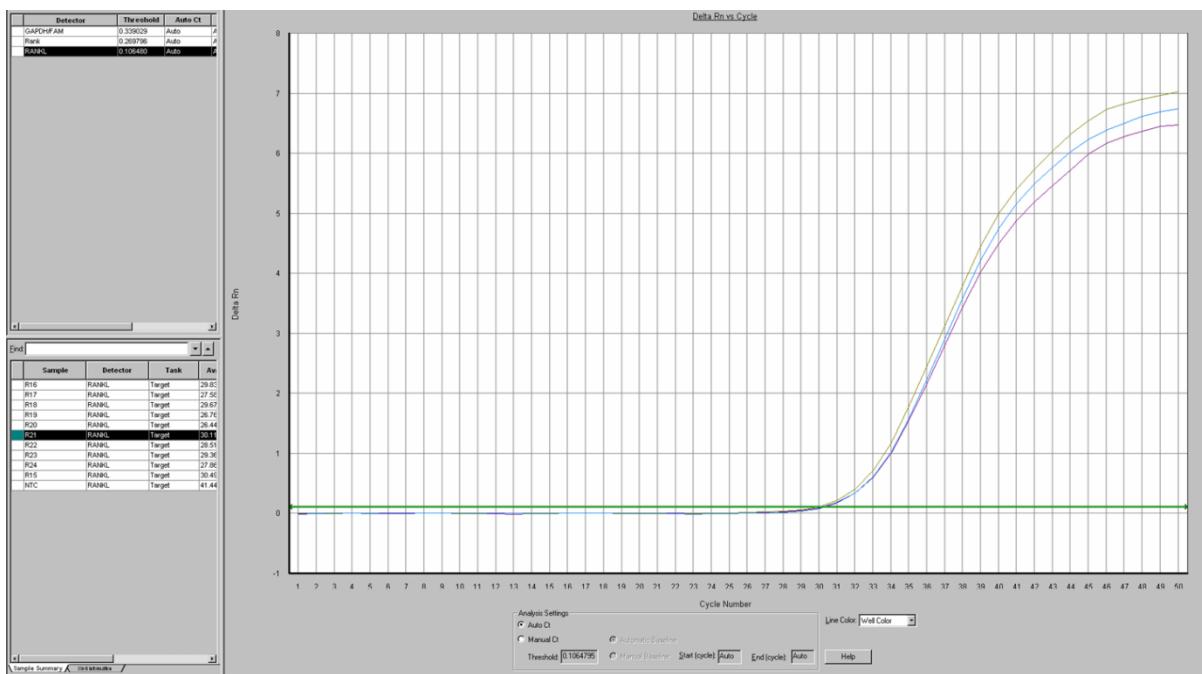


Abb.15: Real-Time-PCR-Kurve des Tieres 21 zur Quantifizierung der Expression von RANKL

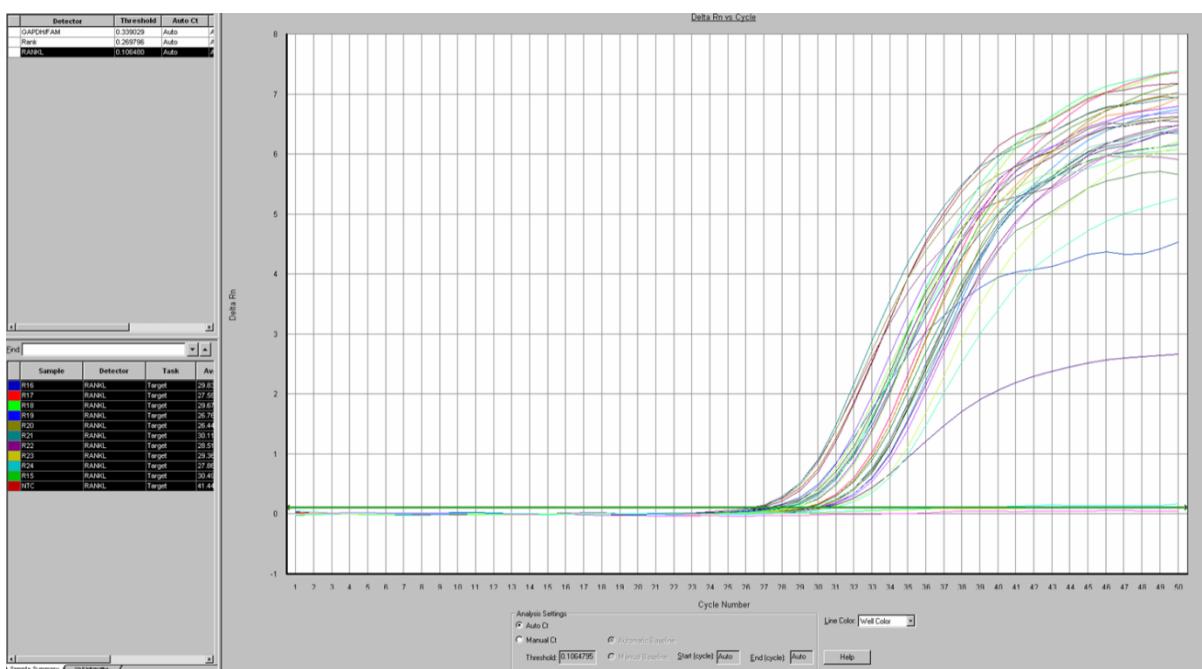


Abb. 16: Real-Time-PCR-Kurve der Tiere 15 bis 24 zur Quantifizierung der Expression von RANKL

Die mittels quantitativer Realtime PCR gewonnenen Daten wurden relativ zur unbehandelten Kontrolle ausgewertet (100 %). Die Abb. 17 stellt diesem Sachverhalt graphisch dar. Die Genexpression von RANK, RANKL und OPG zeigte deutliche Unterschiede zu den einzelnen Standzeiten. So war nach 3-wöchiger intermittierender NaCl- bzw. PTH-Gabe ein niedriges

Expressionsniveau zu bestimmen ((MW \pm SEM: RANK: 4 \pm 1,1 % (NaCl), 2 \pm 0,7 % (PTH); RANKL: 1 \pm 0,2 % (NaCl), 1 \pm 0,3 % (PTH); OPG: 2 \pm 0,4 % (NaCl), 2 \pm 0,7 % (PTH)). Es konnten keine Unterschiede der Genexpression zwischen der PTH- und der NaCl-Gruppe festgestellt werden, welche das Signifikanzniveau erreichten. Nach 6-wöchiger Standzeit ließ sich eine Steigerung der Expression aller Gene ermitteln. Die Gene RANK (MW \pm SEM: 30 \pm 6 % (NaCl-Gruppe), 52 \pm 6 % (PTH-Gruppe)) und RANKL (MW \pm SEM: 39 \pm 13 % (NaCl-Gruppe), 54 \pm 8 % (PTH-Gruppe)) zeigten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine verminderte Expression. Beim OPG (MW \pm SEM: 161 \pm 40 % (NaCl-Gruppe), 141 \pm 19 % (PTH-Gruppe)) dagegen ließ sich eine deutliche Expressionssteigerung nachweisen. Ein signifikanter Unterschied zwischen der PTH- und der NaCl-Gruppe zeigte sich in der RANK-Expression nach 6-wöchiger Versuchsstrecke ($p = 0,031$).

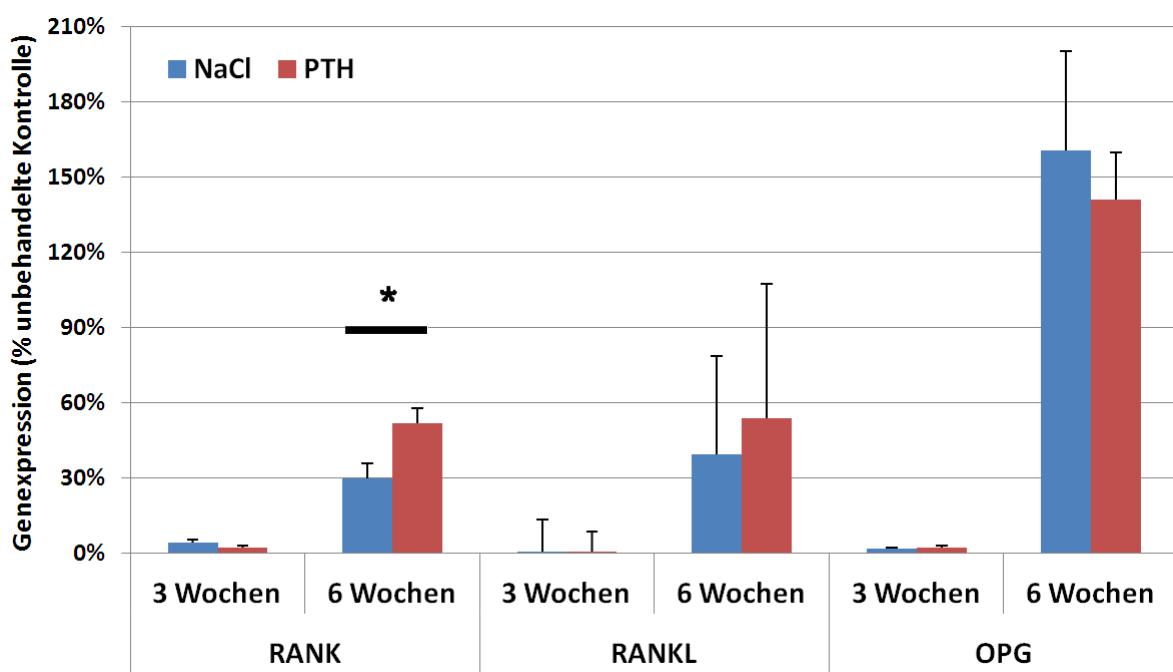


Abb. 17: Expression von RANK, RANKL und OPG nach intermittierender PTH- und NaCl-Gabe im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (MW \pm SEM); * $p = 0,031$ PTH vs. NaCl

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Tiermodells zur molekularbiologischen Untersuchung der Knochenstoffwechselmarker RANK, RANKL und OPG bei der Knochenregeneration unter intermittierender Parathormongabe. Hierfür wurde das Knochenkammermodell nach Aspenberg (1996) durch molekularbiologische Untersuchung der Genexpression des gewonnen Materials ergänzt. Es sollte die Wirkung von intermittierend, systemisch appliziertem Parathormon (PTH) auf die Knochenmarker Osteoprotegerin (OPG), Receptor Activator of Nuclear factor (NF)-kB Ligand (RANKL) und Receptor Activator of Nuclear factor (NF)-kB (RANK) im regenerierenden Knochengewebe mittels Realtime-PCR untersucht werden.

5.1 Wirkung der PTH-Applikation auf das RANK-RANKL-OPG-System

5.1.1 Wirkung der PTH-Applikation auf des RANK-RANKL-OPG-System unter physiologischen Bedingungen

In unserer tierexperimentellen Studie untersuchten wir mittels PCR-Analyse die Wirkung intermittierender PTH-Applikation auf die Expression der Knochenmarker OPG, RANK und RANKL im regenerierenden Knochen. Die erwähnten Knochenmarker sind regulativer Bestandteil des Remodelings und des RANK-RANKL-OPG-Systems. Dieses steuert den Knochenstoffwechsel über die Regulation der Differenzierung, der Aktivität, der Fusion und der Apoptose der Osteoklasten und sichert somit über das sogenannte *coupling* zwischen Osteoklasten und Osteoblasten die Balance zwischen Knochenresorption und Knochenneubildung (Suda et al., 1999; Hofbauer et al., 2000; Wong et al., 1999b; Nakamichi et al., 2007; Gardner et al., 2007).

RANKL (Lacey et al., 1998; Yasuda et al., 1998a; Wong et al., 1997b; Anderson et al., 1997) wird vor allem membrangebunden auf Osteoblasten exprimiert und greift über seinen osteoklastären Rezeptor RANK (Anderson et al., 1997) an den Osteoklastenvorläuferzellen an. RANKL stimuliert die Differenzierung der Osteoklastenvorläuferzellen, steigert die Anzahl und Aktivität der Osteoklasten und fördert so die Knochenresorption (Li et al. 2000). OPG (Simonet

et al., 1997; Yasuda et al., 1998b; Kwon et al., 1998; Tan et al., 1997) spielt hierbei die Rolle eines löslichen Scheinrezeptors, welcher von Osteoblasten exprimiert wird und über die Bindung von RANKL in der Lage ist, übermäßigem Knochenmasseverlust vorzubeugen. Das RANK-RANKL-OPG-System ist als zentraler Kontrollmechanismus des Knochenstoffwechsels Angriffspunkt vieler Zytokine und Hormone. Als „Stellschrauben“ für den Knochenmetabolismus dienen hierbei vor allem RANKL und OPG durch Herauf- oder Herabregulierung ihrer Expression. Häufig ist eine reziproke Regulation von RANKL und OPG zueinander zu beobachten. Es wurde vermutet, dass deren Funktion darin liegt, proresorptive Signale zu verstärken (Nagai & Sato, 1999; Nakagawa et al., 1999). Die Ergebnisse zahlreicher Studien weisen darauf hin, dass vor allem das Verhältnis zwischen OPG und RANKL (RANKL-OPG-Ratio) eine wichtige Komponente in der Regulation der Knochenresorption spielt (Lee & Lorenzo, 1999; Fazzalari et al., 2001; Ma et al., 2001; Grimaud et al., 2003). Indem die Relation von RANKL und OPG zueinander verändert wird, wird auch die Osteoklastendifferenzierung und -aktivität modifiziert. Ein Beispiel für eine reziproke Regulation der Knochenmarker findet sich in der PTH-Applikation. Das PTH wirkt in Abhängigkeit von Dosis und Dosisintervall auf den Knochenstoffwechsel entweder katabol, oder anabol. Bei kontinuierlichem Einfluss fördert PTH die Osteoblastendifferenzierung und stimuliert über die Reduktion der OPG- und Steigerung der RANKL-Produktion die osteoklastäre Knochenresorption, was eine Verminderung der Knochendichte und -masse zur Folge hat (Ishizuya et al., 1997; Lee & Lorenzo, 1999; Teitelbaum, 2000; Fu et al., 2002). Es wirkt somit katabol.

Der Mechanismus des anabolen PTH-Effektes ist noch nicht vollständig verstanden und Gegenstand aktueller Forschung. In der Literatur finden sich zum Teil kontroverse Aussagen über die Wirkung des PTH auf die oben erwähnten Knochenmarker. Der aktuelle Wissensstand soll an dieser Stelle kurz zusammengefasst werden: Der anabole Effekt einer intermittierenden PTH-Applikation erhöht unter anderem die trabekuläre und kortikale Knochendichte (Okimoto et al., 1998). Sie beruht vermutlich auf einer nur kurzzeitigen Veränderung des OPG-RANKL-Verhältnisses, was Mechanismen induziert, die zur Proliferation und Differenzierung von Osteoprogenitorzellen beitragen (Nakajima et al., 2002). Weiterhin kommt es zur Reaktivierung ruhender Bone Lining Cells (Dobnig et al., 1995). Auf diese Weise wirkt sich die PTH-Applikation positiv auf das Remodeling aus. Weiterhin steigert die intermittierende PTH-Applikation die Anzahl und Aktivität der Osteoblasten (Dobnig et al., 1995) und verhindert deren Eintritt in die Apoptose (Jilka et al., 1999). Jilka et al. (1999) nahmen aufgrund der Kurzlebigkeit der Osteoblasten und der ebenfalls nur kurz wirkenden Effekte des PTH an, dass

eine Knochenmassezunahme am ehesten durch Summation der Einzeleffekte bei täglicher PTH-Applikation zustande kommt. Somit wird repetierend der Eintritt der Osteoblasten in die Apoptose verzögert, was kumulativ die anabole Wirkung bedingt. Als weiterer Effekt eines intermittierenden PTH-Einflusses konnte neben einer antiapoptotischen Wirkung (Bellido et al., 2003) außerdem eine Verminderung des Sclerostin-Levels gezeigt werden (Bellido et al., 2005). Bei Sclerostin handelt es sich um einen von Osteozyten sezernierten Inhibitor der Osteoblastogenese.

In *in vitro* Versuchen konnte beobachtet werden, dass bei PTH-Applikation die Expression der RANKL-mRNA stieg, während sich die OPG-Expression entweder verringerte (Lee & Lorenzo, 1999; Kanzawa et al., 2000; Kondo et al., 2002; Huang et al., 2004) oder nicht verändert wurde (Coetzee et al., 2007). Auch Tierversuche an Mäusen und Ratten ergaben ähnliche Ergebnisse. Es zeigte sich sowohl bei intermittierender (Onyia et al., 2000; Iida-Klein et al., 2002; Wang et al., 2004) als auch bei kontinuierlicher (Ma et al., 2001; Ueno et al., 2003) PTH-Applikation eine Steigerung der RANKL-mRNA-Expression, wobei ebenfalls die OPG-Expression unberührt blieb (Ueno et al., 2003). In einem Versuch von Onyia et al. (2000) an Ratten wurden nach der Applikation von 80 µg/ kg PTH (1-38) die Knochenmarker bestimmt. Schon nach einer Stunde war eine Senkung der OPG- und eine Steigerung der RANKL-Expression zu beobachten. Die Veränderungen dauerten allerdings nur für ca. drei Stunden an (Onyia et al., 2000). Auch am Menschen wurden bereits Studien durchgeführt. In den meisten Fällen wurde hierbei die Serumkonzentration von RANKL und OPG beobachtet. Im Rahmen einer Studie wurden Frauen mit einer Glucocorticoid-induzierten Osteoporose über einen Zeitraum von 12 Monaten täglich 40 µg hPTH (1-34) verabreicht und im Folgenden nach einem Monat und dann in Abständen von je drei Monaten Serumuntersuchungen durchgeführt. Man stellte bereits nach einem Monat einen signifikanten Anstieg des löslichen RANKL fest, welcher über die gesamte Behandlungsdauer erhöht blieb. Dagegen trat erst nach sechs Monaten eine milde Suppression des OPG-Levels ein. Die Autoren zogen den Schluss, dass PTH zunächst die Osteoblastenreifung und -funktion unterstützte. Diese förderte wiederum die Osteoklastenaktivierung und führe im Folgenden zu einer allmählichen Wiedereinstellung des Gleichgewichtes zwischen Knochenresorption und Knochenformation (Buxton et al., 2004). Bereits Ma et al. (2001) vermuteten die Notwendigkeit einer Stimulation der Osteoklastenformation und –aktivität zur Vermittlung des anabolen PTH-Effektes. Eine Möglichkeit sah man in der Präparation der Knochenoberfläche zum Anbau neuer Knochensubstanz (Delmas et al, 1995). In einer anderen Studie am Menschen wurde Frauen mit Osteoporose über 12 Monate täglich 20 µg PTH (1-34) verabreicht. Im Folgenden wurden nach

einer Stunde, einem Tag und einem Monat nach Therapieinitiation Serumproben unter anderem auf den Gehalt von OPG und RANKL untersucht. Auch hier beobachtete man einen Anstieg des RANKL-Levels, wobei das Serum-OPG nicht verändert wurde und die OPG/RANKL-Ratio sank. Man zog einen ähnlichen Schluss: Die Autoren vermuteten, dass die Steigerung des RANKL-Serumwertes Ausdruck der erhöhten Osteoblastenzahl sein könnte. Mit dem Anstieg der aktiven Osteoblasten stiegen demnach ebenso die RANKL-Serumwerte, was wiederum zur Aktivierung neuer Osteoklasten führe und so die *turnover*-Rate steigere (Anastasilakis et al., 2008). Trotzdem konnte von Pierroz et al. (2010) gezeigt werden, dass die anabole PTH-Wirkung nicht gänzlich von Osteoklasten und der Knochenresorption abhängig ist. Auch in Abwesenheit von Osteoklasten ist eine anabole Reaktion außerhalb des Remodelings, höchstwahrscheinlich auf Basis bloßen Modelings, möglich, welche aber in ihrem Umfang eingeschränkt ist (Pierroz et al., 2010).

