TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie

des Klinikums rechts der Isar

Genexpressionsveränderungen des Wnt-Signalwegs im Knochengewebe bei Diabetes mellitus Typ 2

Leonie Hannah Zeeb

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

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

2. Prof. Dr. Rüdiger von Eisenhart-Rothe

Die Dissertation wurde am 17.10.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.04.2019 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 1

Abkürzungsverzeichnis 4

1. Einleitung 9

1.1. Diabetes mellitus 9

1.1.1. Epidemiologie 11

1.1.2. Langzeitfolgen 14

1.2. Knochen 16

1.2.1. Modeling und Remodeling 17

1.2.2. Knochenheilung 18

1.3. Diabetische Knochenkrankheit 20

1.4. Wnt–Signalweg 24

1.4.1. Der kanonische Wnt-Signalweg 26

1.4.2. Nicht-kanonische Wnt-Signalwege 27

1.4.3. Bedeutung 30

1.5. Zielgene dieser Arbeit 32

1.5.1. WNT3A 32

1.5.2. WNT5A 33

1.5.3. LRP5 34

1.5.4. LRP6 36

1.5.5. TCF7L2 37

1.5.6. TCF4 40

1.5.7. ALK5 40

1.5.8. GSK3B 41

1.5.9. Fibronektin 42

1.5.10. Adiponektin 45
2. Fragestellung 47
3. Material und Methodik 48
3.1. Patientenkollektiv 48
3.2. Geräte 50
3.3. Verbrauchsmaterial 51
3.4. Software 51
3.5. Probeentnahme und Aufbereitung 52
3.5.1. Blutproben 52
3.5.2. Knochenproben 53
3.6. RNA-Isolation aus Knochengewebe 53
3.7. RNA Quantität mit Hellma TrayCell 55
3.8. First strand cDNA Synthese 56
3.8.1. Die quantitative PCR (qPCR) 58
3.9. Statistik 61
4. Ergebnisse 62
4.1. Patientenkollektiv 62
4.1.1. Glucose und HbA1C 62
4.1.2. Blutfette: Triglyceride, gesamt Cholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Lipoprotein A 62
4.1.3. Elektrolyte: Natrium, Kalium, Kalzium 64
4.1.4. Nierenfunktionsparameter: Kreatinin, Harnstoff-N 66
4.2. Genexpressionsanalyse von Patientenspongiosa 66
4.2.1. Ergebnisse der RT-PCR von WNT3a und WNT5a 66
4.2.2. Ergebnisse der RT-PCR von LRP5 und LRP6 67

4.2.3. Ergebnisse der RT-PCR von TCF7L2 und TCF4 68
4.2.4. Ergebnisse der RT-PCR von ALK5 und GSK3B 69
4.2.5. Ergebnisse der RT-PCR von Fibronektin und Adiponektin 70
5. Diskussion 71
5.1. Interpretation des Patientenkollektives 71
5.2. Interpretation der Genexpressionsanalyse 74
5.2.1. Im metabolischen Stoffwechsel 75
5.2.2. Im Knochenstoffwechsel 78
5.3. Gesamte Bedeutung des Wnt-Signalweges für den Patienten 80
5.3.1. Diabetische Knochenkrankheit 80
5.3.2. Einfluss auf den klinischen Patienten 82
5.4. Limitationen 82
5.5. Therapeutische Chancen und Ausblick 83
6. Zusammenfassung 85
7. Danksagung 87
8. Abbildungsverzeichnis 88
9. Tabellenverzeichnis 90
10. Literaturverzeichnis 91

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
AER	Apical ectoderm ridge
AGEs	Advanced glycosylation end-products
ALK	Activin receptor-like kinase
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Adenomatöse Polyposis coli
β-TRCP	Beta-transducin repeat containing protein
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BMD	Knochendichte (bone mineral density)
BMI	Body-Mass-Index
BMP	Knochenmorphogenetischen Proteine (bone morphogenetic protein(s))
BMS	Knochenstärke (bone mineral strength)
BMU	Basic multicellular unit
C	Celsius
Ca^{2+}	Kalzium
CaMKII	Kalzium/Calmodulin abhängigen Proteinkinase II
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
C/EBPalpha	CCAAT-Anker-Bindeprotein alpha (CCAAT enhancer binding proteins)
cFN	zelluläres Fibronektin (cellular fibronectin)
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratzentimeter
CO_2	Kohlenstoffdioxid

DAAM	Dishevelled associated activator of morphogenesis
DEXA	Duale Röntgen Absorptiometrie (dual energy x-ray absorptiometry)
dH_2O	(destilliertes) Wasser
dl	Deziliter
DM	Diabetes mellitus
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dvl	Dishevelled
DXA	Dual-Röntgen-Absorptionsmetrie (dual energy X-ray absorptiometry DXA)
E	Extinktion
EZM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FN	Fibronektin
FOXO	Forkhead-Box-Proteine Transkriptionsgruppe O (Forkhead box transcription factor subgroup O)
FRAX	Fracture risk assessment tool
Fz	Frizzled
G	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
GLP	Glukagon-like-peptide
GSK	Glykogensynthase-Kinase
HbA1c	Glykiertes Hämoglobin A1
HDL	Lipoprotein hoher Dichte (high-density lipoprotein)
HMW	Hohes Molekulargewicht (hight molecular weight)
HR	Hazard Ratio
HR-pQCT	Hochauflösende periphere quantitative Computertomographie (high-resolution peripheral quantitative computer tomography)
Hz	Hertz

IFG	Abnorme Nüchternglukose (impaired fasting glucose)
IGF	Insulin-like growth factor
IGT	Gestörte Glukosetoleranz (impaired glucose tolerance
ICD	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems)
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramm
KO	Knockout
KrdI	Klinikum rechts der Isar
l	Liter
LEF	Lymphoid enhancer-binding factor
LDL	Lipoprotein niederer Dichte (low-density lipoprotein)
LDLR	Rezeptor für Lipoprotein niederer Dichte (low density lipoprotein receptor)
LMW	Niedriges Molekulargewicht (low molecular weight)
LRP	Low-density-lipoprotein (LDL) receptor-related protein
m	Männlich
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol

MMP	Matrix metalloproteinase
MMW	Mittleres Molekulargewicht (medium molecular weight)
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MSC	Mesenchymale Stammzelle (mesenchymal stem cell)
NaOH	Natriumhydroxid
NF-AT	Nuclear factor of activated T-cells
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OCN	Osteokalzin
oGTT	Oraler Glukosetoleranztest
OPPG	Osteoporose Pseudoglioma Syndrom
PAX	Paired-box
PCP	Planar cell polarity
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PDGF	Platelet-derived growth factor
pFN	Plasmafibronektin
PKA	Proteinkinase A
PPARgamma	Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptor gamma
PTH	Parathormon
qCT	Quantitative Computertomographie
Rho	Ras homologue (GTPase)
ROCK	Rho-assoziierte Kinase
ROR	Receptor tyrosine kinase like orphan receptor
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (reverse transcriptase-polymerase chain reaction)
RYK	Rezeptor-like tyrosine kinase

SERM	Selektiver Östrogenrezeptormodulator (selective estrogen receptor modulator)
SFRPs	Secreted frizzled-related proteins
SNP	Single nucleotide polymorphism
T1DM	Diabetes mellitus Typ 1
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
TCF	T-cell Faktor
TCF7L2	Transkription factor 7 like 2
TGF-β	Transforming growth factor beta
TGFBR	Transforming growth factor beta receptor
TIMP	Tissue Inhibitor of matrix metalloproteinase
VLDL	Lipoprotein sehr niederer Dichte (very low-density lipoprotein)
w	Weiblich
Wg	Winglessgen
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
Wif	Wnt inhibitory factor
Wnt	wingless-type MMTV integration site family

1. Einleitung

1.1. Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus (DM) ist der Sammelbegriff für eine Gruppe von Stoffwechselerkrankungen. Ihr Leitbefund ist charakterisiert durch chronische Hyperglykämie mit Störungen des Kohlenhydrat-, Fett- und Protein-Metabolismus (Expert Committee in the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus 2002). Die Erkrankung an DM ist mit einem deutlich erhöhten Risiko für schwere Begleit- und Folgeerkrankungen verbunden.

In der Ätiopathogenese des DM ist entweder eine gestörte Insulinsekretion, eine gestörte Insulinwirkung oder beides kombiniert. Während es bei der gestörten Insulinsekretion zu einer „Erschöpfung“ der Insulin-produzierenden Zellen in der Bauchspeicheldrüse kommt, wird bei der gestörten Insulinwirkung die Insulinresistenz, also eine verminderte Empfindlichkeit der Körperzellen für das blutzuckersenkende Hormon Insulin, gesteigert. Die Folge ist eine heterogene Krankheitsgruppe mit der Hyperglykämie als gemeinsamer Eigenschaft.

Um die Vorstufen sowie das Ausmaß von DM anhand von festgelegten Parametern einzuteilen und zu kontrollieren führte die WHO sogenannte Diabeteskriterien ein. Zur Einstufung der Patienten gibt es derzeit zwei Möglichkeiten, welche in Tabelle 1 dargestellt werden: Erstens steht die Bestimmung des Nüchternblutzuckers aus venösem Blut zur Verfügung. Zweitens ist die Bestimmung des venösen Blutzuckers im oralen Glukose Toleranz Test (oGTT) möglich.

Tabelle 1: Diabetes mellitus (American Diabetes Association 2003).
oGTT (oraler Glukose Toleranz Test), IGT (Impaired glucose tolerance), IFG (impaired fasting glucose)

Einstufung	*Nüchternblutzucker (venös/plasmareferenziert)*	*Blutzucker im oGTT nach 2 Stunden (venös)*
Normal	<110 mg/dl <6,1 mmol/l	<140 mg/dl <7,8 mmol/l
Abnorme Nüchternglukose (IFG)	≥110–<126 mg/dl ≥ 6,1–<7,0 mmol/l	< 140 mg/dl < 7,8 mmol/l
Gestörte Glukosetoleranz (IGT)	<126 mg/dl <7,0 mmol/l	≥140–<200 mg/dl ≥7,8–<11,1 mmol/l
Diabetes mellitus	≥126 mg/dl ≥7,0 mmol/l	≥200 mg/dl ≥11,1 mmol/l

DM ist in der Regel gekennzeichnet durch folgende Symptome: vermehrter Durst (Polidipsie) und erhöhtes Urin Volumen (Polyurie), wiederkehrende Infekte, verschwommenes Sehen sowie unerklärbarer Gewichtsverlust. In schwereren Fällen kann sich eine Ketoazidose oder ein hyperosmolarer nicht ketogener Zustand entwickeln und zu starker Glukosurie, Benommenheit, Koma und im Falle fehlender Therapie bis zum Tod führen (Viner, White et al. 2017). Oft sind die Symptome jedoch schwach oder gar nicht vorhanden. So können bestehende Hypoglykämien bereits vor der Diagnose DM zu pathologischen und funktionalen Veränderungen führen (Umpierrez and Korytkowski 2016).

Die zwei häufigsten Formen von DM sind der primär insulinabhängige Diabetes mellitus (Typ 1 Diabetes) und der nicht primär insulinabhängige Diabetes mellitus (Typ 2 Diabetes).

Der nicht primär insulinabhängige Typ 2 Diabetes (T2DM) wurde früher auch als „Altersdiabetes“ bezeichnet. Mittlerweile findet sich diese Form des Diabetes aber zunehmend auch bei übergewichtigen Kindern und Jugendlichen.

In diesem Kontext ist die Bedeutung des metabolischen Syndroms zu erläutern, auf dessen Grundlage sich häufig der T2DM entwickelt. Das metabolische Syndrom fasst folgende Symptomkonstellation zusammen: Adipositas, insbesondere abdominale Fettleibigkeit, geschädigte Glukoseregulation oder DM, arterielle Hypertonie sowie

Dyslipidämie – darunter sind erhöhte Triglyceride, niedriges high-density lipoprotein (HDL) und erhöhtes low-density lipoprotein (LDL) zu verstehen (Eckel, Grundy et al. 2005). Vermutlich entwickelt sich diese Konstellation auf dem Boden der in der Pathogenese entstehenden peripheren Insulinresistenz (Molitch, DeFronzo et al. 2002).

Das metabolische Syndrom ist eine der fordernsten Krankheiten des 21. Jahrhunderts. So führt die periphere Insulinresistenz und die damit verbundene Hyperinsulinämie, Hyperglykämie sowie auftretende Adipokinen häufig zu Schädigungen in vaskulären Endothelien, einem abnormalen Lipidprofil, Bluthochdruck und vaskulärer Entzündung. Hieraus entsteht eine erhöhte Suszeptibilität für arteriosklerotische und kardiovaskuläre Erkrankungen.

Die Erkrankungswahrscheinlichkeit wird durch genetische Prädisposition, Bewegungsmangel sowie Körperfettverteilung beeinflusst. Es wurde oft gezeigt, dass Teile des metabolischen Syndroms bereits 10 Jahre vor dem eigentlichen Entdecken der glykämischen Unordnung vorhanden sind. Energisches, frühes Management des Syndroms kann einen signifikanten Einfluss auf die Vermeidung von beidem, Diabetes und kardiovaskulären Erkrankungen haben.

1.1.1. Epidemiologie

Die Bedeutsamkeit des DM nimmt in unserer Gesellschaft stetig zu. Im Vordergrund stehen hierbei vor allem veränderte Essgewohnheiten, zunehmende Fettleibigkeit und ein erhöhter Anteil an sitzenden Tätigkeiten.

Die International Diabetes Federation zählte 2017 weltweit etwa 425 Millionen Diabetiker. Die Mehrheit leidet unter T2DM, wobei einer von elf Erwachsenen weltweit erkrankt ist. Derzeit bleiben jedoch 46,5% der erkrankten Diabetiker undiagnostiziert. Die Prävalenz der undiagnostizierten Patienten mit T2DM steigt vor allem in dem als nicht Risiko eingeschätzten Patientengut: bei unter 30-jährigen sowie bei Betroffenen mit gutem (<159 mg/dl) oder sehr hohem (>220 mg/dl) LDL. Entgegen die Erwartungen haben der Body-Mass-Index (BMI) oder ein geringer Bildungsstand keinen Einfluss auf die Diagnoserate (Zhang, Yang et al. 2017).

„The global burden of Diabetes“ beschreibt die zunehmende Wichtigkeit des DM in unserer Gesellschaft. Bereits 12% der Gesundheitsausgaben werden für das Management der aufkommenden Komplikationen bei der Erkrankung des DM verwendet (International Diabetes Federation 2015). Es wird angenommen, dass die Anzahl der Erkrankten im Jahre 2017 von 425 Millionen auf 642 Millionen im Jahr 2030 ansteigen wird (International Diabetes Federation 2015). Ursächlich ist vor allem die demographische Alterung der Bevölkerung (Wild, Roglic et al. 2004, Heidemann, Du et al. 2013).

Abbildung 1: Weltweite Prävalenz von Diabetikern (20-79 Jahre) im Jahre 2015 (International Diabetes Federation 2015)

In allen Altersgruppen wird eine weltweite Prävalenz von 8,8% im Jahre 2017 und 10,4% in 2040 geschätzt. Die weltweite Prävalenz von Diabetikern variiert wie in Abbildung 1 dargestellt zwischen den verschiedenen Ländern. Sie steigt mit zunehmendem Alter deutlich an und ist bei niedrigem Sozialstatus höher als bei hohem Sozialstatus (Heidemann, Du et al. 2013). So führen soziale Unterschiede einerseits zu variierendem Gesundheitsverhalten in der Ernährung und der körperlichen Aktivität. Andererseits entsteht eine abweichende Gesundheitskompetenz durch mangelnde Edukation oder fehlendem Zugang zum

Gesundheitssystem. Weiter sind psychosoziale Faktoren wie die Motivation und die Fähigkeit für Selbstpflege zu beachten.

Während die Prävalenz derzeit deutlich höher in industriellen Ländern als in Entwicklungsländern ist, wird in den nächsten Jahrzehnten eine Zunahme der Erkrankungen vor allem in den Entwicklungsländern um 170%, in Industrieländern dagegen ein geringerer Anstieg von immerhin noch 42% erwartet (King, Aubert et al. 1998). Führend in der Prävalenz sind derzeit vor allem Nauruer (41%) und die Pima/Papago Indianer (59%), gefolgt von Arabern, immigrierte Amerikaner aus Indien, Chinesen und Amerikaner mit spanisch – sprechender Herkunft von jeweils 14-20%. In Europa beträgt die Prävalenz 3-10%, während in manchen traditionellen Gemeinden der Entwicklungsländer die Prävalenz bei unter 3% liegt (King und Rewers 1993). Interessanterweise zeigte sich, dass die Prävalenz für DM bei Männern höher ist wie bei Frauen, Frauen jedoch eine größere Inzidenzrate aufweisen und daher häufiger an DM erkranken (Wild, Roglic et al. 2004).

Diabetiker besitzen ein deutlich erhöhtes Mortalitätsrisiko im Vergleich zu Nicht-Diabetikern. Die Lebenserwartung wird maßgeblich von bekannten Folgeerkrankungen beeinflusst. Hier lassen sich mit 60% der durch T2DM verursachten Tode vor allem kardiovaskuläre Erkrankungen als Ursache heranführen (Khunti, Davies et al. 2015). Des Weiteren zählen Nierenerkrankungen mit 11% in Typ 2 Diabetikern zu den führenden Todesursachen (Morrish, Wang et al. 2001). Interessanterweise steigt die Erkrankungsdauer, die Anzahl kardiovaskulärer Erkrankungen sowie der Hypoglykämien und damit assoziierte Mortalität steil mit fortgeschrittenem Alter an, wohingegen mikrovaskuläre Komplikationen stabil bleiben oder nachlassen (Huang, Laiteerapong et al. 2014). Während Männer durchschnittlich 7 Lebensjahre verlieren, sind es bei Frauen 7,5 Jahre (Morgan, Currie et al. 2000). Weltweit stellt DM die fünfthäufigste Todesursache dar. Eine direkte Todesursache durch DM wurde auf 9,8% aller Verstorbenen geschätzt (Taylor, Heneghan et al. 2013). Es fällt auf, dass diese Zahl stark zwischen den Ländern variiert: In ärmeren Ländern beschränkt sich die Anzahl auf 2-3% der Verstorbenen, wogegen man in den USA, Kanada und dem Mittleren Osten von 8% spricht. Auch zeigt sich, dass in den

Altersgruppen der 35-64-Jährigen 6-27% der Tode dem DM zuzuschreiben sind (Roglic, Unwin et al. 2005).

In Deutschland leben etwa sechs Millionen Erwachsene, bei denen ein DM diagnostiziert wurde. Über 90% davon sind dem T2DM zuzuordnen, nur etwa fünf Prozent dem T1DM (Federation 2015).

Es zeigen sich deutliche regionale Unterschiede in der Prävalenz des T2DM in Deutschland: Im Gebiet der neuen Bundesländer sind die Prävalenzen etwa doppelt so hoch wie im Süden Deutschlands. Es lässt sich im Vorkommen des DM also ein Nord–Süd–Gefälle sowie ein Ost-West-Gefälle feststellen (Robert Koch Institut 2011). Ursache für den regionalen Unterschied in Deutschland werden folgende Umstände diskutiert: Traditionelle Risikofaktoren wie Übergewicht, Rauchen und unzureichende körperliche Bewegung. Weiter gibt es neue Risikofaktoren wie Luftverschmutzung, strukturelle Deprivation, hohe Arbeitslosigkeit, schlechte Infrastruktur, psychosoziale Faktoren und genetische Risikovarianten (Rathmann, Scheidt-Nave et al. 2013, Tamayo, Rosenbauer et al. 2014, Deutsche Diabetes Hilfe 2016).

1.1.2. Langzeitfolgen

Zu den Folgeerkrankungen des DM zählen vor allem Mikro- und Makroangiopathien. So kann es im Verlauf der Erkrankung häufig zu diabetischer Retinopathie, Nephropathie, renaler Osteodystrophie oder Neuropathie mit Fußulzera, Charcot-Fuß und sexueller Dysfunktion kommen. Weiter besteht ein deutlich erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre und zerebrovaskuläre Erkrankungen.

Nierenschäden gehören zu den häufigsten Folgekrankheiten des T1DM und T2DM. Rund 20-40% der an DM erkrankten Patienten erleiden im Laufe ihrer Erkrankung eine Nephropathie, wobei Typ 2 Diabetiker weniger häufig daran erkranken als Typ 1 Diabetiker (Botella Martinez, Varo Cenarruzabeitia et al. 2016). Als Hauptursache des sogenannten Kimmelstiel-Wilson-Syndromes lässt sich eine Schädigung der kleinen Gefäße (Mikroangiopathie) durch erhöhte Blutzuckerspiegel sowie gesteigerten Blutdruck feststellen. Die Schäden treten häufig recht früh auf, werden jedoch sehr spät entdeckt.

Die diabetische Nephropathie zeichnet sich durch Erhöhung der Albuminausscheidung im Urin sowie einer Abnahme der glomerulären Filtrationsrate aus. Von einer klinisch manifesten Nephropathie spricht man ab ≥ 300 mg Albumin/Tag. Als Folge kann es zu der Entwicklung oder der Verstärkung einer Hypertonie und einer Dyslipoproteinämie kommen. Im schlimmsten Fall kann es bis zu einer Niereninsuffizienz führen, welche nur durch lebenslange Dialyse oder Transplantation behandelt werden kann. Eine adäquate Diabetestherapie verringert das Risiko eine Niereninsuffizienz zu entwickeln deutlich. Im Vordergrund steht hier die glykämische Kontrolle, welche die relative Wahrscheinlichkeit einer Nephropathie um 21% senkt (Fried, Emanuele et al. 2013). Da über 70% der Typ 2 Diabetiker im Zusammenhang des metabolischen Syndroms an Hypertonus erkranken, ist auch die antihypertensive Therapie für Typ 2 Diabetiker nicht außer Acht zu lassen. Die strikte antihypertensive Therapie verzögert die Entwicklung der makro- sowie mikrovaskulären Schäden und damit die Schädigung der Glomerula (Isaacs and Vincent 2016).

Die renale Osteodystrophie fasst Skelettsymptome und Störungen des Mineralstoffwechsels zusammen, die bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz auftreten. Dabei kann diese Erkrankung durch einen erhöhten oder verminderten Knochenumsatz gekennzeichnet sein. Als Ursache der renalen Osteodystrophie lässt sich eine Kombination aus sekundärem Hyperparathyreoidismus mit Elektrolytstörungen und einer Vitamin-D-Hormon-Stoffwechselstörung finden. Differentialdiagnostisch muss bei niedrigem Knochenumsatz an die aplastische Knochenkrankheit und die renal bedingte Osteomalazie gedacht werden. Renale Dysfunktion führt also zum sekundären Hyperparathyreoidismus sowie Knochenverlust, indem die Knochenresorption gesteigert wird und die Mineralisation gestört ist. Kontinuierlich erhöhte Blutglukosespiegel können zu renalem Kalziumverlust führen und werden hierbei nicht ausreichend durch erhöhtes Parathormon ausgeglichen. Diese fehlende Regulierung wird auch als ‚funktionaler Hypoparathyreoidismus‘ bezeichnet (Moseley 2012).

1.2. Knochen

Das Knochengewebe ist verantwortlich für die Stabilisierung des Körpers, dient als Hebel bei Bewegungen, ist Ansatzpunkt für Muskeln und schützt die vulnerablen Teile des Körpers wie Gehirn, Spinalkanal und innere Organe vor mechanischen Verletzungen. Somit verlangt die mechanische Funktion des Knochens einerseits elastische Fähigkeiten um einwirkende Energie abzufedern, andererseits hohe Stabilität für Bewegungen und für die Protektion innerer Strukturen. Weiter wirkt Knochen als Mineraldepot für Kalzium sowie Phosphat und sorgt in diesem Kontext für einen gleichmäßigen Kalziumspiegel im Blut. Außerdem ist das Knochenmark entscheidend für die Hämatopoese (Harada and Rodan 2003).

Das Knochengewebe besteht aus zellulären Anteilen und der Knochenmatrix, die in anorganische Matrix und organische Matrix unterschieden werden kann. Hauptkomponente der anorganischen Matrix sind Hydroxyapatit-Kristalle. Die organische Matrix setzt sich aus Kollagen Typ I, einer glykosaminreichen Grundsubstanz und vielen weiteren Proteinen wie z.B. Fibronektin, Osteonektin oder Osteokalzin (OCN) zusammen. Die Organisation aus der Zugfestigkeit durch Kollagenfasern und erlangte Steifigkeit durch Hydroxyapatit-Kristalle ist für die Stabilität des Knochens von entscheidender Rolle.

Im menschlichen Skelett existieren im Wesentlichen zwei Knochentypen: Kortikaler und trabekulärer Knochen. Während die Bausteine beider Formen gleich sind, unterscheiden sich die Formen in ihrer mikro- und makroskopischen Zusammensetzung. Kortikaler Knochen macht 80% des Skeletts aus und ist dicht und kompakt gebaut. Seine Struktur zeigt einen hohen Widerstand gegenüber Biege- und Zugkräften und stellt den stabilisierenden Faktor des Skelettes dar. Der trabekuläre Knochen bildet ein inneres Gerüst, sorgt für die strukturelle Stabilität und stellt die metabolische Funktion des Knochens dar.

1.2.1. Modeling und Remodeling

Der Knochen wird durch den Prozess des Modelings gebildet und im Prozess des Remodelings umgewandelt. Bei Erwachsenen steht der Erhalt von Form, Qualität und Größe des Skeletts im Vordergrund.

Knochen untersteht demnach einem fortlaufenden Umbauprozess, der den Anforderungen und einwirkenden Belastungen lebenslang gezielt angepasst wird. BMUs (Basic Multicellular units) steuern diesen Prozess. Sie bestehen aus knochenspezifischen Makrophagen, Osteoklasten und Osteoblasten. Osteoblasten stellen von mesenchymalen Stammzellen (MSC) abstammende, knochenspezifische Zellen dar (Frost 1997).

Der Knochenhaushalt sowie die Stärke des Knochens werden durch ein Gleichgewicht zwischen Knochenresorption der Osteoklasten sowie der Knochenformation durch die Osteoblasten geregelt. Abbildung 2 stellt dieses Gleichgewicht mit den Einflussfaktoren dar.

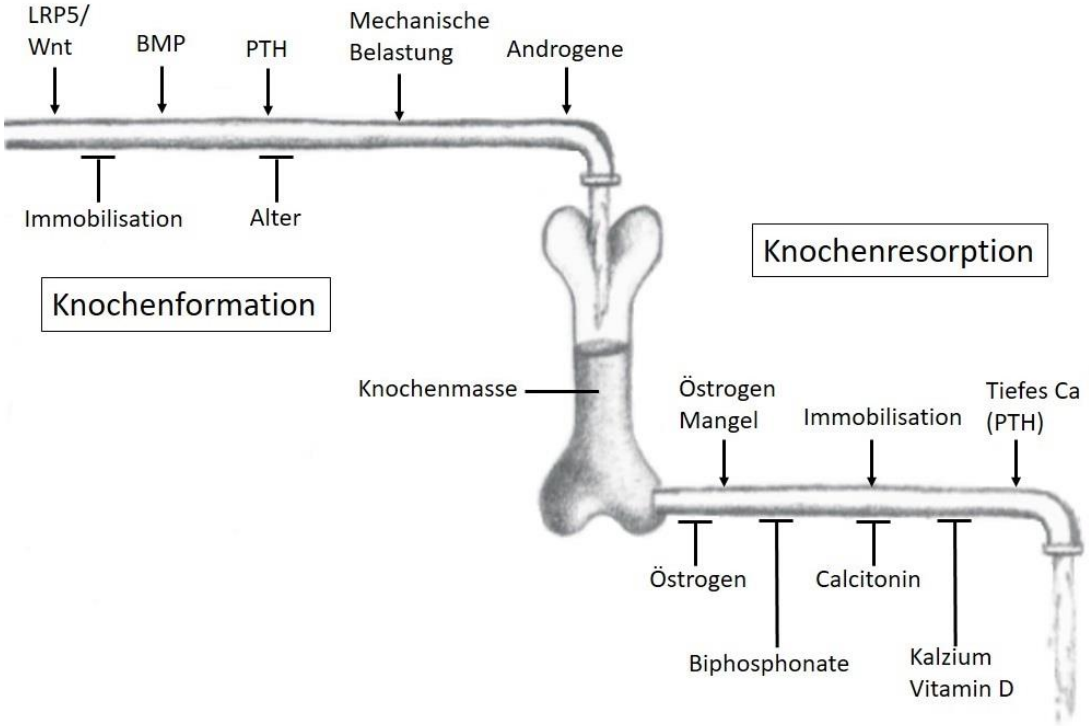

Abbildung 2: Überblick über die Knochenhomöostase und die regulierenden Faktoren. Aufrechterhaltung einer stabilen Knochenmasse durch physiologische und Pharmakologische Stimulatoren (⟶) und Inhibitoren (⊣). [Abkürzungen: BMP: bone morphogenetic protein(s); LRP5: low-density lipoprotein (LDL)-receptor-related protein 5; PTH: parathyroid hormone.] Modifiziert nach (Harada and Rodan 2003).

Der Ablauf des Remodeling beinhaltet drei aufeinanderfolgende Phasen: In der Resorption wird Knochensubstanz von Osteoklasten aufgenommen. In der Formation bauen Osteoblasten neuen Knochen auf, bis der bereits resorbierte Knochen vollständig ersetzt ist und organisieren die Knochenmatrix neu. Zur Steuerung dieses Prozesses werden eine Reihe von Wachstumsfaktoren ausgeschüttet. Hierzu gehören insulin-like growth factor (IGF), platelet-derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor-beta (TGF-β) und bone morphogenetic proteins (BMP) (Hadjidakis and Androulakis 2006). Als letzten Schritt differenzieren sich Osteoblasten zu Osteozyten, indem sie sich in sogenannten Lakunen in die synthetisierte Matrix einmauern.

1.2.2. Knochenheilung

Frakturheilung ist ein regenerativer Prozess, welcher als Antwort auf eine Verletzung erfolgt und zu einer optimalen Wiederherstellung der Skelettfunktion führen soll

(Einhorn 1998). Bei gesundem Knochen wird optimalerweise neuer Knochen geformt, welcher von unverletztem, angrenzendem Knochengewebe nicht zu unterscheiden ist. Dies liegt daran, dass Frakturen nach einer weitgehend gleichen Systematik heilen, wie wir es bei der embryonale Knochenentwicklung finden (Dimitriou, Tsiridis et al. 2005). So teilen sich beispielsweise in beiden Vorgängen MSCs regelmäßig, um Knochen, Knorpel, Sehnen, Bänder oder Muskel zu formen (Bruder, Fink et al. 1994).

