

Aus der Klinik für Gastroenterologie und Endokrinologie

(Prof. Dr. V. Ellenrieder)

Rolle von Single-Nukleotid-Polymorphismen der 11beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase in Bezug auf den Glucocorticoidstoffwechsel im Knochen –
Einfluss auf den supprimierten Cortisolspiegel und die Knochendichte bei Osteoporosepatienten

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Michael Helmut Mergler-Etmanski

(geb. Etmanski)

aus Winsen an der Luhe

Göttingen 2018

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H.K. Kroemer
Referent/in	Prof. Dr. H. Siggelkow
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. H. Bickeböller
Drittreferent/in:	Prof. Dr. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 13.02.2019

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel
" Rolle von Single-Nukleotid-Polymorphismen der 11beta-
Hydroxysteroid-Dehydrogenase in Bezug auf den
Glucocorticoidstoffwechsel im Knochen –
Einfluss auf den supprimierten Cortisolspiegel und die
Knochendichte bei Osteoporosepatienten"
eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir
angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 OSTEOPOROSE.....	1
1.1.1 <i>Glucocorticoid-induzierte Osteoporose</i>	5
1.1.2 <i>Endogener Hypercortisolismus</i>	9
1.2 11BETA-HYDROXYSTEROID-DEHYDROGENASEN – ENZYM DES GC-STOFFWECHSELS	11
1.2.1 <i>HSD11B1 und Knochen</i>	12
1.2.2 <i>Polymorphismen im HSD11B-Gen</i>	13
1.3 ZIEL DER ARBEIT	15
2 MATERIALIEN UND METHODEN	16
2.1 MATERIALIEN	16
2.1.1 GERÄTE.....	16
2.1.2 <i>Chemikalien</i>	17
2.1.3 <i>Verbrauchsmaterial</i>	18
2.1.4 <i>Wiederverwendete Materialien</i>	19
2.1.5 <i>Kits und Assays</i>	20
2.1.6 <i>Lösungen und Puffer</i>	20
2.1.7 <i>Primersequenzen</i>	21
2.2 METHODEN.....	23
2.2.1 <i>Probandenrekrutierung</i>	23
2.2.2 <i>Klinische Messdaten</i>	23
2.2.3 <i>DNA-Isolierung</i>	24
2.2.4 <i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	24
2.2.5 <i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	28
2.2.6 <i>Genotypisierung mittels Primerextension (SNaPshot™)</i>	29
2.2.7 <i>Bioinformatik</i>	35
2.2.8 <i>Statistische Methoden</i>	36
3 ERGEBNISSE	37
3.1 POPULATION	37
3.2 SUPPRIMIERTES CORTISOL NACH DEXAMETHASON-HEMMTEST	39
3.3 GENOTYPISIERUNG	44
3.4 PHÄNOTYP-GENOTYP-ASSOZIATION	49
4 DISKUSSION	56
5 ZUSAMMENFASSUNG	72
6 LITERATURVERZEICHNIS	74

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
AP	alkalische Phosphatase
BMD	<i>bone mineral density</i> , Knochendichte
BMI	<i>Bodymassindex</i>
bp	Basenpaare
C	Cytosin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphate, dATP + dCTP + dGTP + dTTP
dsDNA	doppelsträngige Nukleinsäure
DVO	Dachverband Osteologie e. V.
DXA	<i>Dual-X-Ray</i> -(Photonen)-Absorptiometrie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
G	Guanin
GC	Glucocorticoide
GH	<i>growth hormone</i> , Somatotropin
GR	Glucocorticoidrezeptor
GSK-3 β	<i>Glycogensynthase-Kinase-3β</i>
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
<i>HSD11B</i>	11beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase -Gen
11 β HSD	11beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
HT	Haplotyp
HWE	Hardy-Weinberg equilibrium
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor</i>
IL-1 β	Interleukin-1 β
LD	<i>linkage disequilibrium</i>
LS	Längenstandard
M	Molar
MAF	<i>minor allele frequency</i>
MR	Mineralcorticoid-Rezeptor
N	Anzahl

NADPH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
OPG	Osteoprotegerin
OPO	Osteoporose
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDC	Post-Dexamethason-Cortisollevel, nach Dexamethasongabe supprimiertes Cortisol
<i>PPAR</i>	<i>pivotal adipogenic transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor</i>
prim.	primär
R	Korrelationskoeffizient
RANK-L	receptor activator of NF- κ B Ligand
RNA	Ribonukleinsäure
Runx2	<i>runt-related protein 2</i>
SAP	<i>Shrimp</i> Alkalische Phosphatase
SD	<i>Standard Deviation</i> , Standardabweichungen
sek.	sekundär
SNP	Einzelnucleotid-Polymorphismus
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
T-Score	Knochendichteparameter s.S.1
TM	trade mark
U	<i>unit</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
WHO	<i>World Health Organisation</i>
WS	Wirbelsäule
YSM	Jahre seit Menopause
Z-Score	Knochendichteparameter s.S.23

1 Einleitung

1.1 Osteoporose

Die Osteoporose (OPO) ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine erniedrigte Knochenmasse und eine Verschlechterung der mikroarchitektonischen Knochenstruktur charakterisiert ist. Hierdurch kommt es zu einer verminderten Knochenstabilität und höherer Neigung zu Frakturen (Kanis und Reginster 2008; WHO 1991).

Im Knochen laufen zeitlebens Auf- und Abbauprozesse ab, und OPO bedeutet ein Missverhältnis zugunsten vermehrter Knochenresorption. Die klinische Bedeutung der OPO liegt im Auftreten von Knochenbrüchen und den damit einhergehenden Einschränkungen für Morbidität und Mortalität. Am häufigsten treten diese Frakturen an der Wirbelsäule, dem proximalen Femur und am distalen Radius auf (Melton et al. 1990). Die negativen Einflüsse dieser Frakturen auf Lebensqualität und Morbidität wurden in vielen Studien beobachtet (Greendale et al. 1995; Hall et al. 1999; Huang et al. 1996). Die Mortalität bei Schenkelhalsfrakturen liegt in den ersten 6 Monaten bei 20-25% (Smektala et al. 2005). Auch Wirbelkörperfrakturen führen im Anschluss an das Ereignis zu erhöhter Mortalität (Kanis et al. 2004b). Die Prävalenz der OPO in Deutschland bei Frauen im Alter von 50-60 Jahre liegt bei etwa 15% und steigt im Alter von mehr als 70 Jahre auf 45% an. Bei den Männern betrug die Prävalenz einer erniedrigten Knochendichte am Schenkelhals im Alter von 50 bis 60 Jahre 2,4% und stieg im Alter von mehr als 70 Jahre auf 17% an (DVO 2014; Lunt et al. 1997). Dabei können ca. 30% der Frakturen bei älteren Frauen und Männern mit erniedrigter Knochendichte in Verbindung gebracht werden, womit die Osteoporose eine wichtige behandelbare Ursache für Frakturen darstellt (Siris et al. 2006).