Vereinzelte Studienergebnisse belegen zumindest auch einen kurzfristigen Effekt von PTH auf OPG. Lee und Lorenzo (1999) beobachteten *in vitro* an Knochenmark-Zellkulturen einen biphasischen Effekt von PTH auf die OPG-mRNA-Expression. Innerhalb einer Stunde nach PTH-Stimulation erfolgte eine Erhöhung des OPG mRNA-Levels, welches nach zwei Stunden auf seinen Ausgangswert sank. Im weiteren Verlauf kam es nach sechs Stunden zu einer Inhibition der OPG-mRNA-Expression (Lee and Lorenzo, 1999). In einem Versuch von Ma et al. (2001), indem man Ratten einer kontinuierlichen PTH-Applikation unterzog, beobachtete man dagegen bereits innerhalb einer Stunde sowohl eine rasche Steigerung der RANKL-, als auch eine schnelle Verminderung der OPG-Expression, die über einen Zeitraum von 24 Stunden anhielt. Man folgerte, dass diese kurzfristigen und raschen OPG- und RANKL-Änderungen Initiator für Vorgänge zur Differenzierung, Rekrutierung und Aktivierung von Osteoklasten sein könnten (Ma et al., 2001). Diese Studien lassen eine sehr rasche und zeitlich begrenzte OPG- Antwort auf den PTH-Einfluss vermuten, wobei diese Ergebnisse allerdings noch nicht unter intermittierender PTH-Applikation oder im Versuch am Menschen reproduzierbar waren (Anastasilakis et al., 2008).

5.1.2 PTH-Wirkung auf das RANK-RANKL-OPG- System im regenerierenden bzw. periimplantären Knochen

Der genaue Mechanismus der anabolen PTH-Wirkung und deren Effekte auf OPG und RANKL sind noch nicht vollständig geklärt und noch Gegenstand aktueller Forschung. Es existieren zwar Betrachtungen zur PTH-Wirkung auf die Implantatintegration und auch Studien über Auswirkungen einer intermittierenden PTH-Applikation auf die Expression der Knochenmarker des RANK-RANKL-OPG-Systems. Dennoch gibt es nur sehr geringfügige Informationen über die besondere Stimulation der Knochenmarkerexpression in regenerierendem Gewebe unter intermittierender PTH-Applikation. Die Studien, welche sich mit dem unterschiedlichen Vorkommen der Knochenmarker OPG, RANK und RANKL in periimplantären Bereichen beschäftigen, richten ihr Hauptaugenmerk zumeist auf deren Rolle bei periimplantären Entzündungen und der aseptischen Prothesenlockerung. An dieser Stelle soll ein kurzer Abriss der Ergebnisse zusammengefasst werden.

Horiki et al. (2004) untersuchten Bindegewebe, welches sich um gelockerte, gelenkersetzende prothetische Implantate gebildet hatte, auf den Gehalt von RANKL-mRNA. Innerhalb des betrachteten Bindegewebes fanden sich drei Zellarten von RANKL-positiven Zellen: Prolyl 4-Hydroxylase (PH)-positive Zellen der Fibroblastenzellreihe, CD68 Zellen und *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP)-positive mono- und multinukleäre Zellen der Macrophagenzelllinie. Die Autoren sahen hierin einen Anhalt für eine mögliche RANKL-Expression durch Zellen der Fibroblasten- oder Macrophagenzellreihe und dass dies zur Prothesenlockerung durch die Beeinflussung der Osteoklastogenese und Knochenresorption beitragen könnte (Horiki et al., 2004). In einer weiteren Studie von Veigl et al. (2006) wurde an 59 Patienten mit einer Hüfttotalendoprothese, die sich aufgrund einer aseptischen Prothesenlockerung einer Revisionsoperation unterziehen mussten, der Zusammenhang zwischen periimplantärer Osteolyse, Abriebpartikeln der Endoprothese und der RANKL-Expression im umliegenden Gewebe untersucht. Man vermutete eine Aktivierung des RANK-RANKL-OPG-Systems durch die Abriebpartikel. Tatsächlich zeigten 23 der untersuchten Patienten, vor allem solche mit einer gelockerten zementierten Endoprothese, RANKL-positive Zellen. Weiterhin beobachteten die Autoren, dass RANKL hauptsächlich in Geweben zu finden war, wo große Mengen von Abriebpartikeln vorkamen (Veigl et al., 2006). Ähnliche Ergebnisse wurden von Crotti et al. (2004) erzielt. Diese Versuchsgruppe wies erhöhte RANKL-mRNA-Level im periimplantären Gewebe von Patienten mit aseptischer Prothesenlockerung nach. Diese zeigten sich im

Besonderen in Zellen welche Abriebpartikel enthielten. Die Autoren vermuteten einen kausalen Zusammenhang zur aseptischen Prothesenlockerung (Crotti et al., 2004). Auch auf die Manifestation und der Schwere von inflammatorischen Prozessen in der unmittelbaren Umgebung von Implantaten scheinen die betrachteten Knochenmarker Einfluss zu nehmen. Duarte et al. (2009) fanden im periimplantären Bindegewebe von gesunden Implantaten und solchen mit periimplantärer Entzündung RANKL und OPG. Interessanterweise unterschied sich die Menge der gefundenen mRNA bei der Gruppe mit periimplantärer Entzündung und der Kontrollgruppe. Die größte Menge am OPG fand sich in den Bindegewebsproben gesunder Implantate, wobei sich der Gehalt von RANKL mit der Schwere der Entzündung steigerte (Duarte et al., 2009). Aus diesen Ergebnissen konnten schon sehr bald therapeutische Konsequenzen gezogen werden. Zhongguo et al. zeigten 2011, dass mit einem RANKL-Antikörper effizient durch Implantatabriebpartikel verursachter Knochenabbau gehemmt werden kann (Zhongguo et al., 2011). Somit konnte nachgewiesen werden, dass das RANK-RANKL-OPG-System auch im periimplantären Knochen Bestandteil wichtiger physiologischer und pathophysiologischer Regelmechanismen ist. Die Erforschung molekulärbiologischer Abläufe des periimplantären und regenerativen Knochengewebes zeigt zunehmend klinische Relevanz.

5.2 PTH-Wirkung auf Regenerationsprozesse

5.2.1 PTH-Wirkung auf die Frakturheilung

Auch im Bezug auf den Einfluss von PTH auf die Frakturheilung wurden positive Effekte beobachtet. In einem Tierversuch von Andreassen et al. (1999) zur Frakturheilung unter intermittierender PTH-Applikation zeigte sich unter 60 µg/kg täglich neben einer gesteigerten mechanischen Belastbarkeit auch eine Erhöhung des Kallusvolumens um 42 %, allerdings erst nach 40 Tagen. In einer weiteren großen Studie wurden 170 Ratten mit geschlossenen femoralen Frakturen über 21 bis 35 Tage eine Dosis von 5 oder 30 µg/kg PTH verabreicht und im Folgenden der Kallus auf Steifheit, Torsionsstärke, Mineralanteil, Knochendichte und Knorpelvolumen untersucht. Außer im Knorpelvolumen, welches signifikant verringert war, konnte bei allen analysierten Parametern ein signifikanter Anstieg in der PTH-behandelten Gruppe beobachtet werden (Alkhiary et al., 2005). Ähnliche Ergebnisse erzielten andere Versuchsgruppen bei der Untersuchung der Frakturheilung unter Einfluss von PTH (1-34) und PTH (1-84) an Ratten (Nozaka et al., 2008; Andreassen et al., 2004) und Affen (Manabe et al.,

2007). Eine aktuelle Studie beschäftigt sich sogar mit der Anwendung von PTH zur Verbesserung der Frakturheilung am Menschen. Hier wurden postmenopausale Frauen mit distalen Radiusfrakturen einer achtwöchigen PTH-Therapie (20 µg oder 40 µg) unterzogen. Im Folgenden wurde radiologisch die benötigte Zeit zur kortikalen Überbrückung des Frakturpaltes ermittelt. Interessanterweise zeigte sich zwar unter der Therapie mit 20 µg PTH eine Verkürzung der Zeitspanne, die zur Heilung benötigt wurde von 9,1 auf 7,4 Wochen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Unter der Therapie mit 40 µg PTH erwies sich die Wirkung mit 8,8 Wochen jedoch nicht als signifikant. Dennoch konnte anhand der PTH-Effekte bei 20 µg gezeigt werden, dass PTH in der Lage ist, auch beim Menschen die Frakturheilung zu verbessern (Aspberg et al., 2010). Ein anderer Versuch beschäftigte sich mit der Möglichkeit der PTH-Therapie zur Forcierung der Knochenneubildung nach Distraktionsosteogenese. Hier zeigte sich an Ratten, welche einer Femurverlängerung mittels Distraktionsosteogenese unterzogen wurden, nach der jeden zweiten Tag erfolgten Applikation von 60 µg/ kg PTH für einen Monat eine Steigerung der maximalen Kraftaufnahme (*ultimate load*), der Steifheit, des Kallusmineralanteils und der Knochendichte. In der Versuchsgruppe, in welcher die Distraktion in 20 Tagen und nicht in 40 Tagen erfolgte, zeigte sich außerdem eine Erhöhung des totalen Kallusvolumens (Seebach et al., 2004). Weiterhin konnte an Ratten beobachtet werden, dass PTH sogar an Stellen, an denen im Rahmen des Alterungsprozesses eine spärliche Trabekelstruktur vorliegt, die Neubildung von Spongiosabälkchen induziert wurde (Oxlund et al., 2002).

Diese Versuche belegen, neben der Potenz einer intermittierenden PTH-Applikation die Frakturheilung zu verbessern bzw. zu beschleunigen, auch deren positive Effekte auf das Kallusgewebe in Form einer vermehrten PTH-induzierten Kallusbildung oder durch Verbesserung der Kalluseigenschaften. Auch in unserem Versuch konnte bei den Tieren der PTH-Gruppe subjektiv vermehrte Kallusbildung beobachtet werden.

5.2.2 PTH-Wirkung auf die Implantatintegration

Die Primärstabilität durch die frühe Osteointegration in den periimplantären Knochen ist maßgeblich für die Standzeit und die langfristige Stabilität einer zementfreien Endoprothese (Kärrholm et al., 1994). Heutzutage ist die häufigste Ursache für Revisionsoperationen die aseptische Prothesenlockerung. In Schweden sind nach Sundfeldt et al. (2006) 2/3 aller Hüft-Revisionsoperationen und ca. 50 % aller Knie-Revisionsoperationen der aseptischen Prothesenlockerung geschuldet.

Da jede Implantation zunächst einen Knochendefekt mit sich bringt, kann die Implantatverankerung als Ergebnis einer Frakturheilung gesehen werden. Somit ist ihre Qualität abhängig von der Befähigung des umliegenden Knochens, über eine Frakturheilung und die Überbrückung der Lücke zwischen Knochen und Implantat die Integrationsarbeit zu leisten (Davies, 2003).

Durch mechanische und histomorphometrische Analysen konnte bereits in früheren Studien der positive Einfluss der osteoanabolen Wirkung von intermittierender PTH-Applikation auf die Knochenregeneration und somit auf die Implantatintegration gezeigt werden. In einer Tierversuchsreihe von Skripitz et al. (2000) wurde die anabole Wirkung von PTH auf den regenerierenden Knochen mittels Knochenkammerschrauben und sogenannter *Pull-out-Screws* an Ratten untersucht. Man analysierte histomorphometrisch nach 6-wöchiger täglicher Applikation verschiedener PTH-Dosen von 0, 15, 60 und 240 µg/kg die spongiöse Knochendichte des in die Knochenkammer eingewachsenen Materials. Es zeigte sich eine Erhöhung der Knochendichte beispielsweise auf 132 % bei den mit 60 µg/kg PTH behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren. Außerdem erkannte man neben einer nicht-signifikanten Steigerung der Einwachsdistanz in die Knochenkammer unter PTH auch einen linearen Zusammenhang zwischen Knochendichte und der logarithmierten PTH-Dosis (Skripitz et al., 2000). Die osteoanabole Wirkung einer intermittierenden systemischen Applikation von Parathormon äußert sich am gesamten Skelett. Dennoch zeigte sich in einem weiteren Versuch, dass sich der PTH-Einfluss stärker auf regenerierenden Knochen als auf ruhenden Knochen auswirkt. Hierbei wurde den Tieren dreimal wöchentlich über 2, 4 und 6 Wochen 60 µg/kg PTH verabreicht. Man beobachtete im Vergleich der Knochenproben aus den Kammern und den intakten Femora oder Wirbelkörpern eine besonders starke PTH-Wirkung auf den regenerierendem Knochen (Skripitz et al., 2000). Weiterhin konnte auch eine Steigerung der Implantatfixation durch PTH-Einfluss gezeigt werden, indem Ratten *Pull-out-Screws* implantiert wurden und nach 4-wöchiger Behandlung mit täglich 60 µg/kg PTH täglich die Torsions- und *Pull-out*-Kraft gemessen wurde, welche zum Entfernen der Implantate aufgewendet werden musste. Hierbei beobachtete man eine Erhöhung der aufzuwendenden Torsionskraft von 1,1 Ncm bei den Kontrolltieren und auf 3,5 Ncm bei den PTH-therapierten Tieren. Auch die *Pull-out*-Kraft steigerte sich von 66 auf 145 N (Skripitz und Aspenberg, 2001). In einem Folgeversuch, in welchem ebenfalls *Pull-out-Screws* implantiert wurden, konnte neben ebenfalls erhöhten Torsions- und *Pull-out*-Kraftaufwand histologisch gezeigt werden, dass schon nach 1-wöchiger PTH-Applikation eine signifikante Steigerung der Implantat-Knochen-Kontaktfläche

von 45 % auf 69 % zu verzeichnen war. Im Zuge dessen wurde die Hypothese aufgestellt, dass PTH schon die frühe Implantatintegration durch die Steigerung der Dichte des periimplantären Knochens und somit durch einen erhöhten Implantat-Knochen-Kontakt zu optimieren vermag (Skripitz und Aspenberg, 2001). In einem Vergleich der PTH-stimulierten Implantatintegration (60 µg/kg, dreimal wöchentlich) von Implantaten aus polymerem Methyl-Methacrylat (PMMA) und Stahlimplantaten konnte diese Annahme bei beiden Materialien durch die Steigerung der Knochenmasse unter Reduzierung von fibrösem Bindegewebe unmittelbar periimplantär histologisch bestätigt werden. Allerdings fiel die Implantat-Knochen-Kontaktfläche in der PMMA-Gruppe mit 65,6 % im Vergleich zur Stahlimplantat-Gruppe mit 47,1 % nach vier Wochen höher aus (Skripitz et al., 2005). Daugaard et al. (2011) zeigten in einer aktuellen Studie mittels Titanimplantaten einen positiven Einfluss von Parathormon (5 µg/kg täglich über vier Wochen) auf die Implantatfixation in Bereichen der mikroskopischen Zwischenräume der Implantat-Knochen-Kontaktfläche. In diesen Räumen zwischen Knochen und Implantat steigerte sich die Knochenmasse unter PTH-Applikation im Vergleich zum umliegenden Knochen besonders, was die mechanische Implantatfixation optimierte. Man untersuchte außerdem histologisch das Gewebe in der Lücke zwischen Implantat und intaktem Knochen. Hierbei beobachtete man in der PTH-Gruppe große Mengen unreifen Knochens in Form eines feinmaschigen Trabekelnetztes, in welchem die Trabekel im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl zahlreicher, als auch dicker und besser vernetzt erschienen. Dennoch waren die Spongiosabälkchen dünner, als die des umliegenden, intakten Knochengewebes (Daugaard et al., 2011). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass PTH durch die Ausbildung dickerer Trabekel unmittelbar periimplantär sogar in der Lage ist, die Implantatlockerung hinauszuschieben beziehungsweise dieser vorzubeugen (Gabet et al. 2010). Die vorteilhafte Wirkung von PTH auf die Implantatintegration wurde in weiteren tierexperimentellen Studien sowohl auf den intakten (Aspenberg et al., 2008; Mair et al., 2009), als auch auf den pathologischen Knochen beobachtet (Gabet et al., 2006; Ohkawa et al., 2008; Skripitz et al., 2009). Interessanterweise wurde in einem Versuch zur Verminderung der Implantatfixation nach Beendigung der PTH-Therapie (60 µg/kg täglich über fünf Wochen) gezeigt, dass der positive Effekt des PTH einerseits nach 16 Tagen verloren geht, aber andererseits diese Entwicklung durch die Verabreichung von Bisphosphonaten verhindert werden kann (Johansson et al., 2008).