Klassisch wird die Heilung in zwei Formen unterteilt: die primäre (direkte) und die sekundäre (indirekte) Knochenheilung. Bei der direkten Knochenheilung fördern Gefäßendothelzellen und perivaskuläre mesenchymale Zellen die Umwandlung von Osteoprogenitorzellen zu Osteoblasten in der inneren Knochenhaut, dem Endost. Diese Osteoblasten bilden neues Knochengewebe, welche die Knochenbälkchen der Fragmente durch Anlagerung zusammenwachsen lassen. Hierbei findet keine periostale Reaktion statt, wodurch kein Kallus entsteht. Aufgrund der geringen mechanischen Belastbarkeit dieses Knochens findet ab der achten Woche ein Umbau zu druck- und zugbelastbarem Knochen, das sogenannte Remodeling, statt. Diese Form der Knochenheilung ist das Ziel der unfallchirurgisch-orthopädischen Versorgung (Ghiasi, Chen et al. 2017).

Die indirekte Knochenheilung findet bei komplexen, instabilen oder schlecht adaptierten Frakturen statt. In Abbildung 3 ist der Weg vom Knochenbruch über die Knochenheilung zum reparierten Knochen abgebildet.

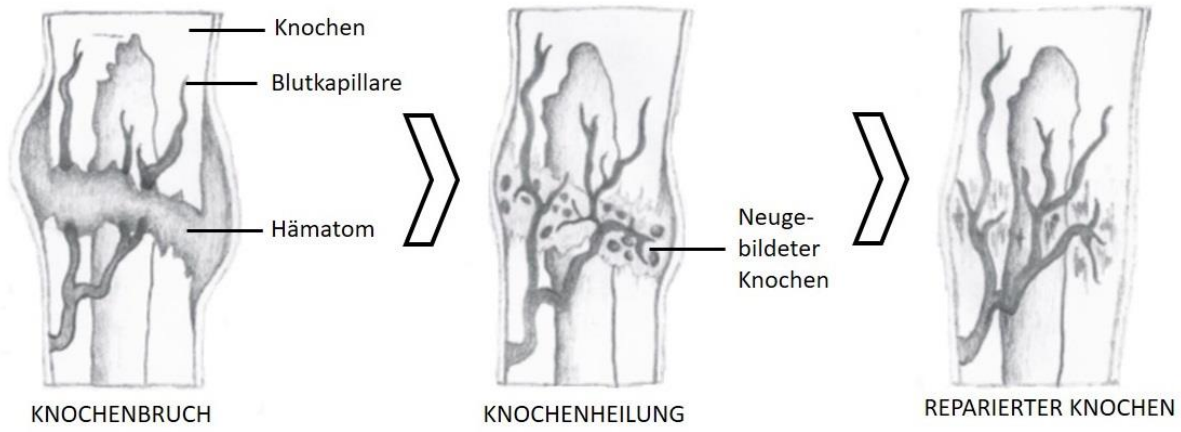

Abbildung 3: Knochenheilung. Modifiziert nach (OrthoBullets)

Die Heilung beginnt hierbei mit der inflammatorischen Phase, in der sich durch Gefäßverletzung entstandene Blutungen zu Hämatomen entwickeln. Entzündungszellen setzen Zytokine frei, wodurch sich undifferenzierte mesenchymale Stammzellen ansammeln. Diese bilden das Granulationsgewebe, woraus eine bindegewebige Narbe entsteht. In der darauffolgenden Reparaturphase wird Kallusgewebe gebildet. Hieran sind zwei bekannte Mechanismen beteiligt (Olsen, Reginato et al. 2000). Die desmale Ossifikation formt den harten Kallus direkt aus embryonalem Bindegewebe. Während der enchondralen Ossifikation wandeln sich undifferenzierte MSCs im Granulationsgewebe zu Chondrozyten um und es entsteht der weiche Kallus, welcher die Knochenfragmente primär verbindet (Ghiasi, Chen et al. 2017).

Der Heilungserfolg einer Fraktur ist jedoch von verschiedensten Faktoren abhängig und kann zu verzögerter und verschlechterter Knochenbruchheilung führen. Zu den Einflussfaktoren gehören eine mangelnde Gefäßversorgung mit folgender Knochennekrose, eine Instabilität in der vulnerablen Phase der Kallusüberbrückung, ein mangelnder Kontakt der Knochenfragmente mit fehlendem Informationsfluss (Stürmer 1996) sowie der Frakturtyp und genetische Disposition, Alter, Ernährungs- und Gesundheitszustand des Patienten (Röntgen 2011).

1.3. Diabetische Knochenkrankheit

Ein kontrovers diskutiertes Thema ist die veränderte Knochendichte als zentrales Thema der Erkrankung. Während die Knochendichte (bone mineral density, BMD) bei T1DM verringert ist, zeigt das Knochengewebe bei T2DM paradoxerweise nach Berücksichtigung des Alters sowie des BMI, in der Mehrzahl der Arbeiten eine erhöhte BMD (Schwartz, Sellmeyer et al. 2001, Vestergaard 2007, Leslie, Rubin et al. 2012, Starup-Linde, Lykkeboe et al. 2016). Jedoch gibt es auch Arbeiten, welche eine verminderte (Levin, Boisseau et al. 1976, Dutta, Pakhetra et al. 2012, Mathen, Thabah et al. 2015, Cui, Zhou et al. 2016) oder gleichbleibende (Adil, Aydın et al. 2015) BMD zeigten. Diese Widersprüche in der Literatur lassen sich am Ehesten durch folgende Störfaktoren erklären: Unterschiedliche Studienkonzepte mit spezifischer Auswahl

von Patienten, Auftreten von Komplikationen, Messung an verschiedenen Körperregionen oder abweichende BMD-Messmethoden wie die Quantitative Computertomographie (qCT) oder die Duale Röntgen Absorptiometrie (DEXA).

Um die Theorie der erhöhten BMD zu untersuchen, wurde mit Hilfe von hochauflösender peripherer quantitativer Computertomographie (HR-pQCT; high-resolution peripheral quantitative computer tomography) gezeigt, dass Frauen mit T2DM bei deutlich dichterem Knochentrabekelwerk eine vermehrt poröse Kortikalis haben (Burghardt, Issever et al. 2010, Paccou, Ward et al. 2016). Die Knochenhärte nimmt im Verlauf der Erkrankung mit DM ab und die Porosität der Kortikalis zu (Creecy, Uppuganti et al. 2016). Auch die Rotterdam Studie untersuchte die Knochenstrukturen und fand eine um 1,1-5,6% erhöhte BMD für schlecht eingestellte Diabetiker sowie eine um 4,6-5,6%ig verdickte Kortikalis (Oei, Zillikens et al. 2013). Der Unterschied in der BMD zwischen T1DM und T2DM lässt sich womöglich auf die unterschiedlichen Insulinkonzentrationen zurückführen, da Insulin über pro-osteoblastische Mechanismen in der Knochenformation und im Knochenwachstum eine entscheidende Rolle einnimmt. Typ 1 Diabetiker leiden unter absolutem Insulinmangel, einer Hypoinsulinämie, während die bei Typ 2 Diabetikern über längere Zeit bestehende Hyperinsulinämie sich sukzessiv zu einem relativen Insulinmangel entwickelt (Thrailkill, Lumpkin et al. 2005).

Weiter zeigen mehrere Arbeiten ein deutlich erhöhtes Frakturrisiko für Patienten mit T1DM sowie ein bis zu 1,4-fach erhöhtes Risiko für Patienten mit T2DM (de Liefde, van der Klift et al. 2005, Strotmeyer, Cauley et al. 2005, Vestergaard, Rejnmark et al. 2005, Bonds, Larson et al. 2006, Starup-Linde, Lykkeboe et al. 2016). Die Rotterdam Studie zeigte ein 47%-62% erhöhtes Frakturrisiko für Diabetiker mit schlecht eingestelltem Glukosespiegel im Vergleich zu Patienten ohne DM (Hazard Ratio (HR) 1,47 [1,12–1,92]) und Patienten mit gut kontrolliertem Glukosespiegel (HR 1,62 [1,09–2,40]) (Oei, Zillikens et al. 2013). Anfällig im menschlichen Körper für Frakturen sind vor allem die Hüfte mit 32,7%, gefolgt von der oberen Extremität mit 19,3% (Kim, Jung et al. 2012) sowie dem Fuß 11,4% (Schwartz, Sellmeyer et al. 2001). So zeigte sich bei älteren Erwachsenen mit T2DM ein erhöhtes Frakturrisiko der Extremitäten

von 50%-80%. Außerdem fand man ein relatives Risiko von 1,7 für Beckenfrakturen bei Männern und Frauen mit T2DM im Vergleich zu gesunden Patienten. Das Risiko für alle klinischen Frakturen war mit einem relativen Risiko von 1,2 ebenfalls für beide an DM erkrankten Geschlechter erhöht (Rubin and Patsch 2016). Hierbei wirkt sich sowohl eine lange Erkrankungsdauer mit DM (Creecy, Uppuganti et al. 2016) als auch die Behandlung mit Insulin oder Glitazonen negativ auf das Frakturrisiko aus (Nicodemus and Folsom 2001, Janghorbani, Feskanich et al. 2006). So führt die Therapie mit Glitazonen nicht nur zur Steigerung der Insulin Sensitivität, sondern stimuliert die Differenzierung der Adipozyten sowie der Osteoklasten und hemmt die Osteoblastenfunktion. Dies führt zu einer Zunahme des Knochenfettes, einer Hemmung der Knochenformation und einer Zunahme der Knochenreabsorption (Meier, Schwartz et al. 2015). Insulin stimuliert durch seinen anabolen Effekt einerseits die Osteoblastendifferenzierung und die Knochenmatrixsynthese. Andererseits ist Insulin mit einem erhöhten Frakturrisiko assoziiert, welches sich durch die unter Insulintherapie auftretende Hypoglykämie induzierte Fallneigung erklären lassen kann (Monami, Cresci et al. 2008). Einen positiven Effekt auf das Frakturrisiko findet sich in der Behandlung mit Metformin durch die Stimulation der Osteoblastendifferenzierung und der Reossifikation von Knochen (Vestergaard, Rejnmark et al. 2005). Veränderte Knocheneigenschaften, verminderte biochemische Marker des Knochenumsatzes, die Akkumulation von AGEs (advanced glycosylation end-products) und variierende Insulinlevel beeinflussen das Milieu des Knochens (Rubin and Patsch 2016) und erhöhen somit das Frakturrisiko. Zu den biochemischen Markern, welche mit gesteigertem Frakturrisiko assoziiert werden, zählen die Verminderung von OCN, knochenspezifische Alkalische Phosphatase und Parathormon sowie eine Erhöhung von Sklerostin (Rubin 2015). Aber auch eine bestehende Hyperglykämie, erhöhte Sauerstoffradikale, eine vermehrte Ausschüttung von Zytokinen, veränderte Fettsättigungen im Knochenmark und eine erhöhte Entzündungstendenz im Körper von Typ 2 Diabetikern wirken sich auf Frakturen aus. Gleichzeitig werden proinflammatorische Zytokine und Chemokine in T2DM mit Knochenfrakturen durch Glukose stimuliert (Sun, Yang et al. 2016).

Weitere Faktoren, die das Frakturrisiko bei Diabetikern beeinflussen, sind vor allem das verstärkte Gewicht mit Auswirkungen auf das gesamte Skelett, die Retinopathie der Augen mit folglich schlechterem Sehen, sowie die Polyneuropathie mit einer Zunahme der Sturzgefahr. Außerdem kann die diabetische Nephropathie zur renalen Osteodystrophie (Kapitel 1.1.2) führen und somit den Knochenhaushalt beeinflussen, indem unter anderem durch Hyperkalzurie das für den Knochen wichtige Kalzium verloren geht (Moseley 2012).

Dies spricht für die Beteiligung von DM assoziierten Veränderungen in Material- sowie Struktureigenschaften des Knochens. Eine übermäßig glykierte Kollagenmatrix in einem Zustand von geringem Umsatz in Kombination mit leichten kortikalen Abnormalitäten, könnte zu einer verminderten biomechanischen Kompetenz führen (Leslie, Rubin et al. 2012). Das ‚fracture risk assessment tool' (FRAX) der World Health Organisation unterschätz bisher das Frakturrisiko bei Diabetespatienten. Um dies zu verbessern werden neue Parameter untersucht, gemessen und einbezogen (Giangregorio, Leslie et al. 2012, Botella Martinez, Varo Cenarruzabeitia et al. 2016). Hierzu zählen bei Typ 2 Diabetikern die deutlich schlechtere Knochenqualität, eine verringerte Knochenbildung, ein vermindertes Knochenregenerationspotential sowie zahlreiche Mikroangiopathien mit Folgeschäden (Loder 1988, Leidig-Bruckner and Ziegler 2001, Schwartz 2003). Die veränderte Knochenqualität geht mit einer verschlechterten Vernetzung der Trabekel, erhöhter Porosität und vermindertem enzymatischem Crosslinking (Saito and Marumo 2010) einher. Für die Einschätzung des Frakturrisikos ist die alleinige Verwendung der BMD also nicht aussagekräftig. Wichtig ist hierbei die BMS (bone mineral strength), zusammengesetzt aus Knochendichte, -struktur und –qualität (Palermo, Tuccinardi et al. 2016). Hierbei werden mikrostrukturelle und gewebsmaterielle Eigenschaften des Knochens mit einbezogen. So zeigen postmenopausale Frauen mit T2DM eine durch DEXA gemessene BMD, die ähnlich ist wie die der durch Alter und BMI verglichenen Nicht-Diabetikern. Es zeigte sich jedoch eine deutlich verminderte BMS bei den T2DM im Vergleich zu den nicht-diabetischen Kontrollen (Farr, Drake et al. 2014).

Zusammenfassend werden diese pathologischen Veränderungen im diabetischen Knochen als ‚diabetic bone disease' bezeichnet (Retzepi and Donos 2010). So führt eine schlechte Einstellung des Diabetes in T2DM zu einem erhöhten Frakturrisiko, einer erhöhten BMD sowie einer verdickten Kortikalis. Weiter zeigt sich die Knochenheilung in einem diabetischen Patienten erschwert. Dies muss bei der Planung einer operativen Versorgung bedacht werden und stellt die medizinische Versorgung vor eine bedeutende Problematik. In der klinischen Versorgung ist demnach eine enge Kontrolle der Glukosespiegel peri- sowie postoperativ wichtig zur Verbesserung des Frakturmilieus. Ein stabile Stoffwechselsituation ist ausschlaggebend für das Heilungspotential (Bibbo, Lin et al. 2001).

1.4. Wnt–Signalweg

Der Signaltransduktionsweg der wingless-type MMTV integration site family (Wnt) besteht aus Proteinen, welche gezielt Signale aufnehmen um sie danach in die Zelle weiterzuleiten und so unter anderem die Genexpression steuern. Wnt aktiviert mindestens vier verschiedene Signalkaskaden, darunter der Wnt/β-catenin-Weg, der Wnt/Ca^{2+}-Weg, der Wnt/PCP (planar cell polarity) -Weg oder der Wnt/PKA (proteinkinase A) -Weg (Moon, Bowerman et al. 2002).

Wnt-Gene sind 39-46 kDa zysteinreiche Glykoproteine, welche in verschiedensten Organismen gefunden wurden. So wurden diese in der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster)*, im Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans)*, im Frosch (*Xenopus laevis)*, im Zebrafisch (*Danio rerio)*, in der Maus (*Mus musculus)*, im Huhn und im Menschen erforscht. 1982 entdeckte man das Proto-onkogen Int-1 in Mäusen, welches dem Wingless Gen (Wg) in Drosophila entsprach. In der Nomenklatur wurden beide Gene später zum Wnt-Gen zusammengefasst. Die Erkenntnis der Funktion des Wnt-Mechanismus zeichnet sich also aus verschiedensten Systemen ab. Ein menschliches Genom besitzt 19 Wnt-Signalproteine, welche an 10 verschiedene Frizzled Transmembranrezeptoren binden können. Die Korezeptoren Low-density-lipoprotein receptor-related proteins 5 und 6 (*LRP5 und LRP6)*, welche eine Unterklasse der Low-

density-lipoprotein receptor (LDLR) Familie darstellen, spielen eine wichtige Rolle zur Stabilisierung des Komplexes (He, Semenov et al. 2004).

Primär erkannte man die Signalwege als wichtigen Bestandteil bei der Entstehung von Krebserkrankungen bei Erwachsenen. So kommt es durch die Aktivierung des Signalweges im Tumorsuppressorgen APC durch eine loss-of-function Mutation oder durch eine gain-of-function Mutation im β-Catenin zu Karzinomen. Hierunter fallen vor allem Kolorektale Karzinome und Melanome (Moon, Bowerman et al. 2002). Später wurde herausgefunden, dass die Signalwege entscheidende Vorgänge bei der Zell-Zell-Interaktion in der embryonalen Entwicklung regulieren. Sie spielen also eine wichtige Rolle für Zelldifferenzierung, -proliferation und –migration sowie in der neuronalen Strukturierung und Organogenese (Komiya and Habas 2008). Des Weiteren wird die Gewebsregeneration im erwachsenen Knochenmark, in der Haut sowie im Darm durch diese Signalwege kontrolliert (Logan and Nusse 2004). Auch in der Hemmung der Adipogenese (Ross, Hemati et al. 2000), der Entstehung von pathologischer Angiogenese (Wright, Aikawa et al. 1999) sowie in der Extremitätenbildung und Knochenregulation spielt der Wnt-Signalweg eine wichtige Rolle. (Moon, Bowerman et al. 2002).

1.4.1. Der kanonische Wnt-Signalweg

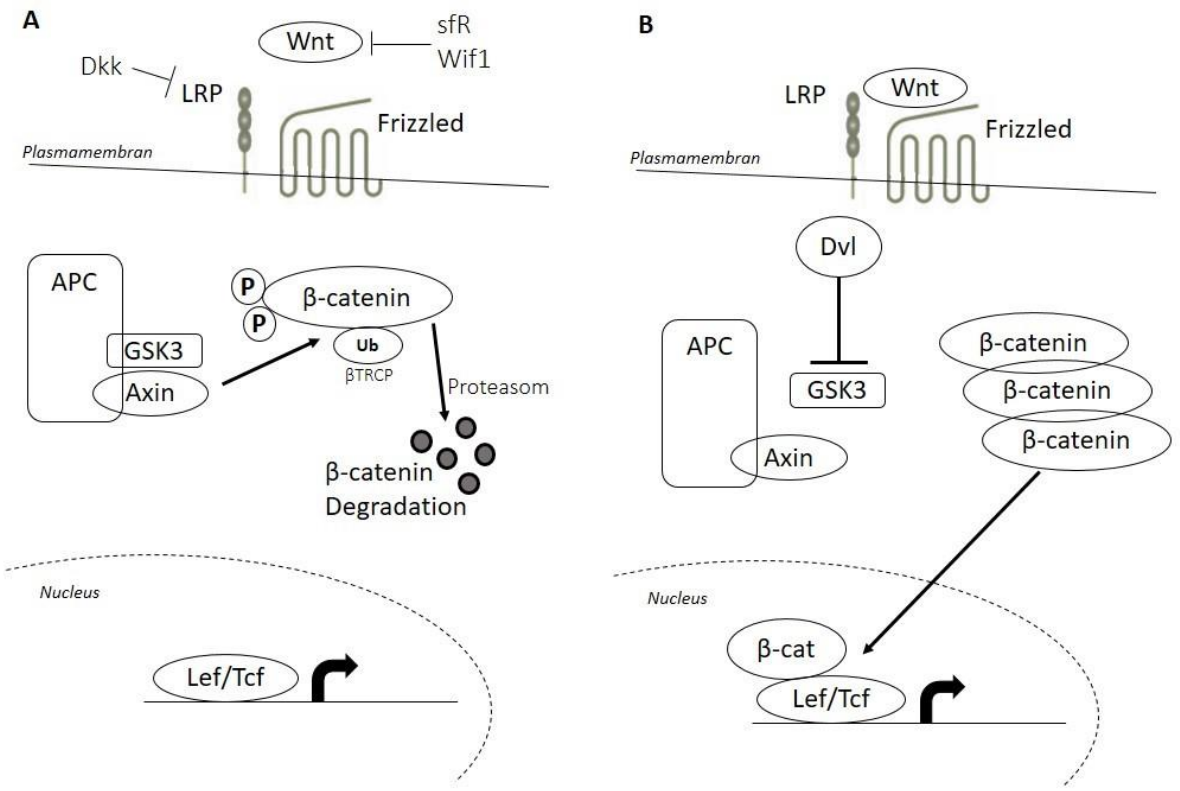

Abbildung 4: Wnt-Signalweg im Off (A) und On (B) State
Wnt (wingless-type), DKK (Dickkopf), LRP (Low Density Lipoprotein Receptor), APC (Adenomatous polyposis coli), GSK (Glykogensynthase-Kinase), P (Phosphatgruppe), 6-TRCP1 (beta transducin repeat containing protein 1), Ub (Ubiquitin), Dvl (Dishellved), Lef (lymphoid enhancer-binding factor), Tcf (T-cell Faktor), sfR (Secreted Frizzle related Proteins), Wif (Wnt inhibitory factor); Dekonstruktionskomplex: APC + Axin + GSK3

Im Abschnitt A der Abbildung 4 wird der Off-State des Wnt-Signalweges dargesellt. Im Off-State wird das β-Catenin, ein integrales E-Cadherin Adhäsionsprotein und Transkriptions Ko-Regulator, durch den Adenomatous polyposis coli (APC) / Axin / Glykogensynthase-Kinase (GSK) -3β-Destruktionskomplex am NH_2-terminalen Ende phosphoryliert. Über beta transducin repeat containing protein 1 (β-TRCP1) wird dieser Komplex polyubiquitiniert und anschließend proteasomal degradiert.

Die Aktivierung des Wnt-Signales wird im Abschnitt B der Abbildung 4 schematisiert. Im On-State bindet der Wnt-Ligand, ein Glykoprotein, an den Frizzled Rezeptor, welcher in der Zellmembran liegt. Dies führt zu einer Komplexbildung mit dem stabilisierenden und unentbehrlichen Korezeptoren LRP5 und 6. Der Komplex aus diesen drei Komponenten führt nun zu einer Aktivierung des Dishevelled (Dvl) Proteins

durch Phosphorylierung, Polyubiquitinierung und Polymerisation. Als Folge bindet Dishevelled den zytoplasmatischen Multiproteinkomplex aus GSK-3β, APC und Axin. Der Komplex kann somit β-Catenin nicht mehr phosphorylieren. Das nun stabile β-Catenin wird in den Kern transloziert, wo es die lymphoid enhancer-binding factor (LEF) / T-cell Faktor (TCF) abhängige Transkription anregt.

Es wurde neben dem typischen Wnt-Rezeptor/Frizzled Ligand Komplex ein alternativer Aktivierungsweg der Gene gefunden. So identifizierte man Ryk als alternativen Wnt-Rezeptor und Norrie disease protein NDP sowie R-Spondin als neuen Frizzed Liganden (Hendrickx and Leyns 2008).

Auch finden im OFF-State weitere Mechanismen statt. So bindet Dickkopf (DKK) direkt an die LRP Komponenten und verhindert zusammen mit Kremen1 und 2 direkt den Frizzled/LRP Komplex, welcher daraufhin per Endozytose von der Zellmembran entfernt wird (Mao, Wu et al. 2002). SFRPs (Secreted Frizzled related Proteins) und Wif1 (Wnt inhibitory factor 1) wirken als direkte Antagonisten der Wnt-Proteine, indem sie an Wnt binden und sie sequestrieren (Bafico, Liu et al. 2001). Im Zellkern ist unter anderem der Korezeptor Groucho für die Unterdrückung der Transkription zuständig (Wu, Bowe et al. 2014).

1.4.2. Nicht-kanonische Wnt-Signalwege

Es existieren verschiedene nicht-kanonische Wnt-Signalwege, wobei jedoch eine genaue Abgrenzung der einzelnen Wege aufgrund von Überschneidungen nicht eindeutig möglich ist (Semenov, Habas et al.). Die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege laufen β-Catenin unabhängig. Fz-Rezeptoren interagieren mit Korezeptoren wie ROR2 und RYK (Katoh and Katoh 2007).

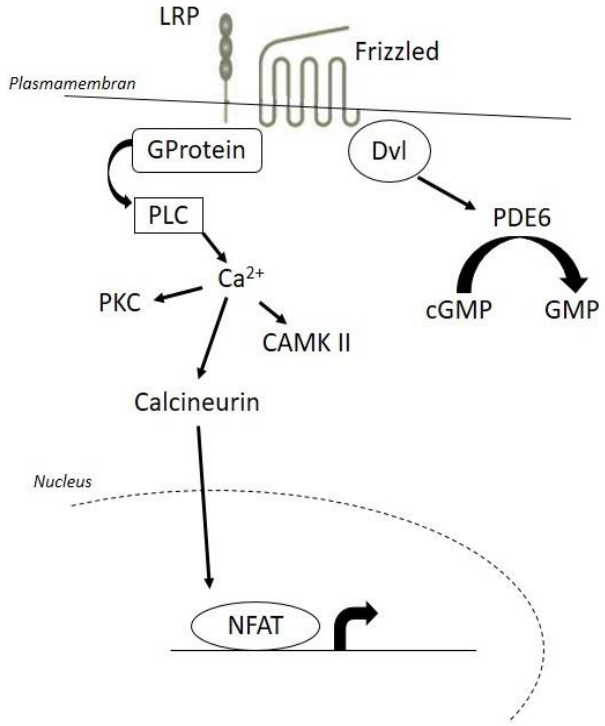

Abbildung 5: Wnt/Kalzium-Signalweg

Im Wnt/ Ca^{2+}-Signalweg binden Wnt-Proteine an Fz Rezeptoren und aktivieren heteromere G-Proteine, welche das intrazelluläre Kalzium erhöhen und das zyklische GMP (cGMP) senken (Abbildung 5). Das erhöhte Kalzium führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), der Kalzium/ Calmodulin abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) und des Calcineurin, welches den Kernfaktor der aktivierten T Zelle (NF-AT) und weitere Transkriptionsfaktoren aktiviert (Wang and Malbon 2003, Kohn and Moon 2005). Der Wnt/ Ca^{2+}-Signalweg beeinflusst Zell Adhäsion sowie Zellbewegung während der Gastrulation und inhibiert den kanonischen Wnt-Signalweg. (Torres, Yang-Snyder et al. 1996).

Im Wnt/PCP-Signalweg führt die Bindung von Wnt-Proteinen an Fz Rezeptoren zu der durch Dvl getriggerten Aktivierung der kleinen GTPasen Rho und Rac (Abbildung 6). Während Rho Daam-1 benötigt und damit ROCK aktiviert, stimuliert Rac die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und damit die Genexpression. Dieser Signalweg fördert die asymmetrische zytoskeletale Organisation (Habas, Dawid et al. 2003) und durch Modifikation des Aktin Zytoskelettes die Zellpolarisation (Huelsken and Behrens 2002, Habas and Dawid 2005).

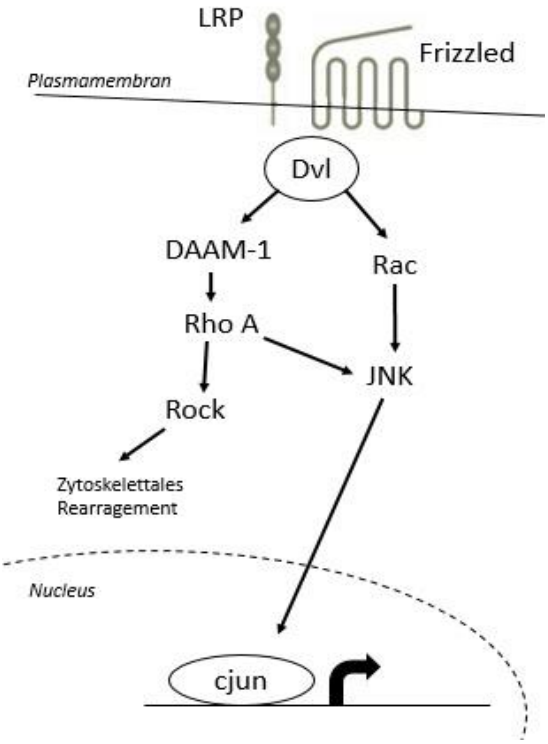

Abbildung 6: Wnt/PCP-Signalweg

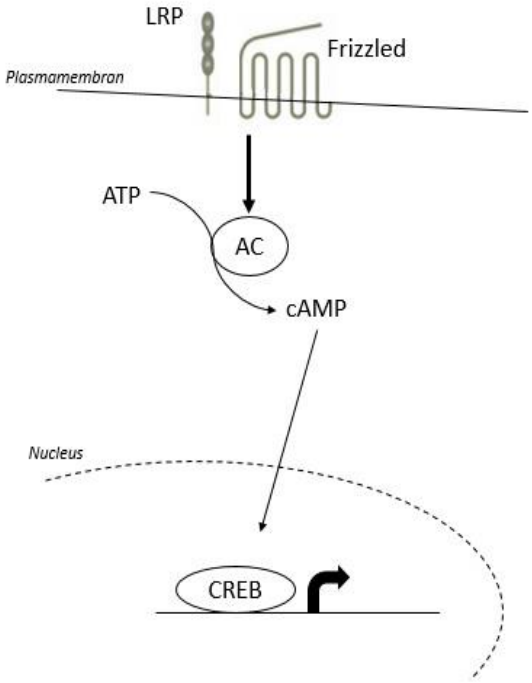

Abbildung 7: Wnt/PKA-Signalweg

Der Wnt/PKA-Signalweg ist in Abbildung 7 dargestellt und aktiviert das zyklische AMP (cAMP) und stimuliert die CREB-abhängige Transkription in PKA abhängiger Form und führt so zur myogenen Gen Expression während der Entwicklung (Chen, Ginty et al. 2005).

In der folgenden Arbeit wird jedoch hauptsächlich der kanonische Wnt-Signalweg betrachtet.

1.4.3. Bedeutung

In den letzten Jahren wurde die Wichtigkeit der Signalmoleküle der Wnt-Familie weiter erforscht und es konnte eine zentrale Rolle nicht nur in der embryonalen Entwicklung, sondern auch in der Regulierung von Knochenmasse und endokrinen Funktionen festgestellt werden.

Bei Betrachtung verschiedenster Entwicklungsvorgängen im menschlichen Körper zeigen Studien unter anderem die Bedeutung des Wnt an der Entwicklung des exokrinen Pankreas mit seinen Pankreasinseln sowie der Entstehung, der Funktion und die Proliferation der β-Zellen (Jin 2008). Es wurde außerdem deutlich, dass Wnt die durch Glukose stimulierte Insulin Sekretion reguliert und damit die Glukose Homöostase erhält (Schinner 2009). Jedoch weiß man derzeit, dass der kanonische Wnt-Signalweg durch Interaktionen und Verknüpfungen mit anderen Signalwegen sehr viel komplizierter ist als angenommen. So induziert GLP-1 (Glukagon-like-peptide-1) über die PKA (Proteinkinase A) die Aktivierung des β-Catenin und damit die Transkription Wnt reagibler Gene. Weiter hemmt Insulin GSK3β, welches hierdurch ebenfalls zu einer Aktivierung von β-Catenin und damit der Transkription führt (Welters and Kulkarni 2008). Demzufolge führen Veränderungen der Wnt-Aktivität zu Insulin Resistenz, DM und dem metabolischem Syndrom (Palsgaard, Emanuelli et al. 2016).