Im Folgenden sind die durch die *World Health Organization* (WHO) 1994 definierten Klassifikationen aufgearbeitet. Dabei klassifiziert die WHO den Schweregrad der OPO anhand der röntgenologischen Knochenmineraldichte (*bone mineral density*, BMD) (WHO 1994). Als Messpunkte sind die Lendenwirbelsäule, der Femurhals und der Gesamtfemur etabliert. Die gemessene BMD einer Person wird dabei mit der durchschnittlichen maximalen Knochendichte gesunder Erwachsener im Alter zwischen 20 und 40 Jahre verglichen (T-Score). Liegt die BMD dabei 2,5

Standardabweichungen (SD) oder mehr unter dem T-Score (T-Score $-2,5$ oder weniger), wird von OPO gesprochen. Bei einem T-Score von -1 bis $-2,5$ liegt eine erniedrigte Knochendichte oder auch Osteopenie vor. Sind bei einem T-Score ab $-2,5$ bereits eine oder mehrere OPO-assoziierte Frakturen aufgetreten, spricht man von einer manifesten OPO. Weiterhin wird die Diagnose Osteoporose im klinischen Gesamtkontext auf Grundlage von Risikofaktoren definiert und als 10-Jahres-Frakturnisiko angegeben. Hierzu zählen neben der Knochendichte auch klinische Risikofaktoren (z. B. Lebensalter, Frakturen, Muskelkraft, Stürze), anamnestische Hinweise (Begleiterkrankungen, Familienanamnese, Ernährung, Medikation, Genussmittel) und ein knochenhistologischer Befund (DVO 2009; DVO 2014; Kanis et al. 2005). Hierzu zeigt Tabelle 1 einen Überblick über die Risikofaktoren für osteoporotische Frakturen, die in der Leitlinie des Dachverbandes für Osteologie e. V. (DVO) diskutiert werden.

Klinische Risikofaktoren für osteoporotische Frakturen			
<u>Allgemeine Risiken</u>			
Lebensalter	Geschlecht	Wirbelkörperfrakturen	Nichtvertebrale Frakturen nach dem 50. Lebensjahr
Proximale Femurfraktur bei Vater oder Mutter	Multiple intrinsische Stürze	Kalzium-/Vitamin-D-Mangel	Homozystein, Folsäure und Vitamin -B12-Mangel
Untergewicht	Immobilität	Nikotinkonsum	
<u>Risiken durch spezielle Grunderkrankungen</u>			
Cushing-Syndrom	Primärer Hyperparathyreoidismus	Wachstumshormonmangel bei Hypophyseninsuffizienz	Subklinische/manifeste Hyperthyreose
Diabetes mellitus I	Rheumatoide Arthritis	Bilroth-II-Magenresektion/Gastrektomie	Epilepsie
<u>Risiken durch eine medikamentöse Therapie</u>			
Orale Glucocorticoide	Aromatasehemmer	Protonenpumpenhemmer	Therapie mit Glitazonen
Antandrogene Therapie, männlicher Hypogonadismus anderer Ursache			

Tabelle 1 Gliederungspunkte der DVO-Leitlinie 2014 über klinische Risikofaktoren für osteoporotische Frakturen(DVO 2014).

Die systemische OPO wird anhand ihrer Ursache in eine primäre und sekundäre Form unterteilt. Bei unbekannter Ursache spricht man von primärer OPO, welche etwa 95% aller OPO ausmacht. Diese wird weiter in eine idiopathische OPO bei jungen Menschen, in die postmenopausale OPO (Typ-I-OPO) und die senile OPO (Typ-II-OPO) unterteilt.

Die Typ-I-OPO tritt in einem Geschlechterverhältnis Frauen zu Männern von 20 zu 1 auf und macht etwa 80% aller OPO aus. Kennzeichnend ist ein überdurchschnittlich schneller Verlust vor allem trabekulären Knochens, auf den vermehrt Wirbelkörper- oder Radiusfrakturen nach Bagatelltraumata folgen. Neben anderen allgemeinen Risikofaktoren wird die Entstehung hauptsächlich auf den Östrogenmangel zurückgeführt.

Die Typ-II-OPO wird als Altersosteoporose bei Frauen und Männern ab dem 70. Lebensjahr im Verhältnis von 2 zu 1 diagnostiziert. Charakteristisch ist oft ein übermäßiger Verlust von trabekulärem und kortikalem Knochen. Im Alter stehen Frakturen des Femurhalses an erster Stelle, gefolgt von Frakturen der Wirbelkörper sowie des Beckens und des Humerus. Pathogenetisch liegen dem Knochenverlust im Alter mehrere Risikofaktoren zu Grunde. Zu betonen wären, im Vergleich zur Typ-I-OPO, eine Vitamin-D- bzw. Kalziummangelsituation durch geringere Sonnenlichtexposition, kalziumarme Ernährung oder eine verminderte körperliche Aktivität mit folgendem Muskelabbau bis hin zur Sarkopenie. Die Übergänge zwischen der postmenopausalen und der senilen OPO sind oft fließend, wodurch es schwierig ist, zwischen den Risikofaktoren zu unterscheiden.

Die sekundäre OPO folgt auf unphysiologische Einflüsse und macht etwa 5% der OPO-Erkrankungen aus. In Tabelle 2 sind hierzu weitere Ursachen laut WHO aufgelistet. Unter ihnen ist die Glucocorticoid-induzierte OPO am häufigsten.

Ätiologie generalisierter sekundärer Osteoporose			
<u>Endokrine und Stoffwechsel- Erkrankungen</u>			
Hypogonadismus	Cushing-Syndrom	Thyreotoxikose	Anorexia nervosa
Hyperprolaktinämie	Mastozytose	Porphyrie	Hypophosphatasie
Diabetes mellitus I		Thalassämie	
<u>Ernährungsbedingte Erkrankungen</u>			
Malabsorptions Syndrome	Chronische Lebererkrankungen	Skorbut	
Alkoholismus	Kalzium-/Vitamin-D-Mangel	Magen-Operationen	
<u>Risiken durch eine medikamentöse Therapie</u>			
Chronische Heparingabe	Glitazone	Antiepileptika	
<u>Erbkrankheiten des Kollagenstoffwechsels</u>			
Osteogenesis imperfecta	Homocystinurie	Ehlers-Danlos-Syndrom	Marfan-Syndrom
<u>Andere Ursachen</u>			
Rheumatoide Arthritis	Myelom / andere Karzinome	Immobilisation	Schwangerschaft

Tabelle 2 Ursachen für sekundärer Osteoporose modifiziert nach WHO (WHO 1994)

1.1.1 Glucocorticoid-induzierte Osteoporose

Glucocorticoide (GC) sind potente immunmodulatorische Medikamente und werden therapeutisch bei einer Vielzahl von entzündlichen Systemerkrankungen wie rheumatoider Arthritis, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Asthma und Multipler Sklerose eingesetzt. Neben der postmenopausalen und der senilen OPO ist deshalb die GC-induzierte OPO heute die dritthäufigste Form der OPO (Lukert und Raisz 1994). Dabei ist der iatrogen verursachte Hypercortisolismus als Ursache der Osteoporose wesentlich häufiger geworden als der endogene Hypercortisolismus (Cushing-Syndrom). Eine Metaanalyse von 42.000 Menschen weltweit schätzt die Prävalenz des mindestens einmaligen Langzeitgebrauches von GC auf 3% im Alter von 30 Jahre, ansteigend auf 5,2% im Alter von 80 Jahre (Kanis et al. 2004a). GC beeinflussen den Auf- und Abbau von Knochensubstanz sowohl durch direkte als auch indirekte Effekte auf die verschiedenen Knochenzellen. Systemische GC beeinflussen dabei den Knochenstoffwechsel durch verminderte intestinale Resorption und verstärkte renale Exkretion von Calcium, verminderte Produktion und Aktivierung von Sexual- und Wachstumshormonen sowie Abnahme der Muskelkraft (Hofbauer und Rauner 2009; Patschan et al. 2001). Diese Faktoren tragen alle auch zum Verlust von Knochensubstanz, Verminderung der Knochenqualität höherem Sturz- und Frakturrisiko bei (Hofbauer und Rauner 2009). Einen Überblick gibt Abbildung1.