Diese Versuche belegen eine zeit- und dosisabhängige Steigerung der Knochendichte des regenerierenden Knochens und damit die positive Wirkung einer intermittierenden PTH-Applikation auf die Implantatintegration. Es liegt der Schluss nahe, dass PTH eine vielversprechende therapeutische Möglichkeit zur Erhöhung der Primärstabilität und zur Optimierung der Implantatfixation sein könnte.

5.3 Erhöhung der RANK-Expression – mögliche Ursachen

Es fehlen vergleichbare Versuche, in welchen die Expression der Knochenmarker des RANK-RANKL-OPG-Systems in Kallusgewebe oder periimplantärem Knochen unter intermittierender PTH-Applikation analysiert wird. Aus diesem Grund fällt es schwer Daten zu finden, mit deren Hilfe sich die in dieser Arbeit erhöhte RANK-Expression in der PTH-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erklären ließe. In den erfolgten Studien werden vornehmlich in Ruhe befindliche Knochenareale untersucht. (Ma et al., 2001; Buxton et al, 2004; Silvestrini et al., 2007; Lee & Lorenzo, 1999). Es besteht demnach weiterer Forschungsbedarf über die molekularbiologischen Prozesse der Knochenregeneration und der Frakturheilung.

Generell ist die Hochregulierung der RANK-Expression im Vergleich zu anderen Studienergebnissen relativ ungewöhnlich. Den meisten Studien zufolge stellen OPG und RANKL die regulativen Momente des RANK-RANKL-OPG-Systems dar, wobei RANK als „Stellschraube“ nur relativ geringen Schwankungen in der Genexpression unterliegt (Lee & Lorenzo, 1999; Kearns et al., 2008). Aus diesem Grund wurde in einigen neueren Untersuchungen zur Expression der Knochenmarker anhand verschiedener Versuchsmodele lediglich die Expression der regulativen Knochenmarker RANKL und OPG analysiert und zum Teil gänzlich auf eine Bestimmung der RANK-Genexpression verzichtet, was wiederum einen Nachteil in der Datenlage verursacht. (Ma et al., 2001; Seck et al., 2001; Buxton et al., 2004; Silvestrini et al., 2007; Anastasilakis et al., 2008)

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Beeinflussung des RANK-Spiegels durch nicht untersuchte Faktoren anderer Regulationssysteme. Beispielsweise nimmt auch proresorptives IL-1 Einfluss auch die Genexpression von RANK und RANKL, indem es beide hochreguliert (Trouvin & Goëb, 2010). Aber auch 1,25-Dihydroxyvitamin D und Interferon γ sollen sich förderlich auch die Expression von RANK auswirken. Interessanterweise sind alle genannten Faktoren in der Lage, sowohl OPG und RANKL, als auch RANK hochzuregulieren. IL-4

dagegen wirkt sich nur auf RANK vermindernd aus (Kearns et al., 2008). Allerdings muss man erwähnen, dass schon frühe Versuche an RANK- und RANKL-knockout-Mäusen, welche den gleichen Phänotyp ausbilden, den Schluss nahe legen; dass RANK und RANKL außerhalb ihrer Interaktion miteinander, höchstens geringfügige andere stoffwechselrelevante Funktionen haben können (Trouvin & Goëb, 2010).

Auch kann die in der vorliegenden Arbeit quantifizierte RANK-RNS von vielen Zellarten exprimiert werden. Zu ihnen gehören neben den Osteoklasten und deren Vorläuferzellen auch Chondrozyten, Fibroblasten, Macrophagen und Endothelzellen (Kearns et al., 2008). Wobei die Wirkung einer RANKL-Bindung an RANK bei diesen Zellen sicher nicht eine Stimulation der Osteoklastogenese bewirken wird. Im Rahmen der Regeneration und der Kallusbildung, könnten aber all diese Zellen eine Rolle spielen und somit das vorliegende Ergebnis beeinflussen.

Ein weiterer Erklärungsversuch besteht darin, dass eine erhöhte RANK-Genexpression eventuell einen gesteigerten Knochenstoffwechsel anzeigen könnte. Da RANK zum größten Teil oberflächengebunden auf Osteoklasten exprimiert wird, könnte der gesteigerte Gehalt an RANK-RNS auch mit einer gesteigerten Anwesenheit von Osteoklasten in Verbindung gebracht werden. Die Stimulation, aus welcher eine höhere Anzahl an Osteoklasten resultieren könnte, könnte in der PTH-Applikation und den durch das Regenerationsgeschehen gesteigerten Knochenstoffwechsel bestehen. Durch diese beiden Stimuli könnte es zunächst über die anabole PTH-Wirkung zu einer Steigerung der Osteoblastenzahlen kommen. Zu den Effekten der intermittierenden PTH-Applikation, welche im ruhenden Knochen dazu beitragen, gehören: Die Förderung der Differenzierung und Proliferation von Osteoprogenitorzellen (Nakajima et al., 2002), die Steigerung der Aktivität der Osteoblasten (Dobnig et al., 1995), die Verzögerung der Apoptose reifer Osteoblasten (Jilka et al., 1999) und die Reaktivierung bereits ruhender Bone Lining Cells (Dobnig et al., 1995). Im Folgenden könnte durch die Osteoblasten über den in diesem Versuch abgebildeten RANKL-mRNS-Spiegel eine Stimulation der Osteoklastogenese stattfinden. Somit könnte die erhöhte RANK-Expression einen gesteigerten *bone-turnover* und Knochenstoffwechsel abbilden. Einen ähnlichen Gedankengang verfolgte auch die Studiengruppe Anastasilakis et al. (2008), indem sie in einem erhöhten RANKL-Level, wobei RANKL vor allem membrangebunden auf Osteoblasten exprimiert wird, einen Anhalt für gesteigerte Osteoblastenzahlen und einer Erhöhung der *turnover*-Rate sahen (Anastasilakis et al., 2008).

Zuletzt ist anzumerken, dass als Primer für RANKL, OPG und das *house-keeping* Gen GAPDH vorgefertigte sogenannte *Pre-Developed Taqman ® Assay Reagents* der Firma Applied Biosystems genutzt wurden. Von diesem Hersteller verwendeten wir in unserem Versuch

ebenfalls das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* für die reverse Transkription, der *TaqMan® Universal PCR Mastermix* und der *ABIPrism 7000 Cycler* für die Real-Time-PCR, sowie die *7000 System Sequence Detection Software* für deren Auswertung. Im Gegensatz dazu wurde der Primer für RANK in Ermangelung vorgefertigter Primer mit dem *Primer Design Tool* von NCBI selbst hergestellt. Wir können nicht ausschließen, dass auch dieser Umstand artifiziell Einfluss auf unsere Versuchsergebnisse gehabt haben könnte.

5.4 Alternative Signalwege des Knochenmetabolismus

Unter den zahlreichen beschriebenen Signalwegen, die Einfluss auf den Knochenstoffwechsel nehmen, ist das RANK-RANKL-OPG-System und dessen Stimulation über PTH der bedeutendste. Dennoch können zum heutigen Zeitpunkt nicht alle Stoffwechselprozesse über diesen Mechanismus erklärt werden, weshalb der Schluss naheliegt, dass auch alternative Signalwege Einfluss auf das RANK-RANKL-OPG-System und den Knochenmetabolismus nehmen könnten. Zum einen existiert der wnt/β-catenin-Signalweg, welcher als interzellulärer Mechanismus des Osteoblasten die Koordination der Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität ermöglicht. Er greift in die Knochenmasseregulation ein, indem er sich des RANK-RANKL-OPG-Regelkreises bedient (Glass et al., 2006; Holmen et al., 2005). Weiterhin gibt es Anhalt für einen RANKL-unabhängigen Mechanismus: Hierbei handelt es sich um ein Zytokinsystem, welches sich über IL-6 und IL-11 förderlich auf die Osteoklastogenese auswirkt und das Remodeling unterstützt (Kudo et al., 2003). Die Autoren Anastasilakis et al. (2008) zogen bei der Untersuchung der PTH-Wirkung auf die OPG- und RANKL-Serumwerte osteoporotischer Frauen in Betracht, dass der osteoanabole PTH-Effekt statt über das RANK-RANKL-OPG-System auch über andere Zytokinsysteme ausgeübt werden könnte, welche nicht, wie das RANK-RANKL-OPG-System die Osteoklastenaktivität, sondern die Aktivität der Osteoblasten regeln. Hierbei sahen die Autoren vor allem Zytokine wie den *insulin-like growth factor*-I und II (IGF-I und IGF-II) als mögliche Akteure. Man vermutete die Funktion von IGF-I als *Coupling*-Faktor, welcher beim Remodeling sowohl direkt formationsfördernd auf die Osteoblasten, als auch indirekt über das RANK-RANKL-OPG-System resorptionsfördernd auf die Osteoklasten wirkt (Anastasilakis et al., 2008; Rubin et al., 2002).

5.5 Mögliche Ursachen für den fehlenden PTH-Effekt auf die Stoffwechselmarker am regenerierenden/ periimplantären Knochen im Knochenkammermodell

Entgegen unserer Erwartungen konnte eine PTH-abhängige Veränderung der Genexpression der Knochenmarker nur bei RANK nach 6-wöchiger Versuchsphase festgestellt werden ($p = 0,031$). Es könnte verschiedene Ursachen für den nicht nachweisbaren Einfluss von PTH auf die anderen Knochenmarker geben, die im weiteren Verlauf diskutiert werden sollen:

5.5.1 Geschlecht

In unserer Studie wurden als Versuchstiere weibliche, nicht-ovarektomierte Ratten der Rasse Sprague Dawley gewählt. In anderen Versuchen, welche die Wirkung von PTH auf die Knochenmarker untersuchten, wurden vornehmlich männliche (Skripitz et al., 2000; Gunness et al., 2002) oder ovarektomierte, weibliche Ratten (Dobnig et al., 1995; Kim et al., 1999; Lane et al., 2003) genutzt. Nur in Ausnahmefällen wurden weibliche, nicht-ovarektomierte Tiere verwendet (Friedl et al., 2007). Hierin könnte eine mögliche Ursache für die fehlende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse anderer Versuchsgruppen im Knochenkammermodell zu finden sein. Die Wahl männlicher oder ovarektomierter, weiblicher Tiere erscheint insofern logisch, da hierdurch die Beeinflussung des Versuchs durch hormonelle Interferenzen durch Estrogen vermieden wird. Die osteoprotektive Wirkung von Estrogen begründet sich auf die Stimulation der osteoblastären OPG-Ausschüttung (Hofbauer et al., 1999b; Saika et al., 2001) und der Initiierung der Apoptose von Osteoklasten (Hughes et al., 1996). Des Weiteren beeinträchtigt Estrogen die RANK-Signalkette, wodurch es zu einer Inhibierung der Osteoklastendifferenzierung kommt (Shevede et al., 2000; Srivastava et al., 2001). In Zusammenschau dieser Faktoren muss man die Eignung der weiblichen, nicht-ovarektomierten Ratte als Versuchsobjekt zur Untersuchung von Knochenstoffwechselvorgängen in Frage stellen.

5.5.2 Einfluss mechanischer Belastung und Versuchsdauer auf die PTH-Wirkung

Es gibt weiterhin Anzeichen dafür, dass die Wirkung von PTH durch mechanische Belastung stimuliert wird. Ma et al. (1999) stellten bereits einen synergistischen Effekt von mechanischer Belastung und PTH-Einfluss auf die Wiederherstellung der kortikalen Knochenmasse nach Immobilitätsosteopenie bei Ratten fest (Ma et al., 1999). Sugiyama et al. (2008) zeigten mittels Mikro-Computertomographie an Mäusen, dass durch mechanische Stimuli unter intermittierender PTH-Applikation (20, 40 oder 80 µg/kg täglich über vier Wochen) in intaktem Knochen eine osteoanabole Reaktion ausgelöst werden kann. Da in unserem Modell eine Implantation an einer Lokalisation erfolgt, welche weder Gelenke oder andere, direkt krafttragende Bereiche einschließt, bleibt ein Teil der mechanischen Stimuli auf die Knochenformation und als Verstärker der PTH-Wirkung aus. Auch dies könnte Einfluss auf unsere Ergebnisse genommen haben. Auch muss die Versuchsdauer als mögliche Ursache für die fehlende PTH-Wirkung in Betracht gezogen werden. In einem Tierversuch von Andreassen et al. (1999) zur Frakturheilung unter intermittierender PTH-Applikation zeigte sich unter 60 µg/kg täglich neben einer gesteigerten mechanischen Belastbarkeit auch eine Erhöhung des Kallusvolumens um 42 %, allerdings erst nach 40 Tagen. Unsere längste Versuchsphase umfasste eine Dauer von 42 Tagen, was die Zeitspanne des PTH-Effektes möglicherweise nur zum Teil einschließt (Andreassen et al., 1999).

5.5.3 PTH-Wirkung auf verschiedene Knochenkompartimente

Ein Hindernis, um gültige Aussagen über Grundgesamtheit des regenerierenden Knochens zu machen, stellt der Umstand dar, dass sich in aktuellen Studien immer mehr abzeichnet, dass PTH neben seiner systemischen Wirkung auch feinregulatorische lokale Effekte im Metabolismus aufweist und dass verschiedene Knochenkompartimente und -regionen in unterschiedlichem Ausmaß auf die PTH-Applikation reagieren. Die Effekte des PTH-Einflusses zeigen, obwohl systemisch verabreicht, regionale Unterschiede.

Beispielsweise zeigt sich, wie bereits erwähnt, der anabole Effekt stärker am regenerierenden Knochen als am ruhenden Knochengewebe, was in einer tierexperimentellen Studie an Ratten gezeigt werden konnte (Skripitz et al., 2000). Es wurde zudem ein größeres Ausmaß der PTH-Wirkung auf die Spongiosa als auf die Kompakta beobachtet (Schiller et al., 1999; Andreassen et

al., 1999; Iida-Klein et al., 2002). Weiterhin scheinen sich die PTH-Effekte in verschiedenen Knochenkompartimenten bei gleicher Dosis unterschiedlich auszuwirken. An Mäusen wurde beobachtet, dass von der PTH-Wirkung in Form von Knochendichtheosteigerung, Kortikalsdicke und Trabekelanzahl Tibia und Femur sowohl in größerem Ausmaß, als auch nach kürzerer Zeit profitieren als die Lendenwirbelkörper. Auch eine erhöhte Genexpression von Osteocalcin, RANKL und *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP) konnte in Tibia und Femur beobachtet werden (Iida-Klein et al., 2002). Zusätzlich differiert die Antwort auf PTH zwischen Metaphyse und Epiphyse. Man nimmt an, dass dies unter anderem mit der unterschiedlichen Stoffwechselrate dieser beiden Knochenkompartimente zusammenhängen könnte, wobei die Metaphyse eine höhere Stoffwechselrate aufweist als der Kortexbereich oder die Epiphyse (Silvestrini et al., 2008). Onyia et al. (2000) stellten zudem in einem Versuch fest, dass Ratten, denen eine einmalige subkutane PTH-Injektion (1-38) (80 µg/kg) verabreicht wurde, im Vergleich zu unbehandelten Tieren eine dreimal höhere basale Expression von OPG mRNA in der Metaphyse als in der Diaphyse auswiesen. Die Autoren schlossen daraufhin auf ein unterschiedliches Potential der beiden Knochengewebe, die Osteoklastenformation zu unterstützen (Onyia et al., 2000). In einer Versuchsreihe der Gruppe Silvestrini et al. (2007a & 2008) wurde sogar zwischen der so genannten primären metaphysären und sekundären metaphysären Spongiosa differenziert und es konnten Unterschiede in der Expression der Knochenmarker RANKL und OPG beobachtet werden. Der Bereich, der zur primären Spongiosa zählt, umfasst den Abschnitt ca. 1 mm unterhalb des Knorpels der Wachstumsfuge, wobei die sekundäre Spongiosa sich in den 2 mm unmittelbar unter der primären Spongiosa befindet. In der erwähnten Versuchsreihe fanden sich interessanterweise gegensätzliche Tendenzen der RANKL- und OPG-Expression unter intermittierendem PTH-Einfluss: In der primären metaphysären Spongiosa verursachte PTH eine Steigerung der OPG-mRNA-Expression und eine Senkung der RANKL-mRNA-Expression während sich die OPG-Expression in der sekundären metaphysären Spongiosa verringerte und die RANKL-Expression stieg. Dennoch konnte in den erwähnten Versuchen kein Anhalt für einen differierenden PTH-Effekt im Bezug auf die Osteoklastogenese ausgemacht werden. Silvestrini et al. vermuteten als Hintergrund für den Umstand der unterschiedlichen Genexpression eine differierende Antwort auf hormonelle Einflüsse zwischen den beiden Spongiosakompartimenten aus Geflechtknochen (primäre Spongiosa) und Lamellenknochen (sekundäre Spongiosa). Das Vorliegen unterschiedlicher Stoffwechselprozesse (vorwiegend Modeling in der primären Spongiosa und größtenteils Remodeling in der sekundären metaphysären Spongiosa) wird neben einem verstärkten Effekt des PTH auf

Geflechtknochen als ursächlich angesehen (Silvestrini et al., 2007a; Silvestrini et al., 2008; Gorski 1998). Zudem zeigten sich interessanterweise in dem schon erwähnten Versuch von Daugaard et al. (2011) bei der Untersuchung des neu entstandenen Gewebes zwischen Implantat und intaktem Knochen bereits histologische Unterschiede zwischen regenerierendem Trabekelnetz und dem Trabekelnetz des intakten Knochens. Möglicherweise werden auch hier die Knochenmarker unterschiedlich exprimiert.