T2DM ist weitverbreitet als chronische und altersabhängige Erkrankung. Mittlerweile ist bekannt, dass β-Catenin auch mit FOXOs (forkhead box transcription factor subgroup O) interagieren kann, um die metabolische Homöostase durch die Insulin-FOXO Protein Signalkaskade zu kontrollieren. Demnach konkurrieren FOXOs und TCF Proteine um den limitierten β-Catenin Pool, was wiederum zu einer verminderten Wnt-Aktivität führt. Da mit dem Alter und durch oxidativen Stress die Aktivität der FOXOs gefördert wird, erschließt sich eine neue Erklärung der Pathogenese von T2DM sowie weiteren altersabhängigen Erkrankungen (Ip, Chiang et al. 2012).

Anomalitäten der Wnt-Genfunktion führen zu unterschiedlichen pathologischen Knochenkonditionen. Dies beinhaltet abnormale Knochenmassen, Knochenentwicklungsstörungen, Osteosarkome sowie Knochenverluste. Ferner wird

der Wnt-Signalweg sowie *LRP5* (Kapitel 1.5.3) als Teil davon, bei der Reparatur von Knochenfrakturen aktiviert und spielt eine entscheidende Rolle in der Knochenregulation, -morphologie sowie dem gesunden Knochenaufbau (Macsai, Foster et al. 2008, Audrey Koay and Brown 2016). So wird der Wnt-Signalweg bereits während postnataler knochenregenerativen Vorgänge aktiviert, wie auch bei BMP-2 induzierter enchondraler Knochenformation oder Frakturheilung (Chen and Alman 2009). Der kanonische Wnt-Signalweg ist in verschiedenen Zelltypen des fötalen und neonatalen Skelettes aktiv, einschließlich Chondrozyten, Osteoblasten und Osteozyten. Mit dem Alter nimmt die Aktivierung des Wnt-Signalweges ab, in Chondrozyten und Osteozyten bleibt es jedoch erhalten (Hens, Wilson et al. 2005). Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark sind pluripotente Progenitorzellen, welche sich in Knochen-, Knorpel-, Muskel- und Fettzellen differenzieren können. In der Knochenregeneration wandeln sich mesenchymale Stammzellen in Zellen der Osteoblastenlinie um (Si, Kang et al. 2006). Hierbei hat der Wnt/β-Catenin-Signalweg drei wichtige Funktionen: Spezialisierung von Osteo-/Chondroprogenitor Zellen zu Osteoblasten/Chondroblasten, Stimulation der Osteoblastenproliferation und die Steigerung des Überlebens von Osteoblasten und Osteozyten (Khosla, Westendorf et al. 2008). Zur Unterstützung der Theorie zeigte sich in geschlossenen Rattenfrakturen eine Hochregulierung einiger Gene des Wnt/β-Catenin-Signalweges. Hierzu gehören Wnt-4, Wnt-5a, Wnt-5b, Fz, β-Catenin, Dvl, TCF-1, LRP5, Fibronektin, Phosphatase 2A, Connexin 43 sowie c-myc (Hadjiargyrou, Lombardo et al. 2002, Zhong, Gersch et al. 2006).

Es wird deutlich, dass der Wnt-Signalweg in vieler Hinsicht an Bedeutung gewinnt, und vor allem im Hinblick auf die Therapie der Erkrankungen nicht außer Acht gelassen werden sollte. So wird vermutet, dass GSK3β- Inhibitoren in der Behandlung von DM erfolgreich sein können, indem sie die Eigenschaft von Insulin nachahmen und die Glykoneogenese anregen, während sie die Insulinresistenz umgehen (Cohen and Goedert 2004). Auch im Knochenstoffwechsel sind therapeutische Ansätze nicht zu unterschätzen. Wie im oberen Abschnitt beschrieben, wird β-Catenin in frühen pluripotenten mesenchymalen Stammzellen benötigt, um sie in Osteoblasten zu

differenzieren und diese positiv zu beeinflussen. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit der Aktivierung des β-Catenin in Zukunft als therapeutisches Mittel zur erhöhten Knochendichte sowie besserer Frakturheilung einzusetzen (Silkstone, Hong et al. 2008).

1.5. Zielgene dieser Arbeit

1.5.1. WNT3A

Wie in Kapitel 1.4 bereits beschrieben, sind Moleküle der Wnt-Familie nicht nur wichtig für den embryonalen Entwicklungsprozess, sondern auch für die Regulierung der Knochenmasse und der Knochenregeneration wie die enchondrale Knochenformation und die Frakturheilung, sowie Bestandteil der Entwicklung von DM.

So wurde gezeigt, dass WNT3A während der Entwicklung der Insulinresistenz speziell von Skelettmuskel und Fettgewebe ausgeschüttet werden. Im prädiabetischen Stadium führt die Expression von WNT3A und somit die Aktivierung des Wnt-Signalweges in β-Zellen zu einer gesteigerten Insulinproduktion sowie β-Zell-Proliferation. In ausgebildetem T2DM dagegen, wird der Wnt-Signalweg in β-Zellen herunterreguliert und führt somit zu dysfunktionalen Pankreasinseln. Das Zusammenspiel von aktivierenden Wnt-Faktoren wie WNT3A und hemmenden Wnt-Faktoren wie WNT4 triggert also die Progression von Prädiabetes zu DM (Kozinski, Jazurek et al. 2016). Aus der aktuellen Studienlage geht hervor, dass WNT3A die adipogene Differenzierung durch Herunterregulation des CCAAT-Anker-Bindeproteins alpha (C/EBPalpha) und des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptor gamma (PPARgamma) hemmt (Shang, Wang et al. 2007).

Bei der Knochenregeneration wird der ursprüngliche weiche, knorpelige Kallus durch einen härteren, knochigen Kallus ersetzt. Dies läuft ähnlich wie bei der embryonalen Knochenentwicklung. Die Wnt-Familie reguliert hierbei die Differenzierung von pluripotenten MSCs in Osteoblasten (Marsell and Einhorn 2011). Es wurde gezeigt, dass WNT3A hierbei die Proliferation und Migration von Erwachsenen MSCs fördert

(Shang, Wang et al. 2007). Qiang et al. schleusten WNT3A cDNA in H929 Zellen, kultivierten diese in serumfreiem Medium, um sie später in Knochen von Mäusen zu transplantieren. Hierbei zeigte sich in den transplantierten Knochen eine gesteigerte Osteoblastenpopulation bei einer fallenden Osteoklastenanzahl (Qiang, Shaughnessy et al. 2008). Neben dem Einfluss auf die Entwicklung der Knochenzellen wirkt WNT3A zusammen mit BMP-2 positiv auf die Produktion von MMP-13 (matrix metalloproteinase). MMPs, stehen mit TIMPs (Tissue Inhibitors of matrix metalloproteinase) im Gleichgewicht und stellen zusammen eine maßgebliche Rolle im Knochenremodeling dar (Aiko and Masato 2006). Auch konnte in einem Knochentransplantationsmodell gezeigt werden, dass liposomales WNT3A das Zellüberleben verbessert und hierbei die knöcherne Regeneration deutlich fördert (Leucht, Jiang et al. 2013).

1.5.2. WNT5A

Das auf Chromosom 3p14.3 lokalisierte WNT5A gehört zur Familie der Proto-onkogene und spielt eine maßgebliche Rolle in der Skelettentwicklung. So wird das Wnt-Gen für das longitudinale Skelettwachstum (Yang, Topol et al. 2003) sowie für das distale Mesenchym während der Extremitätenentwicklung benötigt (Fischer, Boland et al. 2002).

In einer Western Blot Analyse wurde festgestellt, dass während der Frakturheilung ein deutlich hochreguliertes WNT5A und eine vermehrte Proteinkinase C alpha (PKCα) vorhanden sind. Bekannt ist die Aktivierung des Wnt/Ca^{2+}-Signalwegs durch WNT5A und PKCα als entscheidender Bestandteil der Frakturheilung (Chen, Whetstone et al. 2007).

WNT5A spielt aber nicht nur im Knochenmetabolismus eine wichtige Rolle. Mehrere Studien zeigen, dass WNT5A an entzündlichen Prozessen beteiligt ist und eine hohe Relevanz für metabolische Erkrankungen hat. So führt Übergewicht zur Einwanderung von Makrophagen ins Fettgewebe, welche hier nicht nur über Zytokine, sondern auch über WNT5A auf den Körper wirken und die Differenzierung von Präadipozyten inhibiert. WNT5A ist somit ein potenter Inhibitor der Adipogenese.

Proinflammatorisches WNT5A kann im Serum von Normalgewichtigen nicht nachgewiesen werden, während es bei Übergewichtigen vorzufinden ist. Normalerweise wirkt SFRP5 als Gegenspieler von WNT5A, schafft es jedoch bei ausgeprägter Adipositas und Überschuss an proinflammatorischem WNT5A nicht, diesem entgegen zu wirken (Schulte, Müller et al. 2012).

Ein Schlüsselmerkmal des DM ist die Endotheldysfunktion und daraus folgende vaskuläre Schäden. Proinflammatorisches WNT5A führt zu endothelialer Insulinresistenz und Entzündungsreaktion in Patienten mit DM, was zwei ausschlaggebende Einflussfaktoren in der Entstehung der Endotheldysfunktion sind. So ist in Endothelzellen von Diabetikern im Vergleich zu Nicht-Diabetikern die Expression von WNT5A 1,3-fach erhöht (Bretón-Romero, Feng et al. 2016). Das vermehrte Vorkommen von WNT5A führt einerseits zu gesteigerter Insulinresistenz und gleichzeitig zu metabolischer Komorbidität (Gerdes, Laudes et al. 2014).

1.5.3. LRP5

LRP5 ist ein Transmembranprotein Typ I und stellt eine Untergruppe der LDLR-Familie dar (Brown, Twells et al. 1998). Als Korezeptor ist LRP5 wichtig in der Regulation des Knochen- , Glukose und Cholesterin-Metabolismus (He, Semenov et al. 2004). Man fand das Gen innerhalb des Insulin-abhängigen DM Locus IDDM4 auf Chromosom 11q13 (Hey, Twells et al. 1998). Mutationen des *LRP5* werden häufig mit Übergewicht assoziiert und fördern hierbei die damit zusammenhängenden Erkrankungen wie DM, das metabolische Syndrom, Herzerkrankungen und Bluthochdruck (Guo, Xiong et al. 2006, Jin 2008).

LRP5 kommt, wie viele Mitglieder des Wnt-Signalweges, ubiquitär im Körper vor und reguliert die Knochendichte. So zeigen LRP5 Knockout-Mäuse einen postnatalen Knochenverlust aufgrund mangelnder Knochenformation sowie fehlender Osteoblasten Proliferation. Auch fanden sich bei *LRP5* Mutationen (Missense Mutationen A29T (c.85G>A) und R1036Q (c.3107G>A) sowie Frameshift C913fs (c.2737_2738insT)) schwere Formen von Osteoporose und eine Anhäufung von wiederkehrenden Frakturen (Hartikka, Mäkitie et al. 2005). Beispielhaft ist das durch

Mutationen in *LRP5* entstehende autosomal rezessive Osteoporose Pseudoglioma Syndrom (OPPG) zu erwähnen. Bei diesem Syndrom fällt eine verminderte Knochenmasse, also eine schwere Form der Osteoporose im Menschen auf (Gong, Slee et al. 2001).

Der Funktionsverlust von LRP5 führt also zu einer reduzierten Knochenmasse (Gong, Slee et al. 2001). Verschiedene Arbeiten zeigen jedoch, dass Phänotypen mit einer einzelnen Punktmutation im Exon 3 durch einen folglich stattfindenden Aminosäureaustausch von Glycin zu Valin an Position 171 auf Chromosom 11q12-13 gesteigerte Knochenmassen aufzeichnen. Im Mausmodell zeigte sich, dass eine mit $LRP5_{G171V}$ Mutation exprimierte Mauslinie durch eine Erhöhung der Zahl aktiver Osteoblasten zu einem Phänotyp mit erhöhter Knochenmasse führt (Little, Folz et al. 2002). Diese autosomal dominant vererbte Mutation wurde als Ursache der Hyperostosis corticalis generalisata congenita identifiziert. Patienten, die an diesem genetischen Defekt leiden, zeigen eine stark erhöhte Knochendichte, eine ausgesprochen prominent entwickelte Mandibula und leiden an einem Torus palatinus, einem benignen Knochentumor des Gaumens. Des Weiteren fiel auf, dass die in dieser Studie untersuchten LRP5-Mutationsträger einen dreifach erhöhten OCN-Serumspiegel, einen um mehr als das fünffache erhöhten TGF-β1-Serumspiegel (transforming growth factor beta 1) und doppelt so hohe Fibronektin 1-Spiegel (FN1) gegenüber Nicht-Mutationsträgern zeigten. Die Marker der Knochenformation zeigten sich also gesteigert, während Marker der Knochenresorption gleich blieben. Dabei scheint die durch die Mutationen verringerte Bindungsaffinität des LRP5 für DKK für das erhöhte Wnt-Signal verantwortlich zu sein (Abbildung 8). Die gesteigerte Knochenmasse ergibt sich also aus der gestörten Hemmung, die normalerweise durch DKK ausgeübt wird, des Wnt-Signalweges und somit einem gesteigerten Ablauf der Signalkaskade (Boyden, Mao et al. 2002).

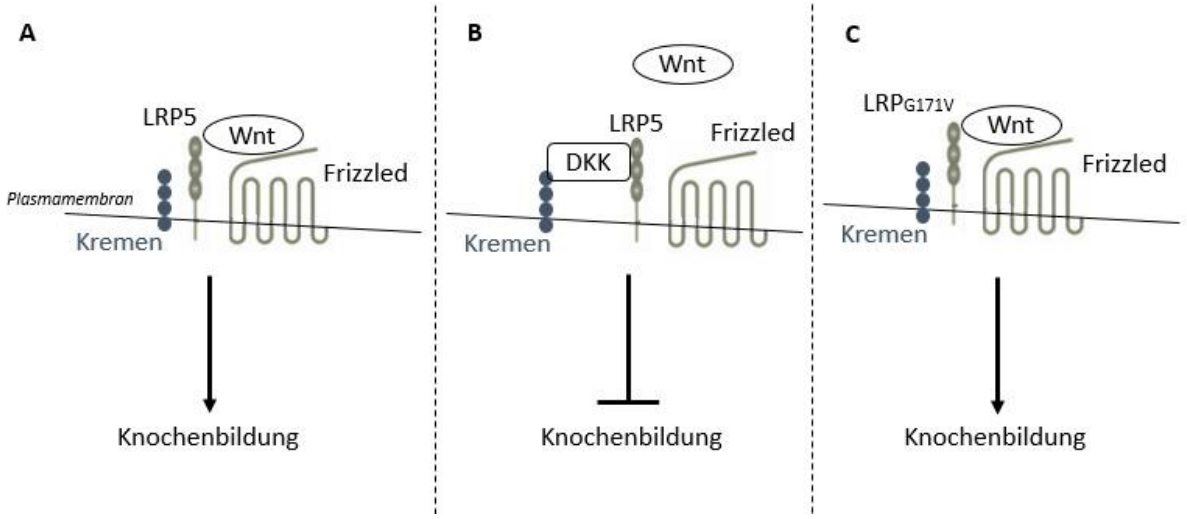

Abbildung 8: LRP5 Signalweg im Knochen; Wnt (wingless-type), LRP (Low Desity Lipoprotein Receptor), DKK (Dickkopf)

A) Wnt aktiviert den Komplex LRP5 (Korezeptor Wnt) und Frizzled (Rezeptor für Wnt). Hierdurch wird der Signalweg zur Knochenformation angeregt.
B) LRP5 kann auch einen Komplex mit dem Dickkopf-1, einem Wnt-Inhibitor, sowie Kremen, einem DKK Rezeptor formen, welches zum Abbau von LRP5 an der Zelloberfläche führt. Hierdurch wird der Wnt-Signalweg inhibiert.
C) $LRP5_{G171V}$ Mutation führt zu einer gesteigerten Knochenmasse. Es wird vermutet, dass dies über den Wnt-Frizzled Komplex zu einer kontinuierlichen Aktivierung des Wnt-Signalweges gelingt.

Somit ist klar, dass loss-of-function Mutationen in Genen welche für LRP5 kodieren zu verminderter Knochenmasse führen, während gain-of-function Mutationen die Knochenmasse in Mensch und Maus erhöhen (Khosla, Westendorf et al. 2008)

1.5.4. LRP6

LRP6 enthält, wie in Kapitel 1.5.3 erläutert, ebenfalls die Eigenschaften der LDL Rezeptor Familie.

Es wurde festgestellt, dass LRP6 ein Säugetier Homolog des Arrow, einem Korezeptor des Wingless Signalprotein in Drosophila, ist. Homozygote Mutationen im LRP6 Gen von Mäusen zeigen Entwicklungsstörungen auf, welche einzelnen Wnt-Gen–Mutationen bemerkenswert ähneln. Außerdem wurde in Knock-out LRP6 Mäusen ein

Verlust im Wnt-Signalweg und hiermit ein Verlust von vielen Entwicklungsprozessen festgestellt. So zeigten Mäuse mit einer In-frame-Insertion des βgeo-Reportergen um die ersten 321 Aminosäuren des LRP6 Proteins Extremitätenfehlbildungen, Mikroophthalmie oder urogenitale Fehlbildungen (Pinson, Brennan et al. 2000).

Wie LRP5 spielt LRP6 auch eine Rolle im Knochenstoffwechsel. So wurde eine Mutation im LRP6 Gen mit erhöhten Osteoporose und Kardiovaskulärem Risiko assoziiert (Mani, Radhakrishnan et al. 2007). Neben der Verminderung des Knochengewebes, sind LRP6 Mutationen auch an der Entstehung früher, autosomal-dominant vererbter Koronarerkrankungen, an der Erkrankung des T2DM sowie an der Entstehung des metabolischen Syndroms beteiligt (Jin 2008). So fand man eine Punktmutation, LRP6$_{R611C}$, welche für alle Erkrankungen verantwortlich scheint. Es zeigte sich, dass Nicht-Diabetiker, welche aber Träger der LRP6$_{R611C}$ Mutation sind, insulinresistent und hyperinsulämisch sind. Hierfür sollte bedacht werden, dass Wnt/LRP6 die Insulin Rezeptoren und die IGFR (Insulin like growth factor receptor) Expression reguliert. Außerdem führen LRP6 Mutationen zu einer Verminderung der Transkription factor 7 like 2 (TCF7L2) abhängigen Insulinrezeptor (IR) Expression. So wurde die Expression von IR mRNA in Wnt3a stimulierten Zellen gemessen. Es zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der IR mRNA bis zu einem Maximum nach 8 Stunden. Bei ausgeschaltetem LRP6 jedoch zeigte sich keine durch Wnt stimulierte IR Expression. Man geht also davon aus, dass LRP6 die WNT3a-abhängige IR Transkription vermittelt (Singh, De Aguiar et al. 2013).

Zusammengefasst kann die Wnt/LRP6/TCF7L2-Achse als Regulator des Glukosemetabolismus angesehen werden und ist ein ernährungssensitiver Regulator des Körpergewichts (Liu, Singh et al. 2012). Hier erschließt sich großes Potenzial für zukünftige innovative Therapiestrategien für Übergewicht und DM (Singh, De Aguiar et al. 2013).

1.5.5. TCF7L2

TCF7L2 ist ein T-Zell spezifischer Transkriptionsfaktor und ein weiterer wichtiger Bestandteil des Wnt-Signalweges. TCF7L2 führt mit Hilfe einer Interaktion des

stabilisierten β-Catenins und der Tcf-Familie zu einer Translokation des Komplexes in den Kern und steuert hier die Genexpression.

Aus verschiedenen Arbeiten geht hervor, dass TCF7L2 (Transkription factor 7 like 2) wichtig für die Entstehung und das Überleben von β-Zellen in Pankreasinseln ist. Erstens kommt es in TCF7L2 Knockout Mäusen zu einer verminderten β-Zellmasse (Mitchell, Mondragon et al. 2014). TCF7L2 übernimmt also eine zellunabhängige Rolle in der Kontrolle der β-Zell Funktion und Masse und spielt somit eine entscheidende Rolle im Glukosemetabolismus als wichtiger Regulator der Inselzellen (Takamoto, Kubota et al. 2014). Zweitens führt die Erschöpfung von TCF7L2 zu einer Aktivierung von GSK3β. GSK3β wiederum spielt als Teil des Destruktionskomplexes eine entscheidende Rolle in der Inhibition des Wnt-Signalweges und damit führt die Aktivierung zu einer gestörten Entwicklung von Pankreasinseln und β-Zellen. Drittens wurde gezeigt, dass TCF7L2 mRNA in prädiabetischen Zuständen extrem instabil ist (Le Bacquer, Shu et al. 2011).

Im Ileum und Kolon ist TCF7L2 bedeutsam für die Entwicklung neuroendokriner L-Zellen (Jin 2008, Jin and Liu 2008). Hierdurch wird die Produktion von Glukagon-like-peptide-1 und 2 sowie das intestinale Pro-Glukagon hochreguliert, welche die postprandiale Insulin Sekretion regulieren (Doria, Patti et al. 2008). Auch beeinflusst TCF7L2 die Glukoneogenese, die Adipogenese sowie die Expression der Inkretin Rezeptoren des Pankreas und den Inkretin Effekt. Der Inkretin Effekt beschreibt die stärkere Aktivierung der Insulin Ausschüttung durch orale Glukosegabe im Vergleich zur Aktivierung bei intravenöser Glukosegabe bei gleichem Glukosespiegel im Blut. (Ip, Chiang et al. 2012).

Seit 2006 ist durch Grant et al. bekannt, dass Single nucleotide polymorphisms (SNPs) des in β-Zellen des Pankreas vermehrt angereicherten TCF7L2 eine hohe Korrelation mit gestörter Insulin Sekretion und damit einem erhöhten Risiko für sowohl T2DM als auch Adipositas in verschiedenen ethnischen Gruppen zeigen (Grant, Thorleifsson et al. 2006, Lyssenko, Lupi et al. 2007, Jin 2008, Shu, Sauter et al. 2008, Gjesing, Kjems et al. 2011, Mattei, Qi et al. 2012). So fand man eine Genvariante des TCF7L2 auf Chromosom 10q, welche eine Erhöhung des Risikos für die Entstehung von T2DM um

50% zeigte (Humphries, Gable et al. 2006). Die TCF7L2 Variante rs7903146 ist derzeit der stärkste, bekannte Risikofaktor für T2DM (Grant, Thorleifsson et al. 2006). Weiter wurde das TCF7L2 SNP rs11196175 mit erhöhten BMI Werten sowie gesteigerten Cholesterol und LDL Leveln assoziiert. Auch das TCF7L2 SNP rs12255372 zeigte Veränderung in BMI, HDL, Very Low Density Lipoprotein (VLDL) und Triglycerin Levels.

Abbildung 9 zeigt die Struktur des TCF7L2 Gens zusammen mit den fünf Risiko SNPs.

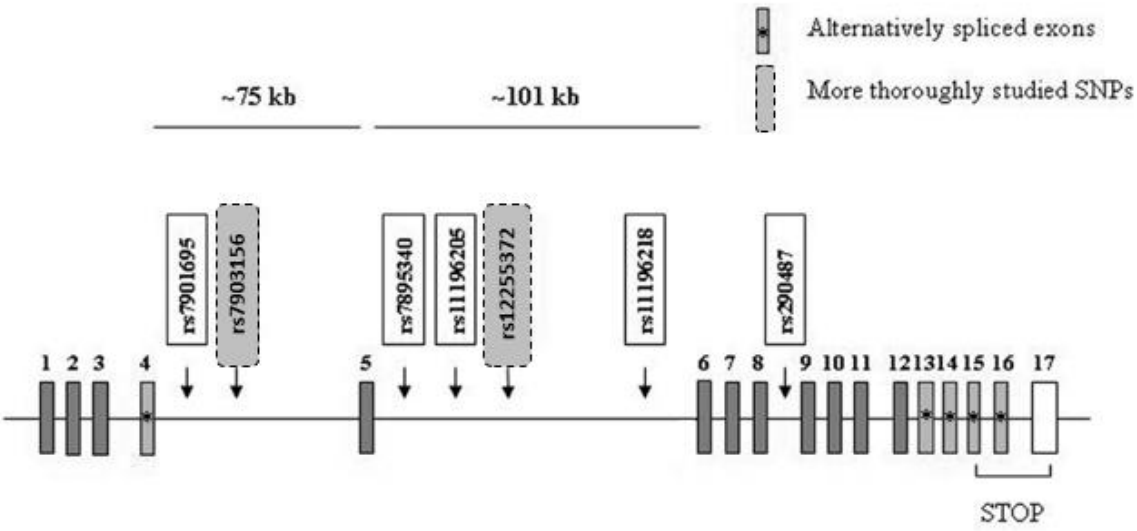

Abbildung 9: TCF7L2 Genstruktur mit T2DM Risiko Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Lokalisationen (Chiang, Ip et al. 2012)

Auf Chromosom 10q25.3 ist das menschliche TCF7L2 Gen, bestehend aus 17 Exonen (in Abbildung 9 als 17 nummerierte Boxen auf dem Strich dargestellt), lokalisiert. Exone beschreiben den DNA Anteil, welcher in reife mRNA transkribiert wird und für Proteine kodieren kann. Introne entsprechen den Abschnitten zwischen den Exonen, welche nach Transkription zu prä-mRNA durch Spleißen entfernt werden und keinen Anteil in der mRNA darstellen. Es wurde gezeigt, dass von den 17 Exone des menschlichen TCF7L2 Gens mindestens 5 Exone durch alternatives Spleißen verändert sind (in Abbildung 9 als 5 weiße Boxen über dem Strich dargestellt). Um das Exon 5 sind die fünf Risiko SNPs, welche für eine Vielfalt von ethnischen Gruppen mit T2DM assoziiert werden, lokalisiert. SNPs zeigen eine Veränderung in nur einem

Basenpaar, welches aber dennoch die Proteinfunktion ausschlaggebend affektieren und zu pathogenen Proteinvarianten führen kann. Die am stärksten mit T2DM assoziierten Risiko-SNPs sind rs12255372 und rs7903146 (in Abbildung 9 als 2 graue Boxen über dem Strich dargestellt) (Ip, Chiang et al. 2012).

An Mäusen wurde gezeigt, dass die Manipulation der TCF7L2 Spiegel in der Leber große Auswirkungen auf den Metabolismus hat. So ist bekannt, dass TCF7L2 die Glukoseproduktion in der Leber reguliert. Steigt also der Spiegel an TCF7L2, so steigt auch die Produktion von Glukose in der Leber. Diese Erkenntnis eröffnet durch Hemmung des Wnt-Signalweges eine neue Therapiemöglichkeit in metabolischen Erkrankungen (Boj, van Es et al. 2012).

1.5.6. TCF4

TCF-4 (Transkriptions Faktor 4) ist Teil der TCF/LEF Transkriptionsfaktorfamilie, ubiquitär vorkommend. TCF-4 reguliert die Zellreifung, -differenzierung und -apoptose. Bekannt ist die funktionelle Interaktion des Helix-loop-helix Transkriptionsfaktor mit β-Catenin, um den Wnt-Signalweg in Wirbeltieren zu vermitteln (Barker, Huls et al. 1999).

1.5.7. ALK5

ALK5 (activin receptor-like kinase 5) ist ein TGF-β-Typ 1 Rezeptor (TGFBR1) und formt zusammen mit einem weiteren Serin/Threonin Kinase Rezeptor, dem Typ 2 TGF-β-Rezeptor, einen heteromeren Komplex. Hierdurch wird das TGF-β Signal von der Zelloberfläche in das Zytoplasma übermittelt (Ten Dijke, Yamashita et al. 1994). ALK5 ist also wichtiger Bestandteil des TGF-β-Signalweges. Die TGF-β-Familie, zusammengesetzt aus verschiedenen Zytokinen, ist an vielen biologischen Prozessen beteiligt. Hierzu zählen das Zellwachstum und –überleben sowie die Zelldifferenzierung und -migration während der Entwicklung normaler als auch erkrankter Systeme (Inman, Nicolás et al. 2002).

Aus der Literatur geht hervor, dass eine Interaktion zwischen TGF-β und Wnt-Signalweg eine entscheidende Rolle bei Entwicklungsprozessen sowie verschiedenen

Erkrankungen spielt. So können beide Signalwege unabhängig oder kooperativ Expressionsgene regulieren (Letamendia, Labbé et al. 2001). Jeder Signalweg ist verantwortlich für die Produktion der Liganden des anderen Signalweges. Im Zytoplasma interagieren verschiedene Komponenten der beiden Signalwege untereinander. Es konnte gezeigt werden, dass TGF-β und Wnt zusammen die Proliferation der humanen MSCs stimulieren, aber die Differenzierung in Osteozyten und Adipozyten hemmen. Exakter betrachtet, hemmt TGF-β über ALK5 die Osteoblastendifferenzierung in hMSCs durch Stabilisation des β-Catenin im aktivierten Wnt-Signalweg (Zhou 2011).

In einer Kultivierung von Pankreas Inselzellen zeigte sich, dass die Hemmung von ALK5 die Anzahl der Endothelzellen innerhalb der Pankreasinseln verbessert. Dieser Effekt konnte sich jedoch nur in der frühen Phase, direkt nach der Implantation, aufrechterhalten (King, Clarkin et al. 2015). Weiter wurde gezeigt, dass die Hemmung der ALK5 Kinase die Angiogenese anregt (Pardali, Goumans et al. 2010). Demnach führt ein fehlregulierter TGF–β Signalweg zu vaskulären Defekten.

Bekannt ist, dass einige Veränderungen von Zellen und Geweben in Patienten mit DM durch auto- und parakrines TGF-β vermittelt werden. Diese Reaktionen werden durch hohe Glukosespiegel sowie glykosilierte Proteine vermittelt indem diese die TGF-β Sekretion dreifach erhöhen. Zu beachten ist jedoch, dass die frühe diabetische Mikroangiopathie durch Endothelzellproliferation charakterisiert ist, während ALK5 die Endothelzellproliferation hemmt. Das diabetische Milieu beschleunigt also teilweise die Zellproliferation sowie proapoptotische Signale (Wang and Hirschberg 2009).

1.5.8. GSK3B

GSK3B (Glykogen synthase kinase 3 beta) kodiert zusammen mit GSK3A die Serin/Threonin Kinase GSK3 (Glykogen synthase kinase 3). Diese wurde vorerst als wichtiges Enzym im Glykogenmetabolismus entdeckt. Nachforschungen zeigen die Beteiligung von GSK3 an verschiedenen Krankheiten wie T2DM, Alzheimer, Parkinson, Krebs sowie bipolaren Störungen. Über die Funktion innerhalb des Wnt-

Signalweges ist GSKB bedeutend für die Knochenregulation. So stimuliert die Hemmung der Kinase die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Osteoblasten, verbessert die Frakturheilung und erhöht die Knochenmasse als auch die Knochenstärke (Komatsu, Mary et al. 2010, Sisask, Marsell et al. 2013).