In unserer tierexperimentellen Studie wurden die Implantate in die hoch stoffwechselaktiven Regionen der proximalen Tibiametaphysen eingesetzt. In Anbetracht der zum Teil widersprüchlichen Untersuchungsergebnisse der erwähnten Studien ist anzumerken, dass bei der in dieser Arbeit entnommenen Proben des periimplantären Knochens weder möglich war, zwischen spongiösem und kortikalem Knochen, noch zwischen primärer oder sekundärer metaphysärer Spongiosa oder dem neu formierten Trabekelnetz unmittelbar um das Implantat zu differenzieren. Dieser Umstand könnte sich negativ auf die Aussagekraft der vorliegenden Ergebnisse auswirken. Zudem muss man bei diesem Versuch die Möglichkeit in Betracht ziehen, dass zwischen Implantat und Knochen eingewachsenes Bindegewebe eine eventuelle Instabilität des Implantats verdecken und zudem die Messergebnisse verfälschen könnte. Zusammenfassend muss in Betracht gezogen werden, dass in dieser Studie mögliche PTH-Effekte durch die Wahl des ausgewerteten Gewebes aufgehoben worden sein könnten.

5.5.4 Tiermodell Ratte und Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen

Die Ratte ist ein gängiges und viel genutztes Tiermodell zur Untersuchung von Sachverhalten, welche sich mit den Eigenschaften von Knochen und dessen Stoffwechsel beschäftigen. Weiterhin handelt es sich im verwendeten Versuchsaufbau um ein bereits erprobtes, tierexperimentelles Modell zur Simulation einer zementfreien Endoprothese (Skripitz et al., 2000; Skripitz et al., 2000; Aspenberg et al., 1996). Es wurde bereits in früheren Versuchen gezeigt, dass das humane PTH (1 -34) bei Ratten und diversen anderen Tiermodellen die gewünschte osteoanabole Wirkung zeigt. Zudem ist die Aminosäuresequenz des PTH interspezifisch hoch konserviert und weist in der biologisch aktiven Region (AS 1-38) einen Homologiegrad von ca. 95 % auf (Potts et al., 1982). In einer Publikation von Gunness et al.

(2002) wird die Möglichkeit einer alternierenden PTH-Wirkung in Abhängigkeit der Rasse der Ratten verneint (Gunness et al., 2002).

Dennoch muss erwähnt werden, dass gewisse Abstriche bezüglich der Übertragbarkeit auf den Menschen zu machen sind: Zum einen fällt der Ort der osteoanabolen Wirkung des PTH zwischen den Spezies unterschiedlich aus. Bei Gattungen wie den Primaten, aber auch anderen Tierarten (Kaninchen, Hund) mit einem osteonalen Remodeling mit intrakortikalen Haversschen Systemen wirkt PTH vor allem über eine Steigerung des *bone-turnovers* und über einen spongiösen Knochenumbau, wobei die kortikale Knochenmasse nur geringen Veränderungen unterliegt (Burr et al., 2001). Im Rattenmodell dagegen, bei dem kein osteonales Remodeling stattfindet (Hirano et al., 1999), verläuft der knochenaufbauende Effekt zumeist über appositionelles Knochenwachstum mit nur geringer spongiöser Beteiligung (Qi et al., 1995). Ejersted et al. (1997) zeigten weiterhin, dass bei Ratten der PTH-induzierte Knochenzuwachs vor allem endostal und peristal stattfindet. Da wir in unserem Versuch bei der Untersuchung des periimplantären Knochens sowohl kortikales, als auch spongiöses Material analysiert haben, lassen sich diese Effekte mit unseren Ergebnissen nicht differenzieren.

Unter den schon erwähnten Unterschieden in der Knochenphysiologie fällt besonders ins Gewicht, dass die Ratte nicht wie der Mensch über ein osteonales Remodeling verfügt und deren Skelett nicht in Osteonen und Haversschen Systemen organisiert ist (Hirano et al., 1999). In alternativen Tiermodellen wurden bereits Versuche an Beagles, Frettchen und Affen durchgeführt (Jerome et al., 1999; Mackey et al., 1995; Zhang et al., 1997). Als kleinstes Tiermodell zur Untersuchung des Einflusses von PTH auf den Knochenstoffwechsel bewährte sich bisher das Kaninchen, da es über intrakortikales Remodeling auf der Basis von Haversschen Systemen verfügt. Zudem beträgt dessen *Remodeling Phase* lediglich 70 Tage im Vergleich zu ca. 90 Tagen bei Hunden und Primaten, was das Kaninchen als Tiermodell attraktiv macht (Hirano et al., 1999). In einer aktuellen Studie von Daugaard et al. (2011) wurde zur Untersuchung der Implantatintegration-fördernden Wirkung von PTH mittels *gap-healing* erfolgreich ein canines Tiermodell angewandt (Daugaard et al.; 2011). Sowohl Daugaard et al. (2011), als auch weitere Autoren vertreten die Ansicht, dass die canine Knochenstruktur dem menschlichen Knochenaufbau am ähnlichsten (Aerssens et al., 1998) und demnach besonders zur Untersuchung der Implantatintegration geeignet ist (Daugaard et al., 2011). In Anbetracht der diversen stoffwechselphysiologischen Unterschiede könnten weitere Versuche an Tiermodellen mit osteonalen Remodeling für genauere Rückschlüsse auf die Wirkung des PTH auf die Knochenheilung und Implantatintegration des Menschen von Vorteil sein.

Am Menschen liegt das Hauptaugenmerk der bisherigen PTH-Studien zumeist bei der Osteoporosetherapie. Es existieren nur wenige Studien am Menschen zur Wirkung von PTH auf die Knochenmarker, Frakturheilung oder Implantatintegration. Einige wenige Studien jedoch zeigen auch hier vergleichbare Ergebnisse mit den *in vitro* und tierexperimentellen Studien. Wie bereits erwähnt untersuchten Aspenberg et al. (2010) die Wirkung einer täglichen 20 µg PTH-Applikation über acht Wochen an postmenopausalen Frauen mit einer distalen Radiusfraktur. Es zeigte sich, dass sich unter PTH-Therapie die Zeit bis zur vollständigen kortikalen Überbrückung des Frakturpaltes von 9,1 Wochen in der Kontrollgruppe auf 7,4 Wochen reduzierte, und dass PTH auch am Menschen eine frakturheilungsfördernde Wirkung ausübt (Aspenberg et al., 2010). Schlussendlich muss man die Eignung des Versuchs- bzw. Tiermodells der Ratte in diesem Zusammenhang in Frage stellen.

5.6 Steigerung der Genexpression der Knochenmarker in Abhängigkeit von der Versuchszeit

In unserer Studie ließ sich eine deutliche Steigerung der Expression aller Stoffwechselmarker im Vergleich von 3-wöchiger zu 6-wöchiger Versuchsphase nachweisen. Nach 3-wöchiger Standzeit ließen sich bei RANK, RANKL und OPG nur sehr niedrige Expressionslevel im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle feststellen ((MW±SEM: RANK: 4±1,1 % (NaCl), 2±0,7 % (PTH); RANKL: 1±0,2 % (NaCl), 1±0,3 % (PTH); OPG: 2±0,4 % (NaCl), 2±0,7 % (PTH))). Nach 6-wöchiger Versuchsphase jedoch steigerte sich bei allen Knochenmarkern das Expressionsniveau deutlich, wobei sich die Level von RANK und RANKL unter und von OPG über den Vergleichswerten der Kontrolltiere befanden ((MW±SEM: RANK: 30±6 % (NaCl), 52±6 % (PTH); RANKL: 39±13 % (NaCl), 54±8 % (PTH); OPG: 161±40 % (NaCl), 141±19 % (PTH))). In unserem Versuch zeigten sich bis auf bei RANK nach 6-wöchiger Versuchsphase ($p = 0,031$) keine PTH-bedingten Veränderungen der Genexpression der Knochenmarker. Aus diesem Grund, muss davon ausgegangen werden, dass die Expressionsveränderungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle allein auf den Einfluss der Knochenkammerschraube, bzw. durch folgende Umbau- und Heilungsprozesse zurückzuführen sind. Es gibt nur eingeschränkt Informationen über die besondere Stimulation der Knochenmarkerexpression im regenerierendem Knochengewebe.

Die niedrige Expression von RANK, RANKL und OPG nach drei Wochen könnte von fibrösem Kallusgewebe in dieser frühen Phase der Defektheilung herrühren, welches nicht im gleichen

Ausmaß die Knochenmarker exprimiert wie reifes Knochengewebe. Dagegen zeigt die gesteigerte Expression aller untersuchten Knochenmarker nach 6-wöchiger Versuchsphase möglicherweise ein Fortschreiten der Umbauvorgänge im Sinne einer Knochenneubildung an. In einem Versuch von Alkhiary et al. (2005) zur Frakturheilung unter PTH-Einfluss zeigte bei histologischen Untersuchungen an Tag 21 nach Fraktur eine Erhöhung des Knorpelanteils im Kallusgewebe, welcher nach Tag 35 wieder zurückging. Dies unterstützt unsere Vermutung dass, die gefundenen Expressionsveränderungen Umbauvorgänge anzeigen, da die Regenerationsprozesse, obgleich im erwähnten Versuch durch PTH beeinflusst, einen ähnlichen Zeitablauf aufzeigen dürften. Wenn die knochenaufbauenden Prozesse in unserem Versuch durch den ausbleibenden PTH-Effekt nicht sogar langsamer abliefen.

Weiterhin konnte in dieser Analyse beobachtet werden, dass die Expression von RANK und RANKL unterhalb und OPG oberhalb der Expressionslevel der Kontrolltiere lagen. Dies könnte gemäß der gängigen Theorie, dass vor allem das Verhältnis von OPG zu RANKL maßgeblich die Knochenstoffwechselvorgänge steuert (Lee & Lorenzo, 1999; Fazzalari et al., 2001; Ma et al., 2001; Grimaud et al., 2003), auf eine knochenaufbauende Stoffwechsellsage hindeuten.

In einer Tierversuchsstudie mit Mäusen wurde unter anderem die Expression der Knochenmarker RANKL, M-CSF und OPG im Kallusgewebe während einer Zeitspanne von 28 Tagen nach einer Tibiafraktur beobachtet. Im Knochengewebe fanden sich während der gesamten Heilungsphase erhöhte Level von OPG, wobei nach 24 Stunden und 7 Tagen eine besondere Expressionssteigerung beobachtet wurde. Im unfrakturiertem Knochen zeigte sich das OPG-Level konstant und unter dem Niveau des frakturierten Knochens. Die RANKL-Expression erfuhr bei einem geringen Expressionslevel in der Kontrollgruppe, ebenfalls eine Steigerung, wobei sich Höhepunkte nach 3 und 14 Tagen zeigten. Die M-CSF-Level folgten dem Expressionsprofil von RANKL, wobei sowohl im frakturierten als auch im unfrakturierten Knochen relativ hohe basale Expressionslevel nachgewiesen werden konnten. Parallel dazu wurden zu den einzelnen Zeitpunkten histologische Untersuchungen durchgeführt, welche zeigten, dass am Tag 3 nach Fraktur das OPG-Level fiel und die RANKL- und M-CSF-Expression stieg. Am Tag 7 zum Zeitpunkt des größten Knorpelaufbaus wiederum verringerte sich die Expression von RANKL und M-CSF, während sich die von OPG erhöhte. Zeitgleich zur Resorption von enchondralem Gewebe und zum Zeitpunkt steigender Osteoklastenzahlen kam es zu einer erneuten Steigerung des RANKL- und M-CSF-Levels und einer relativen Verringerung des OPG-Levels. Nach Abschluss der Resorption von kalzifiziertem Knorpel fielen die Level der RANKL und M-CSF-Expression und die des Knochenmarkers OPG wieder.

Autoren zogen den Schluss, dass die Expressionsprofile von RANKL, M-CSF und OPG während der Frakturheilung eng zusammenspielen und wichtige Funktionen bei der enchondralen Resorption und beim Bone-Remodeling ausüben (Kon et al., 2001). Korrespondierend zu diesen Ergebnissen zeigte sich auch in unserer Studie, nach niedrigen Expressionslevel aller Knochenmarker nach drei Wochen, nach 6-wöchiger Versuchsphase eine relative Steigerung der OPG-Expression bei einer niedrigen RANKL-Expression. Diese Ergebnisse sind bei eingeschränkter Vergleichbarkeit durch das verwendete Tiermodell Maus am ehesten mit dem im Versuch beschrieben Zeitpunkt nach 28 Tagen zu vergleichen. Angesichts dieser Ergebnisse liegt der Schluss nahe, dass in unserer Studie Expressionssteigerung von RANK, RANKL und OPG Ausdruck der physiologischen Umbau- und Heilungsprozesse ist.

Die Expression der Knochenmarker bzw. deren Veränderungen bei der physiologischen Frakturheilung, im periimplantären Gewebe oder beim pathophysiologischen Stoffwechsel im Zuge von Knochenerkrankungen hat bereits an klinischer Relevanz gewonnen. So beschäftigen sich einige Studiengruppen mit dem Zusammenhang von aseptischer Prothesenlockerung und der Expressionssteigerung von RANKL im periimplantären Gewebe (Crotti et al., 2004; Haynes et al., 2004). Eine andere Studie, welche den Zusammenhang der Knochenmarker RANKL und OPG und periimplantären Entzündungen untersuchte, fanden im periimplantären Bindegewebe gesunder Implantate die höchste Expression von OPG, wobei sich der Gehalt von RANKL mit der Schwere der Entzündung steigerte (Duarte et al., 2009). Das Wissen über die Expressionsveränderungen der Knochenmarker hat außerdem bereits zu Überlegungen geführt, wie diese in Zukunft zur Vorhersage von Frakturrisiken oder zum Monitoring von Frakturheilung und verschiedenen Knochenerkrankungen genutzt werden könnten (Dobnig et al., 2007; Wagner et al., 2010; Jørgensen et al., 2012). Ein weiterer Ansatzpunkt stellt die Möglichkeit dar über eine medikamentöse Behandlung in das RANK-RANKL-OPG-System einzugreifen und so Einfluss auf verschiedene Erkrankungen zu nehmen. Am weitesten fortgeschritten sind Überlegungen, welche sich mit dem humanen RANKL-Antikörper Denusomab beschäftigten. Behandlungsmöglichkeiten könnten sich hier bei der rheumatoïden Arthritis, bei der Osteoporose, bei Knochenmetastasen und beim multiplen Myelom ergeben (Kearns et al., 2008).

5.7 Methodische Überlegungen zum Einwachsverhalten

Da in fast in alle Knochenkammern nur wenig Knochenmaterial eingewachsen war, war dessen Menge nicht in allen Fällen ausreichend für eine molekularbiologische Auswertung. Aus diesem Grund entschieden wir uns, zusätzlich periimplantäres Knochengewebe inklusive des Kallus in die Analyse miteinzubeziehen. Unserer Ansicht nach liegen mögliche Gründe für das mangelnde Einwachsen in eventuell mangelhaften primären Implantationsverhältnissen bei einer zu geringen Größe der Tiere. Ein zusätzliches Trauma und eine geringere Heilungskapazität könnten so den Einwachsprozess verzögern. Eine weitere Fehlerquelle besteht möglicherweise in einer fehlenden integrationsfördernden Beschichtung der Knochenkammerschrauben. Allerdings besteht die implantierte Knochenkammerschraube aus reinem Titan, welches sich bereits vielfach sowohl als Material für Implantate in der tierexperimentellen Forschung als auch in der orthopädischen Chirurgie bewährt hat (Aspberg et al., 1996; Skripitz et al., 2000).

5.8 Altersabhängigkeit der PTH-Wirkung

Eine Studie von Friedl et al. (2007) legte den Schluss nahe, dass die Effekte von PTH auch einer altersabhängigen Komponente unterliegen. In dem Versuch wurde der spongiöse Knochen von Ratten in den Altersgruppen von 1, 3, und 13 Monaten nach einwöchiger PTH-Gabe sowohl histomorphometrisch, als auch im Hinblick auf die Genexpression von Kollagen I, Osteocalcin, Osteonektin, IGF-I und TGF- β und auf verschiedene den Knochenumsatz oder den Mineralstoffwechsel reflektierende Serumparameter untersucht. In allen Altersgruppen zeigte sich zwar eine schnelle Knochenmassezunahme, welche allerdings altersabhängig auf verschiedenen Mechanismen beruhte und sogar verschiedene Ausmaße aufwies. Bei den jüngeren Tieren überwog die Erhaltung neuer Knochentrabekel über die Steigerung der Osteoblastenaktivität. Bei den älteren Tieren jedoch erhöhte PTH die Anzahl der Osteoblasten, was sich besonders auf die Dicke der Spongiosatrabekel auswirkte und zur größten relativen Steigerung der oberflächenbezogenen Knochenbildungsraten aller Gruppen führte. Friedl et al. (2007) zogen daraufhin den Schluss, dass die altersbedingte Zunahme der ruhenden Knochenoberflächen mit Bone Lining Cells den PTH-Effekt in besonderer Weise unterstützt. In unserem Versuch ist die altersabhängige Einflussnahme von PTH als Fehlerquelle unwahrscheinlich, da Tiere von etwa gleichem Alter gewählt wurden.

5.9 Methodische Überlegungen zu Dosis und Dauer der PTH-Applikation

In Studien zur Wirkung von PTH auf die Frakturheilung wurden wirksame Dosen von 10 bis 200 µg/ kg/ KG verwendet. Darunter hat sich auch die in unserem Versuch verabreichte Dosis von 60 µg /kg /KG pro Tag bereits in zahlreichen Tierversuchsstudien an Ratten bei intermittierender Applikation als effektiv zur Steigerung der mechanischen Belastbarkeit, zur Erhöhung des Kallusvolumens und zur Verbesserung der Implantatintegration erwiesen (Andreassen et al., 1999; Skripitz et al., 2000; Skripitz et al., 2000; Skripitz et al., 2001; Skripitz et al., 2001; Skripitz und Aspenberg, 2001).

Dennoch ist zu bemerken, dass die in tierexperimentellen Studien verabreichten Dosen stets höher sind als die derzeit für die Osteoporosebehandlung zugelassene Tagesmaximaldosis von 20 µg Teriparatid (rhPTH 1-34) (Dachverband Osteologie e.V, 2009). In einer aktuellen Studie zu den Effekten von PTH auf die Frakturheilung am Menschen konnte allerdings bereits nachgewiesen werden, dass auch eine PTH-Dosis von 20 µg die Frakturheilung zu verbessern vermag (Aspenberg et al., 2010).