GSK3 wirkt sich auf mehreren Ebenen auf metabolische Störungen aus. Erstens ist ein erhöhter Spiegel an GSK3 mit der Insulinresistenz im Skelettmuskel übergewichtiger Typ 2 Diabetiker assoziiert. Dies geschieht über die Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Degradation des Insulin Rezeptor Substrates (Leng, Zhang et al. 2010). Insulin verliert also seine regulierende Funktion, indem der Glukosetransport via Glut-4 Translokation nicht mehr aktiviert werden kann. GSK3 agiert ebenfalls als negativer Regulator in der Glukose Homöostase, indem sie die Glykogen Synthase durch Phosphorylierung inaktiviert (Henriksen and Dokken 2006). Zweitens beeinflusst GSK3 in β-Zellen des Pankreas die Replikation in negativer Form. So fördert GSK3 die Apoptose sowie den Verlust von β-Zellen und unterstützt die Erkrankung an DM (Mussmann, Geese et al. 2007). Drittens regt GSK3 zur Produktion von inflammatorischen Molekülen sowie ihrer Migration an. Dieser Vorgang unterstützt Entzündungen, welche ein Baustein von DM sind (Jope, Yuskaitis et al. 2007).

Im Gegensatz hierzu führt eine generelle Deletion von GSK3 zu perinataler Letalität sowie zahlreichen skelettalen Defekten. In Mäusen wurde gezeigt, dass eine skelett-spezifische Deletion der GSK3 den gesamten Metabolismus beeinflusst und den männlichen Phänotyp für die Entwicklung von T2DM sensibilisiert. Dies geschieht durch eine allgemein gesteigerte Insulinsensitivität, welche später in Insulinresistenz umschlägt (Gillespie, Bush et al. 2013).

1.5.9. Fibronektin

Fibronektin ist ein aus zwei Untereinheiten aufgebautes, extrazelluläres Glykoprotein, welches in zwei unterschiedlichen Formen vorliegt: Die lösliche Variante im Blutplasma sowie in anderen Körperflüssigkeiten, das Plasmafibronektin (pFN), wird von Hepatozyten der Leber synthetisiert (Tamkun and Hynes 1983). Als wichtiger

Bestandteil der extrazellulären Matrix wird vor allem von Fibroblasten das zelluläre Fibronektin (cFN) synthetisiert (Hynes 1990). Hier ist das Fibronektin in unlöslichen Fibrillen organisiert (McDonald 1988) und enthält die Domänen A (EDA) und B (EDB) (Kanters, Banga et al. 2001). An diesen Domänen entstehen durch alternatives Spleißen der Einzel Prä-mRNA eine Vielfalt von Isoformen des Fibronektin im Menschen (White and Muro 2011).

Fibronektin besitzt viele für Interaktionen wichtige Bindungsstellen. Hierzu gehören Bindungsstellen für Fibrin (Makogonenko, Tsurupa et al. 2002), Heparin (Elices, Osborn et al. 1990), Transglutaminasen (Gaudry, Verderio et al. 1999), Kollagen (Dzamba, Wu et al. 1993) und Gelatin (Engvall and Ruoslahti 1977) sowie Bakterien (Signäs, Raucci et al. 1989), DNA (Hayashi and Yamada 1982) und weitere Proteine.

Demzufolge ist Fibronektin an verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligt. Hierzu zählen die Gewebsreparatur durch Bildung eines Kollagennetzwerkes in der extrazellulären Matrix, die Angiogenese und die Wundheilung. Des Weiteren spielt es eine Rolle in der Zellmigration, –adhäsion, -proliferation und –differenzierung (Mosher 2012). Außerdem fördert das Glykoprotein die Bindung von Antigenen an Phagozyten und fungiert hierbei als Opsonin (Reid 1983).

Bei Diabetikern konnten erhöhte Konzentration an spezifischen Matrix Proteinen festgestellt werden. Hierzu zählen Laminin und Fibronektin in den großen Gefäßen und den kleinen Arterien, sowie Typ IV Kollagen (Andresen, Rasmussen et al. 1996). Es wurde gezeigt, dass die diabetische Retinopathie mit einem erhöhten Gehalt an EDA positiven Zell Fibronektin in der subendothelialen Matrix assoziiert ist (Kanters, Banga et al. 2001). Eine Anzahl von Arbeiten belegte nun auch, dass Fibronektin in diversen Geweben von Patienten mit DM in erhöhten Mengen vorkommt. Weiter wird vermutet, dass die in Endothelzellen von Diabetikern erhöhten Spiegel von Fibronektin und Kollagen Typ IV durch Glukose induziert sind. Diese erhöhten Fibronektinspiegel bleiben über das Erreichen von Normalglukose bestehen und zeigen somit deutlich die Irreversibilität mikrovaskulärer Erkrankungen (Roy, Sala et al. 1990).

Heutzutage ist klar, dass cFN bei verschiedenen Erkrankungen in erhöhten Mengen vorkommt. So ist es vor allem bei Diabetikern vermehrt, gefolgt von ischämischen Schlaganfallpatienten und Patienten mit renovaskulärer Hypertonie. Patienten, welche zusätzlich zum DM mindestens einen kardiovaskulären Risikofaktor mit sich tragen, findet sich eine 2,5-fache Steigerung des Fibronektinanteils im Gewebe (Kanters, Banga et al. 2001). Des Weiteren wurden erhöhte Spiegel des Fibronektins auch in Patienten mit nicht atherosklerotischen Gefäßerkrankungen gefunden. Hierzu zählen Preeclampsie, akute Traumata, Sepsis, Thrombotische-thrombozytopenische Purpura und Uveitis (Kanters, Banga et al. 2001, Probst, Fijnheer et al. 2004). Patienten mit diabetischer Nephropathie zeigen eine deutliche miRNA-377 Überexpression, welche zu einer erhöhten Produktion von Fibronektin führt (Wang, Wang et al. 2008).

Mittlerweile ist bekannt, dass Fibronektin die Osteogenese durch die Interaktion mit Integrin-Rezeptoren auf Osteoblasten bereits in frühen Differenzierungsstadien beeinflusst (Moursi, Damsky et al. 1996). Fibronektin ist hierbei nicht nur für die Differenzierung und Überlebensrate von Osteoblasten maßgeblich, sondern stellt auch für die Ausbildung der Knochenmatrix sowie für die Matrixintegrität einen notwendigen Bestandteil dar (Bentmann 2008). So beeinflusst jedoch nur das Fibronektin die Osteoblasten, welches auch von ihnen hergestellt wird. In der Leber synthetisiertes FN dagegen wirkt sich nicht auf die Knochenmatrix aus (Bentmann, Kawelke et al. 2010). Weiter konnte gezeigt werden, dass sowohl das Gewebe in Osteosarkomen als auch in heilenden Frakturen hohe Spiegel an Fibronektin mRNA Varianten zeigen, unabhängig davon, ob es sich um einen benignen oder malignen Prozess handelt (Kilian, Dahse et al. 2004).

Untersuchungen an Xenopus zeigen, dass Fibronektin durch die LEF-TCF Bindungsstelle an Position 368 als direktes Ziel des Wnt-Signalweges gilt. Der Abbau von β-Catenin mit folgender Transfektion von Cadherin in Fibroblasten führt zu einer verminderten Expression von Fibronektin. LEF-1 ermöglicht also Fibroblasten, im Gegensatz zu Epithelzellen, Wnt-Signale zu beantworten. β-Catenin stimuliert hierbei die Transkription von Fibronektin Genen (Gradl, Kuhl et al. 1999). Auch der Off-State

des Wnt-Signalweges wurde im Hinblick auf Fibronektin untersucht. So zeigte sich in transgenen Mäusen, dass durch DKK verursachte morphogenetische Defekte durch Hemmung von Fibronektin nachgeahmt werden können. Fibronektin ist also an Wnt-regulierten morphogenen Prozessen beteiligt (De Langhe, Sala et al. 2005).

1.5.10. Adiponektin

Das Fettgewebshormon Adiponektin ist ein aus 244 Aminosäuren bestehendes Polypeptid und wird hauptsächlich von Adipozyten sezerniert. Es kann aber auch von Skelettmuskel, Herzmuskel oder Endothelzellen synthetisiert werden. Adiponektin existiert in verschiedenen isomeren Formen im Blut als low molecular weight (LMW), medium molecular weight (MMW) und hight molecular weight (HMW) sowie als Spaltungsfragment in Form des globulären Adiponektins. Es wird vom Gen ADIPOQ auf Chromosom 3q27 kodiert. Seine hauptsächliche Wirkung erfolgt über die Rezeptoren AdipoR1 im Skelettmuskel sowie AdipoR2 in der Leber.

Adiponektin übt im menschlichen Körper eine Reihe von Funktionen aus, welche das Risiko für T2DM (Li, Shin et al. 2009, Du, Li et al. 2011), Adipositas, arteriosklerotische Ereignisse (Mostowik, Gajos et al. 2013) und Hypertonus senkt. Im Lipid- und Glukosestoffwechsel steigert Adiponektin die Empfindlichkeit an Zielgeweben für Insulin, steigert die Glukoseaufnahme im Skelettmuskel, fördert die Fetteinlagerung in Adipozyten und wirkt der Insulinresistenz entgegen (Yadav, Kataria et al. 2013). Weiter hemmt es die hepatische Glukoneogenese und fördert den Fettsäureabbau in der Leber.

Umgekehrt ist zu beachten, dass kurzfristig erhöhte Insulinspiegel zu einem erhöhten Anfall von Adiponektin führen, während chronisch erhöhte Insulinspiegel eher zu einem Abfall des Adiponektinspiegels führen.

Während der Entwicklung von Arteriosklerose zeigt sich ein hoher Spiegel von Adiponektin als protektiv. Weiter ergab sich der Nutzen des Adiponektin Spiegels in der Vorhersage des klinischen Ergebnisses nach perkutaner Koronarintervention (Shioji, Moriwaki et al. 2007).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass niedrige Spiegel von Adiponektin die Entwicklung des T2DM sowie das metabolischen Syndrom mit seinen Komponenten fördern. Neue Studien zeigen, dass Adiponektin ein starker Risikomarker für Prädiabetes ist und somit eine große Rolle in bereits früheren Stadien der Diabetesentwicklung spielt (Jiang, Owei et al. 2016). Weiter führt der Zustand mit vermindertem Adiponektin zu Koronaren Herzerkrankungen sowie weiteren arteriosklerotischen Ereignissen wie Herzinfarkt, Schlaganfall und periphere arterielle Verschlusskrankheit. Zukünftig soll der protektive Effekt von Adiponektin auf kardiovaskuläre Erkrankungen therapeutisch genutzt werden (Caselli, D'Amico et al. 2014). Schlägt das Adiponektin in die andere Richtung um, ist es also erhöht, so fördert dies die Entstehung einer Leberzirrhose.

Die Annahme, dass Adiponektin nur im Fettgewebe produziert wird, ist heutzutage überholt. Es zeigt sich eine Transkription, Translation und Sekretion von Adiponektin in vitro in humanen Osteoblasten sowie in vivo in Rattenknochen (Berner, Lyngstadaas et al. 2004). Im Knochenstoffwechsel zeigte sich eine signifikante negative Korrelation von Adiponektin und Knochendichte im gesamten Skelett (Miazgowski, Noworyta-Ziętara et al. 2012).

2. Fragestellung

Der T2DM und mit ihm das metabolische Syndrom sind Volkskrankheiten mit gewaltigen volkswirtschaftlichen Auswirkungen. Eine Facette dieser Erkrankung ist die diabetische Knochenkrankheit, die in der unfallchirurgisch und orthopädischen Versorgung des Patienten von hoher Relevanz ist.

Störungen des Wnt-Signalweges können einerseits durch Störungen in der Entwicklung von Pankreasinseln und der β-Zellen an der Entstehung von T2DM beteiligt sein. Anderseits führt ein gestörter Wnt-Signalweg auch zu einer gestörten Knochenheilung sowie zu variierenden Knochenmassen und zu Knochenverlust. Verschiedene Komponenten des Signalweges beeinflussen so auf facettenreiche Art und Weise sowie in unterschiedlichem Ausmaß mannigfaltige Zielgene.

Im Fokus liegen gezielt ausgewählte, am Wnt-Signalweg beteiligte Gene, welche anhand ihrer Expression in diabetischem und nicht-diabetischem Knochen untersucht werden. Das Ziel dieser Arbeit ist es, eine mögliche Verbindung zwischen dem metabolischen Syndrom bei DM und einer gestörten Knochenheilung, wie es bei der diabetischen Knochenkrankheit vorkommt, zu identifizieren.

3. Material und Methodik

3.1. Patientenkollektiv

Für die klinisch-experimentelle Untersuchung der Genexpressionsveränderungen des Wnt-Signalwegs im Knochengewebe wurden zwei Patientengruppen gebildet: 1. die Typ 2 Diabetiker und 2. die Nicht-Diabetiker als Kontrollgruppe. Die Patienten wurden in der Unfallchirurgie des Klinikums rechts der Isar (KrdI) rekrutiert. Alle Patienten sind europäischer Herkunft. Es wurden Blut- und/oder Knochenproben der zwei Patientengruppen während klinischer Kontrollen in der unfallchirurgischen Ambulanz oder im Rahmen des stationären Aufenthaltes bei elektiven oder notfallmässigen operativen Versorgungen im KrdI gewonnen.

Es liegen die Einverständniserklärungen der Patienten zur Probenentnahme und Probeverarbeitung vor. Ein durch die Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigter Ethikantrag geht konform mit der Deklaration von Helsinki ein.

Die erste Gruppe (Versuchsgruppe) umfasste 61 Typ 2 Diabetiker. Der durchschnittliche Diabetiker war 74,5 Jahre alt. Es wurden dabei 40 Frauen und 21 Männer eingeschlossen. Hiervon konnten von 39 Diabetikern Blutproben in der unfallchirurgischen Ambulanz des KrdI während einer klinischen Kontrolle entnommen werden. Von 22 Diabetikern konnte Knochenmaterial im Operationssaal bei unfallchirurgischen Eingriffen und die zugehörigen Blutproben vorab auf Station gewonnen werden.

Als Grundlage für die Versuchsgruppe wurden die Kriterien des metabolischen Syndroms, sowie die feststehende Diagnose des T2DM herangeführt. Zur Bezeichnung des metabolischen Syndroms gehören folgende Merkmale:

- Abdominelle Adipositas mit Taillenumfang ≥94 cm (m) bzw. ≥80 cm (w)
- Plus zwei der folgenden Kriterien:
    - Triglyceride >150 mg/dl
    - Cholesterin <40 mg/dl (m) bzw. <50 mg/dl (w)

- Blutdruck >130 mmHg systholisch oder >85 mmHg diastolisch

Zur Diagnose des T2DM müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

- Nüchternglukose ≥126 mg/dl
- Blutglukosewert ≥200 mg/dl
- Diagnostizierter DM

Die zweite Gruppe (Kontrollgruppe) umfasste 47 Nicht-Diabetiker im Alter von Durchschnittlich 74,2 Jahren. Die Gruppe war in 31 Frauen und 16 Männer aufgeteilt. Hier konnte von 23 Personen Blutproben in der unfallchirurgischen Ambulanz des KrdI und von 24 Personen Knochenmaterial aus dem Operationssaal bei unfallchirurgischen Eingriffen sowie die zugehörigen Blutproben vorab auf Station gewonnen werden.

Die Patienten der Nicht-Diabetiker Gruppe wiesen weder Kriterien des metabolischen Syndroms, noch die Kriterien des T1DM oder T2DM auf. Des Weiteren waren die Patienten ≥50 Jahre alt, um einen noch nicht manifestierten T2DM mit dennoch vorliegender genetischer Grundlage auszuschließen.

Insgesamt wurden also 62 Blutproben und 39 Knochenproben mit zugehörigen Blutproben untersucht.

Um mögliche Störfaktoren zu eliminieren, durften die Patienten keine der folgenden Diagnosen besitzen oder Kriterien erfüllen:

1. Erkrankungen, welche zu einer sekundären Osteoporose führen:
    - Neoplasien
    - Leber-/ Niereninsuffizienz
    - Organtransplantation
    - Malabsorption
    - Hyperthyreoidismus
    - Hyperparathyreodismus
2. Infektion

3. Einnahme folgender Medikamente:
    - Glukokortikoide
    - Antiepileptika
    - Immunsupressiva
4. Weitere Erkrankungen mit tiefgreifenden systemischen Auswirkungen auf den menschlichen Organismus im besonderen Hinblick auf insuffiziente DM Therapie:
    - Makro-/ Mikroangiopathie
    - Diabetische Nephropathie (schwergradig, Creatin clearane <30 ml/min)
    - Diabetische Neuropathie

3.2. Geräte

In Tabelle 2 ist eine Auflistung der für diese Arbeit benötigten Geräte dargestellt.

Tabelle 2: Geräte

Material	Hersteller
Bio-Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
CFx96 real time PCR-System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Eppendorf Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mastercycler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Knochenmühle	Retsch, Haan, Deutschland
Vortex	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Wide Mini-Sub Cell GT Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

3.3. Verbrauchsmaterial

Die für diese Arbeit benötigten Verbrauchsmaterialien werden in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Chirurgische Handschuhe (steril)	Sempermed, Wien, Österreich
Ethanol 70%ig	Apotheke Krdl, München
Multiwellplatten	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
Pasteurpipetten 150 mm + 230 mm, Glas	Neo Lab, Heidelberg, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße Multiply -Strip	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten 2,5, 5, 10, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Polypropylenröhrchen (= Falcon Tube) 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5; 1,5; 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3.4. Software

Zur Auswertung und Darstellung dieser Arbeit wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Programme genutzt.

Tabelle 4: Software

Software	Hersteller
Endnote X7	Thomson Reuters, New York, USA
Microsoft Excel 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Matlab	MathWorks, Inc., Massachusetts, USA
Microsoft Word 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA

3.5. Probenentnahme und -aufbereitung

Die Proben wurden von Patienten in der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des KrdI gewonnen, welche zuvor den oben genannten Kriterien ausgewählt wurden.

3.5.1. Blutproben

Zur Entnahme und Aufbereitung der Blutproben wurden die in Tabelle 5 aufgeführten Materialien verwendet.

Tabelle 5: Aufbereitung der Blutproben

Material	Hersteller
EDTA-Röhrchen	Sarstedt
Reaktionsgefäß	Sarstedt
Glukose-Röhrchen	Sarstedt
PAXgene Blood DNA Tube	
Serum-Röhrchen	Sarstedt

Die Blutproben wurden in der Ambulanz bei Nicht-Diabetikern oder auf Station präoperativ entnommen.

Sie beinhalteten folgende Proben für das Standardlabor der klinischen Chemie:

- 1x Serumröhrchen (9 ml)
- 1x EDTA–Röhrchen (9 ml)
- 1x Glucose–Röhrchen (3,1 ml)

Die Blutproben für die klinische Chemie wurden sofort nach der Abnahme an das hausinterne Labor verschickt. Zur besseren Patientenerfassung wurden folgende Parameter gemessen:

- Kalium
- Natrium

- Kreatinin
- Harnstoff–N
- HbA1c
- Glukose
- Lipidstatus

3.5.2. Knochenproben

Tabelle 6 zeigt die für die Aufbereitung der Knochenproben verwendeten Materialien.

Tabelle 6: Aufbereitung der Knochenproben

Material	Hersteller
Luer	Medicon
Pinzette (chirurgisch)	Medicon
Allprotect Tissue Reagent	Qiagen

Die Knochenfragmente wurden aus Hüftköpfen gewonnen, welche intraopertiv beim elektiven oder notfallmäßigen Einbau von Hüftkopfprothesen ersetzt wurden. Hiervon wurden einzelne große Spongiosafragmente mit Hilfe eines Luers steril abgetrennt und in 3-5 Spongiosafragmente (5-10 mm Durchmesser) zerkleinert. Diese Fragmente wurden in 15 ml Tubes überführt und mittels Allprotect Tissue Reagent zur sofortigen Stabilisierung von DNA, RNA und Proteinen in dem entnommenen menschlichen Gewebe bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

3.6. RNA-Isolation aus Knochengewebe

Zur Isolation der RNA aus dem Knochengewebe wurden für diese Arbeit die in Tabelle 7 aufgelisteten Materialien verwendet.

Tabelle 7: RNA Isolation

Material	Hersteller
dH_2O	KrdI
Ethanol 70%	KrdI
Flüssigen Stickstoff	KrdI
Isopropanol	KrdI
NaOH-Lösung 1 M	Roth
RIPA inhibitor solution	
1)Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma
2) NaCl	Carl Roth
3) Nonoxinal 40	Sigma
4) Natriumdesoxycholsäure,	Sigma
5) Sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)	Sigma
TriFast	peqLab

Zur RNA-Isolation aus Knochengewebe wird als erster Schritt eine 10 mM NaOH Lösung hergestellt. Hierfür werden 500 µl 1 M NaOH mit 49,5 ml destilliertem Wasser vermischt.

Der Container, sowie die Kugel der Mühle werden nun mit 1 ml 10 mM NaOH Lösung gespült und somit von Proteinen und Nukleinsäuren gereinigt. Danach wird die NaOH Lösung wieder entfernt und der Container kurz offen stehen gelassen, damit dieser trocknen kann. Ein Spongiosastückchen wird zusammen mit 1 ml TRI Reagent hineingegeben. TRI Reagent ist eine monophasische Lösung aus Guanidinthiocyanat, welches Zellen lysiert und RNasen sowie weitere Enzyme inaktiviert, und Phenol, in dem sich RNA löst. Ziel ist die gleichzeitige Isolation von RNA, DNA und Protein. Das Gefäß wird verschlossen und für 30 Sekunden in flüssiges Nitrogen gehalten. Danach wird der Container in die Mühle gespannt und bei 30 Hz für 30 Sekunden bewegt,

wodurch der Knochen gemahlen wird. Der gemahlene Knochen wird nun mit 1 ml TRI Reagent aus dem Container gelöst und in je zwei beschriftete Eppendorf Gefäße überführt. Die Proben werden 5 Minuten auf Eis gelagert und kurz im Vortex gemischt.

Als nächster Schritt wird in jedes Eppi 200 µl Chloroform hinzugegeben, die Proben kurz gemischt und 10 Minuten auf Eis gelagert. Nachdem sie einmal auf den Kopf gestellt werden, müssen die Proben anschließend 10 Minuten bei 4°C und 14000 g zentrifugiert werden. Dadurch trennt sich das Gemisch in drei Phasen: Eine wässrige obere Phase mit RNA, eine DNA reiche Interphase und eine organische Phase mit Chloroform und Proteinen.

In ein neues 2 ml Eppendorfgefäß werden nun 1000 µl TRI Reagent gefüllt. Von den beiden Eppendorfgefäßen einer Probe werden die obere, durchsichtige Phase, welche die in Chloroform gelöste RNA enthält, in das vorbereitete, neue Eppendorfgefäß überführt. Die Proben werden vorsichtig gemischt, 10 Minuten auf Eis gelagert und zur Präzipitation der RNA erneut für 10 Minuten bei 4°C und 14000 g zentrifugiert.

Anschließend wird der flüssige Überstand aus dem Gefäß vorsichtig entfernt und das RNA Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Die Probe wird erneut für 10 Minuten bei 4°C und 14000 g zentrifugiert, entfernt, wiederholt mit 1 ml Ethanol gewaschen und ein letztes Mal zentrifugiert. Letztlich wird das Ethanol dekantiert und die Proben 5 Minuten unter dem Abzug stehengelassen, damit das restliche Ethanol verdunsten und wieder entfernt werden kann. Das RNA Pellet wird mit 30 µl aqua ad iniectabilia gelöst und bei -80°C eingefroren.

3.7. RNA Quantität mit Hellma TrayCell

Um die Nukleinsäurekonzentration in Flüssigkeiten zu messen, wird indirekt, zur Feststellung der Absorption, die Lichtdurchlässigkeit der Lösung bei bekannter Lichtintensität (260 nm) gemessen. Als Grundlage liegt eine aus der Labert–Beer–Regel abgeleitete Gleichung vor:

$$\text{Konzentration}\left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}\right] = \text{Absorption (260 nm)} \times \text{Faktor}$$

Der Faktor setzt sich zusammen aus: probenspezifischem Faktor x Verdünnungsfaktor. Der RNA- probenspezifische Faktor entspricht der Konzentration (ng/µl) bei einer Absorption von 1 und beträgt 40. Der Verdünnungsfaktor hängt von dem verwendeten Deckel ab (HellmaAnalytics 2016).

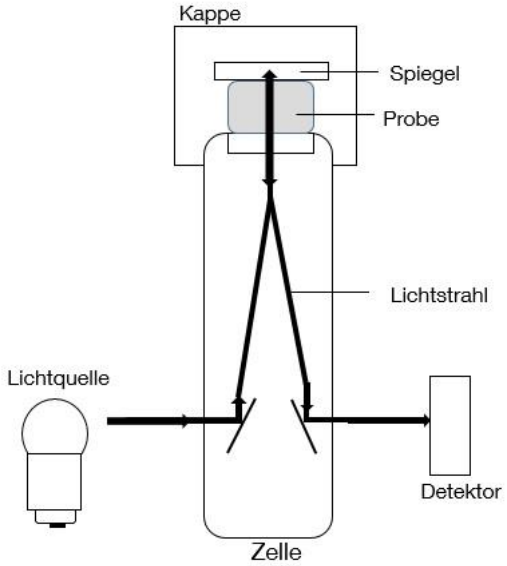

Abbildung 10: Hellma TrayCell (Modifiziert nach HellmaAnalytics, 2016)

Der hier verwendete 1 mm Deckel bildet eine Messkammer und sorgt folglich für eine definierte optische Schichtdicke von 1 mm. Im Vergleich zu einer Standard-Küvette mit 10 mm Schichtdicke wird dadurch eine Verdünnung von 1:10 erreicht. Die Verdünnung am Gerät wurde dabei auf 1 µl + 9 µl eingestellt. Das verwendete Volumen beträgt 4 µl. Aufgrund einer integrierten Strahlumlenkung sowie der Verwendung von faseroptischen Lichtleitern ist es möglich, die Probe direkt auf die Oberfläche des Messfensters aufzubringen (Abbildung 10). Zuerst wird eine Messung mit aqua ad iniectabilia durchgeführt um das Gerät auf Null zu stellen. Nun können die einzelnen Proben gemessen werden.

3.8. First strand cDNA Synthese

Die in Tabelle 8 aufgeführten Materialien sind essenziell für die in dieser Arbeit durchgeführte First strand cDNA Synthese.

Tabelle 8: First strand cDNA Synthese

Material	**Hersteller**
First Strand cDNA Synthesis Kit beinhaltet:	Fermentas
1. Oligo $(dT)_{18}$ Primer	
2. Random Hexamer Primer	
3. 5fach Reaktionspuffer	
4. RibolockTM RNase Inhibitor (20 U/µl)	
5. 10 mM dNTP Mix	
6. M-MuLV Reverse Transriptase (20 U/µl)	

Zuerst ist es wichtig, die einzelnen RNA Konzentrationen (ng/µl) jeder Probe gleichermaßen zu verdünnen, damit genügend Reagenzien zum Umschreiben vorhanden sind. Als Vorgabe muss betrachtet werden, dass maximal 9 µl RNA-Volumen oder 5000 ng RNA-Masse enthalten sind. Sollte also bei einer Probe durch einen hohen RNA Gehalt die m(RNA) die 5000 ng oder das Volumen die 9 µl Angabe überschreiten, so wird weniger Volumen der Probe verwendet und mit dH_2O (aqua ad iniectabilia) verdünnt.

Rechnung: $V(RNA) = \frac{5000}{c(RNA)}$

$V(H_2O) = 9 - V(RNA)$

Nun wird die vorher errechnete Menge an Probe V(RNA) µl in PCR Röhrchen pipettiert und diese gegebenenfalls mit H_2O auf 9 µl ergänzt. Zu jeder Probe wird nun Mix 1, bestehend aus 1 µl oligo$(dT)_{18}$ Primer und 1 µl Random Hexamer Primer, hinzugegeben. Die Proben wird gevortext, kurz zentrifugiert und dann in die Platte des Thermocyclers gestellt. Hier werden sie für 5 Minuten auf 65°C erhitzt und wieder auf 4°C herabgekühlt. In diesem Schritt binden die Primer an die RNA.

Im Anschluss wird zu jeder Probe 9 µl des folgenden Mix 2 hinzugegeben, welcher zuvor in aufgezählter Reinfolge zusammengestellt wird: 4 µl Reaktionspuffer, 1 µl

RiboLock TM, RNase Inhibitor (20 U/µl), 2 µl 10 mM dNTP Mix und 2 µl M-MuLV Reverse Transcriptase (20 U/µl). Hieraus ergibt sich in jeder Probe insgesamt ein Volumen von 20 µl.

Im Folgenden werden die Proben erneut in den Thermocycler gestellt und für 60 Minuten auf 37°C und dann für 5 Minuten auf 70°C erhitzt. Danach wird erneut auf 4°C abgekühlt. Es ist zu beachten, dass in allen Proben der gleiche Gehalt an cDNA vorhanden ist. Hierfür wird gegebenenfalls mit H_2O verdünnt. Letztlich können die Proben bei -80°C gelagert werden.

3.8.1. Die quantitative PCR (qPCR)

Tabelle 9 zeigt die für die qPCR benötigten Materialien. In Tabelle 10 sind die verwendeten Primer aufgelistet.

Tabelle 9: PCR

Material	**Hersteller**
Forward (sense) Primer	Eurofins
Reverse (antisense) Primer	Eurofins
H_2O	Krdl
SsoFast TM EvaGreen Supermix-Mix enthält:	Bio Rad
1 dNTPs	
2 Sso7d fusion polymerase	
3 3 $MgCl_2$	
4 4 Eva Green dye	
5 Stabilizers	

Tabelle 10: Primerliste

Primer	Vorwärtssequenz	Rückwärtssequenz	Annealing–Temperatur [°C]	Volumen cDNA Lösung [µl]
β-Actin	CGA CAA CGG CTC CGG CAT GT	GCA CAG TGT GGG TGA CCC CG	61	7
WNT3a	AAC TGC ACC ACC GTC CAC	AAG GCC GAC TCC CTG GTA	60	7
Wnt5a	ATT GTA CTG CAG GTG TAC CTT AAA AC	CCC CCT TAT AAA TGC AAC TGT TC	59	5
LRP5	GCC AAG ACA GAC AAG ATC GAG	CAG CGT GAA CCC AAA AAT G	56	7
LRP6	AGA ACG CGA GAA GGG AAG AT	TGT TTG CAT AAA GCA ACA AAG G	60	7
TCF7L2	TTG ACC GAC AGA CTT TAT GGT G	TGT ATG TAG CGA ACG CAC TTT T	60	7
TCF4	CAC GGA GAG CCC CTT CTC	GTC CCT AAG GCA GCC ATT C	60	7
Fibronektin	CTG GCC GAA AAT ACA TTG TAA A	CCA CAG TCG GGT CAG GAG	60	5
Adiponektin	TGG TTC TGA TTC CAT ACC AGA G	GCC CTG ATG TCA GGA GTT TC	60	7
ALK5	GCA GAC TTA GGA CTG GCA GTA AG	AGA ACT TCA GGG GCC ATG T	60	3
GSK3B	GAC ATT TCA CCT CAG GAG TGC	GTT AGT CGG GCA GTT GGT GT	58	7

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein enzymabhängiges Verfahren und dient der in vitro Amplifikation einer bestimmten Gensequenz. Es handelt sich um mehrfach wiederholende Reaktionen, welche mit Hilfe eines speziellen Primerpaares und des Enzyms Polymerase ablaufen.