Auch der Zeitraum der PTH-Applikation von 21 - 42 Tagen hat sich bereits in mehreren Studien an Ratten als ausreichend zur Beobachtung der PTH-Effekte auf diverse Knochenparameter, Kallusformation oder Knochenmarker herausgestellt. In der Arbeit von Alkhairy et al. (2005) konnten am Tag 21 bereits Effekte an Kallussteifheit, Torsionskraft, Kallusmineralanteil und Knochendichte unter einer niedrigeren Dosis von 30 µg / kg /KG beobachtet werden (Alkhairy et al., 2005). In einem anderen Versuch zum Effekt von PTH (60 µg /kg / KG) auf die frühe Implantatverankerung konnte bereits nach einer Woche ein gesteigerter Implantat-Knochenkontakt und nach zwei Wochen eine zweifach gesteigerte *Pull-Out-Kraft* gezeigt werden (Skripitz und Aspenberg, 2001). Die anabolen Effekte der intermittierenden PTH-Applikation lassen sich sogar bereits nach kürzeren Zeitspannen beobachten. In einer Studie, in der die Wirkung der PTH-Applikation auf die Implantatintegration an Ratten untersucht wurde, konnten schon nach zwei Wochen unter Verabreichung von 60 µg/kg PTH (1-34) Effekte beobachtet werden. Bereits in diesem kurzen Zeitraum kam es zu einer Steigerung der Knochen-Implantat-Kontaktfläche (Skripitz et al., 2005).

In einem aktuellen Versuch zur Expression der Knochenmarker RANKL und OPG unter PTH und Glucocorticoiden der Gruppe Silvestrini et al. (2007) an Ratten wurde ebenfalls die gleiche Zeitspanne von 21 Tagen gewählt. Der Unterschied zu unserem Versuchsaufbau bestand darin,

dass bei ihnen dreimal wöchentlich 80 µg /kg hPTH verabreicht wurde (Silvestrini et al., 2007). Einschränkend ist zu bemerken, dass die Ergebnisse einiger Studien auch Anhalt für mögliche PTH-Effekte nach der Zeitspanne unseres Versuches geben. In dem bereits erwähnten Versuch von Alkhiary et al. (2005) zur Frakturheilung unter PTH-Einfluss wurde histologisch am 21. Tag nach Fraktur eine Erhöhung des Knorpelanteils im Kallusgewebe beobachtet, welcher nach Tag 35 wieder zurückging. Möglicherweise handelt es sich hierbei um den physiologischen Ablauf des Heilungsprozesses. Dies könnte allerdings das Ergebnis unserer Genexpressionsuntersuchung nach Euthanasie an Tag 21 beeinflusst haben.

Ein anderer Tierversuch von Andreassen et al. (1999) zur Frakturheilung unter intermittierender PTH-Applikation zeigte unter 60 µg/kg täglich neben einer gesteigerten mechanischen Belastbarkeit auch eine Erhöhung des Kallusvolumens um 42 %, allerdings erst nach 40 Tagen. Unsere längste Versuchsphase umfasste eine Dauer von 42 Tagen, was die Zeitspanne des PTH-Effektes möglicherweise nur zum Teil einschließt (Andreassen et al., 1999).

5.10 Unbedenklichkeit der PTH-Nutzung als Therapeutikum in der Humanmedizin

In einer toxikologisch-pathologischen Studie, in der 344 Ratten über zwei Jahre täglich Dosen von 0 bis 75 µg/kg verabreicht wurden, konnte neben den erwarteten Effekten einer gesteigerten Knochenmasse auch ein erhöhtes Auftreten von Osteosarkomen beobachtet werden. Die Ergebnisse begründete man mit der langen Applikationsdauer, die ungefähr 80 - 90 % der Lebensspanne einer Ratte beträgt und nicht wie beim Menschen 2 - 3 %. Weiterhin durchläuft das Rattenskelett statt etwa ein bis drei *turnover*-Zyklen in einem entsprechenden Zeitraum ca. 25 bis 30 (Vahle et al., 2002). Bei den Versuchsergebnissen spielen außerdem die bereits erwähnten Unterschiede in der Knochenphysiologie und das fehlende osteonale Remodeling eine Rolle (Hirano et al., 1999). Zudem hält das Längenwachstum des Rattenknochens aufgrund von dauerhaft bestehenden Wachstumsfugen ein Leben lang an. Vorversuche zur hormonellen Stimulation am Rattentiermodell zeigten weiterhin die Tendenz, dass Ratten unter chronischer Hormonstimulation in einem höheren Ausmaß als der Mensch zu Hyperplasien und unkontrollierter Proliferationsaktivität neigen. Auch in dem bereits beschriebenen Versuch wurde eine überschießende skelettale Reaktion beobachtet, welche die Steigerung der Inzidenz für Knochenmalignome begünstigt. Aufgrund dieser Abstriche in der Übertragbarkeit auf den

Menschen bewertete man die Ergebnisse als nicht prädiktiv für ein erhöhtes Knochenmalignomrisiko für die zeitlich begrenzte Anwendung von PTH zur Osteoporosebehandlung am reifen menschlichen Skelett (Vahle et al., 2002). In einer Stellungnahme der *American Society for Bone and Mineral Research* aus dem Jahr 2002 zur klinischen Sicherheit der Verwendung von PTH zur Osteoporosetherapie scheint in Anbetracht der erheblichen Auswirkungen der Osteoporose auf Morbidität und Mortalität die Verwendung von PTH als potentes Therapeutikum gerechtfertigt. Dennoch wird eine genaue Beobachtung im Hinblick auf einen Anstieg der Inzidenz von Knochentumoren empfohlen (Tashjian & Chabner, 2002).

5.11 Folgeversuch

Aufgrund der in der erwähnten Defizite der Tiermodells der Sprague Dawley Ratte könnten in Folgeversuchen ein anderes Tiermodell Anwendung finden. Eine Anzahl von Studien legt nahe, dass das Mausmodell eine vielversprechende Alternative für die Untersuchung anaboler Wirkstoffe auf molekularer Ebene darstellt (Iida-Klein et al., 2002) und auch für die RNA-Isolation aus dem Knochen geeignet ist (Iida-Klein et al., 2002; Alford et al., 2012). Des Weiteren ist humanes PTH (1-34) in Mäusen anwendbar (Xie et al., 2012, Iida-Klein et al., 2012) und der Femur der Maus hat sich bereits in verschiedenen Versuchen als Frakturmodell bewährt (Holstein et al., 2009; Garcia et al., 2008). Außerdem sollte dem Umstand der Verstärkung der PTH-Wirkung durch mechanische Belastung Rechnung getragen werden. Hierfür könnten Untersuchungen zur Implantatintegration kombiniert mit Laufbandtraining und PTH-Applikation erfolgen. Neben den Genexpressionsanalysen von RANK, RANKL und OPG wäre die Analyse weiterer knochenaufbauender Marker wie Kollagen 1, Alkalische Phosphatase und Osteocalcin interessant. Außerdem könnte durch μ CT Analysen und histologischen Untersuchungen die Implantatintegration untersucht werden.

Weitere Vorschläge, um den Versuchsaufbau zu optimieren und die Aussagekraft der Ergebnisse zu steigern, könnten zum Beispiel den Einsatz eines zweiten *house-keeping*-Genes beinhalten. Obwohl sich das von uns verwendete *house-keeping* Gen GAPDH bereits in mehreren Studien als geeignet erwiesen hat (Silvestrini et al., 2007a; Silverstini et al., 2008; Duarte et al., 2009) könnte die Wahl eines zweiten *house-keeping*-Genes zur Verringerung der Streuungsbreite und zur besseren statistischen Auswertung beitragen.

Von verschiedenen Autoren wird zudem die Auffassung vertreten, dass die Möglichkeit besteht, dass Osteoklasten und deren Vorläuferzellen auch andere Faktoren sezernieren, um beispielsweise über Immunzellen oder andere spezialisierte Zellen Einfluss auf Knochenumsatz oder Knochenvolumen nehmen (Boyce und Xing; 2007). Es könnte also vielversprechend sein, noch andere Faktoren zur Untersuchung ihrer Genexpression unter PTH-Applikation miteinzubeziehen. Ein Beispiel hierfür wäre IGF-I als möglicher *Coupling*-Faktor (Anastasilakis et al., 2008; Rubin et al., 2002). In einer Versuchsreihe zur Untersuchung der Genexpression der Knochenmarker RANKL und OPG im Knochen unter PTH-Applikation, die vom Aufbau dem unseren sehr ähnlich sind, wurde ebenfalls erfolgreich die gleiche Methode der Knochenmaterialzerkleinerung mittels Porzellanmörser angewandt (Silvestrini et al., 2007a; Silverstini et al., 2008). Dennoch könnte die Verwendung eines Homogenisators zur feineren und standardisierten Zerkleinerung des Knochenmaterials eventuell nützlich sein. Aufgrund des Auftretens zu hoher Scherkräfte und Erwärmung ist die Verwendung nur in kurzen Intervallen zulässig. Dieser Grund macht auch kaltes Arbeiten unbedingt erforderlich.

5.12 Schlussfolgerung und Ausblick

In unserem tierexperimentellen Modell konnte gezeigt werden, dass die Knochenregeneration des periimplantären Knochens auf Genexpressionsebene bestimmt werden kann. Das geringe Expressionsniveau der Knochenparameter nach 3-wöchiger Versuchsphase könnte auf fibröses Kallusgewebe zu diesem frühen Zeitpunkt der Regenerationsphase hindeuten. Nach 6 Wochen ließen sich deutliche Umbauvorgänge im Sinne einer Knochenneubildung durch die gesteigerte Expression aller Knochenmarker erkennen. Hierbei weist besonders die gesteigerte OPG-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf eine lokale, osteoanabole Stoffwechselveränderung hin. In unserer Studie zeigte sich ebenfalls das Prinzip, bei dem nach gängiger Auffassung vor allem das Verhältnis von OPG zu RANKL den Schlüssel zur Regulation der Knochenresorption darstellt (Lee & Lorenzo, 1999; Fazzalari et al., 2001; Ma et al., 2001; Grimaud et al., 2003). Dennoch können zum heutigen Zeitpunkt nicht alle Stoffwechselprozesse über diesen Mechanismus erklärt werden, weshalb der Schluss naheliegt, dass auch alternative Signalwege Einfluss auf das RANK-RANKL-OPG-System und den Knochenmetabolismus nehmen könnten. Dieser Umstand sollte Gegenstand zukünftiger Forschung sein. Die Eigenschaft von PTH, die Implantatintegration und Frakturheilung zu fördern, zeigte sich in unserem Versuch in Form eines makroskopisch erhöhten Kallusvolumens.

Trotz der Expressionsunterschiede zwischen den Zeitpunkten konnten in unserem Versuch keine Expressionsunterschiede zwischen den beiden Applikationsformen (NaCl vs. PTH) nachgewiesen werden. In Anbetracht des nicht nachweisbaren Effekts von intermittierend applizierten, humanem PTH auf die Expression der untersuchten Knochenmarker muss die Eignung des Versuchs- bzw. Tiermodells der weiblichen Sprague Dawley Ratte in diesem Kontext in Frage gestellt werden. Des Weiteren müssen alternative Signalwege und die Möglichkeit differenzierender PTH-Effekte in verschiedenen Knochenkompartimenten in Betracht gezogen werden.

Trotz der Defizite unseres Tiermodells, lässt sich aufgrund der Quellenlage zusammenfassen, dass PTH neben der Kapazität als effektives Osteoporosetherapeutikum auch eine vielversprechende therapeutische Möglichkeit zur Behandlung von Frakturen darstellt und zur Optimierung der Implantatintegration und somit zur Erhöhung der Implantatstandzeiten beitragen könnte. Bereits im Jahr 2003 erfolgte in Deutschland die Zulassung von Teriparatid (PTH (1-34)) zur Therapie schwerer Osteoporose, nachdem eine Vielzahl an Studien seine Wirksamkeit bewiesen hatten (Neer et al., 2001; Cosman et al., 2001; Black et al., 2003; Hodsman et al., 2005; Finkelstein et al., 2006). Die Behandlung mit PTH zur Verbesserung von Frakturen und Implantaten befindet sich in der klinischen Erprobung, zum Teil sogar bereits am Menschen (Aspberg et al., 2010). Aus diesem Grund ist die weitere Forschung auf diesem Gebiet weiterhin vielversprechend. Die Erfahrungen aus dieser Studie werden in die Planung eines Folgeversuches eingehen.

6. Zusammenfassung

Der Wirkmechanismus der anabolen PTH-Effekte bei intermittierender Gabe ist noch nicht vollständig verstanden und noch Gegenstand aktuellen Forschung. Zwar existieren Betrachtungen zur PTH-Wirkung auf die Implantatintegration oder Frakturheilung, genauso wie Studien zur Auswirkung einer intermittierenden Applikation auf die Expression der Knochenmarker RANK, RANKL und OPG in gesunden oder osteoporotischen Knochen. Dennoch gibt es nur sehr geringfügige Informationen über die Auswirkung von intermittierend verabreichtem PTH im Hinblick auf die Genexpression der Knochenmarker im regenerierenden und durch PTH im Besonderen stimulierten Gewebe. Die Studien, welche sich mit dem unterschiedlichen Vorkommen der Knochenmarker OPG, RANK und RANKL in periimplantären Bereichen beschäftigen, richten ihr Hauptaugenmerk zumeist auf deren Rolle bei periimplantären Entzündungen und der aseptischen Prothesenlockerung.

In der vorliegenden Studie sollte anhand des Knochenkammer-Modells die Expression der Knochenmarker RANK, RANKL und OPG unter intermittierender PTH-Applikation (60 µg /kg KG täglich) über drei bzw. sechs Wochen im regenerierenden, periimplantären Knochen an weiblichen Sprague Dawley-Ratten untersucht werden. Hierzu wurden 48 Tiere in zwei Versuchsgruppen aufgeteilt und jedem je eine Knochenkammer in beide Tibiametaphysen implantiert. In Folgendem wurden den Tieren gewichtsadaptiert 60 µg/kg KG PTH in der Versuchsgruppe und ein äquivalentes Volumen an physiologischer Kochsalzlösung in der Kontrollgruppe verabreicht. Nach 21 bzw 42 Tagen erfolgte die Euthanasie und die Explantation der Knochenkammern, sowie die beidseitige Entnahme des periimplantären Knochenmaterials inklusive des Kallusgewebes. Zu jedem Versuchszeitpunkt wurden je zwei zusätzliche Tiere als unbehandelte Kontrolle gewählt. Aus dem umliegenden Gewebe von insgesamt 42 der implantierten Knochenkammern wurde erfolgreich die RNS isoliert und mittels PCR-Analyse auf die Genexpression der Knochenmarker OPG, RANK und RANKL untersucht. Nach 3-wöchiger Versuchsphase zeigte sich nur ein geringes Expressionsniveau aller untersuchten Knochenmarker. Dagegen ließen sich nach 6 Wochen eine Expressionssteigerung von RANK, RANKL und OPG nachweisen. Hierbei lag das Expressionslevel von RANK und RANKL unterhalb und das OPG-Level oberhalb des Levels der unbehandelten Kontrolle. Ein signifikanter Unterschied zwischen der PTH- und der NaCl-Applikation bestand nur in der RANK-Expression.

Es gelang uns das erwähnte Knochenkammer-Modell an der Universitätsmedizin Rostock zu etablieren und es für die Analyse periimplantärer Genexpression zu modifizieren.

Des Weiteren sind die Expressionsunterschiede zwischen den Zeitpunkten wahrscheinlich als Abbild der ablaufenden osteoanabolen Stoffwechselvorgänge zu werten. In unserem Versuch konnte ebenfalls die Annahme einer Regulation des Knochenmetabolismus durch Verhältnisänderungen von RANKL zu OPG (Lee & Lorenzo, 1999; Fazzalari et al., 2001; Ma et al., 2001; Grimaud et al., 2003) bestätigt werden. Zudem zeigte sich analog zu Studien, welche die Förderung der Frakturheilung durch PTH betrachteten, ebenfalls makroskopisch ein gesteigertes Kallusvolumen. Allerdings muss aufgrund der nicht nachweisbaren Wirkung von intermittierend appliziertem, humanen PTH auf die untersuchten Knochenmarker die Eignung des Versuchs- bzw. Tiermodells der weiblichen Sprague Dawley Ratte in diesem Kontext in Frage gestellt werden. Des Weiteren müssen alternative Signalwege und die Möglichkeit differenzierender PTH-Effekte in verschiedenen Knochenkompartimenten in Betracht gezogen werden.

Trotz der Defizite unseres Tiermodells, lässt sich aufgrund der Quellenlage zusammenfassen, dass PTH neben der Kapazität als effektives Osteoporosetherapeutikum auch eine vielversprechende therapeutische Möglichkeit zur Behandlung von Frakturen darstellt und zur Optimierung der Implantatintegration und somit zur Erhöhung der Implantatstandzeiten beitragen könnte. Aus diesem Grund ist die weitere Forschung auf diesem Gebiet weiterhin vielversprechend. Die Erfahrungen aus dieser Studie werden in die Planung eines Folgeversuches eingehen.