Zuerst ist das benötigte Volumen jeder Komponente des Master Mixes zu berechnen. Hierzu wird die Anzahl der Zyklen (39), das Reaktionsvolumen per Well (20 µl), das Template Volumen (3 µl), die Anzahl der Supermix Konzentration (2x) sowie die Exzess Reaktion Volumen (7%) beachtet. Reaktionsansatz des Master Mixes pro Reaktion:

- 1,4 µl H_2O
- 0,8 µl des verwendeten forward (sense) Primer
- 0,8 µl des entsprechenden reverse (antisense) Primer
- 2x10 µl SosFast EvaGreen Supermix-Mix

Hieraus entsteht ein Gesamtvolumen von 13 µl. Der hergestellte Mastermix kann nun zu 7 µl der hergestellten cDNA-Lösung (Kapitel 3.8) in ein PCR-Eppendorf-Gefäß pipettiert und vermischt werden. Das Gesamtvolumen beträgt folglich 20 µl, welches auf ein Well einer 96-Well Platte übertragen, mit einer Folie dicht verschlossen und in den Thermocycler gelegt werden kann. Bei jedem Well wird eine Negativkontrolle, also eine Probe mit RNase-freiem Wasser an Stelle der cDNA Probe zur Kontrolle mitgefahren. Die Proben durchlaufen nun verschiedene Zyklen:

1.	5min	95°C	Erhitzen
2.	30s	95°C	Denaturierungsphase: Die cDNA–Stränge trennen sich voneinander.
3.	15-30s	X °C	primerspezifische `annealing temperature‘ (Primer Anlage Temperatur): Bindung der Primer an die Ziel-DNA.
4.	30s	72°C	Amplifikation der RNA
5.			Wiederholung des Zyklus: Schritt 1-4 39x
6.	10min	72°C	Nachsynthese: Temperatur wird gehalten
7.	Ende	4°C	Abkühlen

Die Detektion der Reaktion erfolgt visuell durch die kontinuierliche Messung der Fluoreszenz von EvaGreen. Nach Ablauf des PCR-Programms wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Synthese einzelner spezifischen PCR-Produktes zu kontrolliert.

3.9. Statistik

Die Auswertung aller generierten Daten erfolgte bei nicht normalverteilten Werten mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Als Konfidenzintervall wurde 95% festgelegt. In der grafischen Darstellung der Ergebnisse ist die statistische Signifikanz der untersuchten Bedingungen gegenüber der Kontrolle als * dargestellt. Dabei gilt als statistisch signifikanter p-Wert ein Wert kleiner als 0,05.

4. Ergebnisse

4.1. Patientenkollektiv

Bei der Auswertung der Blutuntersuchung von Diabetikern und Nicht-Diabetikern ergab sich ein stimmiges Bild in Bezug auf das metabolische Syndrom.

4.1.1. Glucose und HbA1C

In Anbetracht der Definition von DM zeigten sich, wie in Abbildung 11 dargestellt, in der Diabetiker-Gruppe erhöhte Werte für die venöse Nüchternglukose (A) sowie ein statistisch signifikanter Anstieg für das Blutzuckergedächtnis, den HbA1C (B).

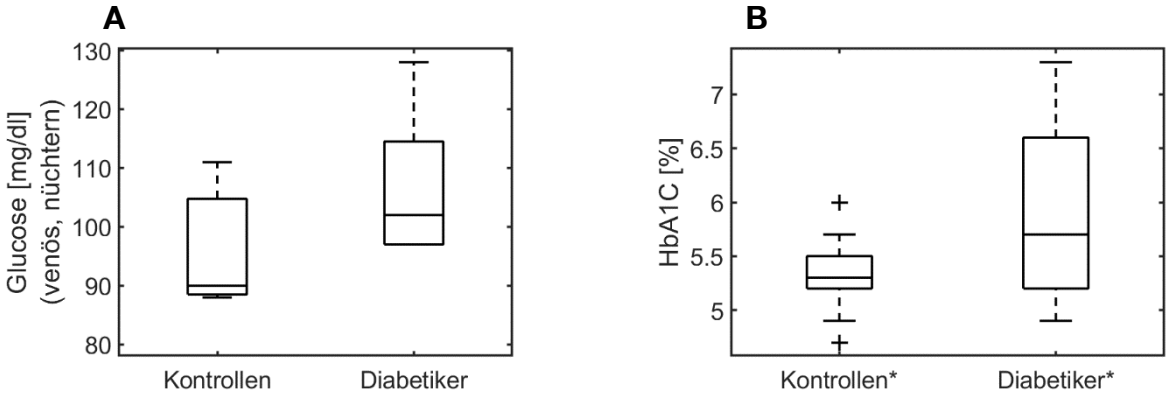

Abbildung 11: Auswertung der Blutuntersuchung von Diabetikern und Nicht-Diabetikern (Glukose und HbA1C). Die Auswertung erfolgte mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Die Ergebnisse sind als „Box and Whiskers" mit Median, oberem und unterem Quartil, Minimum, Maximum und Ausreißern dargestellt. (N ≥ 32, n ≥ 2). P<0,05 gilt als statistisch signifikant. ***A*** *Venöse Nüchternglukose in mg/dl bei Diabetikern in Vergleich zu den Nicht-Diabetikern; p= 0.18434* ***B*** *HbA1C-Wert in % bei Diabetikern in Vergleich zu Nicht-Diabetikern; p= 0.032847.*

4.1.2. Blutfette: Triglyceride, gesamt Cholesterin, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Lipoprotein A

In Bezug auf die Blutfette zeigten sich signifikant höhere Werte für die Gruppe der Diabetiker im Vergleich zu den Nicht-Diabetikern bei den Triglyzeriden und nicht signifikant erhöhte Werte beim LDL-Cholesterin und Gesamt-Cholesterin. Das HDL-Cholesterin war bei den Diabetikern erniedrigt, während sich ein erhöhtes Lipoprotein A bei den Diabetikern fand (Abbildung 12).

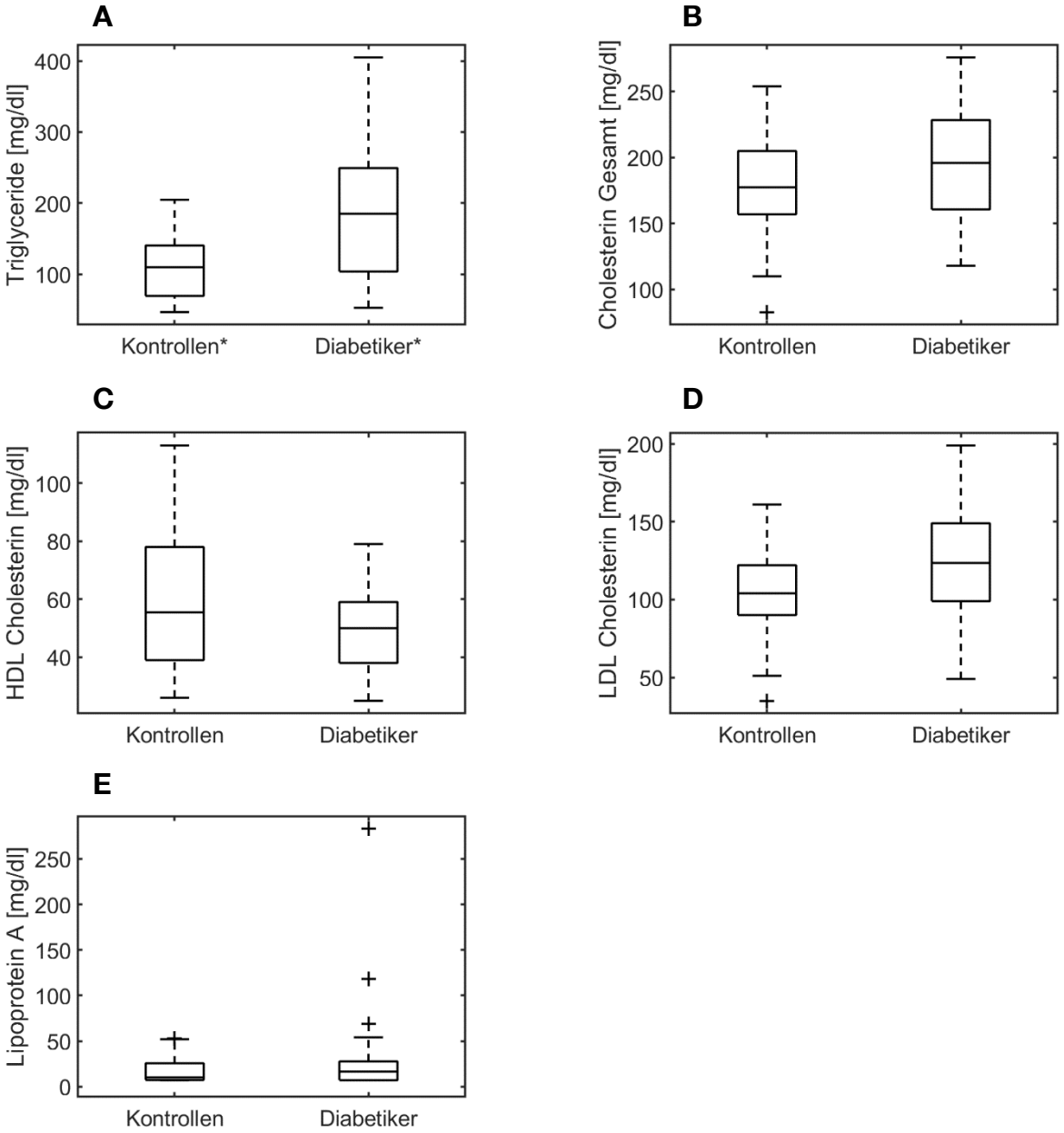

Abbildung 12: Auswertung der Blutuntersuchung von Diabetikern und Nicht-Diabetikern (Blutfette). Die Auswertung erfolgte mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Die Ergebnisse sind als „Box and Whiskers" mit Median, oberem und unterem Quartil, Minimum, Maximum und Ausreißern dargestellt. (N ≥ 32, n ≥ 2). P<0,05 gilt als statistisch signifikant. ***A*** *Triglyceride in mg/dl bei Diabetikern im Vergleich zu Nicht-Diabetikern; p=0.0093289.* ***B*** *Gesamtcholesterin in mg/dl bei Diabetikern im Vergleich zu Nicht-Diabetikern; p=0.34608* ***C*** *HDL-Cholesterin Konzentration in mg/dl bei Diabetikern im Vergleich zu Nicht-Diabetikern; p=0.3778.* ***D*** *LDL- Cholesterin Konzentration in mg/dl bei Diabetikern im Vergleich zu Nicht-Diabetikern; p=0.19442.* ***E*** *Lipoprotein A Konzentration in mg/dl bei Diabetikern im Vergleich zu Nicht-Diabetikern; p= 0.86468.*

A: Der im Blut gemessene Normalwert von Triglyceriden beträgt <150 mg/dl. In der aktuellen Untersuchung zeigte sich, dass die Triglyceride bei den Patienten mit DM im Vergleich zu der Nicht-Diabetiker Gruppe um 68% erhöht waren.

B: Auch das Gesamtcholesterin ist ein Kriterium des metabolischen Syndroms, zeigte aber in der Analyse kaum einen Unterschied von 10,4% zwischen Diabetikern und Nicht-Diabetikern.

C: In den Untersuchungen zeigte sich bei den Kontrollen ein nicht signifikant vermindertes HDL Cholesterin um 10%.

D: Bei Normwerten um die 165 mg/dl zeigte sich ein um 18,8% erhöhtes LDL Cholesterin bei DM Patienten.

E: Auch das Lipoprotein A zeigte sich bei den Diabetikern mit 65% nicht signifikant erhöht.

4.1.3. Elektrolyte: Natrium, Kalium, Kalzium

In den vorliegenden Untersuchungen zeigten die Elektrolyte einen signifikanten Unterschied zwischen Diabetikern und Nicht-Diabetikern (Abbildung 13).

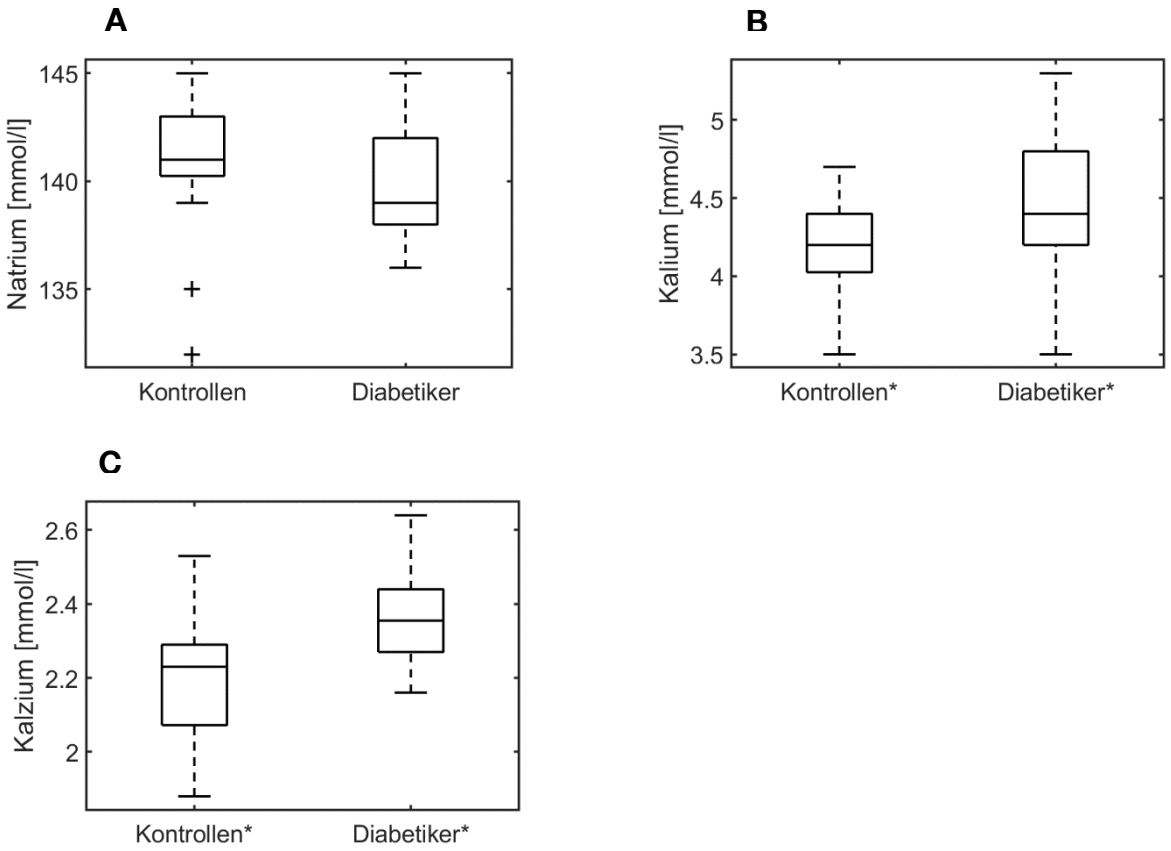

Abbildung 13: Auswertung der Blutuntersuchung von Diabetikern und Nicht-Diabetikern (Elektrolyte). Die Auswertung erfolgte mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Die Ergebnisse sind als „Box and Whiskers" mit Median, oberem und unterem Quartil, Minimum, Maximum und Ausreißern dargestellt. (N ≥ 32, n ≥ 2). P<0,05 gilt als statistisch signifikant. ***A:*** *Unterschiede im Natrium in mmol/l bei Nicht-Diabetikern und Diabetikern; p=0.079973.* ***B:*** *Unterschiede der Kalium Werte in mmol/l bei Nicht-Diabetikern und Diabetikern; p=0.027293.* ***C:*** *Unterschiede im Kalzium in mmol/l bei Nicht-Diabetikern und Diabetikern; p=0.0056612.*

A: In den Versuchen zeigte sich eine Verminderung der Natriumkonzentration mit einem Mittelwert von 139 mmol/l in Diabetikern im Vergleich zu den Kontrollen mit 141 mmol/l.

B. Es zeigten sich leicht erhöhte Kaliumkonzentrationen bei der diabetischen Patientengruppe mit einem Mittelwert von 4,4 mmol/l, während der Mittelwert bei Nicht-Diabetikern 4,2 mmol/l beträgt.

C: Auch bei der Kalziumkonzentration zeigten sich die Werte der Diabetiker erhöht im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. So zeigten die Diabetiker Durchschnittlich eine Kalziumkonzentration von 2,4 mmol/l, die Nicht-Diabetiker 2,2 mmol/l.

4.1.4. Nierenfunktionsparameter: Kreatinin, Harnstoff-N

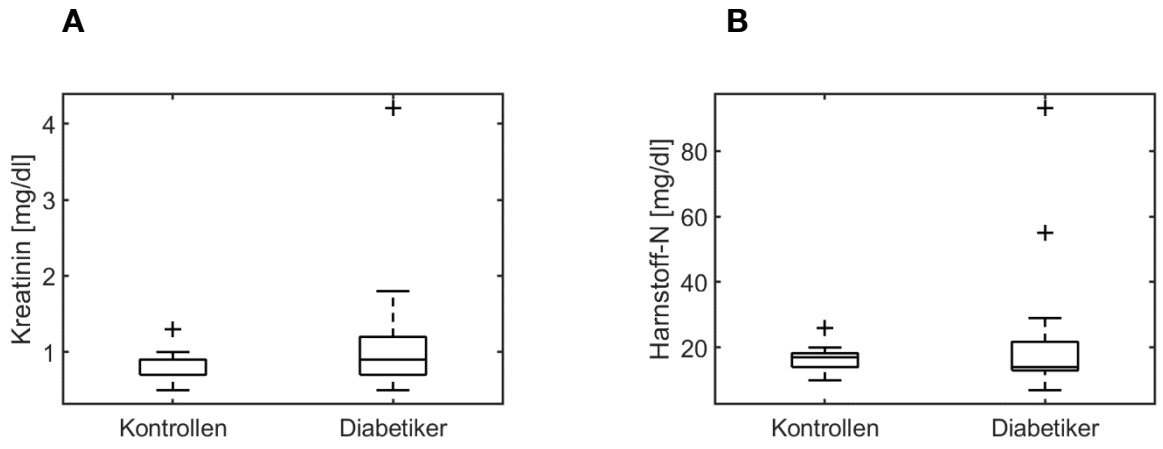

Abbildung 14: Auswertung der Blutuntersuchung von Diabetikern und Nicht-Diabetikern (Nierenfunktionsparameter).
Die Auswertung erfolgte mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Die Ergebnisse sind als „Box and Whiskers" mit Median, oberem und unterem Quartil, Minimum, Maximum und Ausreißern dargestellt. ($N \geq 32$, $n \geq 2$). $P<0,05$ gilt als statistisch signifikant. ***A:*** *Unterschied des Kreatinins in mg/dl bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern; p=0.15974.* ***B:*** *Harnstoff-N Werte in mg/dl bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern; p=0.96191.*

In dem vorliegenden Patientenkollektiv zeigte sich bei beiden Nierenwerten ein ähnlicher Wert für Diabetiker im Vergleich zu Nicht-Diabetikern (Abbildung 14). Sowohl das Kreatinin als auch der Harnstoff-N können einen Hinweis auf bereits bestehende Nierenschädigungen geben.

4.2. Genexpressionsanalyse von Patientenspongiosa

Um den Einfluss von T2DM auf die Genexpression auf mRNA-Ebene in spongiösem Knochen zu untersuchen, wurden qPCRs durchgeführt. Dabei wurde eine Diabetikergruppe mit einer nicht-diabetischen Kontrollgruppe verglichen. Um die Ergebnisse besser zu vergleichen, wurden Diabetiker mit Nicht-Diabetikern nach Alter und Geschlecht gepaart und miteinander verglichen. Das übergreifende Ergebnis wird im Folgenden beschrieben.

4.2.1. Ergebnisse der RT-PCR von WNT3a und WNT5a

Die Untersuchung der Genexpression auf mRNA-Ebene von WNT3A ergab eine verminderte Genexpression bei T2DM gegenüber den Nicht-Diabetikern mit einem Median knapp über 0. Auch zeigte die Genexpression von WNT5A einen Abfall der

Transkriptionsaktivität, welcher mit 30% Abfall (Median = 0,71; Q1 = 0,33; Q3 = 1,16) in der diabetischen Gruppe etwas geringer ausfiel. Abbildung 15 stellt dies dar.

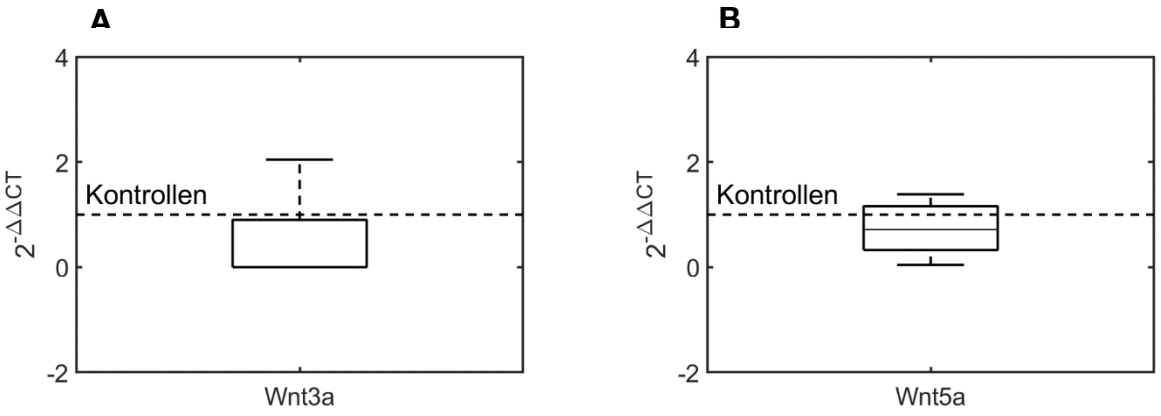

Abbildung 15: Genexpressionsanalyse von WNT3A und WNT5A in Patientenspongiosa – Vergleich von Diabetikern und Nicht-Diabetikern.
Die Genexpressionsanalysen erfolgten mittels konventioneller PCR-SYBER Green, Gelelektrophorese und anschließender semi-quantitativer densitometrischer Analyse. Die statistische Analyse der Daten erfolgte durch den Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Die Ergebnisse sind als „Box and Whiskers" mit Median, oberem und unterem Quartil, Minimum, Maximum und Ausreißern dargestellt. (N ≥ 32, n ≥ 2). P<0,05 gilt als statistisch signifikant. ***A.*** *WNT3A, p= 0.65433,* ***B.*** *WNT5a, p= 1.00000.*

4.2.2. Ergebnisse der RT-PCR von LRP5 und LRP6

Die Genexpression von LRP5 und LRP6 wird in Abbildung 16 aufgezeigt. Die Expression von LRP5 schien bei der Diabetikergruppe nicht wesentlich verändert zu sein. Dennoch zeigte sich mit einem Median von 0,73 (Q1 = 0,34; Q3 = 1,64) eine 27%ige verminderte Genexpression gegenüber den Nicht-Diabetikern. Die RT-PCR-Untersuchung von LRP6 zeigte eine um die Hälfte verminderte Genexpression bei T2DM im Vergleich zu den Nicht-Diabertikern.

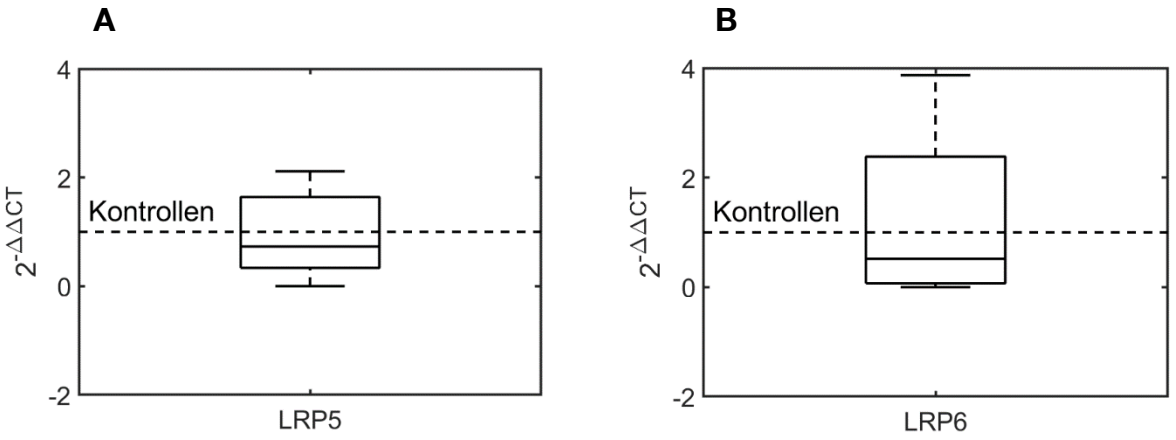

Abbildung 16: Genexpressionsanalyse von LRP5 und LRP6 in Patientenspongiosa – Vergleich von Diabetikern und Nicht-Diabetikern.
Die Genexpressionsanalysen erfolgten mittels konventioneller PCR-SYBER Green, Gelelektrophorese und anschließender semi-quantitativer densitometrischer Analyse. Die statistische Analyse der Daten erfolgte durch den Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Die Ergebnisse sind als „Box and Whiskers" mit Median, oberem und unterem Quartil, Minimum, Maximum und Ausreißern dargestellt. (N ≥ 32, n ≥ 2). P<0,05 gilt als statistisch signifikant. ***A.*** *LRP5, p= 0.81696,* ***B.*** *LRP6, p= 0.21018.*

4.2.3. Ergebnisse der RT-PCR von TCF7L2 und TCF4

Die Ergebnisse der RT-PCR für TCF7L2 ergaben mit einem Median von 0,65 (Q1 = 0,35; Q3 = 1,01) im Wilcoxon Test eine um 64% statistisch signifikante verminderte Genexpression bei T2DM gegenüber den nicht-diabetischen Kontrollen. Die Genexpression von TCF4 war bei der Diabetikergruppe um 39,7% (Median = 0,60; Q1 = 0,25; Q3 = 0,90) im Vergleich zu den Nicht-Diabetikern signifikant reduziert (Abbildung 17).

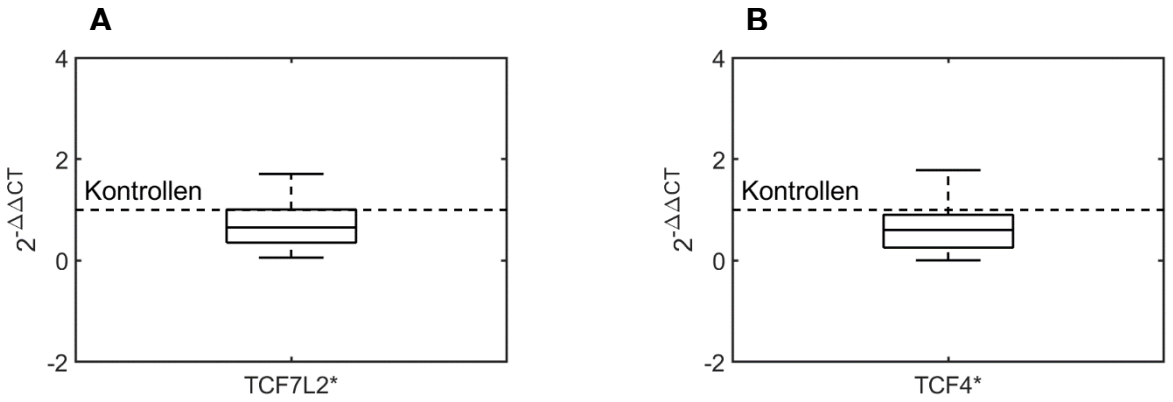

Abbildung 17: Genexpressionsanalyse von TCF7L2 und TCF4 in Patientenspongiosa – Vergleich von Diabetikern und Nicht-Diabetikern.
Die Genexpressionsanalysen erfolgten mittels konventioneller PCR-SYBER Green, Gelelektrophorese und anschließender semi-quantitativer densitometrischer Analyse. Die statistische Analyse der Daten erfolgte durch den Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Die Ergebnisse sind als „Box and Whiskers" mit Median, oberem und unterem Quartil, Minimum, Maximum und Ausreißern dargestellt. (N ≥ 32, n ≥ 2). P<0,05 gilt als statistisch signifikant. ***A.*** *TCF7L2, p= 0.03938),* ***B.*** *TCF4, p= 0.02409.*

4.2.4. Ergebnisse der RT-PCR von ALK5 und GSK3B

Die Untersuchung von ALK5 ergab eine niedrigere Genexpression (Median 0,79; Q1 = 0,60; Q3 = 1.10) bei den T2DM gegenüber den nicht-diabetischen Kontrollpatienten. GSK3B zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zu Nicht-Diabetikern. So war die Genexpression bei T2DM um 78% vermindert (p=0.02) (Abbildung 18).

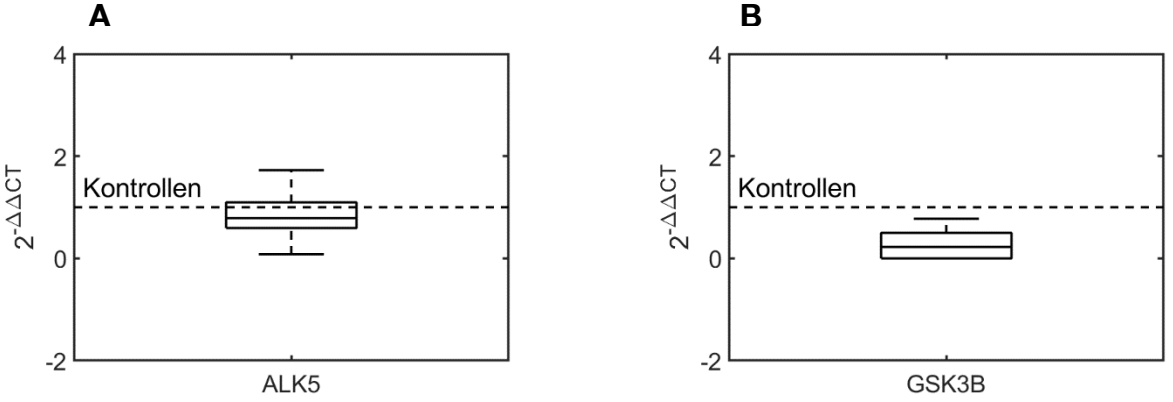

Abbildung 18: Genexpressionsanalyse von ALK5 und GSK3B in Patientenspongiosa – Vergleich von Diabetikern und Nicht-Diabetikern.
Die Genexpressionsanalysen erfolgten mittels konventioneller PCR-SYBER Green, Gelelektrophorese und anschließender semi-quantitativer densitometrischer Analyse. Die statistische Analyse der Daten erfolgte durch den Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Die Ergebnisse sind als „Box and Whiskers" mit Median, oberem und unterem Quartil, Minimum, Maximum und Ausreißern dargestellt. (N ≥ 32, n ≥ 2). P<0,05 gilt als statistisch signifikant. ***A.*** *ALK5, p= 0.32095),* ***B.*** *GSK3B, p= 0.07636.*

4.2.5. Ergebnisse der RT-PCR von Fibronektin und Adiponektin

Abbildung 19 zeigt die Genexpression von Adiponectin und Fibronectin. Adiponektin zeigte in der PCR Untersuchung eine fast 100%ige Abnahme der Genexpression für T2DM gegenüber den nicht-diabetischen Kontrollen. Die densitometrische Untersuchung der Ergebnisse der RT-PCR für Fibronektin zeigte eine statistisch Signifikante Verminderung der Genexpression um 95% bei T2DM im Vergleich zu den Nicht-Diabetikern.