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Differenzierung der Knochenzellen.....	8
Abb. 2: Bone-Remodeling.....	13
Abb. 3: Regulatorische Mechanismen des RANK-RANKL-OPG-Systems im Bone-Remodeling.....	16
Abb. 4: Das Prä-Pro-PTH-Gen und die Prozessierung seines Transkriptions- und Translationsproduktes.....	20
Abb. 5 Schematische Darstellung der Knochenkammerschraube	33
Abb. 6: Arbeitsplatz und OP-Material.....	34
Abb. 7: Knochenkammer in Tibia eingebracht.....	36
Abb. 8: Implantation der Knochenkammerschraube.....	36
Abb. 9: implantierte Knochenkammerschraube.....	37
Abb. 10: schematische Ansicht und Röntgenaufnahme der implantierten Knochenkammerschraube.....	37
Abb. 11: Schematische Darstellung der quantitativen Echtzeit-PCR.....	42
Abb. 12: Gewichtsverlauf der Versuchsgruppen aufgegliedert nach PTH- und NaCl-Gabe Im Vergleich.....	46
Abb. 13: stabile Implantationsverhältnisse vor Explantation.....	47
Abb. 14: fest verankerte Titanknochenkammer vor Probenentnahme.....	47
Abb.15: Real-Time-PCR-Kurve des Tieres 21 zur Quantifizierung der Expression von RANKL.....	49
Abb. 16: Real-Time-PCR-Kurve der Tiere 15 bis 24 zur Quantifizierung der Expression von RANKL.....	49
Abb. 17: Expression von RANK, RANKL und OPG nach intermittierender PTH- und NaCl-Gabe im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.....	50

8. Tabellenverzeichnis

Tab.1: Regulatoren der Expression von RANK, RANKL und OPG.....	19
Tab.2: Vorkommen von Rezeptoren für PTH.....	22

9. Abkürzungsverzeichnis

$1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$	1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ , Calcitrol,
Δ	Delta
%	Prozent
K	Kappa
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BCC	<i>Bone-Conduction-Chamber</i>
BMP-2	<i>Bone Morphogenetic Protein 2</i>
BMU	<i>Bone multicellular Units</i>
C°	Grad Celsius
ca.	circa
Ca^{2+}	Kalzium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cbfa1	<i>C-modul binding faktor A1</i>
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
c-fos	Proto-Onkogen, Mitglied der <i>Immediate Early Response Genes</i> und Transkriptionsfaktor
CFU-M	<i>Colony Forming Unit Megakaryocyte</i>
c-jun	Proto-Onkogen, Mitglied der <i>Immediate Early Response Genes</i> und Transkriptionsfaktor
c-myc	Proto-Onkogen, Mitglied der <i>Immediate Early Response Genes</i> und Transkriptionsfaktor
Co.	Copagnie
COO^-	Carboxyl-Gruppe
cm^2	Quadratzentimeter
cm^3	Kubikzentimeter
CT	Computertomographie
C_T	<i>Threshold Cycle</i>
C-terminal	Carboxy-Ende einer Aminosäure
C-Zellen	parafollikuläre Zellen der Schilddrüse, produzieren Calcitonin
d	Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
Dr.	Doktor
DVO	Dachverband Osteologie e.V.

E ₁	Exon 1
E ₂	Exon 2
E ₃	Exon 3
EP 2	Prostaglandin E-Rezeptor 2
EP 4	Prostaglandin E-Rezeptor 4
et al.	et alii
FGF-2	<i>fibroblast growth factor-2</i>
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gp130	Glykoprotein 130, Erstbeschreibung als „Interleukin-6-Signal-Transducer“
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein, GTP-bindendes Protein
H ⁺	Wasserstoff
hPTH	humanes parathyroidales Hormon
hsCRP	hochsensitives C-reaktives Protein
I ₁	Intron 1
I ₂	Intron 2
I.E.	internationale Einheiten
IFN	Interferon
IFN- γ	Interferon γ
IGF-1	<i>Insulin like growth factor-1</i>
IGF-BP 4	<i>Insulin like growth factor-binding protein 4</i>
IL	Interleukin
IL-1	Interleukin 1
IL-1	Interleukin 1 β
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
IL-7	Interleukin 7
IL-11	Interleukin 11
IL-13	Interleukin 13
IL-16	Interleukin 16
IL-17	Interleukin 17
i.m.	intramuskulär
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LEPS	<i>Lower Extremity Pain Syndrome</i>
LPS	Lipopolysaccharid
μ	Mikro-
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
m ²	Quadratmeter
max.	maximal
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
mg	Milligramm
min.	Minuten
ml	Milliliter

mm	Millimeter
mmol	Millimol
Mrd.	Milliarden
mRNS	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
N ₂	Stickstoff
N ₂ H ⁺	Amino-Gruppe
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	<i>National Institute for Biotechnology Information</i>
NFAT-c1	<i>Nuclear factor of activated T-cells 1</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor-κB</i>
ng	Nanogramm
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
nm	<i>Nanometert</i>
N-terminal	Amino-Ende einer Amonisäure
OP	Operation
OPG	Osteoprotegerin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PGE-2	Prostaglandin E2
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PKA	Proteinkinase A
PTH	Parathyroidales Hormon, Parathormon
PTH1R	PTH1-Rezeptor
PTH2R	PTH2-Rezeptor
PTH3R	PTH3-Rezeptor
PTHrP	<i>Parathyroid hormone-related protein</i>
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor-κB</i>
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor-κB ligand</i>
Real-Time-PCR	<i>Real-Time-Polymerase chain reaction</i>
rhPTH	<i>recombinant human parathyroid hormone</i>
RLT-Puffer	Puffer zur RNA-Isolation, enthält Guanidinthiocyanat
Rn	<i>normalized Reporter</i>
RNase.....	Ribonukleasen, hydrolysieren Ribonukleinsäuren
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT-PCR	<i>RT (Reverse Transkriptase)-Polymerase chain reaction</i>
S.	Seite
s.c.	subcutan
SEM	standard error of the mean
SDS	<i>Sequence Detection System</i>
sec	Sekunde
SERM	<i>Selective Estrogen Receptor Modulator</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
sRANKL	<i>soluble</i> RANKL
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TGF-β	<i>Tumor Growth Factor β</i>

TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TRAF 6	<i>TNF-receptor associated factor 6</i>
T-Wert	Abweichung eines Messwertes in Standardabweichungen vom Mittelwert der durchschnittlichen maximalen Knochendichte gemessen im Alter zwischen 20 und 30 Jahren
USA	<i>United States of America</i>
UV-B	Ultraviolettstrahlung, Wellenlängenbereich 280 - 315 nm
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
Vitamin D ₃	Cholecalciferol
Vitamin B12	Cyanocobalamin
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
WHI	<i>Women's Health Initiative Study</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
Wnt-Signalweg	Signaltransduktionsweg, benannt nach dem Liganden Wnt
X-Achse	Abszissenachse
Y-Achse	Ordinatenachse
z.B.	zum Beispiel

10. Literaturverzeichnis

- [No authors listed] Proposed standard nomenclature for new tumor necrosis factor members involved in the regulation of bone resorption. The American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature. *Bone*. 2000; 27(6):761-4.
- Aerssens J., Boonen S., Lowet G., Dequeker J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology*. 1998; 139(2):663-70.
- Aguirre J.I., Plotkin L.I., Stewart .SA., Weinstein R.S., Parfitt A.M., Manolagas S.C., Bellido T. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J Bone Miner Res*. 2006; 21(4):605-15. Epub 2006 Apr 5.
- Alford A.I., Reddy A.B., Goldstein S.A., Murthy P., Tayim R., Sharma G. Two molecular weight species of thrombospondin-2 are present in bone and differentially modulated in fractured and nonfractured tibiae in a murine model of bone healing. *Calcif Tissue Int*. 2012 May;90 (5):420-8. doi: 10.1007/s00223-012-9580-y. Epub 2012 Feb 24.
- Alkhiary Y.M., Gerstenfeld L.C., Krall E., Westmore M., Sato M., Mitlak B.H., Einhorn T.A. Enhancement of experimental fracture-healing by systemic administration of recombinant human parathyroid hormone (PTH 1-34). *J Bone Joint Surg Am*. 2005; 87(4):731-41.
- Anastasilakis A.D., Goulis D.G., Polyzos S.A., Gerou S., Pavlidou V., Koukoulis G., Avramidis A. Acute changes in serum osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor-kappaB ligand levels in women with established osteoporosis treated with teriparatide. *Eur J Endocrinol*. 2008; 158(3):411-5.
- Anderson D.M., Maraskovsky E., Billingsley W.L., Dougall W.C., Tometsko M.E., Roux E.R., Teepe M.C., DuBose R.F., Cosman D., Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. 1997; 390(6656):175-9.
- Andreassen T.T., Ejerslev C., Oxlund H. Intermittent parathyroid hormone (1-34) treatment increases callus formation and mechanical strength of healing rat fractures. *J Bone Miner Res*. 1999; 14(6):960-8.

- Andreassen T.T., Willick G.E., Morley P., Whitfield J.F. Treatment with parathyroid hormone hPTH(1-34), hPTH(1-31), and monocyclic hPTH(1-31) enhances fracture strength and callus amount after withdrawal fracture strength and callus mechanical quality continue to increase. *Calcif Tissue Int.* 2004; 74(4):351-6.
- Andresen C.J., Moalli M., Turner C.H., Berryman E., Pero R., Bagi C.M. Bone parameters are improved with intermittent dosing of vitamin D3 and calcitonin. *Calcif Tissue Int.* 2008; 83(6):393-403. Epub 2008 Nov 18.
- Arai F., Miyamoto T., Ohneda O., Inada T., Sudo T., Brasel K., Miyata T., Anderson D.M., Suda T. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *J Exp Med.* 1999; 190(12):1741-54.
- Aspenberg P., Genant H.K., Johansson T., Nino A.J., See K., Krohn K., García-Hernández P.A., Recknor C.P., Einhorn T.A., Dalsky G.P., Mitlak B.H., Fierlinger A., Lakshmanan M.C. Teriparatide for acceleration of fracture repair in humans: a prospective, randomized, double-blind study of 102 postmenopausal women with distal radial fractures. *J Bone Miner Res.* 2010; 25(2):404-14.
- Aspenberg P., Jeppsson C., Wang J.S., Boström M. Transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein 2 for bone ingrowth: a comparison using bone chambers in rats. *Bone.* 1996; 19(5):499-503.
- Aspenberg P., Tägil M., Kristensson C., Lidin S. Bone graft proteins influence osteoconduction. A titanium chamber study in rats. *Acta Orthop Scand.* 1996; 67(4):377-82.
- Aspenberg P., Van der Vis H. Migration, particles, and fluid pressure. A discussion of causes of prosthetic loosening. *Clin Orthop Relat Res.* 1998; (352):75-80.
- Aspenberg P., Wermelin K., Tengwall P., Fahlgren A. Additive effects of PTH and bisphosphonates on the bone healing response to metaphyseal implants in rats. *Acta Orthop.* 2008; 79(1):111-5.
- Bartl R., Osteoporose: Prävention-Diagnose-Therapie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2008 (3. Auflage)
- Bellido T., Ali A.A., Gubrij I., Plotkin L.I., Fu Q., O'Brien C.A., Manolagas S.C., Jilka R.L. Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology.* 2005; 146(11):4577-83. Epub 2005 Aug 4.

- Bellido T., Ali A.A., Plotkin L.I., Fu Q., Gubrij I., Roberson P.K., Weinstein R.S., O'Brien C.A., Manolagas S.C., Jilka R.L. Proteasomal degradation of Runx2 shortens parathyroid hormone-induced anti-apoptotic signaling in osteoblasts. A putative explanation for why intermittent administration is needed for bone anabolism. *J Biol Chem.* 2003; 278(50):50259-72. Epub 2003 Oct 1.
- Black D.M., Greenspan S.L., Ensrud K.E., Palermo L., McGowan J.A., Lang T.F., Garnero P., Bouxsein M.L., Bilezikian J.P., Rosen C.J.; PaTH Study Investigators. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med.* 2003; 349(13):1207-15. Epub 2003 Sep 20.
- Brändström H., Jonsson K.B., Ohlsson C., Vidal O., Ljunghall S., Ljunggren O. Regulation of osteoprotegerin mRNA levels by prostaglandin E2 in human bone marrow stroma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 247(2):338-41.
- Brent G.A., LeBoff M.S., Seely E.W., Conlin P.R., Brown E.M. Relationship between the concentration and rate of change of calcium and serum intact parathyroid hormone levels in normal humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988; 67(5):944-50.
- Bubeck D., Der Einfluss von Hydrocortison Parathormon und 17 b-Estradiol auf die Collagen Typ I Synthese humaner Osteoblasten von Patienten mit postmenopausaler Osteoporose und Kontrollen. Dissertation, Universität Ulm 1994.
- Burr D.B., Hirano T., Turner C.H., Hotchkiss C., Brommage R., Hock J.M. Intermittently administered human parathyroid hormone(1-34) treatment increases intracortical bone turnover and porosity without reducing bone strength in the humerus of ovariectomized cynomolgus monkeys. *J Bone Miner Res.* 2001; 16(1):157-65.
- Buxton E.C., Yao W., Lane N.E. Changes in serum receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand, osteoprotegerin, and interleukin-6 levels in patients with glucocorticoid-induced osteoporosis treated with human parathyroid hormone (1-34). *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(7):3332-6.
- Canalis E., Centrella M., Burch W., McCarthy T.L.. Insulin-like growth factor I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. *J Clin Invest.* 1989; 83(1):60-5.
- Chagraoui H., Tulliez M., Smayra T., Komura E., Giraudier S., Yun T., Lassau N., Vainchenker W., Wendling F.. Stimulation of osteoprotegerin production is

- responsible for osteosclerosis in mice overexpressing TPO. *Blood*. 2003; 101(8):2983-9. Epub 2002 Dec 27.
- Coetzee M., Haag M., Kruger M.C. Effects of arachidonic acid, docosahexaenoic acid, prostaglandin E(2) and parathyroid hormone on osteoprotegerin and RANKL secretion by MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *J Nutr Biochem*. 2007; 18(1):54-63. Epub 2006 May 2.
 - Collin-Osdoby P., Rothe L., Anderson F., Nelson M., Maloney W., Osdoby P. Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J Biol Chem*. 2001; 276(23):20659-72. Epub 2001 Mar 23.
 - Cosman F., Nieves J., Woelfert L., Formica C., Gordon S., Shen V., Lindsay R. Parathyroid hormone added to established hormone therapy: effects on vertebral fracture and maintenance of bone mass after parathyroid hormone withdrawal. *J Bone Miner Res*. 2001; 16(5):925-31.
 - Cranney A., Tugwell P., Zytaruk N., Robinson V., Weaver B., Shea B., Wells G., Adachi J., Waldegg L., Guyatt G.; Osteoporosis Methodology Group and The Osteoporosis Research Advisory Group. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. VI. Meta-analysis of calcitonin for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Endocr Rev*. 2002; 23(4):540-51.
 - Crotti T.N., Smith M.D., Findlay D.M., Zreiqat H., Ahern M.J., Weedon H., Hatzinikolous G., Capone M., Holding C., Haynes D.R. Factors regulating osteoclast formation in human tissues adjacent to peri-implant bone loss: expression of receptor activator NFkappaB, RANK ligand and osteoprotegerin. *Biomaterials*. 2004; 25(4):565-73.
 - Daugaard H., Elmengaard B., Andreassen T., Bechtold J., Lamberg A., Soballe K. Parathyroid hormone treatment increases fixation of orthopedic implants with gap healing: a biomechanical and histomorphometric canine study of porous coated titanium alloy implants in cancellous bone. *Calcif Tissue Int*. 2011; 88(4):294-303. Epub 2011 Jan 21.
 - Davies J.E. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ*. 2003; 67(8):932-49.
 - Delmas P.D., Vergnaud P., Arlot M.E., Pastoureaud P., Meunier P.J., Nilssen M.H. The anabolic effect of human PTH (1-34) on bone formation is blunted when bone

resorption is inhibited by the bisphosphonate tiludronate--is activated resorption a prerequisite for the in vivo effect of PTH on formation in a remodeling system? *Bone*. 1995; 16(6):603-10.

- Dhore C.R., Cleutjens J.P., Lutgens E., Cleutjens K.B., Geusens P.P., Kitslaar P.J., Tordoir J.H., Spronk H.M., Vermeer C., Daemen M.J. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21(12):1998-2003.
- Dobnig H., Piswanger-Sölkner J.C., Obermayer-Pietsch B., Tiran A., Strele A., Maier E., Maritschnegg P., Riedmüller G., Brueck C., Fahrleitner-Pammer A. Hip and nonvertebral fracture prediction in nursing home patients: role of bone ultrasound and bone marker measurements. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 May;92(5):1678-86. Epub 2007 Feb 20.
- Dobnig H., Turner R.T. Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology*. 1995; 136(8):3632-8.
- Duarte P.M., de Mendonça A.C., Máximo M.B., Santos V.R., Bastos M.F., Nociti Júnior F.H. Differential cytokine expressions affect the severity of peri-implant disease. *Clin Oral Implants Res*. 2009; 20(5):514-20. Epub 2009 Mar 11.
- Ejersz C., Oxlund H., Andreassen T.T. Bisphosphonate maintains parathyroid hormone (1-34)-induced cortical bone mass and mechanical strength in old rats. *Calcif Tissue Int*. 1998; 62(4):316-22.
- Fazzalari N.L., Kuliwaba J.S., Atkins G.J., Forwood M.R., Findlay D.M. The ratio of messenger RNA levels of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand to osteoprotegerin correlates with bone remodeling indices in normal human cancellous bone but not in osteoarthritis. *J Bone Miner Res*. 2001; 16(6):1015-27.
- Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I., Alobera-Gracia M.A., del-Canto-Pingarrón M., Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006; 11(2):E151-7.
- Finkelstein J.S., Leder B.Z., Burnett S.M., Wyland J.J., Lee H., de la Paz A.V., Gibson K., Neer R.M. Effects of teriparatide, alendronate, or both on bone turnover in osteoporotic men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91(8):2882-7. Epub 2006 May 9.