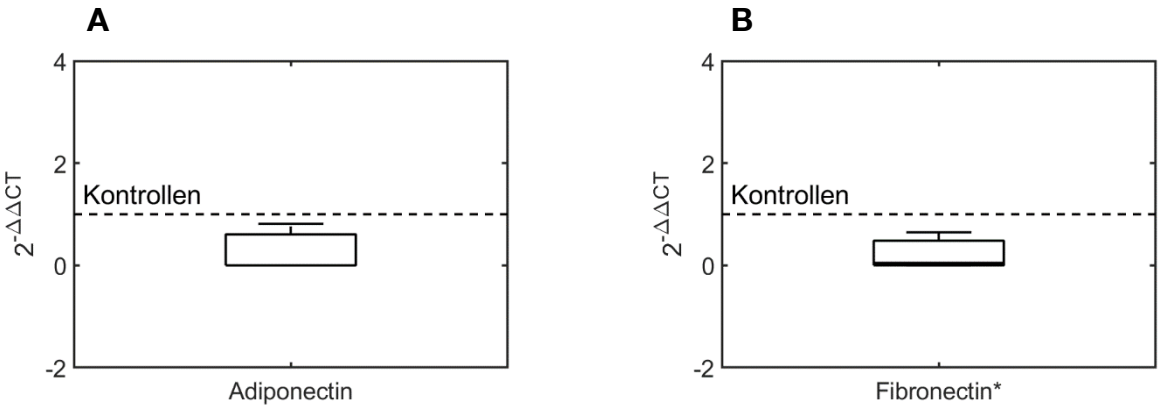

Abbildung 19: Genexpressionsanalyse von Adiponektin und Fibronektin in Patientenspongiosa – Vergleich von Diabetikern und Nicht-Diabetikern.
Die Genexpressionsanalysen erfolgten mittels konventioneller PCR-SYBER Green, Gelelektrophorese und anschließender semi-quantitativer densitometrischer Analyse. Die statistische Analyse der Daten erfolgte durch den Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Die Ergebnisse sind als „Box and Whiskers“ mit Median, oberem und unterem Quartil, Minimum, Maximum und Ausreißern dargestellt. ($N \geq 32$, $n \geq 2$). $P<0,05$ gilt als statistisch signifikant. ***A.*** *Adiponektin, p= 0.26268),* ***B.*** *Fibronektin, p= 0.01026).*

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Erkenntnisse über die Auswirkungen des Wnt-Signalweges auf die diabetische Stoffwechsellage gewonnen. Als Grundlage der Arbeit dienen einzelne Komponenten des Wnt-Signalweges, welche bei diabetischer Stoffwechsellage vermehrt oder vermindert exprimiert werden. Diese Behinderung des normalen Ablaufes im Signalweg können einerseits die Pathogenese des T2DM und damit des metabolischen Syndroms fördern. Anderseits könnte die Kombination aus T2DM und einem gestörten Wnt-Signalweg im Knochen ein Hinweis auf die Manifestation der diabetischen Knochenkrankheit sein. In diesem Kontext sollten die verschiedenen Einflüsse der unterschiedlichen Gene untersucht werden, um so Rückschlüsse auf die diabetische Knochenkrankheit zu erhalten. Im Nachfolgenden werden die Ergebnisse dieser Dissertation diskutiert. Dabei erfolgt zunächst eine kritische Auseinandersetzung mit den Ergebnissen der durchgeführten Genexpressionsanalysen im Zusammenhang mit der diabetischen Knochenkrankheit. Anschließend wird die Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf den diabetischen Patienten erörtert, um zuletzt einen Ausblick über die therapeutischen Chancen, die sich aus dieser Arbeit ergeben, darzulegen.

5.1. Interpretation des Patientenkollektives

Bei den von uns untersuchten Patienten zeigen die Diabetiker in der laborchemischen Untersuchung deutlich erhöhte Werte für das Blutzuckergedächtnis (HbA1C) und die venöse Nüchternglukose. Der HbA1C ist glykosyliertes Hämoglobin und spiegelt je nach Zuckergehalt seine Aufnahme in Erythrozyten wieder. Der HbA1C-Wert gibt den Anteil der verzuckerten Erythrozyten an der Gesamtanzahl der Erythrozyten an (Martin, Gröber et al. 2007). Die bei Diabetikern statistisch signifikante Erhöhung dieser Werte, welche bei der Diagnosestellung und im klinischen Verlauf für den Diabetes eine wichtige Rolle spielen, lässt Rückschlüsse auf die veränderte metabolische Stoffwechsellage ziehen.

Auch zeigen sich bestimmten Blutfette in den laborchemischen Untersuchungen typisch für den Diabetes. So finden wir bei den Diabetikern höhere Werte für Triglyceride, das LDL- und Gesamtcholesterin sowie Lipoprotein A. Erhöhte Triglycerid- und Gesamtcholesterinwerte sind nicht nur Diagnosekriterium des metabolischen Syndroms, sondern sind auch mit Adipositas assoziiert und stellen ein Risiko in der Entstehung von vaskulären Erkrankungen dar (Braunsteiner, Sailer et al. 1966). LDL- Cholesterin führt mit anderen Lipoproteinen dazu, dass Cholesterin in die peripheren Gewebe verteilt wird. Es stellt also den schlechten Anteil des Gesamtcholesterins dar. Im Gegensatz hierzu nimmt das HDL-Cholesterin Cholesterin aus peripheren Geweben auf und transportiert es zurück in die Leber (Wechsler 1997). Es wirkt also in hohen Anteilen gegen die Verbreitung des Cholesterins im Körper. Wie zu erwarten zeigt sich HDL-Cholesterin bei den diabetischen Patienten vermindert.

Weiter wurden verschiedene Elektrolyte in unseren Patienten untersucht. Elektrolyte sind für den menschlichen Körper lebenswichtige Stoffe, welche in wässriger Lösung Strom leiten können. Sie kommen als positive sowie negative Teilchen vor. Die Menge, die richtige Verteilung intra- und extrazellulär sowie das ausgeglichene Verhältnis zwischen positiven und neagtiven Teilchen sind notwendig für das Überleben einzelner Zellen aber auch den reibungslosen Ablauf von Prozessen im Körper. Der Körper ist nicht in der Lage, Elektrolyte selbst herzustellen und gewinnt diese über Nahrung und Getränke. Reguliert wird die Verteilung, Aufnahme und Ausscheidung über Hormone und Peptide. Nun kann der Elektrolythaushalt Rückschlüsse auf fehlfunktionierende Stoffwechsellagen geben (Gruber and Rittmann 1973). Natrium liegt zum grössten Teil ausserhalb der Zellen vor und spielt eine wichtige Rolle in Transportprozessen durch die Zellmembran. DM beeinflusst das Natrium im menschlichen Körper über hormonelle Stoffwechselveränderungen oder Hypovolämie. Dies spiegelt sich in den von uns untersuchten Patienten wieder, da sich hier eine Verminderung des Natriumspiegels in Diabetikern im Vergleich zu den Kontrollen zeigt. Im Gegensatz zu Natrium liegt das ebenfalls positiv geladene Kalium zum grössten Teil intrazellulär vor und erhält dort das sogenannte Ruhepotential der Zellmembran. Im Glukosemetabolismus führt die intrazelluläre Glukoseaufnahme zum

Schluss der ATP-abhängigen Kaliumkanäle und letztendlich zur Depolarisation der Zelle. Diese Depolarisation wiederum führt zu einem Kalziumeinstrom und der Freisetzung von Insulin aus der Zelle (Ammon 2001). Ein ausgeglichener Kalium Wert stellt hierbei also Stabilität dar. Es zeigen sich leicht erhöhte Kalium Werte bei der diabetischen Patientengruppe des extrazellulären K^+-Anteiles. Dies kann für vermehrte Glukoseaufnahme in den Zellen sprechen. Das Kalzium befindet sich zu 99% im Knochen des menschlichen Körpers. Im Zellinneren dient Kalzium als wichtiger Botenstoff zur Übertragung von Signalen. Wie bereits beschrieben, spielt Kalzium unter Glukoseinfluss eine Rolle bei der Insulinfreisetzung. Auch beim Kalzium zeigen sich die Werte der Diabetiker erhöht im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Dies kann ebenfalls Hinweise auf erhöhte Glukosespiegel geben.

Um die Langzeitfolgen bei den Patienten zu beachten, wurden Nierenretensionsparameter laborchemisch bestimmt. Die Nierenfunktion stellt eine Folgeerkrankung des DM mit Organschädigung dar. Die Schädigung läuft schmerzfrei und langsam über mehrere Jahre ab. Eine bei DM bestehende Hypertonie sowie die Verzuckerung von Eiweiß mit Ablagerung in kleinen Gefäßen sind Hintergrund der Nierenschädigung (Werth, Lehnert et al. 2015). Um den Fortschritt der Erkrankung bei den Patienten besser zu beurteilen, wurde zur Aussagekraft der Nierenfunktion die Harnstoff-N Menge sowie das Kreatinin betrachtet. Bei den Kreatininwerten ist zu beachten, dass sie neben Nierenschädigungen auch durch Alter, Muskelmasse, körperliche Aktivität und Geschlecht beeinflusst werden können. In unserem Patientenkollektiv zeigten sich bezüglich der Nierenparameter keine signifikanten Unterschiede zwischen Diabetikern und Nicht-Diabetikern. Hieraus kann man schliessen, dass die Patienten mit Diabetes in frühen Krankheitsstadien untersucht wurden, ohne Hinweise auf Langzeitschädigungen an der Niere.

Es bleibt zu beachten, dass vermehrte Mengen von Zucker im menschlichen Stoffwechsel nicht spurlos an verschiedenen Geweben vorübergehen. Auch kleine überschüssige Mengen beeinflussen und schädigen Organsystheme und Stoffwechselabläufe, wie zum Beispiel den Knochenmetabolismus.

5.2. Interpretation der Genexpressionsanalyse

Aus der Literatur wird ersichtlich, dass die Rolle der diabetischen Knochenkrankheit in den letzten Jahren verstärkt in den Mittelpunkt rückt. So fasst dieses Krankheitskonstrukt die Auswirkungen der metabolischen Veränderungen durch DM auf Veränderungen in Material- und Struktureigenschaften des Knochens zusammen. Ein wichtiger Schlüsselpunkt dieser Verknüpfung stellt der Wnt-Signalweg dar.

Um den Einfluss des Wnt-Signalweges auf die Entstehung des T2DM sowie sein Einfluss auf das Frakturrisiko und der dazugehörigen Knochenheilung zu untersuchen, wurde die Genexpression ausschlaggebender Gene in der Patientenspongiosa mittels konventioneller RT-PCR durchgeführt und analysiert. Wir gehen davon aus, dass die veränderte Expression der untersuchten Gene zu einer gesteigerten oder verminderten Proteintranslation geführt hat. Somit können wir über die Expression der Gene Rückschlüsse auf die Wirkung der Proteine ziehen.

Eine Störung in der Genexpression der untersuchten Gene kann die Entstehung der diabetischen Knochenkrankheit auf zwei Ebenen fördern. Erstens führt die veränderte Expression einzelner Gene zu einer gestörten Pankreasentwicklung (Jin 2008) und einem veränderten Glukosemetabolismus (Schinner 2009). Als Folge verschlechtert sich die Stoffwechsellage bei bereits bestehender Insulinresistenz. Die Erkrankung des DM und die Entstehung des metabolischen Syndroms werden somit verstärkt. Zweitens interagieren gezielte Gene mit dem Wnt-Signalweg und führen durch veränderte Expression zu einer gestörten Knochenheilung (Audrey Koay and Brown 2016). Weiter ist zu beachten, dass sich allein die Erkrankung an T2DM ebenfalls negativ auf die Knochenformation und das -wachstum auswirken kann. Hier spielen im Körper ausgeschüttete Entzündungsfaktoren, Sauerstoffradikale, Zytokine oder Chemokine eine grosse Rolle (Sun, Yang et al. 2016). Auch eine bestehende medikamentöse Therapie bei T2DM beeinflusst den metabolischen Stoffwechsel und damit das Frakturrisiko.

5.2.1. Im metabolischen Stoffwechsel

Die von uns untersuchten Gene wirken sich als Teil des Wnt-Signalweges auf die diabetische Knochenkrankheit aus. Aus der aktuellen Literatur geht hervor, dass eine verändertere Aktivität des Wnt-Signalweges zu Insulinresistenz, DM und dem metabolischem Syndrom führt (Palsgaard, Emanuelli et al. 2016). Dies entsteht durch einen veränderten Einfluss auf das Pankreas, auf die Glukose Homöostase sowie die Adipogenese. Der somit veränderte metabolische Stoffwechsel schlägt sich auch im Knochen nieder und verändert die bestehende Knochensubstanz.

Ein Baustein der Entstehung von DM ist die Funktion der β-Zellen im Pankreas. So ist eine gleichmäßige Expression von TCF7L2 wichtig für das Überleben, den Erhalt der Anzahl und die Funktion dieser Zellen (Mitchell, Mondragon et al. 2014). In dieser Arbeit konnte eine statistisch signifikante Verminderung von TCF7L2 bei den T2DM auf mRNA Level im Vergleich zu den nicht-diabetischen Kontrollen gezeigt werden. Für die Stoffwechsellage der Patienten mit DM könnte eine verminderte Genexpression des TCF7L2 Genes einen negativen Einfluss auf den bereits gestörten Glukosemetabolsmus haben. Wie Grant et al. 2006 zeigte, sind Veränderungen im TCF7L2 Gen mit T2DM, Adipositas, erhöhtem BMI sowie vermehrten Blutfettwerten assoziiert. Die TCF7L2 Variante rs7903146 ist derzeit der stärkste, bekannte Risikofaktor für T2DM (Chiang, Ip et al. 2012). Die durch die Genvariante enstehende Expressionsstörung kann einen veränderten Einfluss von TCF7L2 auf die β-Zellen des Pankreas und der hieraus entstehenden Insulinresistenz erklären. Hinzu kommt, dass TCF7L2 im prädiabetischen Zustand sehr instabil ist (Le Bacquer, Shu et al. 2011). Während der Entstehung des DM kann es demnach frühzeitig zu Veränderungen im TCF7L2 Gen kommen.

Prädiabetische Zustände wirken sich auch auf weitere Gene aus. So wurde gezeigt, dass ALK5 in frühen Stadien des DM die Zunahme der Anzahl von Endothelzellen im Pankreas hemmt und somit an der Entstehung des DM beteiligt sein kann (King, Clarkin et al. 2015). In der vorliegenden Arbeit zeigt sich ein im Vergleich zur Nicht-Diabetiker Gruppe vermindertes ALK5, welches im Widerspruch zu oben genannter Wirkungsweise steht. Nun ist aber zu beachten, dass das untersuchte

Patientenkollektiv bereits seit längerer Zeit an DM leidet. Somit ist das Stadium des Prädiabetes bereits abgeschlossen. Die veränderte Stoffwechsellage bei ausgebildeten DM im Vergleich zu prädiabetischen Zuständen kann durch eine reaktiv verminderte ALK5 Genexpression erklärt werden.

Als essenzielle Bestandteile der Initiation des Wnt-Signalweges wurden WNT3A, WNT5A sowie die Korezeptoren LRP5 und LRP6 untersucht. So zeigt sich in der Genexpressionsanalyse von WNT3A als auch von WNT5A keine statistisch signifikante Veränderung der Genexpression mit einer erniedrigten Transkription bei T2DM. Die aktuelle Literatur bestätig für beide Gene, welche in ausgebildetem T2DM exprimiert werden, eine Herunterregulation des Wnt-Signalwegs in β-Zellen. Somit wird die Entstehung dysfunktionaler Pankreasinseln durch die Gene gefördert (Kozinski, Jazurek et al. 2016). Weiter spielen WNT3A und WNT5A eine Rolle als potente Inhibitoren der Adipogenese im metabolischen Stoffwechsel (Schulte, Müller et al. 2012). Die in den durchgeführten Versuchen gezeigte verminderte Transkription des WNT3A und WNT5A Genes kann einerseits zu einer Steigerung der Adipogenese bei den diabetischen Patienten führen und andererseits die diabetische Stoffwechsellage im Ganzen unterstützen. Auch LRP5 und LRP6 wirken als Korezeptoren des Wnt-Signalweges gleichermaßen auf die Entwicklung des DM. So werden Mutationen des LRP5 mit DM, Adipositas und dem metabolischen Syndrom assoziiert. Eine veränderte oder eine verminderte Expression der LRP5 sowie LRP6, wie es sich bei den hier untersuchten diabetischen Patienten zeigte, kann demnach zu einer verminderten Wnt-Aktivität mit den bereits beschriebenen Folgen auf die Stoffwechsellage führen. Studien unterstreichen die Theorie, dass die Wnt/LRP6-Aktivierung die Expression der Insulin Rezeptoren sowie der IGFR reguliert (Singh, De Aguiar et al. 2013). Die verminderte Transkription von LRP6 könnte somit durch veränderte Expression von Rezeptoren den Stoffwechsel zusätzlich beeinflussen. Die Wnt/LRP6/TCF7L2-Achse kann als Regulator des Glukosemetabolismus angesehen werden und ist ein ernährungssensitiver Regulator des Körpergewichts.

Während sich die bereits genannten Gene positiv auf die Entwicklung der Pankreaszellen auswirken, wirkt GSK3B entgegengesetzt und geht mit

Insulinresistenz und Apoptose von pankreatischen β-Zellen einher (Leng, Zhang et al. 2010). Ein erhöhtes GSK3B spricht also für die Entstehung eines DM. Nun zeigte sich eine statistisch signifikante Verminderung der GSK3B Expression auf mRNA Level, welche somit im Widerspruch zur aktuellen Literatur steht. Es wurde jedoch gezeigt, dass in Mäusen spezifische Deletionen des GSK3 Genes die Entwicklung von T2DM sensibilisieren. Dies geschieht durch eine über Deletionen entstehende, allgemein gesteigerte Insulinsensitivität, welche später in Insulinresistenz umschlägt (Gillespie, Bush et al. 2013). Es kann also sein, dass eine verminderte Expression von GSK3B in dem von uns untersuchten diabetischen Patientenkollektiv mit den bekannten, spezifischen Deletionen im Sinne einer Sensibilisierung für T2DM verknüpft ist.

Auf Ebene der Transkriptionsfaktoren zeigte sich neben dem bereits beschriebenen Einfluss von TCF7L2 ein statistisch signifikanter Transkriptionsabfall im TCF4 bei Patienten mit T2DM im Vergleich zu gesunden Patienten. Die Vermittlung des Wnt-Signalweges wird also auch auf Trankriptionaler Ebene abgeschwächt.

Von außen beeinflusst wird der Wnt-Signalweg durch Fibronektin, welches Wnt-regulierte morphogene Prozesse unterstützt (De Langhe, Sala et al. 2005). Die Versuche zeigen eine verminderte Exprimierung des Fibronektin. Hieraus ergibt sich eine fehlende Aktivierung des Wnt-Signalweges. Welche Auswirkungen diese verminderte Aktivität des Wnt-Signalweges mit sich zieht, wurde bereits diskutiert. Ein ebenfalls äußerlicher Einflussfaktor des Wnt-Signalweges stellt Adiponektin dar. Es wirkt der Insulinresistenz entgegen und senkt das Risiko für die Entwicklung eines manifesten T2DM sowie Begleiterkrankungen wie Adipositas, arteriosklerotische Ereignisse und arterieller Hypertonus (Yadav, Kataria et al. 2013). Die Versuche zeigten eine verminderte Expression von Adiponektin. Es ist also möglich, dass eine gestörte Expression von Adiponektin in bereits erkrankten Patienten die Entwicklung des T2DM sowie des metabolischen Syndroms mit seinen Komponenten weiter fördert. Zu beachten ist, dass Adiponektin als Risikomarker für Prädiabetes fungieren kann (Jiang, Owei et al. 2016). So kann es bereits in frühen Erkrankungsstadien zu einem Abfall der Adiponektinspiegel kommen und Rückschlüsse auf veränderte Stoffwechselzustände geben. Weiter ist bekannt, dass chronisch erhöhte

Insulinspiegel eher zu einem Abfall des Adiponektinspiegels führen. Dies könnte die lange Erkrankungsdauer des Patientenpooles widerspiegeln.

5.2.2. Im Knochenstoffwechsel

Neben der Auswirkung auf den diabetischen Stoffwechsel führen die Gene über eine verminderte Aktivierung des Wnt-Signalweges im Knochen zu Veränderungen der Knocheneigenschaften. So stellt der kanonische Wnt-Signalweg einen stabilen Regulator der Knochenbildung dar. Durch die veränderte Expression der Gene werden die Material- und Struktureigenschaften des Knochens auf unterschiedliche Art und Weise beeinflusst. Hierzu finden sich Veränderungen in der Proliferation, der Differenzierung, der Bildung der Knochenmatrix und der Mineralisation (Schwartz 2003). In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass der kanonische Wnt-Signalweg die Osteoblastendifferenzierung aus MSCs fördern oder hemmen kann. Dies ist abhängig von dem Zellhintergrund, der Spezies des Knochens, den experimentellen Konditionen und Stimuli, dem Wnt-Aktivitätslevel und dem Stadium der MSC Entwicklung (Zhou 2011).

In der hier aufgezeigten Genexpressionsanalyse zeigt sich eine verminderte Expression von WNT3A. Untersuchungen lassen hieraus auf eine verminderte Osteoblastendifferenzierung und ein schlechteres Knochenremodeling schliessen (Aiko and Masato 2006). Einen ähnlichen Effekt zeigt sich in der Literatur bei der Hemmung von GSK3B. Das hier signifikant verminderte GSK3B kann demnach Hinweise auf eine gestörte Osteoblastendifferenzierung, Knochenmasse und –stärke geben (Komatsu, Mary et al. 2010, Sisask, Marsell et al. 2013).

Auch WNT5A zeigt sich bei den diabetischen Patienten herabreguliert. Da WNT5A in der Frakturheilung eine wichtige Rolle spielt, erschwert eine verminderte Expression womöglich den komplexen Heilungsvorgang.

LRP5 kommt wie viele Mitglieder des Wnt-Signalweges ubiquitär im Körper vor und reguliert unter anderem die Knochendichte. So zeigen LRP5-KO-Mäuse einen postnatalen Knochenverlust aufgrund mangelnder Knochenformation sowie fehlender Osteoblasten Proliferation. Es wurde andererseits gezeigt, dass eine mit $LRP5_{G171V}$-

Mutation exprimierte Mauslinie zu einem Phänotyp mit erhöhter Knochenmasse führt. Dies geschieht durch eine Erhöhung der Zahl aktiver Osteoblasten im Knochen (Little, Folz et al. 2002). In den vorliegenden Analysen zeigt sich eine verminderte Expression des LRP5 bei den Diabetikern, was veränderte Struktureigenschaften des Knochens erklären kann. Die paradoxe Erhöhung der BMD kann durch die bei Diabetikern auftretenden spezifischen Mutationen im LRP5 Gen erklärt werden. Es ergeben sich noch weitere Möglichkeiten zur Interpretation der kontrovers diskutierten BMD-Werten. Bei Betrachtung der Interaktion des Wnt-Signalweges mit dem TGFβ-Gen, findet sich eine gemeinsame Stimulation der Proliferation der hMSCs. Die aktuelle Literatur beschreibt eine Hemmung der Differenzierung aus hMSCs in Osteozyten und Adipozyten über ALK5 (Zhou 2011). Bei vermindert exprimiertem ALK5 entsteht hieraus eine unzureichende Hemmung der Osteoblastendifferenzierung. Dies stellt einen weiteren Ansatz zur Erklärung der paradoxen Erhöhung der BMD bei diabetischen Patienten.

Weiter wurde eine gesteigerte Wahrscheinlichkeit für Osteoporose, T2DM sowie das metabolischen Syndroms durch die Punktmutationen LRP6$_{R611C}$ beschrieben (Singh, De Aguiar et al. 2013). Es ist zu erwarten, dass die Konsequenzen eines verminderten LRP6 einer LRP6-Punktmutation ähneln.

Fibronektin stellt neben seiner Funktion in der Differenzierung und Überlebensrate von Osteoblasten auch für die Ausbildung der Knochenmatrix sowie für die Matrixintegrität einen notwendigen Bestandteil dar. So interagiert Fibronektin mit Integrin-Rezeptoren auf Osteoblasten und beeinflusst die Osteogenese bereits in frühen Differenzierungsstadien (Moursi, Damsky et al. 1996). Die in den Untersuchungen statistisch signifikante Verminderung des Fibronektin bei den Diabetikern im Vergleich zu den Nicht-Diabetikern, lässt auf eine verminderte Osteoblastenzahl sowie Knochenmatrix schliessen.

Wie bereits in Kapitel 1.5.10 beschrieben, kommt Adiponektin auch in humanen Osteoblasten vor. Es zeigte sich eine negative Korrelation von Adiponektin und Knochendichte im gesamten Skelett. In der aktuellen Literatur wird die paradoxe Erhöhung der BMD bei T2DM durch proosteoblastische Mechanismen des Insulins

erklärt (Starup-Linde, Lykkeboe et al. 2016). Die Untersuchung des Adiponektin bei diabetischen Patienten zeigt eine signifikant verminderte Expression. Dies kann ein Hinweis auf die erhöhte Knochendichte bei Diabetikern geben.

Auch Spätfolgen der Diabetiker dürfen nicht aus dem Fokus verloren gehen. So wurde bereits angesprochen, dass die renale Osteodystrophie ein weiterer Einflussfaktor auf die Material- und Struktureigenschaften des Knochens sein kann. Nierenschäden treten als Folge von mikroangiopatischen Veränderungen auf. Vaskuläre Defekte können unter anderem durch eine Hemmung der Endothelzellproliferation durch Fehlregulationen im ALK5 Gen entstehen. In der vorliegenden Arbeit zeigt sich ein statistisch signifikanter Abfall der Genexpression von ALK5 bei Typ 2 Diabetikern im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe. Zu beachten ist jedoch, dass Makro- und Mikroangiopathische Veränderungen in unserer diabetischen Patientengruppe zu den Ausschlusskriterien zählten. Hierdurch zeigten die untersuchten Patientengruppen keinen signifikanten Unterschied in der Nierenfunktion und somit keinen Hinweis auf eine fortgeschrittene mikroangiopathische Veränderung. Die hier verminderte Expression des ALK5 Genes kann jedoch ein frühzeitiger Hinweiß auf die Entstehung mikoangiopathischer Veränderungen und Langzeitfolgen des T2DM sein.

5.3. Gesamte Bedeutung des Wnt-Signalweges für den Patienten

Die Arbeit betrachtet verschiedene Teilschritte des Wnt-Signalweges. Veränderungen in einzelnen Abschnitten haben Auswirkung auf die Entwicklung des T2DM sowie der diabetischen Knochenkrankheit.

5.3.1. Diabetische Knochenkrankheit

Bei den hier untersuchten Genen zeigt sich bei Diabetikern in allen Genen eine verminderte Expression. Dies hat zur Folge, dass die veränderte Expression bei fast allen Genen zu einer Einschränkung der Funktion des Wnt-Signalweges durch negative Beeinflussung oder verminderte Aktivierung führt.

Der Wnt-Signalweg beeinflusst die diabetische Knochenkrankheit auf zwei Ebenen. So unterstützt eine verminderte Aktivität des Wnt einerseits die Entwicklung von DM und dem metabolischen Syndrom. Die Entwicklung der metabolischen Stoffwechselerkrankung wiederum wirkt sich negativ auf Knochen aus: Hyperglykämie, variierende Insulinlevel, Entzündungstendenzen, AGEs sowie Mikroangiopathien sind ausschlaggebend für das Ausmaß der diabetischen Knochenkrankheit. Lange bestehende Hyperglykämien senken die Osteoblastenaktivität und steigern gleichzeitig die Aktivität der Osteoklasten. Andererseits ist der Wnt-Signalweg aktiv in der Frakturheilung. Eine verminderte Aktivität führt zu veränderten Material- und Struktureigenschaften des Knochens. Dies geschieht durch zu geringe Osteoblastenproliferation, mangelhaftem Knochenremodeling oder gestörte Knochenheilung. Im Knochenstoffwechsel geht die diabetische Knochenkrankheit demnach mit erhöhtem Frakturrisiko, gestörter Knochenheilung, erhöhter BMD und verminderter BMS einher.

Bei der Entstehung des T2DM stellt sowohl die Insulin Resistenz als auch die β-Zell-Funktion einen Beitrag dar. In der Literatur wurde bereits das Prinzip eines Feedback Loops zwischen insulinsensitivem Gewebe und β-Zellen beschrieben (Ye, Robertson et al. 2016). Dieser Feedback-Mechanismus kann durch die verminderte Expression einzelner Gene verstärkt werden. Durch die Herunterregulierung des Wnt-Signalweges in insulinsensitiven Geweben kommt es zu einer verminderten Aktivität der β-Zellen im Pankreas bis zu ihrer Apoptose.

Eine Verbindung zwischen den β-Zellen des Pankreas sowie dem Knochenmetabolismus stellt OCN dar. Das Insulin Signal in Osteoblasten dient neben knochen-spezifischen Funktionen vermutlich außerdem als Verbindung zwischen Knochenremodeling und der Regulation des systemischen Glukosemetabolismus. Dies wird durch das von Osteoblasten selbst gebildete Peptidhormon OCN ermöglicht. Es dient einerseits als Marker des Knochenaufbaus und fördert andererseits die Insulinproduktion in β-Zellen sowie ihre Anzahl. Weiter stimuliert es die Freisetzung von Adiponektin und erhöht damit die Wirksamkeit von Insulin. Betrachtet man nun den gesamten Metabolismus eines Diabetikers, entsteht durch

die bestehende Insulinresistenz in Osteoblasten ein vermindertes intrazelluläres Signal. Hieraus resultiert eine fehlende Stimulation der OCN Bildung. Eine folglich mangelnde Aktivierung der β-Zellen, zieht eine verminderte Insulinproduktion und intrazelluläre Insulinmenge mit sich. Es entsteht ein Teufelskreis im diabetischen Stoffwechsel (Sabek, Nishimoto et al. 2015, Zoch, Clemens et al. 2016). Ein vermindertes OCN in diabetischer Stoffwechsellage führt ebenso zu einem verminderten Knochenaufbau.

Zusammengefasst ist es möglich, dass eine verminderte Exprimierung der am Wnt-Signalweg beteiligten Proteine und Gene beim diabetischen Patienten zur Entwicklung der diabetischen Knochenkrankheit führt.

5.3.2. Einfluss auf den klinischen Patienten

Klinisch stellt die diabetische Knochenkrankheit den Patienten sowie die betreuenden Ärzte vor neue Probleme. Am Anfang steht für Patienten mit T2DM die Gefahr, sich häufiger Frakturen zuzuziehen. Dies beruht einerseits auf einem erhöhten Sturzrisiko durch ein unsicheres Gangbild bei Polyneuropathie oder Retinopathie. Hinzu kommt ein instabiler Knochen, welcher im Rahmen der diabetischen Stoffwechsellage entsteht. Bei Stürzen wirken durch schwere Körpermassen auf einen bereits fragilen Knochen zusätzliche Kräfte. Die Problematik besteht aber nicht nur in der Zunahme der Frakturen, sondern auch in der darauffolgenden erschwerten Wund- und Knochenheilung. Da es sich nicht um einen akuten Notfall, sondern eher um einen schleichenden Prozess handelt, ist dies besonders gefährlich. So werden viele Diabetiker frühzeitig immobil. Für ältere Patienten kann dies tödlich enden. Bei jungen Patienten wird durch mangelhafte Bewegung die diabetische Stoffwechsellage weiter gefördert. Um präventiv erkrankte Menschen vor neuen Frakturen zu schützen, sollte eine korrekte Blutzuckereinstellung stattfinden.

5.4. Limitationen

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen Limitationen auf. Im Folgenden werden einige kritisch angesprochen.

Beim ausgesuchten Patientenklientel ist zu beachten, dass alle untersuchten Diabetiker bezogen auf das HbA1C gut eingestellte Werte vorzeigen konnten. Dies kann natürlich dazu führen, dass die Expressionen verschiedener Gene nur geringe Veränderungen aufzeigen. Der metabolische Stoffwechsel eines Diabetikers wird demnach nicht in vollem Ausmaße berücksichtigt. Interessant wäre eine Studienpopulation mit schlecht eingestelltem HbA1C, um die Aussagekraft für Diabetiker zu erhöhen.

Ein weiterer kritischer Punkt ist das ausgewählte Knochenmaterial. Das untersuchte Material wurde sowohl aus Frakturgewebe in Notfallsituationen als auch bei endoprothetischen Eingriffen im elektiven Setting entnommen. So kommt es zu unterschiedlichen Fraktursituationen. Die Untersuchung berücksichtigt nicht, ob eine traumatische oder eine vom Operateur induzierte Knochenspaltung stattgefunden hat. Beim Ausmaß des Traumas gibt es wiederum verschiedene Energielevel, welche zu unterschiedlich komplexen Frakturen führen können. Alles in allem wurde der Mechanismus und der Zustand des gewonnenen Materials sowie seiner Umgebung in der Auswertung nicht weiter beachtet. Ein bereits frakturierter Knochen im entzündeten Gewebe ist nicht gleichzusetzten mit arthrothischem oder gar gesundem Gewebe. Hieraus ergeben sich vermehrte Störfaktoren für die Auswertung.

5.5. Therapeutische Chancen und Ausblick

Die Forschungsergebnisse dieser Studie beleuchten die pathogenetischen Zusammenhänge des DM weiter und eröffnen so eine Chance für die Entwicklung neuer Therapieansätze für den DM, sowie dessen Primärprävention. Die bislang aus klinischer Sicht unzureichenden Behandlungsstrategien der diabetischen Knochenkrankheit und hier besonders das Fehlen einer effektiven pharmakologischen Therapie auf Ebene des Wnt-Signalweges eröffnen weitere Möglichkeiten in der Behandlung des metabolischen Syndroms sowie der diabetischen Knochenkrankheit.

Da die β-Zellen des Pankreas im Mittelpunkt des Enstehungsmechanismus für T2DM stehen, kann TCF7L2 als Angriffspunkt fungieren. Hierdurch besteht die Möglichkeit,

die Funktion aufrecht zu erhalten oder zu aktivieren um β-Zellen zu stimulieren und ihren Zerfall zu verhindern.

Eine weitere Idee in der Therapie des DM sind GSK3β-Inhibitoren über die Aktivierung des Wnt/β-catenin-Signalwegs (Krishnan, Bryant et al. 2006). Sie umgehen die Insulinresistenz, indem sie die Eigenschaft von Insulin nachahmen und die Glykoneogenese anregen. Neben den Effekten auf den Stoffwechsel könnten GSK3β-Inhibitoren die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Osteoblasten steigern, Knochenmasse und Knochenstärke fördern und die Frakturheilung verbessern.

Lithium wird derzeit vor allem zur Behandlung bipolarer Störungen eingesetzt. Nicht zu unterschätzen sind aber die Insulin-ähnlichen Effekte des Medikaments. Lithium erhöht die Gykogen-Synthase-Aktivität in Adipozyten und Hepatozyten. Weiter wird die Glukoseaufnahme in Maus-Adipozyten sowie humanen Muskelzellen gesteigert (Eldar-Finkelman and Kaidanovich 2002). Es stellte sich die Frage wie diese Insulin-mimetischen Effekte zu stande kommen. Die aktuelle Literatur zeigt nun auf, dass Lithium Ionen selektive GSK3-Inhibitoren sind. Da eine starke Aktivität des GSK3 den Insulin-abhängigen Wnt-Signalweg unterdrückt, lässt sich vermuten, dass die Insulin-mimetischen Effekte des Lithiums durch die GSK3-Inhinbition induziert ist.

Das im Wnt-Signalweg verwendete β-Catenin wird in frühen pluripotenten mesenchymalen Stammzellen benötigt, um pluripotente Stammzellen in Osteoblasten zu differenzieren und diese positiv zu beeinflussen. Eine Aktivierung des β-Catenin durch Lithiumbehandlung kann in Zukunft als therapeutisches Mittel zur erhöhten Knochendichte sowie verbesserten Frakturheilung eingesetzt werden.

In der Literatur wird bereits die Wnt/LRP6/TCF7L2-Achse des Wnt-Signalweges als Regulator des Glukosemetabolismus und ernährungssensitiver Regulator des Körpergewichts angesehen. Hier erschließt sich großes Potenzial für zukünftige innovative Therapiestrategien für Übergewicht und DM.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Fragestellung bearbeitet, inwiefern der Wnt-Signalweg bei diabetischer Stoffwechsellage Einfluss auf den Knochenmetabolismus nimmt. Hintergrund dieser Studie ist die relevante Zunahme der diabetischen Erkrankung in verschiedenen Altersklassen unserer heutigen Gesellschaft. Unumgänglich steigt die Bedeutung der diabetischen Knochenkrankheit als ausgeprägte Facette dieser Volkskrankheit.

Das diabetische Patientenkollektiv erfüllte mit den Ergebnissen der laborchemischen Untersuchungen die Erwartungen der Erkrankung des DM. Dem diabetischen Stoffwechsel entsprechend fand man ein erhöhtes HbA1c, eine erhöhte Nüchternglukose sowie eine ungünstige Umverteilung der Blutfettwerte. Auch der Elektrolythaushalt zeigte sich in den Diabetikern zu Ungunsten des Stoffwechsels verändert.

Im Fokus der weiteren Untersuchung lagen gezielt ausgewählte, am Wnt-Signalweg beteiligte Gene, welche anhand ihrer Expression in diabetischem und nicht-diabetischem Knochen untersucht wurden. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich alle untersuchten Gene in den Patienten mit DM im Vergleich zu den Nicht-Diabetikern vermindert exprimiert zeigten. Untersucht wurden Gene, mit direkter Beteiligung am Signalweg wie Wnt3a und 5a, LRP5 und 6 sowie ALK5 und GSK3B, als auch Gene auf Transkriptionsebene, wie TCF7L2 und TCF4 sowie externe Einflussfaktoren wie Fibronektin und Adiponektin. Alle beteiligten Gene zeigten sich im diabetischen Patienten so verändert exprimiert, dass sie den regelrechten Ablauf des Wnt-Signalweges behindern.

Mit dem Hintergrund der aktuellen Literatur wird ein veränderter Wnt-Signalweg in diabetischer Stoffwechsellage mit veränderten Sturktureigenschaften des Knochens sowie einem gestörten Knochenmetabolismus auf Zellebene assoziiert. So wirken sich die veränderten Knocheneigenschaften wie auch die diabetische Stoffwechsellage negativ auf den Knochenmetabolismus aus. Die Verbindung zwischen dem durch die Pankreaszellen geförderter diabetischen Stoffwechsel und

den Knochenzellen wird mittels OCN vermittelt. OCN wird bei bestehender Insulinresistenz in Osteoblasten durch fehlendes Intrazelluläres Signal vermindert gebildet und führt zu einer fehlenden Aktivierung des Knochenaufbau sowie der Insulinproduktion im Pankreas. Daraus lässt sich schliessen, dass sich die Funktion des Wnt-Signalweges in diabetischem Stoffwechsel eigeschränkt zeigt und somit die Entstehung der diabetischen Knochenkrankheit fördert.

Diese Ergebnisse stellen sich wegweisend für die Interpretation der Beteiligung des Wnt-Signalweges an den Veränderungen im diabetischen Knochen dar und können wichtige Anstösse für frühzeitige, neue Therapieansätze liefern.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegen bringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsarbeit niemals zustande gekommen wäre:

Ich möchte mich ganz besonders bei Univ.-Prof. Dr. M. van Griensven, meinem Doktorvater, für die Betreuung der Arbeit, der freundlichen Hilfe sowie seine konstante Gesprächsbereitschaft bedanken. Diese Arbeit wäre ohne seine großzügige Unterstützung nicht möglich gewesen. Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Alexander Haug für die Einführung in das wissenschaftliche Denken und Arbeiten.

Ich möchte mich Herzlich bei den Mitarbeiter/-innen des Labors der Experimentellen Unfallchirurgie für die ausgezeichnete und akribische Hilfe, die mir stets entgegengebracht wurde, bedanken. Ich danke Frau Dr. rer. nat. Claudine Seeliger für die Betreuung einzelner Teilschritte meiner Arbeit. Auch bedanke ich mich insbesondere bei Frau Unger für die unermüdliche und professionelle Einführung in die Laborarbeiten der experimentellen Unfallchirurgie sowie Herrn Seidl für die organisatorische Unterstützung.

Den Grundstein durch sehr gute Rahmenbedingungen für diese Arbeit wurde mir freundlicherweise durch Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Peter Biberthaler und den Kollegen der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des Klinikums rechts der Isar ermöglicht.

Ein besonders großes „Dankeschön“ geht auch an meine Freunde, die mir verlässlich in verschiedenen Lebenssituationen zur Seite stehen. Aufbauende Worte und Taten haben mich immer wieder motiviert, wenn es mal nicht so glatt lief. Explizit möchte ich Robin Weber für seine fachliche Unterstützung danken.

Mein letzter und größter Dank geht an meine Familie, die mich in all den Jahren immer unterstützt hat, mit denen ich die schwersten Zeiten überstanden habe und die auch jetzt immer noch sofort zur Stelle sind, wenn ich sie brauche.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Weltweite Prävalenz von Diabetikern (20-79 Jahre) im Jahre 2015 (International Diabetes Federation 2015) 12
Abbildung 2: Überblick über die Knochenhomöostase und die regulierenden Faktoren. 18
Abbildung 3: Knochenheilung. Modifiziert nach (OrthoBullets) 19
Abbildung 4: Wnt-Signalweg im Off (A) und On (B) State 26
Abbildung 5: Wnt/Kalzium-Signalweg 28
Abbildung 6: Wnt/PCP-Signalweg 29
Abbildung 7: Wnt/PKA-Signalweg 29
Abbildung 8: LRP5 Signalweg im Knochen; Wnt (wingless-type), LRP (Low Desity Lipoprotein Receptor), DKK (Dickkopf) 36
Abbildung 9: TCF7L2 Genstruktur mit T2DM Risiko Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Lokalisationen (Chiang, Ip et al. 2012) 39
Abbildung 10: Hellma TrayCell (Modifiziert nach HellmaAnalytics, 2016) 56
Abbildung 11: Auswertung der Blutuntersuchung von Diabetikern und Nicht-Diabetikern (Glukose und HbA1C). 62
Abbildung 12: Auswertung der Blutuntersuchung von Diabetikern und Nicht-Diabetikern (Blutfette). 63
Abbildung 13: Auswertung der Blutuntersuchung von Diabetikern und Nicht-Diabetikern (Elektrolyte). 65
Abbildung 14: Auswertung der Blutuntersuchung von Diabetikern und Nicht-Diabetikern (Nierenfunktionsparameter). 66
Abbildung 15: Genexpressionsanalyse von WNT3A und WNT5A in Patientenspongiosa – Vergleich von Diabetikern und Nicht-Diabetikern. 67
Abbildung 16: Genexpressionsanalyse von LRP5 und LRP6 in Patientenspongiosa – Vergleich von Diabetikern und Nicht-Diabetikern. 68
Abbildung 17: Genexpressionsanalyse von TCF7L2 und TCF4 in Patientenspongiosa – Vergleich von Diabetikern und Nicht-Diabetikern. 69

Abbildung 18: Genexpressionsanalyse von ALK5 und GSK3B in Patientenspongiosa – Vergleich von Diabetikern und Nicht-Diabetikern. 69
Abbildung 19: Genexpressionsanalyse von Adiponektin und Fibronektin in Patientenspongiosa – Vergleich von Diabetikern und Nicht-Diabetikern. 70

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Diabetes mellitus (American Diabetes Association 2003). 10
Tabelle 2: Geräte 50
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien 51
Tabelle 4: Software..... 51
Tabelle 5: Aufbereitung der Blutproben..... 52
Tabelle 6: Aufbereitung der Knochenproben..... 53
Tabelle 7: RNA Isolation 54
Tabelle 8: First strand cDNA Synthese..... 57
Tabelle 9: PCR..... 58
Tabelle 10: Primerliste 59

10. Literaturverzeichnis

Adil, C., T. Aydın, Ö. Taşpınar, H. Kızıltan, A. H. Eriş, I. T. Hocaoglu, S. Poşul, M. Kepekci, E. Denizli and M. Güler (2015). "Bone mineral density evaluation of patients with type 2 diabetes mellitus." Journal of physical therapy science **27**(1): 179-182.

Aiko, N. and T. Masato (2006). "Regulation of matrix metalloproteinase-13 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 gene expression by WNT3A and bone morphogenetic protein-2 in osteoblastic differentiation." Frontiers in Bioscience **11**: 1667-1678.

Ammon, H. (2001). "Wirkungen des Insulins: Molekulare Pathologie des Diabetes mellitus." Pharmazie in unserer Zeit **30**(1): 21-26.

Andresen, J. L., L. M. Rasmussen and T. Ledet (1996). "Diabetic macroangiopathy and atherosclerosis." Diabetes **45 Suppl 3**: S91-94.

Association, A. D. (2003). "Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus." Diabetes Care **26**(suppl 1): s5-s20.

Audrey Koay, M. and M. A. Brown (2016). "Genetic disorders of the LRP5–Wnt signalling pathway affecting the skeleton." Trends in Molecular Medicine **11**(3): 129-137.

Bafico, A., G. Liu, A. Yaniv, A. Gazit and S. A. Aaronson (2001). "Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow." Nat Cell Biol **3**(7): 683-686.

Barker, N., G. Huls, V. Korinek and H. Clevers (1999). "Restricted High Level Expression of Tcf-4 Protein in Intestinal and Mammary Gland Epithelium." The American Journal of Pathology **154**(1): 29-35.

Bentmann, A. (2008). "Die Rolle des Fibronektins im Knochen und in der diabetischen Nephropathie." Bentmann, A., N. Kawelke, D. Moss, H. Zentgraf, Y. Bala, I. Berger, J. A. Gasser and I. A. Nakchbandi (2010). "Circulating fibronectin affects bone matrix, whereas osteoblast fibronectin modulates osteoblast function." Journal of Bone and Mineral Research **25**(4): 706-715.

Berner, H. S., S. P. Lyngstadaas, A. Spahr, M. Monjo, L. Thommesen, C. A. Drevon, U. Syversen and J. E. Reseland (2004). "Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells." Bone **35**(4): 842-849.

Bibbo, C., S. S. Lin, H. A. Beam and F. F. Behrens (2001). "Complications of ankle fractures in diabetic patients." Orthop Clin North Am **32**(1): 113-133.

Boj, Sylvia F., Johan H. van Es, M. Huch, Vivian S. W. Li, A. José, P. Hatzis, M. Mokry, A. Haegebarth, M. van den Born, P. Chambon, P. Voshol, Y. Dor, E. Cuppen, C. Fillat and H. Clevers (2012). "Diabetes Risk Gene and Wnt Effector Tcf7l2/TCF4 Controls Hepatic Response to Perinatal and Adult Metabolic Demand." Cell **151**(7): 1595-1607.

Bonds, D. E., J. C. Larson, A. V. Schwartz, E. S. Strotmeyer, J. Robbins, B. L. Rodriguez, K. C. Johnson and K. L. Margolis (2006). "Risk of fracture in women with type 2 diabetes: the Women's Health Initiative Observational Study." J Clin Endocrinol Metab **91**(9): 3404-3410.

Botella Martinez, S., N. Varo Cenarruzabeitia, J. Escalada San Martin and A. Calleja Canelas (2016). "La paradoja diabética: densidad mineral ósea y fractura en la diabetes tipo 2." Endocrinol Nutr.

Boyden, L. M., J. Mao, J. Belsky, L. Mitzner, A. Farhi, M. A. Mitnick, D. Wu, K. Insogna and R. P. Lifton (2002). "High Bone Density Due to a Mutation in LDL-Receptor–Related Protein 5." New England Journal of Medicine **346**(20): 1513-1521.

Braunsteiner, H., S. Sailer and F. Sandhofer (1966). "Plasmalipide bei Patienten mit Diabetes mellitus." Klinische Wochenschrift **44**(3): 116-119.

Bretón-Romero, R., B. Feng, M. Holbrook, M. G. Farb, J. L. Fetterman, E. A. Linder, B. D. Berk, N. Masaki, R. M. Weisbrod and E. Inagaki (2016). "Endothelial Dysfunction in Human Diabetes Is Mediated by Wnt5a–JNK Signaling." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **36**(3): 561-569.

Brown, S. D., R. C. J. Twells, P. J. Hey, R. D. Cox, E. R. Levy, A. R. Soderman, M. L. Metzker, C. T. Caskey, J. A. Todd and J. F. Hess (1998). "Isolation and Characterization ofLRP6,a Novel Member of the Low Density Lipoprotein Receptor Gene Family." Biochemical and Biophysical Research Communications **248**(3): 879-888.

Bruder, S. P., D. J. Fink and A. I. Caplan (1994). "Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regenaration therapy." Journal of cellular biochemistry **56**(3): 283-294.

Burghardt, A. J., A. S. Issever, A. V. Schwartz, K. A. Davis, U. Masharani, S. Majumdar and T. M. Link (2010). "High-Resolution Peripheral Quantitative Computed Tomographic Imaging of Cortical and Trabecular Bone Microarchitecture in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **95**(11): 5045-5055.

Caselli, C., A. D'Amico, M. Cabiati, T. Prescimone, S. Del Ry and D. Giannessi (2014). "Back to the heart: The protective role of adiponectin." Pharmacological Research **82**: 9-20.

Chen, A. E., D. D. Ginty and C.-M. Fan (2005). "Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins." Nature **433**(7023): 317-322.

Chen, Y. and B. A. Alman (2009). "Wnt pathway, an essential role in bone regeneration." Journal of Cellular Biochemistry **106**(3): 353-362.

Chen, Y., H. C. Whetstone, A. C. Lin, P. Nadesan, Q. Wei, R. Poon and B. A. Alman (2007). "Beta-Catenin Signaling Plays a Disparate Role in Different Phases of Fracture Repair: Implications for Therapy to Improve Bone Healing." PLoS Med **4**(7): e249.

Chiang, Y.-t. A., W. Ip and T. Jin (2012). "The role of the Wnt signaling pathway in incretin hormone production and function." Frontiers in physiology **3**: 273.

Cohen, P. and M. Goedert (2004). "GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential." Nature reviews Drug discovery **3**(6): 479-487.

Creecy, A., S. Uppuganti, A. R. Merkel, D. O'Neal, A. J. Makowski, M. Granke, P. Voziyan and J. S. Nyman (2016). "Changes in the Fracture Resistance of Bone with the Progression of Type 2 Diabetes in the ZDSD Rat." Calcif Tissue Int.

Cui, R., L. Zhou, Z. Li, Q. Li, Z. Qi and J. Zhang (2016). "Assessment risk of osteoporosis in Chinese people: relationship among body mass index, serum lipid profiles, blood glucose, and bone mineral density." Clinical Interventions in Aging **11**: 887.

De Langhe, S. P., F. G. Sala, P.-M. Del Moral, T. J. Fairbanks, K. M. Yamada, D. Warburton, R. C. Burns and S. Bellusci (2005). "Dickkopf-1 (DKK1) reveals that fibronectin is a major target of Wnt signaling in branching morphogenesis of the mouse embryonic lung." Developmental Biology **277**(2): 316-331.

de Liefde, I., M. van der Klift, C. E. de Laet, P. L. van Daele, A. Hofman and H. A. Pols (2005). "Bone mineral density and fracture risk in type-2 diabetes mellitus: the Rotterdam Study." Osteoporos Int **16**(12): 1713-1720.

Deutsche Diabetes Hilfe, D. D. G. (2016). "Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes."

Dimitriou, R., E. Tsiridis and P. V. Giannoudis (2005). "Current concepts of molecular aspects of bone healing." Injury **36**(12): 1392-1404.

Doria, A., M.-E. Patti and C. R. Kahn (2008). "The Emerging Genetic Architecture of Type 2 Diabetes." Cell metabolism **8**(3): 186-200.

Du, W., Q. Li, Y. Lu, X. Yu, X. Ye, Y. Gao, J. Ma, J. Cheng, Y. Cao, J. Du, H. Shi and L. Zhou (2011). "Genetic variants in ADIPOQ gene and the risk of type 2 diabetes: a case–control study of Chinese Han population." Endocrine **40**(3): 413-422.

Dutta, M., R. Pakhetra and M. Garg (2012). "Evaluation of bone mineral density in type 2 diabetes mellitus patients before and after treatment." Medical Journal Armed Forces India **68**(1): 48-52.

Dzamba, B. J., H. Wu, R. Jaenisch and D. M. Peters (1993). "Fibronectin binding site in type I collagen regulates fibronectin fibril formation." J Cell Biol **121**(5): 1165-1172.

Eckel, R. H., S. M. Grundy and P. Z. Zimmet (2005). "The metabolic syndrome." The Lancet **365**(9468): 1415-1428.

Einhorn, T. A. (1998). "The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing." Clinical Orthopaedics and Related Research **355**: S7-S21.

Eldar-Finkelman, H. and O. Kaidanovich (2002). "The role of glycogen synthase kinase-3 in insulin resistance and Type 2 diabetes." Expert Opinion on Therapeutic Targets **6**(5): 555-561.

Elices, M. J., L. Osborn, Y. Takada, C. Crouse, S. Luhowskyj, M. E. Hemler and R. R. Lobb (1990). "VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/Fibronectin binding site." Cell **60**(4): 577-584.

Engvall, E. and E. Ruoslahti (1977). "Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen." Int J Cancer **20**(1): 1-5.

Farr, J. N., M. T. Drake, S. Amin, L. J. Melton, L. K. McCready and S. Khosla (2014). "In Vivo Assessment of Bone Quality in Postmenopausal Women With Type 2 Diabetes." Journal of Bone and Mineral Research **29**(4): 787-795.

Federation, I. I. D. (2015). "IDF Diabetes Atlas, 7th Edition."

Fischer, L., G. Boland and R. S. Tuan (2002). "Wnt-3A enhances bone morphogenetic protein-2-mediated chondrogenesis of murine C3H10T1/2 mesenchymal cells." Journal of Biological Chemistry **277**(34): 30870-30878.

Fried, L. F., N. Emanuele, J. H. Zhang, M. Brophy, T. A. Conner, W. Duckworth, D. J. Leehey, P. A. McCullough, T. O'Connor and P. M. Palevsky (2013). "Combined angiotensin inhibition for the treatment of diabetic nephropathy." New England Journal of Medicine **369**(20): 1892-1903.

Frost, H. M. (1997). "On Our Age-Related Bone Loss: Insights from a New Paradigm." Journal of Bone and Mineral Research **12**(10): 1539-1546.

Gaudry, C. A., E. Verderio, D. Aeschlimann, A. Cox, C. Smith and M. Griffin (1999). "Cell surface localization of tissue transglutaminase is dependent on a fibronectin-binding site in its N-terminal β-sandwich domain." Journal of Biological Chemistry **274**(43): 30707-30714.

Gerdes, S., M. Laudes, K. Neumann, H. Baurecht and U. Mrowietz (2014). "Wnt5a – a potential factor linking psoriasis to metabolic complications." Experimental Dermatology **23**(6): 439-440.

Ghiasi, M. S., J. Chen, A. Vaziri, E. K. Rodriguez and A. Nazarian (2017). "Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods." Bone Rep **6**: 87-100.

Giangregorio, L. M., W. D. Leslie, L. M. Lix, H. Johansson, A. Oden, E. McCloskey and J. A. Kanis (2012). "FRAX underestimates fracture risk in patients with diabetes." Journal of Bone and Mineral Research **27**(2): 301-308.

Gillespie, J., J. Bush, G. Bell, L. Aubrey, H. Dupuis, M. Ferron, B. Kream, G. DiMattia, S. Patel and J. Woodgett (2013). "GSK-3β function in bone regulates skeletal development, whole-body metabolism, and male life span." Endocrinology **154**(10): 3702-3718.

Gjesing, A. P., L. L. Kjems, M. A. Vestmar, N. Grarup, A. Linneberg, C. F. Deacon, J. J. Holst, O. Pedersen and T. Hansen (2011). "Carriers of the TCF7L2 rs7903146 TT genotype have elevated levels of plasma glucose, serum proinsulin and plasma gastric inhibitory polypeptide (GIP) during a meal test." Diabetologia **54**(1): 103-110.

Gong, Y., R. B. Slee, N. Fukai, G. Rawadi, S. Roman-Roman, A. M. Reginato, H. Wang, T. Cundy, F. H. Glorieux, D. Lev, M. Zacharin, K. Oexle, J. Marcelino, W. Suwairi, S. Heeger, G. Sabatakos, S. Apte, W. N. Adkins, J. Allgrove, M. Arslan-Kirchner, J. A. Batch, P. Beighton, G. C. M. Black, R. G. Boles, L. M. Boon, C. Borrone, H. G. Brunner, G. F. Carle, B. Dallapiccola, A. De Paepe, B. Floege, M. L. Halfhide, B. Hall, R. C. Hennekam, T. Hirose, A. Jans, H. Jüppner, C. A. Kim, K. Keppler-Noreuil, A. Kohlschuetter, D. LaCombe, M. Lambert, E. Lemyre, T. Letteboer, L. Peltonen, R. S. Ramesar, M. Romanengo, H. Somer, E. Steichen-Gersdorf, B. Steinmann, B. Sullivan, A. Superti-Furga, W. Swoboda, M.-J. van den Boogaard, W. Van Hul, M. Vikkula, M. Votruba, B. Zabel, T. Garcia, R. Baron, B. R. Olsen and M. L. Warman (2001). "LDL Receptor-Related Protein 5 (LRP5) Affects Bone Accrual and Eye Development." Cell **107**(4): 513-523.

Gradl, D., M. Kuhl and D. Wedlich (1999). "The Wnt/Wg signal transducer beta-catenin controls fibronectin expression." Mol Cell Biol **19**(8): 5576-5587.

Grant, S. F. A., G. Thorleifsson, I. Reynisdottir, R. Benediktsson, A. Manolescu, J. Sainz, A. Helgason, H. Stefansson, V. Emilsson, A. Helgadottir, U. Styrkarsdottir, K. P. Magnusson, G. B. Walters, E. Palsdottir, T. Jonsdottir, T. Gudmundsdottir, A. Gylfason, J. Saemundsdottir, R. L. Wilensky, M. P. Reilly, D. J. Rader, Y. Bagger, C. Christiansen, V. Gudnason, G. Sigurdsson, U. Thorsteinsdottir, J. R. Gulcher, A. Kong and K. Stefansson (2006). "Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes." Nat Genet **38**(3): 320-323.

Gruber, U. F. and W. W. Rittmann (1973). Wasser- und Elektrolythaushalt. Allgemeine und spezielle Chirurgie. M. Allgöwer. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg**:** 20-35.

Guo, Y.-f., D.-h. Xiong, H. Shen, L.-j. Zhao, P. Xiao, Y. Guo, W. Wang, T.-l. Yang, R. R. Recker and H.-w. Deng (2006). "Polymorphisms of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene are associated with obesity phenotypes in a large family-based association study." Journal of medical genetics **43**(10): 798-803.

Habas, R. and I. B. Dawid (2005). "Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier?" Journal of Biology **4**(1): 2-2.

Habas, R., I. B. Dawid and X. He (2003). "Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation." Genes & Development **17**(2): 295-309.

Hadjiargyrou, M., F. Lombardo, S. Zhao, W. Ahrens, J. Joo, H. Ahn, M. Jurman, D. W. White and C. T. Rubin (2002). "Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair." J Biol Chem **277**(33): 30177-30182.

Hadjidakis, D. J. and I. I. Androulakis (2006). "Bone Remodeling." Annals of the New York Academy of Sciences **1092**(1): 385-396.

Harada, S. and G. A. Rodan (2003). "Control of osteoblast function and regulation of bone mass." Nature **423**(6937): 349-355.

Hartikka, H., O. Mäkitie, M. Männikkö, A. S. Doria, A. Daneman, W. G. Cole, L. Ala-Kokko and E. B. Sochett (2005). "Heterozygous Mutations in the LDL Receptor-Related Protein 5 (LRP5) Gene Are Associated With Primary Osteoporosis in Children." Journal of Bone and Mineral Research **20**(5): 783-789.

Hayashi, M. and K. M. Yamada (1982). "Divalent cation modulation of fibronectin binding to heparin and to DNA." J Biol Chem **257**(9): 5263-5267.

He, X., M. Semenov, K. Tamai and X. Zeng (2004). "LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/β-catenin signaling: Arrows point the way." Development **131**(8): 1663-1677.

Heidemann, C., Y. Du, I. Schubert, W. Rathmann and C. Scheidt-Nave (2013). "Prevalence and temporal trend of known diabetes mellitus." Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz **56**(5): 668-677.

HellmaAnalytics (2016). "Anwendung der TrayCell."

Hendrickx, M. and L. Leyns (2008). "Non-conventional Frizzled ligands and Wnt receptors." Development, Growth & Differentiation **50**(4): 229-243.

Henriksen, E. J. and B. B. Dokken (2006). "Role of glycogen synthase kinase-3 in insulin resistance and type 2 diabetes." Current drug targets **7**(11): 1435-1441.

Hens, J. R., K. M. Wilson, P. Dann, X. Chen, M. C. Horowitz and J. J. Wysolmerski (2005). "TOPGAL Mice Show That the Canonical Wnt Signaling Pathway Is Active During Bone Development and Growth and Is Activated by Mechanical Loading In Vitro." Journal of Bone and Mineral Research **20**(7): 1103-1113.
Hey, P. J., R. C. J. Twells, M. S. Phillips, N. Yusuke, S. D. Brown, Y. Kawaguchi, R. Cox, X. Guochun, V. Dugan, H. Hammond, M. L. Metzker, J. A. Todd and J. F. Hess (1998). "Cloning of a novel member of the low-density lipoprotein receptor family1." Gene **216**(1): 103-111.

Huang, E. S., N. Laiteerapong, J. Y. Liu, P. M. John, H. H. Moffet and A. J. Karter (2014). "Rates of complications and mortality in older patients with diabetes mellitus: the diabetes and aging study." JAMA Intern Med **174**(2): 251-258.

Huelsken, J. and J. Behrens (2002). "The Wnt signalling pathway." Journal of Cell Science **115**(21): 3977-3978.

Humphries, S. E., D. Gable, J. A. Cooper, H. Ireland, J. W. Stephens, S. J. Hurel, K. W. Li, J. Palmen, M. A. Miller and F. P. Cappuccio (2006). "Common variants in the TCF7L2 gene and predisposition to type 2 diabetes in UK European Whites, Indian Asians and Afro-Caribbean men and women." Journal of Molecular Medicine **84**(12): 1005-1014.

Hynes, R. e. (1990). "Fibronectins." Springer-Verlag New York.

Inman, G. J., F. J. Nicolás, J. F. Callahan, J. D. Harling, L. M. Gaster, A. D. Reith, N. J. Laping and C. S. Hill (2002). "SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-β superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7." Molecular pharmacology **62**(1): 65-74.

Institut, R. K. (2011). "Zahlen und Trends aus der Gesundheitsberichterstattung des Bundes ".

Ip, W., Y.-t. A. Chiang and T. Jin (2012). "The involvement of the wnt signaling pathway and TCF7L2 in diabetes mellitus: The current understanding, dispute, and perspective." Cell & Bioscience **2**: 28-28.

Isaacs, A. and A. Vincent (2016). "Antihypertensive therapy for the prevention of nephropathy in diabetic hypertensive patients." Journal of clinical pharmacy and therapeutics.

Janghorbani, M., D. Feskanich, W. C. Willett and F. Hu (2006). "Prospective study of diabetes and risk of hip fracture: the Nurses' Health Study." Diabetes Care **29**(7): 1573-1578.

Jiang, Y., I. Owei, J. Wan, S. Ebenibo, S. Dagogo-Jack, A. Ammons, F. Ceesay, N. Umekwe, E. Chapp-Jumbo and C. Edeoga (2016). "Adiponectin levels predict prediabetes risk: the Pathobiology of Prediabetes in A Biracial Cohort (POP-ABC) study." BMJ open diabetes research & care **4**(1): e000194.
Jin, T. (2008). "The WNT signalling pathway and diabetes mellitus." Diabetologia **51**(10): 1771-1780.

Jin, T. and L. Liu (2008). "Minireview: The Wnt Signaling Pathway Effector TCF7L2 and Type 2 Diabetes Mellitus." Molecular Endocrinology **22**(11): 2383-2392.

Jope, R. S., C. J. Yuskaitis and E. Beurel (2007). "Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3): Inflammation, Diseases, and Therapeutics." Neurochemical Research **32**(4): 577-595.

Kanters, S. D. J. M., J.-D. Banga, A. Algra, R. C. J. M. Frijns, J. J. Beutler and R. Fijnheer (2001). "Plasma Levels of Cellular Fibronectin in Diabetes." Diabetes Care **24**(2): 323-327.

Katoh, M. and M. Katoh (2007). "WNT signaling pathway and stem cell signaling network." Clinical Cancer Research **13**(14): 4042-4045.

Khosla, S., J. J. Westendorf and M. J. Oursler (2008). "Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures." The Journal of Clinical Investigation **118**(2): 421-428.

Khunti, K., M. Davies, A. Majeed, B. L. Thorsted, M. L. Wolden and S. K. Paul (2015). "Hypoglycemia and Risk of Cardiovascular Disease and All-Cause Mortality in Insulin-Treated People With Type 1 and Type 2 Diabetes: A Cohort Study." Diabetes Care **38**(2): 316-322.

Kilian, O., R. Dahse, V. Alt, L. Zardi, J. Rosenhahn, U. Exner, A. Battmann, R. Schnettler and H. Kosmehl (2004). "Expression of EDA+ and EDB+ fibronectin splice variants in bone." Bone **35**(6): 1334-1345.

Kim, J.-H., M.-H. Jung, J.-M. Lee, H.-S. Son, B.-Y. Cha and S.-A. Chang (2012). "Diabetic peripheral neuropathy is highly associated with nontraumatic fractures in Korean patients with type 2 diabetes mellitus." Clinical Endocrinology **77**(1): 51-55.

King, A., C. Clarkin, A. Austin, L. Ajram, J. Dhunna, M. Jamil, S. Ditta, S. Ibrahim, Z. Raza and P. Jones (2015). "ALK5 inhibition maintains islet endothelial cell survival but does not enhance islet graft revascularisation or function." Hormone and Metabolic Research **47**(01): 78-83.

King, H., R. E. Aubert and W. H. Herman (1998). "Global Burden of Diabetes, 1995–2025: Prevalence, numerical estimates, and projections." Diabetes Care **21**(9): 1414-1431.

King, H. and M. Rewers (1993). "Global Estimates for Prevalence of Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance in Adults." Diabetes Care **16**(1): 157-177.

Kohn, A. D. and R. T. Moon (2005). "Wnt and calcium signaling: β-catenin-independent pathways." Cell calcium **38**(3): 439-446.

Komatsu, D. E., M. N. Mary, R. J. Schroeder, A. G. Robling, C. H. Turner and S. J. Warden (2010). "Modulation of Wnt signaling influences fracture repair." Journal of Orthopaedic Research **28**(7): 928-936.

Komiya, Y. and R. Habas (2008). "Wnt signal transduction pathways." Organogenesis **4**(2): 68-75.

Kozinski, K., M. Jazurek, P. Dobrzyn, J. Janikiewicz, K. Kolczynska, A. Gajda and A. Dobrzyn (2016). "Adipose- and muscle-derived Wnts trigger pancreatic β-cell adaptation to systemic insulin resistance." Scientific Reports **6**: 31553.

Krishnan, V., H. U. Bryant and O. A. MacDougald (2006). "Regulation of bone mass by Wnt signaling." The Journal of Clinical Investigation **116**(5): 1202-1209.

Le Bacquer, O., L. Shu, M. Marchand, B. Neve, F. Paroni, J. Kerr Conte, F. Pattou, P. Froguel and K. Maedler (2011). "TCF7L2 splice variants have distinct effects on β-cell turnover and function." Human Molecular Genetics **20**(10): 1906-1915.

Leidig-Bruckner, G. and R. Ziegler (2001). "Diabetes mellitus a risk for osteoporosis?" Exp Clin Endocrinol Diabetes **109 Suppl 2**: S493-514.

Leng, S., W. Zhang, Y. Zheng, Z. Liberman, C. J. Rhodes, H. Eldar-Finkelman and X. J. Sun (2010). "Glycogen synthase kinase 3β mediates high glucose-induced ubiquitination and proteasome degradation of insulin receptor substrate 1." Journal of Endocrinology **206**(2): 171-181.

Leslie, W. D., M. R. Rubin, A. V. Schwartz and J. A. Kanis (2012). "Type 2 diabetes and bone." Journal of Bone and Mineral Research **27**(11): 2231-2237.

Letamendia, A., E. Labbé and L. Attisano (2001). Transcriptional Regulation by Smads: Crosstalk between the TGF-β and Wnt Pathways.

Leucht, P., J. Jiang, D. Cheng, B. Liu, G. Dhamdhere, M. Y. Fang, S. D. Monica, J. J. Urena, W. Cole, L. R. Smith, A. B. Castillo, M. T. Longaker and J. A. Helms (2013). "Wnt3a Reestablishes Osteogenic Capacity to Bone Grafts from Aged Animals." The Journal of Bone & Joint Surgery **95**(14): 1278-1288.

Levin, M. E., V. C. Boisseau and L. V. Avioli (1976). "Effects of Diabetes Mellitus on Bone Mass in Juvenile and Adult-Onset Diabetes." New England Journal of Medicine **294**(5): 241-245.

Li, S., H. Shin, E. L. Ding and R. M. van Dam (2009). "Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis." JAMA **302**(2): 179-188.

Little, R. D., C. Folz, S. P. Manning, P. M. Swain, S.-C. Zhao, B. Eustace, M. M. Lappe, L. Spitzer, S. Zweier, K. Braunschweiger, Y. Benchekroun, X. Hu, R. Adair, L. Chee, M. G. FitzGerald, C. Tulig, A. Caruso, N. Tzellas, A. Bawa, B. Franklin, S. McGuire, X. Nogues, G. Gong, K. M. Allen, A. Anisowicz, A. J. Morales, P. T. Lomedico, S. M. Recker, P. Van Eerdewegh, R. R. Recker, J. P. Carulli, R. G. Del Mastro, J. Dupuis, M. Osborne and M. L. Johnson (2002). "A Mutation in the LDL Receptor–Related Protein 5 Gene Results in the Autosomal Dominant High–Bone-Mass Trait." The American Journal of Human Genetics **70**(1): 11-19.

Liu, W., R. Singh, C. S. Choi, H.-Y. Lee, A. R. Keramati, V. T. Samuel, R. P. Lifton, G. I. Shulman and A. Mani (2012). "Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor-related Protein 6 (LRP6) Regulates Body Fat and Glucose Homeostasis by Modulating Nutrient Sensing Pathways and Mitochondrial Energy Expenditure." The Journal of Biological Chemistry **287**(10): 7213-7223.

Loder, R. T. (1988). "The influence of diabetes mellitus on the healing of closed fractures." Clin Orthop Relat Res(232): 210-216.

Logan, C. Y. and R. Nusse (2004). "THE WNT SIGNALING PATHWAY IN DEVELOPMENT AND DISEASE." Annual Review of Cell and Developmental Biology **20**(1): 781-810.

Lyssenko, V., R. Lupi, P. Marchetti, S. Del Guerra, M. Orho-Melander, P. Almgren, M. Sjögren, C. Ling, K.-F. Eriksson, υ.-L. Lethagen, R. Mancarella, G. Berglund, T. Tuomi, P. Nilsson, S. Del Prato and L. Groop (2007). "Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes." Journal of Clinical Investigation **117**(8): 2155-2163.

Macsai, C. E., B. K. Foster and C. J. Xian (2008). "Roles of Wnt signalling in bone growth, remodelling, skeletal disorders and fracture repair." Journal of Cellular Physiology **215**(3): 578-587.

Makogonenko, E., G. Tsurupa, K. Ingham and L. Medved (2002). "Interaction of Fibrin(ogen) with Fibronectin: Further Characterization and Localization of the Fibronectin-Binding Site." Biochemistry **41**(25): 7907-7913.

Mani, A., J. Radhakrishnan, H. Wang, A. Mani, M.-A. Mani, C. Nelson-Williams, K. S. Carew, S. Mane, H. Najmabadi, D. Wu and R. P. Lifton (2007). "LRP6 Mutation in a Family with Early Coronary Disease and Metabolic Risk Factors." Science **315**(5816): 1278-1282.

Mao, B., W. Wu, G. Davidson, J. Marhold, M. Li, B. M. Mechler, H. Delius, D. Hoppe, P. Stannek, C. Walter, A. Glinka and C. Niehrs (2002). "Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/[beta]-catenin signalling." Nature **417**(6889): 664-667.

Marsell, R. and T. A. Einhorn (2011). "The biology of fracture healing." Injury **42**(6): 551-555.

Martin, M., U. Gröber and O. Ploss (2007). "Komplementäre Verfahren in der Diabetologie."

Mathen, P. G., M. M. Thabah, B. Zachariah and A. K. Das (2015). "Decreased bone mineral density at the femoral neck and lumbar spine in south Indian patients with type 2 diabetes." Journal of clinical and diagnostic research: JCDR **9**(9): OC08.

Mattei, J., Q. Qi, F. B. Hu, F. M. Sacks and L. Qi (2012). "TCF7L2 genetic variants modulate the effect of dietary fat intake on changes in body composition during a weight-loss intervention." Am J Clin Nutr **96**(5): 1129-1136.

McDonald, J. A. (1988). "Extracellular matrix assembly." Annual review of cell biology **4**(1): 183-207.

Meier, C., A. V. Schwartz, A. Egger and B. Lecka-Czernik (2015). "Effects of diabetes drugs on the skeleton." Bone **82**: 93-100.

Mellitus, E. C. i. t. d. a. c. o. D. (2002). "Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus." Diabetes Care **25**(suppl 1): s5-s20.

Miazgowski, T., M. Noworyta-Ziętara, K. Safranow, J. Ziemak and K. Widecka (2012). "Serum adiponectin, bone mineral density and bone turnover markers in post-menopausal women with newly diagnosed Type 2 diabetes: a 12-month follow-up." Diabetic Medicine **29**(1): 62-69.

Mitchell, R. K., A. Mondragon, L. Chen, J. A. Mcginty, P. M. French, J. Ferrer, B. Thorens, D. J. Hodson, G. A. Rutter and G. da Silva Xavier (2014). "Selective disruption of Tcf7l2 in the pancreatic β cell impairs secretory function and lowers β cell mass." Human molecular genetics: ddu553.

Molitch, M. E., R. A. DeFronzo, M. J. Franz, W. F. Keane, C. E. Mogensen, H. H. Parving and M. W. Steffes (2002). "Diabetic Nephropathy." Diabetes Care **25**(suppl 1): s85-s89.

Monami, M., B. Cresci, A. Colombini, L. Pala, D. Balzi, F. Gori, V. Chiasserini, N. Marchionni, C. M. Rotella and E. Mannucci (2008). "Bone Fractures and Hypoglycemic Treatment in Type 2 Diabetic Patients." A case-control study **31**(2): 199-203.

Moon, R. T., B. Bowerman, M. Boutros and N. Perrimon (2002). "The promise and perils of Wnt signaling through β-catenin." Science **296**(5573): 1644-1646.

Morgan, C. L., C. J. Currie and J. R. Peters (2000). "Relationship between diabetes and mortality: a population study using record linkage." Diabetes Care **23**(8): 1103-1107.

Morrish, N. J., S. L. Wang, L. K. Stevens, J. H. Fuller and H. Keen (2001). "Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes." Diabetologia **44 Suppl 2**: S14-21.
Moseley, K. F. (2012). "Type 2 diabetes and bone fractures." Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity **19**(2): 128.

Mosher, D. (2012). Fibronectin, Elsevier.

Mostowik, M., G. Gajos, J. Zalewski, J. Nessler and A. Undas (2013). "Omega-3 polyunsaturated fatty acids increase plasma adiponectin to leptin ratio in stable coronary artery disease." Cardiovascular Drugs and Therapy **27**(4): 289-295.

Moursi, A. M., C. H. Damsky, J. Lull, D. Zimmerman, S. B. Doty, S. Aota and R. K. Globus (1996). "Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation." Journal of Cell Science **109**(6): 1369-1380.
Mussmann, R., M. Geese, F. Harder, S. Kegel, U. Andag, A. Lomow, U. Burk, D. Onichtchouk, C. Dohrmann and M. Austen (2007). "Inhibition of GSK3 promotes replication and survival of pancreatic beta cells." J Biol Chem **282**(16): 12030-12037.

Nicodemus, K. K. and A. R. Folsom (2001). "Type 1 and type 2 diabetes and incident hip fractures in postmenopausal women." Diabetes Care **24**(7): 1192-1197.

Oei, L., M. C. Zillikens, A. Dehghan, G. H. Buitendijk, M. C. Castaño-Betancourt, K. Estrada, L. Stolk, E. H. Oei, J. B. van Meurs and J. A. Janssen (2013). "High bone mineral density and fracture risk in type 2 diabetes as skeletal complications of inadequate glucose control the Rotterdam Study." Diabetes care **36**(6): 1619-1628.

Olsen, B. R., A. M. Reginato and W. Wang (2000). "Bone development." Annual review of cell and developmental biology **16**(1): 191-220.

OrthoBullets "Fracture Healing."

Paccou, J., K. A. Ward, K. A. Jameson, E. M. Dennison, C. Cooper and M. H. Edwards (2016). "Bone Microarchitecture in Men and Women with Diabetes: The Importance of Cortical Porosity." Calcif Tissue Int **98**(5): 465-473.

Palermo, A., D. Tuccinardi, G. Defeudis, M. Watanabe, L. D'Onofrio, A. Lauria Pantano, N. Napoli, P. Pozzilli and S. Manfrini (2016). "BMI and BMD: The Potential Interplay between Obesity and Bone Fragility." International journal of environmental research and public health **13**(6): 544.

Palsgaard, J., B. Emanuelli, J. N. Winnay, G. Sumara, G. Karsenty and C. R. Kahn (2016). "Cross-talk between insulin and Wnt signaling in preadipocytes. ROLE OF Wnt CO-RECEPTOR LDL RECEPTOR-RELATED PROTEIN-5 (LRP5)." J Biol Chem **291**(32): 16878.

Pardali, E., M.-J. Goumans and P. ten Dijke (2010). "Signaling by members of the TGF-β family in vascular morphogenesis and disease." Trends in Cell Biology **20**(9): 556-567.

Pinson, K. I., J. Brennan, S. Monkley, B. J. Avery and W. C. Skarnes (2000). "An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice." Nature **407**(6803): 535-538.

Probst, K., R. Fijnheer, P. Schellekens and A. Rothova (2004). "Intraocular and plasma levels of cellular fibronectin in patients with uveitis and diabetes mellitus." Br J Ophthalmol **88**(5): 667-672.

Qiang, Y.-W., J. D. Shaughnessy and S. Yaccoby (2008). "Wnt3a signaling within bone inhibits multiple myeloma bone disease and tumor growth." Blood **112**(2): 374-382.

Rathmann, W., C. Scheidt-Nave, M. Roden and C. Herder (2013) "Typ-2-Diabetes: Prävalenz und Relevanz angeborener und erworbener Faktoren für die Prädiktion." DOI: original 10.3238/arztebl.2013.0331.

Reid, K. B. (1983). "Proteins involved in the activation and control of the two pathways of human complement." Biochem Soc Trans **11**(1): 1-12.

Retzepi, M. and N. Donos (2010). "The effect of diabetes mellitus on osseous healing." Clin Oral Implants Res **21**(7): 673-681.

Roglic, G., N. Unwin, P. H. Bennett, C. Mathers, J. Tuomilehto, S. Nag, V. Connolly and H. King (2005). "The Burden of Mortality Attributable to Diabetes." Realistic estimates for the year 2000 **28**(9): 2130-2135.

Röntgen, V. (2011). "Frakturheilung bei beeinträchtigtem Wnt-Signalweg und dadurch hervorgerufener Osteoporose im Mausmodell."

Ross, S. E., N. Hemati, K. A. Longo, C. N. Bennett, P. C. Lucas, R. L. Erickson and O. A. MacDougald (2000). "Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling." Science **289**(5481): 950-953.

Roy, S., R. Sala, E. Cagliero and M. Lorenzi (1990). "Overexpression of fibronectin induced by diabetes or high glucose: phenomenon with a memory." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(1): 404-408.

Rubin, M. R. (2015). "Bone Cells and Bone Turnover in Diabetes Mellitus." Current Osteoporosis Reports **13**(3): 186-191.

Rubin, M. R. and J. M. Patsch (2016). "Assessment of bone turnover and bone quality in type 2 diabetic bone disease: current concepts and future directions." Bone Research **4**: 16001.

Sabek, O. M., S. K. Nishimoto, D. Fraga, N. Tejpal, C. Ricordi and A. O. Gaber (2015). "Osteocalcin Effect on Human beta-Cells Mass and Function." Endocrinology **156**(9): 3137-3146.

Saito, M. and K. Marumo (2010). "Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus." Osteoporosis International **21**(2): 195-214.

Schinner, S. (2009). "Wnt-signalling and the metabolic syndrome." Hormone and metabolic research **41**(02): 159-163.

Schulte, D. M., N. Müller, K. Neumann, F. Oberhäuser, M. Faust, H. Güdelhöfer, B. Brandt, W. Krone and M. Laudes (2012). "Pro-Inflammatory wnt5a and Anti-Inflammatory sFRP5 Are Differentially Regulated by Nutritional Factors in Obese Human Subjects." PLoS ONE **7**(2): e32437.

Schwartz, A. V. (2003). "Diabetes Mellitus: Does it Affect Bone?" Calcif Tissue Int **73**(6): 515-519.

Schwartz, A. V., D. E. Sellmeyer, K. E. Ensrud, J. A. Cauley, H. K. Tabor, P. J. Schreiner, S. A. Jamal, D. M. Black and S. R. Cummings (2001). "Older women with diabetes have an increased risk of fracture: a prospective study." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **86**(1): 32-38.

Semenov, M. V., R. Habas, B. T. MacDonald and X. He "SnapShot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways." Cell **131**(7): 1378.e1371-1378.e1372.

Shang, Y.-c., S.-h. Wang, F. Xiong, C.-p. Zhao, F.-n. Peng, S.-w. Feng, M.-s. Li, Y. Li and C. Zhang (2007). "Wnt3a signaling promotes proliferation, myogenic differentiation, and migration of rat bone marrow mesenchymal stem cells1." Acta Pharmacologica Sinica **28**(11): 1761-1774.

Shioji, K., S. Moriwaki, Y. Takeuchi, T. Uegaito, S. Mutsuo and M. Matsuda (2007). "Relationship of Serum Adiponectin Level to Adverse Cardiovascular Events in Patients Who Undergo Percutaneous Coronary Intervention." Circulation Journal **71**(5): 675-680.

Shu, L., N. S. Sauter, F. T. Schulthess, A. V. Matveyenko, J. Oberholzer and K. Maedler (2008). "Transcription Factor 7-Like 2 Regulates β-Cell Survival and Function in Human Pancreatic Islets." Diabetes **57**(3): 645-653.

Si, W., Q. Kang, H. H. Luu, J. K. Park, Q. Luo, W.-X. Song, W. Jiang, X. Luo, X. Li and H. Yin (2006). "CCN1/Cyr61 is regulated by the canonical Wnt signal and plays an important role in Wnt3A-induced osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells." Molecular and cellular biology **26**(8): 2955-2964.

Signäs, C., G. Raucci, K. Jönsson, P. E. Lindgren, G. M. Anantharamaiah, M. Höök and M. Lindberg (1989). "Nucleotide sequence of the gene for a fibronectin-binding protein from Staphylococcus aureus: use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptides." Proceedings of the National Academy of Sciences **86**(2): 699-703.

Silkstone, D., H. Hong and B. A. Alman (2008). "[beta]-Catenin in the race to fracture repair: in it to Wnt." Nat Clin Pract Rheum **4**(8): 413-419.

Singh, R., R. B. De Aguiar, S. Naik, S. Mani, K. Ostadsharif, D. Wencker, M. Sotoudeh, R. Malekzadeh, R. S. Sherwin and A. Mani (2013). "LRP6 Enhances Glucose Metabolism by Promoting TCF7L2-dependent Insulin Receptor Expression and IGF Receptor stabilization in Humans." Cell metabolism **17**(2): 197-209.

Sisask, G., R. Marsell, A. Sundgren-Andersson, S. Larsson, O. Nilsson, Ö. Ljunggren and K. B. Jonsson (2013). "Rats treated with AZD2858, a GSK3 inhibitor, heal fractures rapidly without endochondral bone formation." Bone **54**(1): 126-132.

Starup-Linde, J., S. Lykkeboe, S. Gregersen, E.-M. Hauge, B. L. Langdahl, A. Handberg and P. Vestergaard (2016). "Bone structure and predictors of fracture in type 1 and type 2 diabetes." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **101**(3): 928-936.

Starup-Linde, J., S. Lykkeboe, S. Gregersen, E.-M. Hauge, B. L. Langdahl, A. Handberg and P. Vestergaard (2016). "Differences in biochemical bone markers by diabetes type and the impact of glucose." Bone **83**: 149-155.

Strotmeyer, E. S., J. A. Cauley, A. V. Schwartz, M. C. Nevitt, H. E. Resnick, D. C. Bauer, F. A. Tylavsky, N. de Rekeneire, T. B. Harris and A. B. Newman (2005). "Nontraumatic fracture risk with diabetes mellitus and impaired fasting glucose in older white and black adults: the health, aging, and body composition study." Arch Intern Med **165**(14): 1612-1617.

Stürmer, K. (1996). "Pathophysiologie der gestörten Knochenheilung." Der Orthopäde **25**(5): 386-393.

Sun, M., J. Yang, J. Wang, T. Hao, D. Jiang, G. Bao and G. Liu (2016). "TNF-α is upregulated in T2DM patients with fracture and promotes the apoptosis of osteoblast cells in vitro in the presence of high glucose." Cytokine **80**: 35-42.

Takamoto, I., N. Kubota, K. Nakaya, K. Kumagai, S. Hashimoto, T. Kubota, M. Inoue, E. Kajiwara, H. Katsuyama, A. Obata, Y. Sakurai, M. Iwamoto, T. Kitamura, K. Ueki and T. Kadowaki (2014). "TCF7L2 in mouse pancreatic beta cells plays a crucial role in glucose homeostasis by regulating beta cell mass." Diabetologia **57**(3): 542-553.

Tamayo, T., J. Rosenbauer, S. H. Wild, A. M. W. Spijkerman, C. Baan, N. G. Forouhi, C. Herder and W. Rathmann (2014). "Diabetes in Europe: An update." Diabetes Research and Clinical Practice **103**(2): 206-217.

Tamkun, J. W. and R. O. Hynes (1983). "Plasma fibronectin is synthesized and secreted by hepatocytes." J Biol Chem **258**(7): 4641-4647.

Taylor, K. S., C. J. Heneghan, A. J. Farmer, A. M. Fuller, A. I. Adler, J. K. Aronson and R. J. Stevens (2013). "All-cause and cardiovascular mortality in middle-aged people with type 2 diabetes compared with people without diabetes in a large U.K. primary care database." Diabetes Care **36**(8): 2366-2371.

Ten Dijke, P., H. Yamashita, T. K. Sampath, A. H. Reddi, M. Estevez, D. L. Riddle, H. Ichijo, C.-H. Heldin and K. Miyazono (1994). "Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4." Journal of Biological Chemistry **269**(25): 16985-16988.

Thrailkill, K. M., C. K. Lumpkin, Jr., R. C. Bunn, S. F. Kemp and J. L. Fowlkes (2005). "Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues." Am J Physiol Endocrinol Metab **289**(5): E735-745.

Torres, M. A., J. A. Yang-Snyder, S. M. Purcell, A. A. DeMarais, L. L. McGrew and R. T. Moon (1996). "Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early Xenopus development." The Journal of cell biology **133**(5): 1123-1137.

Umpierrez, G. and M. Korytkowski (2016). "Diabetic emergencies [mdash] ketoacidosis, hyperglycaemic hyperosmolar state and hypoglycaemia." Nat Rev Endocrinol **12**(4): 222-232.

Vestergaard, P. (2007). "Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes--a meta-analysis." Osteoporos Int **18**(4): 427-444.

Vestergaard, P., L. Rejnmark and L. Mosekilde (2005). "Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk." Diabetologia **48**(7): 1292-1299.

Viner, R., B. White and D. Christie (2017). "Type 2 diabetes in adolescents: a severe phenotype posing major clinical challenges and public health burden." The Lancet **389**(10085): 2252-2260.

Wang, H.-y. and C. C. Malbon (2003). "Wnt signaling, Ca2+, and cyclic GMP: visualizing Frizzled functions." Science **300**(5625): 1529-1530.

Wang, Q., Y. Wang, A. W. Minto, J. Wang, Q. Shi, X. Li and R. J. Quigg (2008). "MicroRNA-377 is up-regulated and can lead to increased fibronectin production in diabetic nephropathy." The FASEB Journal **22**(12): 4126-4135.

Wang, S. and R. Hirschberg (2009). "Diabetes-relevant regulation of cultured blood outgrowth endothelial cells." Microvascular Research **78**(2): 174-179.

Wechsler, J. G. (1997). "Adipositas und Fettstoffwechselstörungen." Der Internist **38**(3): 231-236.

Welters, H. J. and R. N. Kulkarni (2008). "Wnt signaling: relevance to beta-cell biology and diabetes." Trends Endocrinol Metab **19**(10): 349-355.

Werth, S., H. Lehnert and J. Steinhoff (2015). "Diabetische Nephropathie." Der Internist **56**(5): 513-519.

White, E. S. and A. F. Muro (2011). "Fibronectin splice variants: understanding their multiple roles in health and disease using engineered mouse models." IUBMB Life **63**(7): 538-546.

Wild, S., G. Roglic, A. Green, R. Sicree and H. King (2004). "Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030." Diabetes Care **27**(5): 1047-1053.

Wright, M., M. Aikawa, W. Szeto and J. Papkoff (1999). "Identification of a Wnt-responsive signal transduction pathway in primary endothelial cells." Biochemical and biophysical research communications **263**(2): 384-388.

Wu, J., D. B. Bowe, A. Sadlonova, T. R. Whisenhunt, Y. Hu, A. K. Rustgi, Y. Nie, A. J. Paterson and X. Yang (2014). "O-GlcNAc transferase is critical for transducin-like enhancer of split (TLE)-mediated repression of canonical Wnt signaling." J Biol Chem **289**(17): 12168-12176.

Yadav, A., M. A. Kataria, V. Saini and A. Yadav (2013). "Role of leptin and adiponectin in insulin resistance." Clinica Chimica Acta **417**: 80-84.

Yang, Y., L. Topol, H. Lee and J. Wu (2003). "Wnt5a and Wnt5b exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation." Development **130**(5): 1003-1015.

Ye, L., M. A. Robertson, T. L. Mastracci and R. M. Anderson (2016). "An insulin signaling feedback loop regulates pancreas progenitor cell differentiation during islet development and regeneration." Developmental Biology **409**(2): 354-369.

Zhang, N., X. Yang, X. Zhu, B. Zhao, T. Huang and Q. Ji (2017). "Type 2 diabetes mellitus unawareness, prevalence, trends and risk factors: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999–2010." Journal of International Medical Research **45**(2): 594-609.

Zhong, N., R. P. Gersch and M. Hadjiargyrou (2006). "Wnt signaling activation during bone regeneration and the role of Dishevelled in chondrocyte proliferation and differentiation." Bone **39**(1): 5-16.

Zhou, S. (2011). "TGF-β regulates β-catenin signaling and osteoblast differentiation in human mesenchymal stem cells." Journal of cellular biochemistry **112**(6): 1651-1660.

Zoch, M. L., T. L. Clemens and R. C. Riddle (2016). "New Insights into the Biology of Osteocalcin." Bone **82**: 42-49.