- Friedl G., Turner R.T., Evans G.L., Dobnig H. Intermittent parathyroid hormone (PTH) treatment and age-dependent effects on rat cancellous bone and mineral metabolism. *J Orthop Res.* 2007; 25(11):1454-64.
- Fu Q., Jilka R.L., Manolagas S.C., O'Brien C.A. Parathyroid hormone stimulates receptor activator of NF κ B ligand and inhibits osteoprotegerin expression via protein kinase A activation of cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem.* 2002; 277(50):48868-75. Epub 2002 Oct 2.
- Gabet Y., Kohavi D., Voide R., Mueller T.L., Müller R., Bab I. Endosseous implant anchorage is critically dependent on mecanostructural determinants of peri-implant bone trabeculae. *J Bone Miner Res.* 2010; 25(3):575-83.
- Gabet Y., Müller R., Levy J., Dimarchi R., Chorev M., Bab I., Kohavi D. Parathyroid hormone 1-34 enhances titanium implant anchorage in low-density trabecular bone: a correlative micro-computed tomographic and biomechanical analysis. *Bone.* 2006; 39(2):276-82. Epub 2006 Apr 17.
- Gao Y.H., Shinki T., Yuasa T., Kataoka-Enomoto H., Komori T., Suda T., Yamaguchi A. Potential role of cbfa1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF). *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 252(3):697-702.
- Garcia P., Schwenzer S., Slotta J.E., Scheuer C., Tami A.E., Holstein J.H., Histing T., Burkhardt M., Pohleman T., Menger M.D. Inhibition of angiotensin-converting enzyme stimulates fracture healing and periosteal callus formation - role of a local renin-angiotensin system. *Br J Pharmacol.* 2010 Apr;159(8):1672-80. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00651.x . Epub 2010 Mar 5.
- Gardner C.R. Morphological analysis of osteoclastogenesis induced by RANKL in mouse bone marrow cell cultures. *Cell Biol Int.* 2007, 31(7):672-82. Epub 2007 Jan
- Glass D.A. 2nd, Bialek P., Ahn J.D., Starbuck M., Patel M.S., Clevers H., Taketo M.M., Long F., McMahon A.P., Lang R.A., Karsenty G. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell.* 2005; 8(5):751-64.
- Golledge J., McCann M., Mangan S., Lam A., Karan M. Osteoprotegerin and osteopontin are expressed at high concentrations within symptomatic carotid atherosclerosis. *Stroke.* 2004; 35(7):1636-41. Epub 2004 May 13.
- Goodship A.E. Mechanical stimulus to bone. *Ann Rheum Dis.* 1992; 51(1):4-6.

- Gori F., Hofbauer L.C., Dunstan C.R., Spelsberg T.C., Khosla S., Riggs B.L. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology*. 2000; 141(12):4768-76.
- Gorski J.P. Is all bone the same? Distinctive distributions and properties of non-collagenous matrix proteins in lamellar vs. woven bone imply the existence of different underlying osteogenic mechanisms. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998; 9(2):201-23.
- Grimaud E., Soubigou L., Couillaud S., Coipeau P., Moreau A., Passuti N., Gouin F., Redini F., Heymann D. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am J Pathol*. 2003; 163(5):2021-31.
- Gunness M.E., Cain R.L., Hock J.M. The role of strain in the response of rapidly growing young male rat bones to parathyroid hormone. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2002 Jun; 2(4):321-6.
- Habener J.F., Kemper B., Potts J.T. Jr. Calcium-dependent intracellular degradation of parathyroid hormone: a possible mechanism for the regulation of hormone stores. *Endocrinology*. 1975; 97(2):431-41.
- Habener J.F., Rosenblatt M., Kemper B., Kronenberg H.M., Rich A., Potts J.T. Jr. Pre-proparathyroid hormone; amino acid sequence, chemical synthesis, and some biological studies of the precursor region. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978; 75(6):2616-20.
- Habener J.F., Rosenblatt M., Potts J.T. Jr. Parathyroid hormone: biochemical aspects of biosynthesis, secretion, action, and metabolism. *Physiol Rev*. 1984; 64(3):985-1053.
- Habener J.F., Stevens T.D., Ravazzola M., Orci L., Potts J.T. Jr. Effects of calcium ionophores on the synthesis and release of parathyroid hormone. *Endocrinology*. 1977; 101(5):1524-37.
- Haynes D.R., Crotti T.N., Zreiqat H. Regulation of osteoclast activity in peri-implant tissues. *Biomaterials*. 2004 Sep; 25(20): 4877-85.
- Hirano T., Burr D.B., Turner C.H., Sato M., Cain R.L., Hock J.M. Anabolic effects of human biosynthetic parathyroid hormone fragment (1-34), LY333334, on remodeling

- and mechanical properties of cortical bone in rabbits. *J Bone Miner Res.* 1999; 14(4):536-45.
- Hodsman A.B., Bauer D.C., Dempster D.W., Dian L., Hanley D.A., Harris S.T., Kendler D.L., McClung M.R., Miller P.D., Olszynski W.P., Orwoll E., Yuen C.K. Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use. *Endocr Rev.* 2005; 26(5):688-703. Epub 2005 Mar 15.
 - Hofbauer L.C., Dunstan C.R., Spelsberg T.C., Riggs B.L., Khosla S. Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 250(3):776-81.
 - Hofbauer L.C., Gori F., Riggs B.L., Lacey D.L., Dunstan C.R., Spelsberg T.C., Khosla S. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology.* 1999; 140(10):4382-9.
 - Hofbauer L.C., Khosla S., Dunstan C.R., Lacey D.L., Boyle W.J., Riggs B.L. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2000; 15(1):2-12.
 - Hofbauer L.C., Khosla S., Dunstan C.R., Lacey D.L., Spelsberg T.C., Riggs B.L. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology.* 1999; 140(9):4367-70.
 - Hofbauer L.C., Shui C., Riggs B.L., Dunstan C.R., Spelsberg T.C., O'Brien T., Khosla S. Effects of immunosuppressants on receptor activator of NF- κ B ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic and coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 280(1):334-9.
 - Holmen S.L., Zylstra C.R., Mukherjee A., Sigler R.E., Faugere M..C, Bouxsein M.L., Deng L, Clemens T.L., Williams B.O. Essential role of beta-catenin in postnatal bone acquisition. *J Biol Chem.* 2005; 280(22):21162-8. Epub 2005 Mar 31.
 - Holstein J.H., Becker S.C., Fiedler M., Scheuer C., Garcia P., Histing T., Klein M., Menger M.D., Pohleman T. Increased exercise after stable closed fracture fixation does not affect fracture healing in mice. *J Biomech.* 2012 Apr 30;45(7):1299-304. doi: 10.1016/j.jbiomech.2012.01.028 . Epub 2012 Feb 14.

- Horiki M., Nakase T., Myoui A., Sugano N., Nishii T., Tomita T., Miyaji T., Yoshikawa H. Localization of RANKL in osteolytic tissue around a loosened joint prosthesis. *J Bone Miner Metab.* 2004; 22(4):346-51.
- Huang J.C., Sakata T., Pfleger L.L., Bencsik M., Halloran B.P., Bikle D.D., Nissenson R.A. PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. *J Bone Miner Res.* 2004; 19(2):235-44. Epub 2003 Dec 16.
- Hughes D.E., Dai A., Tiffey J.C., Li H.H., Mundy G.R., Boyce B.F. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med.* 1996; 2(10):1132-6.
- Hurley M.M., Okada Y., Xiao L., Tanaka Y., Ito M., Okimoto N., Nakamura T., Rosen C.J., Doetschman T., Coffin J.D. Impaired bone anabolic response to parathyroid hormone in Fgf2-/- and Fgf2+/- mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 341(4): 989-94.
- Iida-Klein A., Zhou H., Lu S.S., Levine L.R., Ducayen-Knowles M., Dempster D.W., Nieves J, Lindsay R. Anabolic action of parathyroid hormone is skeletal site specific at the tissue and cellular levels in mice. *J Bone Miner Res.* 2002; 17(5):808-16.
- Ishizuya T., Yokose S., Hori M., Noda T., Suda T., Yoshiki S., Yamaguchi A. Parathyroid hormone exerts disparate effects on osteoblast differentiation depending on exposure time in rat osteoblastic cells. *J Clin Invest.* 1997; 99(12):2961-70.
- Jerome C.P., Johnson C.S., Lees C.J. Effect of treatment for 3 months with human parathyroid hormone 1-34 peptide in ovariectomized cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis). *Bone.* 1995; 17(4 Suppl):415S-420S.
- Jilka R.L. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone.* 2007; 40(6):1434-46.
- Jilka R.L., Weinstein R.S., Bellido T., Roberson P., Parfitt A.M., Manolagas S.C. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest.* 1999; 104(4):439-46.
- Johansson H.R., Skripitz R., Aspenberg P. Bisphosphonates can block the deterioration in implant fixation after withdrawal of intermittent doses of parathyroid hormone. *J Bone Joint Surg Br.* 2008; 90(3):400-4.
- Jørgensen L., Hansen J.B., Ahmed L., Bjørnerem Å., Emaus N., Joakimsen R., Mathiesen E., Størmer J., Vik A., Jacobsen B.K. Osteoprotegerin is associated with

- hip fracture incidence: the Tromso Study. *Int J Epidemiol.* 2012 Aug;41(4):1033-9. Epub 2012 Apr 25.
- Junqueira L.C.U., Knochen und Knochenverbindungen. In: *Histologie*. Springer, Berlin 1996 (4.Auflage), S 190-217.
 - Kanzawa M., Sugimoto T., Kanatani M., Chihara K. Involvement of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor in the stimulation of osteoclast formation by parathyroid hormone in mouse bone cells. *Eur J Endocrinol.* 2000; 142(6):661-4.
 - Kärrholm J., Borssén B., Löwenhielm G., Snorrason F. Does early micromotion of femoral stem prostheses matter? 4-7-year stereoradiographic follow-up of 84 cemented prostheses. *J Bone Joint Surg Br.* 1994; 76(6):912-7.
 - Kearns A.E., Khosla S., Kostenuik P.J. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev.* 2008; 29(2):155-92.
 - Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* 2001; 142(12):5050-5.
 - Kim H.W., Jahng J.S. Effect of intermittent administration of parathyroid hormone on fracture healing in ovariectomized rats. *Iowa Orthop J.* 1999; 19:71-7.
 - Kitazawa R., Kitazawa S., Maeda S. Promoter structure of mouse RANKL/TRANCE/OPGL/ODF gene. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1445(1):134-41.
 - Kon T., Cho T.J., Aizawa T., Yamazaki M., Nooh N., Graves D., Gerstenfeld L.C., Einhorn T.A. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res.* 2001 Jun; 16(6): 1004-14.
 - Kondo H., Guo J., Bringhurst F.R. Cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A mediates parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor regulation of osteoclastogenesis and expression of RANKL and osteoprotegerin mRNAs by marrow stromal cells. *J Bone Miner Res.* 2002; 17(9):1667-79.
 - Kong Y.Y., Boyle W.J., Penninger J.M. Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol Today.* 2000; 21(10):495-502.
 - Kudo O., Sabokbar A., Pocock A., Itonaga I., Fujikawa Y., Athanasou N.A. Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone.* 2003; 32(1):1-7.

- Kwon B.S., Wang S., Udagawa N., Haridas V., Lee Z.H., Kim K.K., Oh K.O., Greene J., Li Y., Su J., Gentz R., Aggarwal B.B., Ni J. TR1, a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB J.* 1998; 12(10):845-54.
- Lacey D.L., Timms E., Tan H.L., Kelley M.J., Dunstan C.R., Burgess T., Elliott R., Colombero A., Elliott G., Scully S., Hsu H., Sullivan J., Hawkins N., Davy E., Capparelli C., Eli A., Qian Y.X., Kaufman S., Sarosi I., Shalhoub V., Senaldi G., Guo J., Delaney J., Boyle W.J. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998; 93(2):165-76.
- Lane N.E., Yao W., Kinney J.H., Modin G., Balooch M., Wronski T.J. Both hPTH(1-34) and bFGF increase trabecular bone mass in osteopenic rats but they have different effects on trabecular bone architecture. *J Bone Miner Res.* 2003; 18(12): 2105-15.
- Lanyon L.E. Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif Tissue Int.* 1993;53 Suppl 1:S102-6; discussion S106-7.
- Lee S.K., Lorenzo J.A. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology.* 1999; 140(8):3552-61.
- Li J., Sarosi I., Yan X.Q., Morony S., Capparelli C., Tan H.L., McCabe S., Elliott R., Scully S., Van G., Kaufman S., Juan S.C., Sun Y., Tarpley J., Martin L., Christensen K., McCabe J., Kostenuik P., Hsu H., Fletcher F., Dunstan C.R., Lacey D.L., Boyle W.J. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(4):1566-71.
- Löffler G., Petrides P.E., Heinrich P.C., Hormonelle Regulation des Calcium- und Phosphatstoffwechsels. Biochemie und Pathobiochemie. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2007 (8. Auflage), S. 933-938.
- Lüllmann-Rauch R., Knochen. In: Taschenlehrbuch Histologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2006 (2. Auflage), S. 142-162.
- Ma Y.L., Cain R.L., Halladay D.L., Yang X., Zeng Q., Miles R.R., Chandrasekhar S., Martin T.J., Onyia J.E. Catabolic effects of continuous human PTH (1--38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology.* 2001; 142(9):4047-54.

- Ma Y., Jee W.S., Yuan Z., Wei W., Chen H., Pun S., Liang H., Lin C. Parathyroid hormone and mechanical usage have a synergistic effect in rat tibial diaphyseal cortical bone. *J Bone Miner Res.* 1999; 14(3):439-48.
- MacGregor R.R., Jilka R.L., Hamilton J.W. Formation and secretion of fragments of parathormone. Identification of cleavage sites. *J Biol Chem.* 1986; 261(4):1929-34.
- Mackey M.S., Stevens M.L., Ebert D.C., Tressler D.L., Combs K.S., Lowry C.K., Smith P.N., McOske J.E. The ferret as a small animal model with BMU-based remodeling for skeletal research. *Bone.* 1995; 17(4 Suppl):191S-196S.
- Mair B., Tangl S., Feierfeil J., Skiba D., Watzek G., Gruber R. Age-related efficacy of parathyroid hormone on osseointegration in the rat. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20(4):400-5.
- Manabe T., Mori S., Mashiba T., Kaji Y., Iwata K., Komatsubara S., Seki A., Sun Y.X., Yamamoto T. Human parathyroid hormone (1-34) accelerates natural fracture healing process in the femoral osteotomy model of cynomolgus monkeys. *Bone.* 2007; 40(6):1475-82. Epub 2007 Feb 2.
- Mannstadt M., Jüppner H., Gardella T.J. Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *Am J Physiol.* 1999; 277(5 Pt 2):F665-75.
- Manolagas S.C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000; 21(2):115-37.
- Marks S.C. Jr, Popoff S.N. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat.* 1988; 183(1):1-44.
- Mentaverri R., Kamel S., Brazier M. Involvement of capacitive calcium entry and calcium store refilling in osteoclastic survival and bone resorption process. *Cell Calcium.* 2003; 34(2):169-75.
- Miyakoshi N. Effects of parathyroid hormone on cancellous bone mass and structure in osteoporosis. *Curr Pharm Des.* 2004; 10(21):2615-27.
- Mukohyama H., Ransjö M., Taniguchi H., Ohyama T., Lerner U.H. The inhibitory effects of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on osteoclast formation are associated with upregulation of osteoprotegerin and downregulation of RANKL and RANK. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 271(1):158-63.

- Murray T.M., Rao L.G., Divieti P., Bringhurst F.R. Parathyroid hormone secretion and action: evidence for discrete receptors for the carboxyl-terminal region and related biological actions of carboxyl-terminal ligands. *Endocr Rev.* 2005; 26(1):78-113.
- Nagai M., Sato N. Reciprocal gene expression of osteoclastogenesis inhibitory factor and osteoclast differentiation factor regulates osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 257(3):719-23.
- Nagasawa T., Kobayashi H., Kiji M., Aramaki M., Mahanonda R., Kojima T., Murakami Y., Saito M., Morotome Y., Ishikawa I. LPS-stimulated human gingival fibroblasts inhibit the differentiation of monocytes into osteoclasts through the production of osteoprotegerin. *Clin Exp Immunol.* 2002; 130(2):338-44.
- Nakagawa N., Yasuda H., Yano K., Mochizuki S., Kobayashi N., Fujimoto H., Shima N., Morinaga T., Chikazu D., Kawaguchi H., Higashio K. Basic fibroblast growth factor induces osteoclast formation by reciprocally regulating the production of osteoclast differentiation factor and osteoclastogenesis inhibitory factor in mouse osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 265(1):158-63.
- Nakajima A., Shimoji N., Shiomi K., Shimizu S., Moriya H., Einhorn T.A., Yamazaki M. Mechanisms for the enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1-34). *J Bone Miner Res.* 2002; 17(11):2038-47.
- Nakamichi Y., Udagawa N., Kobayashi Y., Nakamura M., Yamamoto Y., Yamashita T., Mizoguchi T., Sato M., Mogi M., Penninger J.M., Takahashi N. Osteoprotegerin reduces the serum level of receptor activator of NF- κ B ligand derived from osteoblasts. *J Immunol.* 2007; 178(1):192-200.
- Nakashima T., Kobayashi Y., Yamasaki S., Kawakami A., Eguchi K., Sasaki H., Sakai H. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF- κ B ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 275(3):768-75.
- Naveh-Many T., Friedlaender M.M., Mayer H., Silver J. Calcium regulates parathyroid hormone messenger ribonucleic acid (mRNA), but not calcitonin mRNA in vivo in the rat. Dominant role of 1,25-dihydroxyvitamin D. *Endocrinology.* 1989; 125(1):275-80.

- Nicholson G.C., Moseley J.M., Sexton P.M., Mendelsohn F.A., Martin T.J. Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization. *J Clin Invest.* 1986; 78(2):355-60.
- Niethard F.U., Pfeil J., Biberthaler P., Osteoporose. In: *Orthopädie und Unfallchirurgie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart. 2009 (6. Auflage), S. 144-150.
- Neer R.M., Arnaud C.D., Zanchetta J.R., Prince R., Gaich G.A., Reginster J.Y., Hodzman A.B., Eriksen E.F., Ish-Shalom S., Genant H.K., Wang O., Mitlak B.H. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med.* 2001; 344(19):1434-41.
- Nozaka K., Miyakoshi N., Kasukawa Y., Maekawa S., Noguchi H., Shimada Y. Intermittent administration of human parathyroid hormone enhances bone formation and union at the site of cancellous bone osteotomy in normal and ovariectomized rats. *Bone.* 2008; 42(1):90-7. Epub 2007 Sep 14.
- O'Brien C.A., Gubrij I., Lin S.C., Sailors R.L., Manolagas S.C. STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF- κ B ligand and stimulation of osteoclastogenesis by gp130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1,25-dihydroxyvitamin D3 or parathyroid hormone. *J Biol Chem.* 1999; 274(27):19301-8.
- Ohkawa Y., Tokunaga K., Endo N. Intermittent administration of human parathyroid hormone (1-34) increases new bone formation on the interface of hydroxyapatitecoated titanium rods implanted into ovariectomized rat femora. *J Orthop Sci.* 2008; 13(6):533-42. Epub 2008 Dec 17.
- Okimoto N., Tsurukami H., Okazaki Y., Nishida S., Sakai A., Ohnishi H., Hori M., Yasukawa K., Nakamura T. Effects of a weekly injection of human parathyroid hormone (1-34) and withdrawal on bone mass, strength, and turnover in mature ovariectomized rats. *Bone.* 1998; 22(5):523-31.
- Onyia J.E., Bidwell J., Herring J., Hulman J., Hock J.M. In vivo, human parathyroid hormone fragment (hPTH 1-34) transiently stimulates immediate early response gene expression, but not proliferation, in trabecular bone cells of young rats. *Bone.* 1995; 17(5):479-84.
- Onyia J.E., Helvering L.M., Gelbert L., Wei T., Huang S., Chen P., Dow E.R., Maran A., Zhang M., Lotinun S., Lin X., Halladay D.L., Miles R.R., Kulkarni N.H., Ambrose E.M., Ma Y.L., Frolik C.A., Sato M., Bryant H.U., Turner R.T. Molecular profile of

- catabolic versus anabolic treatment regimens of parathyroid hormone (PTH) in rat bone: an analysis by DNA microarray. *J Cell Biochem*. 2005; 95(2):403-18.
- Onyia J.E., Miles R.R., Yang X., Halladay D.L., Hale J., Glasebrook A., McClure D., Seno G., Churgay L., Chandrasekhar S., Martin T.J. In vivo demonstration that human parathyroid hormone 1-38 inhibits the expression of osteoprotegerin in bone with the kinetics of an immediate early gene. *J Bone Miner Res*. 2000; 15(5):863-71.
 - Oxlund H., Dalstra M., Ejersted C., Andreassen T.T. Parathyroid hormone induces formation of new cancellous bone with substantial mechanical strength at a site where it had disappeared in old rats. *Eur J Endocrinol*. 2002; 146(3):431-8.
 - Palmqvist P., Persson E., Conaway H.H., Lerner U.H. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF- κ B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF- κ B in mouse calvariae. *J Immunol*. 2002; 169(6):3353-62.
 - Parfitt A.M. Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone*. 2002; 30(1):5-7.
 - Potts J.T. Jr, Kronenberg H.M., Rosenblatt M.. Parathyroid hormone: chemistry, biosynthesis, and mode of action. *Adv Protein Chem*. 1982; 35:323-96.
 - Qi H., Li M., Wronski T.J. A comparison of the anabolic effects of parathyroid hormone at skeletal sites with moderate and severe osteopenia in aged ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*. 1995; 10(6):948-55.
 - Raisz L.G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest*. 2005; 115(12):3318-25.
 - Rosen C.J., Bilezikian J.P. Clinical review 123: Anabolic therapy for osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86(3):957-64.
 - Rubin J., Ackert-Bicknell C.L., Zhu L., Fan X., Murphy T.C., Nanes M.S., Marcus R., Holloway L., Beamer W.G., Rosen C.J. IGF-I regulates osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand in vitro and OPG in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87(9):4273-9.
 - Ryd L., Albrektsson B.E., Carlsson L., Dansgård F., Herberts P., Lindstrand A., Regnér L., Toksvig-Larsen S. Roentgen stereophotogrammetric analysis as a predictor of mechanical loosening of knee prostheses. *J Bone Joint Surg Br*. 1995; 77(3):377-83.

- Saika M., Inoue D., Kido S., Matsumoto T. 17beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alpha. *Endocrinology*. 2001; 142(6):2205-12.
- Dachverband Osteologie e.V. DVO-Leitlinie 2009 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Erwachsenen. *Osteologie*. 2009; 18: 304–328.
- Schiller P.C., D'Ippolito G., Roos B.A., Howard G.A. Anabolic or catabolic responses of MC3T3-E1 osteoblastic cells to parathyroid hormone depend on time and duration of treatment. *J Bone Miner Res*. 1999; 14(9):1504-12.
- Schlüter K.D. PTH and PTHrP: Similar Structures but Different Functions. *News Physiol Sci*. 1999; 14:243-249.
- Schoppet M., Henser S., Ruppert V., Stübig T., Al-Fakhri N., Maisch B., Hofbauer L.C. Osteoprotegerin expression in dendritic cells increases with maturation and is NF-kappaB-dependent. *J Cell Biochem*. 2007; 100(6):1430-9.
- Schwartz T., Walter S., Marten S.M., Kirschhäuser F., Nusser M., Obst U. Use of quantitative real-time RT-PCR to analyse the expression of some quorum-sensing regulated genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Anal Bioanal Chem*. 2007; 387(2):513-21.
- Seebach C., Skripitz R., Andreassen T.T., Aspenberg P. Intermittent parathyroid hormone (1-34) enhances mechanical strength and density of new bone after distraction osteogenesis in rats. *J Orthop Res*. 2004; 22(3):472-8.
- Segre G.V., Perkins A.S., Witters L.A., Potts J. Jr. Metabolism of parathyroid hormone by isolated rat Kupffer cells and hepatocytes. *J Clin Invest*. 1981; 67(2):449-57.
- Shevde N.K., Bendixen A.C., Dienger K.M., Pike J.W. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(14):7829-34.
- Silvestrini G., Ballanti P., Leopizzi M., Gualtieri N., Sardella D., Monnazzi P., Simeoni S., Sebastiani M., Bonucci E., Patacchioli F.R. Effects of the administration of corticosterone, parathyroid hormone, or both, and of their withdrawal, on rat bone and cartilage histomorphometric parameters, and on osteoprotegerin and RANKL mRNA expression and proteins. *J Mol Histol*. 2007; 38(3):215-26. Epub 2007 May 3.
- Silvestrini G., Ballanti P., Sebastiani M., Leopizzi M., Di Vito M., Bonucci E. OPG and RANKL mRNA and protein expressions in the primary and secondary

- metaphyseal trabecular bone of PTH-treated rats are independent of that of SOST. *J Mol Histol.* 2008; 39(2):237-42. Epub 2007 Dec 20.
- Simonet W.S., Lacey D.L., Dunstan C.R., Kelley M., Chang M.S., Lüthy R., Nguyen H.Q., Wooden S., Bennett L., Boone T., Shimamoto G., DeRose M., Elliott R., Colombero A., Tan H.L., Trail G., Sullivan J., Davy E., Bucay N., Renshaw-Gegg L., Hughes T.M., Hill D., Pattison W., Campbell P., Sander S., Van G., Tarpley J., Derby P., Lee R., Boyle W.J. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997; 89(2):309-19.
 - Skripitz R., Andreassen T.T., Aspenberg P. Parathyroid hormone (1-34) increases the density of rat cancellous bone in a bone chamber. A dose-response study. *J Bone Joint Surg Br.* 2000; 82(1):138-41.
 - Skripitz R., Andreassen T.T., Aspenberg P. Strong effect of PTH (1-34) on regenerating bone: a time sequence study in rats. *Acta Orthop Scand.* 2000; 71(6):619-24.
 - Skripitz R., Aspenberg P. Early effect of parathyroid hormone (1-34) on implant fixation. *Clin Orthop Relat Res* 2001:427-32.
 - Skripitz R., Aspenberg P. Implant fixation enhanced by intermittent treatment with parathyroid hormone. *J Bone Joint Surg Br* 2001; 83:437-40.
 - Skripitz R., Aspenberg P. Parathyroid hormone (1-34) increases attachment of PMMA cement to bone. *J Orthop Sci.* 2001; 6(6):540-4.
 - Skripitz R., Böhling S., Rüther W., Aspenberg P. Stimulation of implant fixation by parathyroid hormone (1-34)-A histomorphometric comparison of PMMA cement and stainless steel. *J Orthop Res.* 2005; 23(6):1266-70. Epub 2005 Jun 16.
 - Skripitz R., Johansson H.R., Ulrich S.D., Werner A., Aspenberg P. Effect of alendronate and intermittent parathyroid hormone on implant fixation in ovariectomized rats. *J Orthop Sci.* 2009; 14(2):138-43. Epub 2009 Apr 1.
 - Srivastava S., Toraldo G., Weitzmann M.N., Cenci S., Ross F.P., Pacifici R. Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)-induced JNK activation. *J Biol Chem.* 2001; 276(12):8836-40. Epub 2000 Dec 19.
 - Stanislaus D., Devanarayan V., Hock J.M. In vivo comparison of activated protein-1 gene activation in response to human parathyroid hormone (hPTH)(1-34) and hPTH(1-84) in the distal femur metaphyses of young mice. *Bone.* 2000; 27(6):819-26.

- Stürmer K.M. [Pathophysiology of disrupted bone healing]. *Orthopade*. 1996; 25(5):386-93.
- Suda T., Takahashi N., Udagawa N., Jimi E., Gillespie M.T., Martin T.J. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev*. 1999; 20(3):345-57.
- Sugiyama T., Saxon L.K., Zaman G., Moustafa A., Sunters A., Price J.S., Lanyon L.E. Mechanical loading enhances the anabolic effects of intermittent parathyroid hormone (1-34) on trabecular and cortical bone in mice. *Bone*. 2008; 43(2):238-48. Epub 2008 May 1.
- Sundfeldt M., Carlsson L.V., Johansson C.B., Thomsen P., Gretzer C. Aseptic loosening, not only a question of wear: a review of different theories. *Acta Orthop*. 2006; 77(2):177-97.
- Suzawa T., Miyaura C., Inada M., Maruyama T., Sugimoto Y., Ushikubi F., Ichikawa A., Narumiya S., Suda T. The role of prostaglandin E receptor subtypes (EP1, EP2, EP3, and EP4) in bone resorption: an analysis using specific agonists for the respective EPs. *Endocrinology*. 2000; 141(4):1554-9.
- Takahashi N., Udagawa N., Takami M., Suda T. Cells of Bone – Osteoclast Generation. *Principles of Bone Biology*, 2nd Edition, Volume 1, 2002; 109-26.
- Takami M., Takahashi N., Udagawa N., Miyaura C., Suda K., Woo J.T., Martin T.J., Nagai K., Suda T. Intracellular calcium and protein kinase C mediate expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in osteoblasts. *Endocrinology*. 2000; 141(12):4711-9.
- Tan K.B., Harrop J., Reddy M., Young P., Terrett J., Emery J., Moore G., Truneh A. Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Gene*. 1997; 204(1-2):35-46.
- Tashjian A.H. Jr, Chabner B.A. Commentary on clinical safety of recombinant human parathyroid hormone 1-34 in the treatment of osteoporosis in men and postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 2002; 17(7):1151-61.
- Teitelbaum S.L. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000; 289(5484):1504-8.
- Teitelbaum S.L. Osteoclasts; culprits in inflammatory osteolysis. *Arthritis Res Ther*. 2006; 8(1):201. Epub 2005 Nov 29.

- Trouvin A.P., Goëb V. Receptor activator of nuclear factor-κB ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clin Interv Aging*. 2010; 5:345-54.
- Tsuda E., Goto M., Mochizuki S., Yano K., Kobayashi F., Morinaga T., Higashio K. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 234(1):137-42.
- Tsukii K., Shima N., Mochizuki S., Yamaguchi K., Kinosaki M., Yano K., Shibata O., Udagawa N., Yasuda H., Suda T., Higashio K. Osteoclast differentiation factor mediates an essential signal for bone resorption induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3, prostaglandin E2, or parathyroid hormone in the microenvironment of bone. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 246(2):337-41.
- Ueno Y., Shinki T., Nagai Y., Murayama H., Fujii K., Suda T. In vivo administration of 1,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses the expression of RANKL mRNA in bone of thyroparathyroidectomized rats constantly infused with PTH. *J Cell Biochem*. 2003; 90(2):267-77.
- Vahle J.L., Sato M., Long G.G., Young J.K., Francis P.C., Engelhardt J.A., Westmore M.S., Linda Y., Nold J.B. Skeletal changes in rats given daily subcutaneous injections of recombinant human parathyroid hormone (1-34) for 2 years and relevance to human safety. *Toxicol Pathol*. 2002; 30(3):312-21.
- van der Donk S, Buma P, Aspenberg P, Schreurs BW. Similarity of bone ingrowth in rats and goats: a bone chamber study. *Comp Med*. 2001 Aug; 51(4):336-40.
- Vasicek T.J., McDevitt B.E., Freeman M.W., Fennick B.J., Hendy G.N., Potts J.T. Jr, Rich A., Kronenberg H.M. Nucleotide sequence of the human parathyroid hormone gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983; 80(8):2127-31.
- Veigl D., Niederlová J., Krystufková O.. Periprosthetic osteolysis and its association with RANKL expression. *Physiol Res*. 2007; 56(4):455-62. Epub 2006 Aug 22.
- Wagner D., Fahrleitner-Pammer A. Levels of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator for nuclear factor kappa B ligand (RANKL) in serum: are they of any help? *Wien Med Wochenschr*. 2010 Sep;160(17-18):452-7. doi: 10.1007/s10354-010-0818-x . Epub 2010 Aug 16.
- Wang L., Quarles L.D., Spurney R.F. Unmasking the osteoinductive effects of a G-protein-coupled receptor (GPCR) kinase (GRK) inhibitor by treatment with PTH(1-34). *J Bone Miner Res*. 2004; 19(10):1661-70. Epub 2004 Jul 14.

- Watson P.H., Fraher L.J., Kisiel M., DeSousa D., Hendy G., Hodsman A.B. Enhanced osteoblast development after continuous infusion of hPTH(1-84) in the rat. *Bone*. 1999; 24(2):89-94.
- Wong B.R., Josien R., Choi Y. TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function. *J Leukoc Biol.* 1999; 65(6):715-24.
- Wong B.R., Rho J., Arron J., Robinson E., Orlinick J., Chao M., Kalachikov S., Cayani E., Bartlett F.S. 3rd, Frankel W.N., Lee S.Y., Choi Y. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem.* 1997; 272(40):25190-4.
- Xie Y., Su N., Jin M., Qi H., Yang J., Li C., Du X., Luo F., Chen B., Shen Y., Huang H., Xian C.J., Deng C., Chen L. Intermittent PTH (1-34) injection rescues the retarded skeletal development and postnatal lethality of mice mimicking human achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Hum Mol Genet.* 2012 Sep 15; 21(18):3941-55. doi: 10.1093/hmg/dds181. Epub 2012 May 24.
- Yan T., Riggs B.L., Boyle W.J., Khosla S. Regulation of osteoclastogenesis and RANK expression by TGF-beta1. *J Cell Biochem.* 2001; 83(2):320-5.
- Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Mochizuki S.I., Yano K., Fujise N., Sato Y., Goto M., Yamaguchi K., Kuriyama M., Kanno T., Murakami A., Tsuda E., Morinaga T., Higashio K. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology.* 1998; 139(3):1329-37.
- Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Yamaguchi K., Kinosaki M., Mochizuki S., Tomoyasu A., Yano K., Goto M., Murakami A., Tsuda E., Morinaga T., Higashio K., Udagawa N., Takahashi N., Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(7):3597-602.
- Zannettino A.C., Holding C.A., Diamond P., Atkins G.J., Kostakis P., Farrugia A., Gamble J., To L.B., Findlay D.M., Haynes D.R. Osteoprotegerin (OPG) is localized to the Weibel-Palade bodies of human vascular endothelial cells and is physically associated with von Willebrand factor. *J Cell Physiol.* 2005; 204(2):714-23.
- Zhang L., Takahashi H.E., Inoue J., Tanizawa T., Endo N., Yamamoto N., Hori M. Effects of intermittent administration of low dose human PTH(1-34) on cancellous and cortical bone of lumbar vertebral bodies in adult beagles. *Bone.* 1997; 21(6):501-6.

11. Danksagung

Hiermit möchte ich allen danken, die mir bei meiner Dissertation behilflich waren. Mein Dank gilt Priv. Doz. Dr. med. habil. Ralf Skripitz für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit und die jederzeit gute Zusammenarbeit und die Korrekturen meiner Erstentwürfe. Weiterhin danke ich Dr. med. Cornelius Kasch für die gute Betreuung und das stets offene Ohr für die alltäglichen Schwierigkeiten und Probleme eines Doktoranden. Danken möchte ich außerdem dem Leiter es Forschungslabors für Biomechanik und Implantat-Technologie (FORBIOMIT) Prof. Dr. med. habil. Dipl.-Ing. Rainer Bader, der diese Arbeit durch das zur Verfügung stellen von Arbeitsmaterial, Räumlichkeiten und finanziellen Mitteln möglich machte und durch fachkompetenten Rat unterstützte. Mein ganz besonderer Dank gilt Dipl. Biol. Anika Jonitz für die große Hilfe bei der Umsetzung der molekularbiologischen Anteile meiner Arbeit, sowie für alle mir gegebenen Anregungen und die stete Hilfsbereitschaft. Außerdem möchte ich mich bei Anja Osterberg für die Hilfe bei der Aufbereitung eines Teils der Knochenproben bedanken. Des Weiteren möchte ich allen anderen Mitarbeitern des Forschungslabors danken, welche mir bei meiner Arbeit behilflich waren. Namentlich danke ich Dr. rer. nat. Karin Lochner für ihre wertvolle Arbeit im Vorfeld dieser Studie. Außerdem möchte ich mich bei Dipl.-Ing. Tobias Lindner für die Hilfe bei der Implantation und bei Doris Hansmann für die praktische Hilfe bei der Laborarbeit bedanken. Herrn Prof. Dr. med. Robert Jaster möchte ich für die Erlaubnis der Nutzung des *AbiPrism 7000 Cycler* des Forschungslabors der Abteilung Gastroenterologie danken. Weiterhin danke ich Sebastian Otto für die schnelle und unkomplizierte Hilfe bei den schematischen Darstellungen der Knochkammerschrauben. Schließlich möchte ich an dieser Stelle von ganzem Herzen meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinem Freund Malte für ihre immerwährende, uneingeschränkte Unterstützung und ihre Liebe danken. Danke!

12. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorlegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift