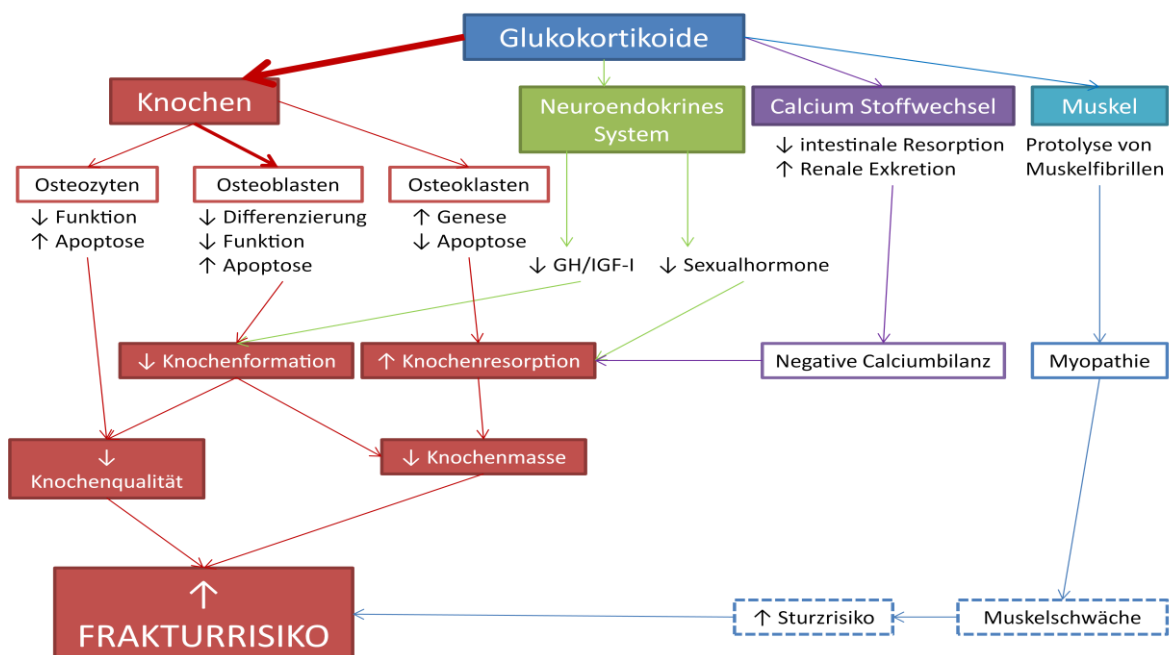


Abbildung 1 Indirekte und direkte GC-Einflüsse auf das Frakturrisiko modifiziert nach Canalis et al. 2007

Die lokalen Effekte von GC im Skelett kontrollieren die Aktivität, Differenzierung und Apoptose von Knochenzellen. Zusammen tragen diese Faktoren zum Knochenverlust bei (Canalis et al. 2007).

Unter anderem verringern GC die Zahl und die Funktion von Osteoblasten und führen so zu verminderter Knochenneubildung. Dies geschieht über eine Hemmung der Osteoblastogenese im Knochenmark, eine verfrühte Apoptose und eine niedrigere Knochenmineralisationsfunktion (Weinstein und Manolagas 2000). Für die Osteoblastogenese entscheidende Transkriptionsfaktoren wie *runt-related protein 2* (Runx2) und β -Catenin werden durch GC gehemmt. Insbesondere der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist dabei für die Osteoblastogenese entscheidend. Beispielsweise führen Deletionen von Wnt oder β -Catenin zum völligen Fehlen der Osteoblastogenese und vermehrter Osteoklastogenese (Glass et al. 2005). Wnt bewirkt eine Inaktivierung der *glycogen-synthase kinase-3 β* (GSK-3 β), deren Aktivität eine Translokation des osteogenetischen Transkriptionsfaktors β -Catenin in den Nukleus verhindert. GC erhöhen die Expression des sogenannten Dickkopf-Faktors, welcher wiederum GSK-3 β aktiv hält und führen so schlussendlich zu einer Inaktivierung von β -Catenin (Ohnaka et al. 2005; Smith und Frenkel 2005).

Weiterhin ist die Differenzierung der mesenchymalen Vorläuferzellen unter GC in Richtung der Adipogenese verschoben, was ebenfalls die Zahl der knochenbildenden Zellen und die Knochenstabilität verringert (Nuttall und Gimble 2000). Eine Hauptursache für diese vermehrte Adipogenese unter GC ist die erhöhte Expression des *pivotal adipogenic transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) γ 2. Damit einhergehend kommt es zu einer niedrigeren Expression des für die Osteogenese wichtigen Transkriptionsfaktors Runx2 (Shi et al. 2000). Klinisch wird dieser GC-Effekt bei Patienten mit Langzeit-GC-Therapie deutlich, bei denen es gleichzeitig zur Ansammlung von Knochenmarksfett und dortigem Verlust von Knochensubstanz kommt (Vande Berg et al. 1999).

Neben dem Einfluss auf die Osteoblastogenese führen GC zu einer Beeinträchtigung der Knochenmatrixsynthese und –zusammensetzung. Die Genexpression der für die extrazelluläre Matrix wichtigen Proteine Kollagen Typ I und Osteocalcin wird durch GC vermindert (Canalis et al. 2007). Zusätzlich steigt die Expression von Inhibitoren der Knochenmineralisation (Dmp-1 und Phex) im Knochengewebe bei Mäusen unter GC-Gabe. An diesem Punkt setzten OPO-Medikamente wie Teriparatid und

Risedronat an, welche im Mausmodell diesen GC-Effekten entgegenwirken konnten (Yao et al. 2008).

Die Differenzierung und Aktivität der Osteoklasten wird durch den Zytokin-*receptor activator of NF- κ B ligand* (RANK-L) gefördert und durch das Zytokin Osteoprotegerin (OPG) gehemmt (Teitelbaum 2000). Beide Substanzen werden dabei von den Osteoblasten sezerniert (Hofbauer et al. 2000). GC erhöhen die Expression von RANK-L und vermindern die von OPG. Dadurch wird die Aktivität der Osteoklasten gesteigert und deren Apoptose verhindert, woraus eine vermehrte Knochenresorption resultiert (Hofbauer et al. 1999). Die Osteozyten zeigen unter GC-Einfluss eine frühzeitige Apoptose, die zur Ausbildung von Vakunen in der Knochenmatrix führt (Weinstein et al. 1998). Hierdurch ist die normale Knocheninstandsetzung nicht mehr gewährleistet, und die biomechanischen Eigenschaften des Knochens verschlechtern sich (Lane et al. 2006).

Zusammenfassend betrachtet führen diese GC-Effekte zu einer insuffizienten Knochenmatrixproduktion und Mineralisation sowie erhöhter Apoptose von Osteoblasten und Osteozyten, während die Lebenszeit von Osteoklasten steigt (Canalis et al. 2007). Die GC-induzierte Apoptose der Osteozyten führt zur Abnahme der BMD und einem Anstieg des Frakturrisikos. Dabei erfolgt der Verlust der Knochenstärke zeitlich vor dem Verlust der eigentlichen Knochendichte bei Patienten mit GC-induzierter OPO (Weinstein 2011). Der zeitliche Verlauf der GC-induzierten OPO geschieht in zwei Phasen: einem anfänglichem rapidem Knochendichteverlust innerhalb der ersten Monate und einem langsameren Verlust aufgrund verminderter Knochenneubildung (Canalis et al. 2004).

Das Risiko, Frakturen zu erleiden, steigt bei vielen Patienten mit chronischer GC-Therapie an, wobei Frakturen bei 30-50% der Patienten unter Langzeit-GC-Therapie auftreten (> 6 Monate) (Angeli et al. 2006; Canalis et al. 2007; Cohen et al. 1999; Wallach et al. 2000). Diese Frakturen treten häufiger bei postmenopausalen Frauen und älteren Männern auf und sind dabei vor allem an den Wirbelkörpern und am Femurhals lokalisiert, also am Knochen, der überwiegend aus spongiöser Knochenmatrix besteht (Shaker und Lukert 2005; van Staa et al. 2002). Ähnlich wie bei Wirbelkörperfrakturen von postmenopausalen Frauen sind diese GC-induzierten Frakturen oft asymptomatisch. Konventionelle Röntgen-Kontrollen zeigten, dass 37% der postmenopausalen Frauen, die eine Langzeit-GC-Therapie erhielten, eine oder

mehrere Wirbelkörperfraktur erlitten (Angeli et al. 2006; Canalis et al. 2007). Wirbelkörperfrakturen treten gehäuft in der Phase auf in der die BMD schnell abnimmt. Der anfängliche rapide Knochenverlust begünstigt dabei hauptsächlich das Frakturrisiko der Wirbelkörper, und das auch bereits bei Patienten, deren T-Score noch im osteopenen Bereich liegt (Canalis et al. 2007; Cohen und Shane 2003). Dieser schnelle Verlust der BMD ist im ersten Jahr der GC-Therapie am größten und beträgt bis zu 30% in den ersten 6 Monaten (Adachi et al. 2001; Crandall 2002; Kanis et al. 2007). Obwohl Frakturen bereits früh während der GC-Therapie auftreten können, ist das Frakturrisiko auch von der Dosis und der Dauer der Therapie abhängig. In einem Review von vier großen Studien bzw. Metaanalysen von van Staa et al. zeigt sich, das bereits bei einer täglichen oralen GC-Dosis von weniger als 2,5 mg Prednisolonäquivalent über drei Monate ein erhöhtes Frakturrisiko besteht. Am häufigsten führt dies zu Wirbelkörperfrakturen (van Staa 2006). Die von van Staa et al. berechneten relativen Risiken für Frakturen unter *low-dose*-GC-Medikation zeigt Tabelle 3.

Relatives Frakturrisiko unter GC-Medikation

Lokalisation

jegliche Fraktur	1,33 – 1,91
Hüfte	1,61 – 2,25
Wirbelkörper	2,86 – 4,16
Unterarm	1,03 – 1,64

Tabelle 3 Relatives Frakturrisiko unter GC-Medikation nach van Staa et al 2006 (van Staa 2006)

Andere Daten zeigen, dass das relative Frakturrisiko an der Hüfte bis zu 7-mal und an der Wirbelsäule und bis zu 17-mal steigt, untersucht man Patienten mit einer Dosis von 10 mg Prednisolonäquivalent über den gleichen Zeitraum von 3 Monaten (Canalis et al. 2007; Steinbuch et al. 2004). Nach Ende der GC-Therapie kann das Frakturrisiko wieder abnehmen (Canalis et al. 2007).

1.1.2 Endogener Hypercortisolismus

Neben der Wirkung von externen GC spielt auch der endogene Cortisolstoffwechsel eine wichtige Rolle im Knochen. Der Hypercortisolismus ist eine häufige Ursache für sekundäre Osteoporosen (Shaker und Lukert 2005). Ein endogener Hypercortisolismus, wie bei einem Cushing-Syndrom, führt häufig zu einer OPO, trägt aber nur zu einem geringen Anteil der OPO in der allgemeinen Bevölkerung bei (Prävalenz 1 zu 500 000) (Arnaldi et al. 2003).

Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass ein erhöhter Cortisolspiegel, der aber keine klassischen klinischen Cushing-Symptome verursacht, einen wichtigen Einfluss auf die Entstehung von Hypercortisolismus-bedingten Krankheitsbildern hat. Hierzu zählt neben der OPO, unter anderem auch der Typ2-Diabetes (Chiodini et al. 2007; Chiodini et al. 2005). Dieser Hormonstatus wird als *subklinischer Hypercortisolismus* bezeichnet und ist relativ häufig in der Bevölkerung. Die Prävalenz wird auf ca. 1 zu 1000 geschätzt (Reincke 2000), wobei sie vermutlich aufgrund der fehlenden Symptomatik bei diesen Patienten noch höher liegt (Barzon et al. 2003; Reincke 2000; Terzolo et al. 1998). Einige Ergebnisse deuten darauf hin, dass osteoporotische Frakturen möglicherweise Hinweise auf einen subklinischen Hypercortisolismus geben können (Khanine et al. 2000). Ein Zusammenhang mit der OPO-Entstehung wird zusätzlich von einer Studie bestätigt, welche vermuten lässt, dass zwischen Gesunden und OPO-Patienten ein Unterschied in der physiologischen Cortisolsekretion aufgrund einer milden autonomen Hypersekretion bei den OPO-Patienten besteht (Kann et al. 2001). Daten einer Studie von Chiodini et al. zu diesem Thema kommen zu dem Ergebnis, dass 10,8% der OPO-Patienten mit Fraktur und 4,8% aller OPO-Patienten einen subklinischen Hypercortisolismus aufweisen (Chiodini et al. 2007).

Als ein Parameter, der Hinweise auf das Vorliegen eines subklinischen Hypercortisolismus geben kann, gilt die Höhe des nach Dexamethasongabe supprimierten Cortisolspiegels (Post-dexamethason-Cortisollevel = PDC). Generell dient der Dexamethasonsuppressionstest als Ausschlussdiagnostik für einen Morbus Cushing. Für die Diagnose eines subklinischen Hypercortisolismus fehlt allerdings noch ein etablierter Goldstandard. Aktuell schlagen mehrere Studien einen Zusammenhang zwischen mangelnder Cortisolsuppression und Hypercortisolismus-assoziierten Krankheitsbildern wie Diabetes, Fettleibigkeit und OPO vor (Catargi et

al. 2003; Chiodini et al. 2007; Kann et al. 2001; Pasquali et al. 2002). Bezüglich der OPO beschreibt eine Studie von Kann et al. einen Unterschied bei der endogenen Cortisolsekretion nach der oralen Einnahme von 3 mg Dexamethason zwischen Gesunden und Patienten mit primärer OPO. In der Gruppe der OPO-Patienten lag der Cortisolspiegel nach Suppression 50% höher als bei den Gesunden (Kann et al. 2001).

Wodurch die individuelle Höhe des supprimierten Cortisols zustande kommt, ist nicht genau geklärt. Der Cortisolspiegel wird durch die Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA) und den peripheren Cortisolstoffwechsel bestimmt (Gathercole et al. 2013; Tomlinson et al. 2004). Dexamethason supprimiert die HPA in normalen Individuen durch die Aktivierung des Glucocorticoidrezeptors im Hypothalamus und den Nebennieren. Darauf kommt es zu einer niedrigeren ACTH-Ausschüttung und folgendem Abfall der Cortisolspiegel (Makras et al. 2006). Neben der HPA, spielt aber auch der lokale Cortisolstoffwechsel, vor allem in der Leber und im Fettgewebe, eine Rolle für die Cortisolspiegel nach Dexamethasonsuppression (Andrews und Walker 1999; Lavery et al. 2012; Stewart et al. 1999). Für diesen lokalen Cortisolstoffwechsel sind die 11beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen die Schlüsselenzyme.

1.2 11beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen – Enzym des GC-Stoffwechsels

Cortison ist in der Zelle selbst nicht metabolisch wirksam, da es weder an den Glucocorticoidrezeptor (GR) noch an den Mineralcorticoid-Rezeptor (MR) bindet. Die Hydrierung von Cortison führt zu aktivem Cortisol. Diese Reaktion wird in beide Richtungen von den Enzymen 11beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (11 β HSD) katalysiert. Gleiches gilt auch für synthetische Derivate wie z. B. Prednison und Prednisolon, wobei die Enzymkinetik für synthetische sowie endogene GC vergleichbar zu sein scheint (Cooper et al. 2002). Es sind zwei Isoenzyme bekannt, 11 β HSD1 und 11 β HSD2, welche für die Regulation des in der Zelle aktiven Cortisolspiegels verantwortlich sind (Tomlinson et al. 2004).

Das im Blut zirkulierende Cortison stammt hauptsächlich aus der Niere, wo das Enzym 11 β HSD2 das aktive Cortisol inaktiviert. 11 β HSD2 wird am stärksten in Geweben exprimiert die MR ausbilden und arbeitet lediglich einseitig zur Oxidierung des aktiven Cortisols. Cortisol und Aldosteron können beide mit ähnlicher Affinität an den MR binden, wobei die zirkulierenden Cortisolspiegel wesentlich höher sind als die Aldosteronspiegel. 11 β HSD2 ist daher nötig, um die intrazellulären Cortisolspiegel zu reduzieren und so die spezifische Bindung von Aldosteron zu ermöglichen. Aufgrund dessen wird 11 β HSD2 unter anderem eine Rolle in der Regulation des Blutdruckes und der extrazellulären Flüssigkeit zugeschrieben. Studien zeigten, dass es vermutlich aufgrund erniedrigter 11 β HSD2-Aktivität zu einem Hypertonus und erhöhter Plasmahalbwertszeit von Cortisol kommt (Soro et al. 1995; Walker und Edwards 1993). Es gibt Hinweise, dass die *HSD11B2*-Expression bei Nierenfunktionseinschränkungen abnimmt und es ebenfalls zu einer verlängerten Cortisolhalbwertszeit im Plasma kommt (Quinkler et al. 2005).

11 β HSD1 ist ein im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiertes, membranständiges Enzym, das NADPH-abhängig die Aktivierung des Cortisons katalysiert. Ebenfalls im ER befindet sich das Enzym Hexose-6-Phosphat, welches den Kofaktor NADPH regeneriert und damit Einfluss auf die Enzymkinetik von 11 β HSD1 hat. 11 β HSD1 kann prinzipiell in beide Richtungen arbeiten, also auch Cortisol zu Cortison oxidieren. In vivo überwiegt allerdings die Aktivierung des Cortisons (Draper et al. 2003). Exprimiert wird *HSD11B1* ubiquitär, am stärksten in

Zellen mit hoher Expression von GR wie Leber, Fettgewebe und ebenso im Knochen (Tomlinson et al. 2004).

1.2.1 11 β HSD1 und Knochen

11 β HSD1-, aber nicht 11 β HSD2-, Aktivität wurde in Osteoblasten von Menschen, Mäusen und Ratten nachgewiesen, wobei diese Zellen aktives Cortisol aus inaktivem Cortison generieren können (Cooper et al. 2002).

Das Vorhandensein von 11 β HSD1 im Knochen lässt vermuten, dass endogene „inaktive“ GC eine wichtige Rolle für die Knochenphysiologie aufgrund ihrer lokalen Reaktivierung spielen. Die Expression von *HSD11B1* in Osteoblasten und damit die Möglichkeit aktives Cortisol aus Cortison zu generieren, erhöht sich unter GC-Medikation oder inflammatorischen Cytokinen (IL-1 β , TNF- α) bei lokalen Entzündungsreaktionen (Cooper et al. 2002; Kaur et al. 2010). Dadurch bildet das Enzym einen *fast-forward*-Mechanismus für die Aktivierung von Cortison. Wahrscheinlich spielen deshalb erhöhte lokale GC-Spiegel nicht nur bei der Osteoporose eine Rolle, sondern auch beim periartikulären Knochenverlust bei langjähriger rheumatoiden Arthritis (Kaur et al. 2010).

11 β HSD1 scheint auch einen wichtigen Einfluss auf die Pathogenese des senilen Knochenschwunds zu haben. Die Veränderungen der Knochenhistomorphologie im Alter weisen Ähnlichkeiten mit denen durch GC induzierten auf (Dalle Carbonare et al. 2001), obwohl sich die zirkulierenden Cortisolspiegel wohl nicht mit dem Alter erhöhen (Ferrari et al. 2001). Erklärt werden könnte dies durch eine Studie, die das Ansteigen der 11 β HSD1-Aktivität in Osteoblasten mit höherem Alter feststellte. Osteoblasten von Älteren konnten dabei 3-mal mehr Cortisol generieren als die von Jüngeren. Sollte dieser Effekt auch in vivo eine Rolle spielen, wären die Osteoblasten bei Älteren einem wesentlich höheren lokalen Cortisolspiegel ausgesetzt. Dies könnte einen Teil des dramatisch ansteigenden Frakturrisikos im Alter erklären (Cooper et al. 2002).

Eine weitere Studie von Cooper et al. kommt sogar zu dem Ergebnis, dass die Aktivität von 11 β HSD1 als Maßstab für die individuelle Anfälligkeit für GC-induzierte OPO geeignet sein könnte. Dabei wurden gesunde Männer nach siebentägiger 2x5 mg-Prednisolongabe untersucht. Die 11 β HSD1-Aktivität korrelierte dabei negativ mit der Höhe der Knochenformationsmarker Osteocalcin und N-terminal-Propeptid

Typ 1, was anscheinend durch erhöhte lokale GC-Aktivierung verursacht wird (Cooper et al. 2003). Ebenso zeigten diese Studien, dass es einen erheblichen Unterschied in der Aktivität von 11 β HSD1 bei verschiedenen Individuen gab. Diese individuellen Unterschiede in der 11 β HSD1-Aktivität könnten somit auch einen Einfluss auf das Vorhandensein eines endogenen Hypercortisolismus und der damit einhergehenden OPO haben. Die 11 β HSD1-Aktivität konnte bereits mit einigen Genvarianten in Verbindung gebracht werden, ein detaillierter Zusammenhang mit dem Knochenstoffwechsel bleibt aber noch zu ergründen (Cooper et al. 2002).

1.2.2 Polymorphismen im *HSD11B*-Gen

Da die Cortisolregulation in vielen Systemen eine Rolle spielt, liegen auch bereits einige Studien über *HSD11B*-Polymorphismen vor. Eine Möglichkeit diese Einflüsse eines Gens auf klinische Parameter nachzuweisen bildet die Analyse dieser Polymorphismen. Die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA und deren regulatorische Elementen wird durch die genaue Nukleotidabfolge beeinflusst. Schon der Austausch eines einzelnen Basenpaares kann die Bindungsintensität verändern und die Transkription beeinträchtigen. Kommt so eine Mutation zu einer gewissen Häufigkeit in einer Population vor, bezeichnet man sie auch als *Single-Nucleotide-Polymorphismus* (SNP). Man kann die Genotypen der SNP mit klinischen Parametern korrelieren und so Aussagen machen, ob sie einen Einfluss auf das Enzym haben.

Für das Enzym 11 β HSD2 liegen verschiedene Untersuchungen zu SNP-Assoziationen bezüglich des Salzhaushaltes und des Hypertonus vor (Alikhani-Koupaei et al. 2007; Mariniello et al. 2005). Publierte Untersuchungen zum Einfluss von *HSD11B2*-Polymorphismen auf den Knochen liegen nicht vor.

Polymorphismen im *HSD11B1*-Gen werden unter anderem bereits mit Typ 2-Diabetes und Hypertonus assoziiert (Franks et al. 2004; Nair et al. 2004). Ein Beispiel eines detailliert analysierten SNP im *HSD11B1*-Gen ist ein T->G-Polymorphismus (rs12086634) im Intron 3, der in einer Studie an Pima Indianern protektiv gegenüber Diabetes ist (Nair et al. 2004). Das seltenere Allel der SNP reduziert die Gentranskription von *HSD11B1* in vitro und führt so zu einer niedrigeren lokalen Cortisolsynthese in der Zelle (Draper et al. 2003). Weiterhin ist dieser SNP mit erhöhter Cortisolclearance und dem kompensatorischen adrenalen Hyperandrogenismus in schlanken Patienten mit polycystischem Ovarsyndrom

assoziiert und scheint zudem vor Adipositas zu schützen (Gambineri et al. 2006; Gelernter-Yaniv et al. 2003).

Bezüglich des Knochens wurde kürzlich eine koreanische Studie veröffentlicht, die einen Zusammenhang von zwei gekoppelten *HSD11B1*-SNPs in Intron 5 (rs1000283, rs932335) mit der Knochendichte am Femurhals bei postmenopausalen Frauen feststellte. Ebenso scheinen diese beiden SNPs einen Einfluss auf die Frakturrate der Wirbelkörper zu haben (Hwang et al. 2009). Inwieweit diese Ergebnisse auf die europäische Allgemeinbevölkerung übertragbar sind, ist nicht geklärt.

Bei genetischen Assoziationsstudien besteht meistens das Problem der geringen Fallzahl oder der unterschiedlichen Ethnien. Die Häufigkeiten der einzelnen SNPs ist teilweise sehr unterschiedlich zwischen Bevölkerungsgruppen, sodass ein Vergleich zwischen Ethnien (Europäer, Afroamerikaner, Asiaten) schwerfallen kann. Bei den meisten SNP-Assoziationsstudien zu *HSD11B* war die Fallzahl dementsprechend relativ niedrig (meist unter 500 Probanden).

1.3 Ziel der Arbeit

Aufgrund der Bedeutung der Enzyme 11β HSD1 und 11β HSD2 für den Cortisolstoffwechsel soll untersucht werden, welchen Einfluss häufige Polymorphismen in diesen Enzymen auf den Knochen haben. Dabei steht ein klinisch charakterisiertes Kollektiv von ca. 450 Osteoporose-Patienten der endokrinologischen Ambulanz der Universität Göttingen zu Verfügung. In einer Vorgängerstudie wurde im gleichen Kollektiv bereits eine Korrelation zwischen der Knochendichte und der Höhe der nach 2 mg Dexamethason supprimierten Cortisolspiegel nachgewiesen (Bozkurt 2007). Ziel dieser Arbeit ist es nun folgende Hypothesen zu testen:

1. Polymorphismen in den Genen für *HSD11B1* und *HSD11B2* sind für die Produktion von Cortisol im Körper entscheidend. Polymorphismen der beiden Enzyme beeinflussen die Menge an synthetisiertem Cortisol und dadurch auch die Höhe der nach Dexamethason supprimierten Cortisolspiegel.
2. Polymorphismen in den 11β HSD-Enzymen beeinflussen den physiologischen Cortisolmetabolismus im Knochen und sind damit pathophysiologische Faktoren für erniedrigte Knochenmineraldichte und erhöhtes Frakturrisiko.
3. Der physiologische Cortisolmetabolismus ist ein relevanter Faktor bei der Entwicklung einer Altersosteoporose. Die mit höherem Alter steigende 11β HSD1-Aktivität wird durch Polymorphismen beeinflusst, wodurch diese ein pathophysiologischer Faktor bei der Entstehung einer Altersosteoporose sein könnten.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

BioRobot ® EZ1	Qiagen, Hilden
Elektrophorese-Kammer (ComPhor L Mini)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Elektrophorese-Netzteil (Standard Power Pack P25)	Biometra, Göttingen
Feinwaage BL 610	Sartorius, Göttingen
Fluor-S™ MultiImager (für Gelfotografie)	BioRad, Hercules USA
Gefrierschrank Premium	Liebherr, Heidelberg
Kühlschrank	Bauknecht, Stuttgart
Magnetrührer (IKAMAG RET)	IKA, Staufen
Mikrowelle MWS 2820	Bauknecht, Schorndorf
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
PCR-Gradienten-Cycler (384-Well), Typ Master-Cycler	Eppendorf, Hamburg
PCR-Gradienten-Cycler (96-Well), PTC-200 Peltier	MJ Research/BioRad, Hercules, USA
Photometer (Biophotometer 6313)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl), Typen <i>Research and Reference</i>	Eppendorf, Hamburg

Rahmen und Septen für Sequenzierer	Applied Biosystems, Darmstadt
Sequenzierer 3130x Genetic Analyser	Applied Biosystems, Darmstadt
Sequenzierplatten	Applied Biosystems, Darmstadt
Stauschlauch zur Blutentnahme	Prämeta, Troisdorf
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortexer (MS 2 <i>Minishaker</i>)	IKA, Staufen
Wärmeschrank	Binder, Tuttlingen
Zentrifuge Multifuge X3R	Heraeus, Hanau

2.1.2 Chemikalien

Agarose <i>Ultra Pure</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Anodenpuffer (für Sequenzierer)	Applied Biosystems, Darmstadt
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (1% in H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Exonuklease I	USB, Staufen
FastAP	Fermentas
FastAP Buffer	Fermentas
GeneScan™ LIZ® 120 Size Standard	Applied Biosystems, Darmstadt

Glycerol 85%	Zentralapotheke Klinikum Göttingen
HiDi-Lösung (mit Formamid)	Applied Biosystems, Darmstadt
Polymer POP7 (für Sequenzierer)	Applied Biosystems, Darmstadt
Primer (Design nach gewünschter Sequenz)	MWG-Biotech, Ebersberg
QSolution	Qiagen, Hilden
100 bp-Leiter	Rapidozym, Berlin
Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)	USB, Staufeu

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Alkoholisches Haut-Desinfektionsspray (Kodan®)	Schülke & Mayr, Norderstedt
Blutentnahme-Besteck (Butterfly, Micro-Flo™)	LDKS Oversan, Gemonio, Italien
Mehrkanal Pipette (8er) 0,5 – 10 µl	Eppendorf, Hamburg
Monovetten Kalium-EDTA, 2,7 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Monovetten Lithium-Heparin, 9 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Multiadapter für Blutentnahme-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg

PCR Softtubes Flachdeckel, RNase- und DNase-frei (0,2 ml)	Biozym, Hessisch Oldendorf
PCR-Folien (Adhesive PCR Foil Seals)	Abgene, Epsom
Pipetten, steril (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen RNase-, DNase-frei (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Kisker, Steinfurt
Platten, Thermo fast 384-Well	Abgene, Epsom
Platten, Thermo fast 96-Well	Abgene, Epsom
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Spitzen für Multipipette plus (Combitip plus 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Spitzen für Multipipette plus, verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg
Streifen (8er) für PCR-Platten	Abgene, Epsom
Tupfer (aus Zellstoff)	Hartmann, Heidenheim

2.1.4 Wiederverwendete Materialien

Rahmen und Septen für Sequenzierer	Applied Biosystems, Darmstadt
Sequenzierplatten	Applied Biosystems, Darmstadt
Stauschlauch zur Blutentnahme	Prämeta, Troisdorf

2.1.5 Kits und Assays

EZ1 DNA Blood Kit zur DNA-Isolierung aus Gesamtblut, vollautomatisch	Qiagen, Hilden
Multiplex PCR Kit	Qiagen, Hilden
SNaPshot_-Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt

2.1.6 Lösungen und Puffer

Probenpuffer für Gelelektrophorese	Bromphenolblau Ficoll Puffer Typ 400 Gelöst in 1x TBE-Puffer	0,25 % (w/v) 15 % (w/v)
TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer) als 10x konzentriert hergestellt, mit HCl auf pH 8,3 eingestellt	Tris Borsäure EDTA	1 M 1 M 30 mM

2.1.7 Primersequenzen

Zur Analyse mehrerer SNPs gleichzeitig wurden untenstehende Gruppierungen (Pool A-D) durchgeführt.

Pool A

Primer ID	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
11B1_PCR10	CAAAGGGGTAAAAGGACACCATAGG	GAATAGGCAGCAACCATTGGATAAG
11B1_PCR9	TAAGCCACCCAGTTTGTGGTAATTT	ATGTCCCATCTCCCCAAATACTTA
11B2_PCR1	GTGCTGGCCTCAGACACCTGAAGTT	TCTTTCCCAGCTCTGACCTTCATTC
PPRG_PCR	GTGAGCGCCCAGATGAGATTACTTT	TGAAGGGCTTGATATCAAAGGAGTG
11B1_PCR8-1	TGTCCCCCTTCCTGTGTCCAAGTGT	ACCTGCTCCCCCTGGTTGCAACACC

Pool B

Primer ID	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
AMELXY	CACTGCTGCTTCTCTGGTTGGAGTCA	CACGGGGATGATTTGGTGGTGCAGC
11B2_PCR2	GTGGGGGCGCGGCGGAGAGCTGAG	GCGGGGGCGGGGCTTTCCTTCACTT
11B2_PCR3	CCCTCGCCTAAGGCTGCTGCAGATG	GCTCGAGCGCGCCAAGAAATTCAC

Pool C

Primer ID	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
11B1_PCR10	CAAAGGGGTAAAAGGACACCATAGG	GAATAGGCAGCAACCATTGGATAAG
11H1_PCT2	GACATGGCTAGTTCAGTGAAGTTC	CAAGCAGAGGTAAGTGCATGTATTC
11H1_PCT6	CTTGGCACCTATTGAGCAAGTTTCT	GAAGGCCTCCTGGACAGCCTCATAG
AMELXY	CACTGCTGCTTCTCTGGTTGGAGTCA	CACGGGGATGATTTGGTGGTGCAGC

Pool D

Primer ID	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
11H1_PCT1	TATGCCTAGTTCTTTGTATTACATA	CAAATGCCTAATGACCTTTTACAA
11H1_PCT2	GACATGGCTAGTTCAGTGAAGTTC	CAAGCAGAGGTAAGTGCATGTATTC
11H1_PCT3	ATCTTGGCAGCTGTGAGTTCTGAGG	TCCCCAGCCAAGTGGAACTGTAATC
11H1_PCT4	GGTGCAAGGAGTGGAGTGAAGTGT	ATCTGGGGAAATCACTGGGATTGAG
11H1_PCT5	GCTGCCTGCTTAGGAGGTTGTAGAA	TCAAGCACCCCTGTGTTTTTTAAAC
11H1_PCT6	CTTGGCACCTATTGAGCAAGTTTCT	GAAGGCCTCCTGGACAGCCTCATAG
11H1_PCT7	TTGCCTCTGAAAGCTGTTGAAATAC	TTAGCTCCAGGGAATCAGAGATGAA
11H1_PCT8	TGACCCCACTCCAATCATAAGAGAA	TCTGATGGCCTTGACACTTTTGAAG

Tabelle 4 Primersequenzen der Multiplex-PCR für Pool A-D. Alle Sequenzen sind vom 5'- 3'-Ende angegeben. Die Primer ID enthält das zugehörige Gen und eine internen PCR-Nummer. AMELXY für Geschlechtsbestimmung.

Pool A

rs-Nummer	Gen	Sequenz
A12P_rs1805192	<i>PPAGR</i>	GACACAGAGATGCCATTCTGG
rs6499129	<i>HSD11B2</i>	gatcgatcgatAGCAGGTCTGAGAGGTTCC
rs932335	<i>HSD11B1</i>	gatcgatcgatGGTTAATAAGGCTGCCCATTTCA
rs12059226	<i>HSD11B1</i>	gatcgaGAAGAATACTGACCAAATGTTTTATAAAATGT
rs1000283	<i>HSD11B1</i>	gatcgatcgatcgatcgatcgGGACAGTGTCCCTCTGTGTAA

Pool B

rs-Nummer	Gen	Sequenz
AMELX/Y		GGGCTCGTAACCATAGGAAG
rs56057545	<i>HSD11B2</i>	gatcgaCGCAGGGCAGGTGCTCCCC
rs13306425	<i>HSD11B2</i>	gatcgatcgaCAAACCAGGAGACATTAGCM
rs45483293	<i>HSD11B2</i>	gatcgatcgatcgaAAAGTGGCCACTGGAGACAG
rs45598932	<i>HSD11B2</i>	gatcgatcgatcgatcgaTCTCCAAGCACCGCCCGCA
rs5479	<i>HSD11B2</i>	gatcgatcgatcgatcgatcgatTGCCACTGACCGGTGCTGGT

Pool C

rs-Nummer	Gen	Sequenz
AMELX/Y		GGGCTCGTAACCATAGGAAG
rs760951	<i>HSD11B1</i>	gatcgatcATGGCATTTTGGAGGCAACT
rs932335	<i>HSD11B1</i>	gatcgatcgatGGTTAATAAGGCTGCCCATTTCA
rs11811440	<i>HSD11B1</i>	gatcgatcgatcgaATCTAAATTTATTTATCTCACACAAAACAC

Pool D

rs-Nummer	Gen	Sequenz
rs17317033	<i>HSD11B1</i>	TTACTAAAATGTGCACCTGT
rs846906	<i>HSD11B1</i>	gatcGAGCACAGCCTAATCACTGTG
rs760951	<i>HSD11B1</i>	gatcgatcATGGCATTTTGGAGGCAACT
rs10863782	<i>HSD11B1</i>	gatcgatcgatcgaGGTGGGGGTGGCAAGA
rs3753519	<i>HSD11B1</i>	gatcgGAAACAGTTGTATTTTCATTTTGTCTTTATTA
rs13306421	<i>HSD11B1</i>	gatcgatcgatcgatcgatcCTTCAGGCCAGCTCCCTGTG
rs12059226	<i>HSD11B1</i>	gatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcTGAACAAAACCAAATCAAGG
rs11811440	<i>HSD11B1</i>	gatcgatcgatcgaATCTAAATTTATTTATCTCACACAAAACAC

Tabelle 5 SNaPshot™-Primer für Pool A-D. Jede SNP ist als eindeutige rs-Nummer mit zugehörigem Gen und Sequenz des Primers (Richtung 5'-3'-Ende) angegeben. Die Position nach dem 3'-Ende entspricht dem zu bestimmenden Polymorphismus.

2.2 Methoden

2.2.1 Probandenrekrutierung

In dieser Studie wurden die Daten von insgesamt 453 Probanden, welche sich über einen Zeitraum von sechseinhalb Jahre (1998-2005) in der Universität Göttingen vorstellten, retrospektiv analysiert. Die Patienten wurden zur Abklärung einer OPO von ihrem Hausarzt, Orthopäden, Internisten oder Gynäkologen in die endokrinologische Ambulanz überwiesen. Die dortige Anamnese- und Befunderhebung erfolgte nach einem standardisierten Ablauf, um möglichst viele vergleichbare Gründe und Ausprägungen der OPO zu erfassen. Die Genehmigung des Ethikantrags erfolgte am 17.02.2007 (Aktenzeichen 17/2/07)

2.2.2 Klinische Messdaten

Alle klinischen Messdaten wurden bereits in der Vorgängerstudie „Risikofaktoren der Osteoporose unter besonderer Berücksichtigung von Homocystein, supprimiertem Cortisol und Laktose-Intoleranz“ von Sarayi Bozkurt aus dem Jahre 2007 erhoben (Bozkurt 2007).

Osteodensitometrie

Die Knochendichtemessung erfolgte mittels *Dual-X-Ray*-(Photonen)-Absorptiometrie (DXA). Die Mineraldichte des Knochens (BMD) wurde sowohl für die Lendenwirbelsäule (Wirbel L1-L4) als auch für den Femurhals in g/cm² mit einer Präzision von < 0,01 g/cm² gemessen. Um einen direkten Vergleich des Patienten mit einem gesunden Referenzkollektives zu ermöglichen, wurde der T-Score und der Z-Score benutzt. Der T-Score beschreibt die Abweichung vom gleichgeschlechtlichen 30-jährigen Gesunden und dient somit zum alterslosen Vergleich mit der *peak bone mass*. Der Z-Score bezieht sich auf gesunde Frauen bzw. Männer gleichen Alters.

Formeln: $Z\text{-Score} = P\text{-MAM} / SDAM$

$T\text{-Score} = P\text{-MY} / SDY$

P = Gemessener Patientenwert; MAM = Mittelwert einer Vergleichsgruppe gleichen Alters und Geschlechts; SDAM = Standardabweichung vom Mittelwert gleichen Alters und Geschlechts; MY = Mittelwert einer Vergleichsgruppe von gesunden 30-40-jährigen Patienten; SDY = Standardabweichung vom Mittelwert gesunder 30-40-jähriger Patienten

Dexamethason-Hemmtest

Der Dexamethason-Hemmtest diente primär zum Ausschluss eines Cushing-Syndroms der Patienten. Der Test wurde als *low-dose*-Variante des Dexamethason-

Kurztestes ambulant durchgeführt. Hierbei nahmen die Patienten 2 mg Dexamethason abends um 22 Uhr ein. Am folgenden Morgen wurde ihnen zwischen 8 und 9 Uhr Blut abgenommen und aus dem Serum mittels Festphasen Chemilumineszenz-Enzym-Immunoassay (Biermann GmbH, Metra Biosystems 1988) der supprimierte Cortisolspiegel bestimmt.

2.2.3 DNA-Isolierung

Für die Genotypisierung wurde den Patienten EDTA-Blut abgenommen und bei -20 °C gelagert. Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte mittels eines automatisierten Solid-Phase-Extraktionsverfahren mit dem BioRobot EZ1 und dem Kit für DNA-Blut ($350\text{ }\mu\text{l}$) der Firma Qiagen. Aus $350\text{ }\mu\text{l}$ Vollblut konnten so $200\text{ }\mu\text{l}$ DNA-Eluat über magnetische Separation gewonnen werden. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist inzwischen eine molekularbiologische Standardmethode, die erstmals von Kary B. Mullis entwickelt wurde (Saiki et al. 1985). Mit Hilfe der PCR gelingt es einen kurzen, definierten Teil von doppelsträngigen Nukleinsäuren in-vitro zu vervielfältigen (Amplifikation > 10 Milliarden). Die Grundlage der PCR ist eine sich wiederholende Abfolge von Reaktionsschritten (z. B. 35-mal), in denen jeweils die Produkte des vorherigen Zyklus als Ausgangsstoffe dienen.

Anfangs wird die DNA-Doppelhelix durch das Aufbrechen der Wasserstoffbrücken bei ca. 95 °C in zwei antiparallele Einzelstränge getrennt (Denaturierung).

Um das Anlagern der kurzen komplementären Oligonukleotide (Primer) zu ermöglichen, wird die Temperatur auf einen Wert gesenkt, welcher ca. $5\text{-}10\text{ °C}$ niedriger als der Primerschmelzpunkt liegt (Annealing). Die Sequenz des Primerpaares (meist 20-30 Nukleotide lang, Vorwärts- und Rückwärtsprimer für jeweils einen der gegenläufigen DNA-Stränge) sorgt für die Wahl des zu amplifizierenden Genabschnittes und somit für die Spezifität der PCR.

Das 3'-Ende des Primers dient nun als Anfang für die DNA-Polymerase, welche den Strang komplementär mit freien Nukleotiden füllt (Elongation). Eine hitzebeständige Taq-Polymerase ermöglicht den bequemen Reaktionsablauf in einem Thermocycler, ohne ständig neue DNA-Polymerase hinzufügen zu müssen.

Vor dem ersten Zyklus wird die DNA für längere Zeit denaturiert, um sicherzustellen, dass nur noch Einzelstränge vorliegen. Am Ende sorgt eine 10-minütige Elongation für die Vervollständigung inkompletter Bruchstücke.

Um dem Ziel gerecht zu werden, mehrere Genbereiche unserer Probanden zu genotypisieren, bot sich das Verfahren der Multiplex-PCR an. Dabei handelt es sich um eine Variante der klassischen PCR, die es ermöglicht Amplifikationen unterschiedlicher Genbereiche in einer Reaktion durchzuführen. Voraussetzungen sind besondere Sorgfalt beim Primer-Design und möglichst der Länge nach unterschiedliche PCR-Produkte, damit diese per Gelelektrophorese differenziert werden können.

Es wurden mehrere Primer-Pools für die Multiplex-PCR etabliert, wobei auf ähnlichen GC-Gehalt der einzelnen Fragmente und auf unterschiedliche Produktlänge, zur Differenzierung auf einem Agarosegel, geachtet wurde. Um die optimalen *Annealing*-Temperaturen zu ermitteln, wurde für jeden Pool eine Multiplex-Gradient-PCR mit und ohne *Q-Solution* durchgeführt und das Ergebnis auf einem Agarosegel ausgewertet. *Q-Solution* verändert die Schmelzeigenschaften der DNA, wodurch die Ergebnisse bei hohem GC-Gehalt oder ausgeprägter Sekundärstruktur des DNA-Templates verbessert werden können. Bei der Gradient-PCR wurde eine Test-DNA zum PCR-Mix hinzugefügt und bei *Annealing*-Temperaturen zwischen 50-70 °C amplifiziert. Aufgetragen auf einem Agarosegel konnte so die Temperatur mit den stärksten Banden - und der somit optimalen Vervielfältigung - bestimmt werden. Anhand des mitgelaufenen Längenstandards konnte überprüft werden, ob alle PCR-Produkte der erwarteten Längen vorkamen.

Um die erhaltenen Genotypen nochmals mit dem Probandengeschlecht vergleichen zu können, wurde ein Primer (AMELX/Y) zur Geschlechtsbestimmung hinzugefügt.

Pool A und Pool C		Pool B	
	Menge [µl]		Menge [µl]
2x QIAGEN Master Mix	5,5	2x QIAGEN Master Mix	5,5
10x Primer Mix	1,1	5x Q-solution	2,2
H ₂ O	3,4	10x Primer Mix	1,1
		H ₂ O	1,2
<hr/>		<hr/>	
Gesamtvolume	10	Gesamtvolume	10
DNA	1	DNA	1
<u>PCR Bedingungen</u>		<u>PCR Bedingungen</u>	
95 °C	15 min	95 °C	15 min
94 °C	30 sec	94 °C	30 sec
65 °C	1 min 30 sec	67 °C	1 min 30 sec
68 °C	1 min 30 sec	68 °C	1 min 30 sec
68 °C	10 min	68 °C	10 min
	35 Zyklen		35 Zyklen
Pool D			
	Menge [µl]		
2x QIAGEN Master Mix	5,5		
10x Primer Mix	1,1		
H ₂ O	3,4		
<hr/>			
Gesamtvolume	10		
DANN	1		
<u>PCR Bedingungen</u>			
95 °C	15 min		
94 °C	30 sec		
53 °C	1 min 30 sec		
68 °C	1 min 30 sec		
68 °C	10 min		
	35 Zyklen		

Tabelle 6 Pipettierschema und Cycler-Bedingungen der Multiplex-PCRs.

PCR ID	Primer ID	Amplicon size [bp]	GC%	Primer amount in 500 µl
Pool A				
HSD11B1 -PCR8	11B1_PCR8-1_f	824	38.7	20
	11B1_PCR8-1_r	824		20
HSD11B1 -PCR9	11B1_PCR9_f	145	39.3	10
	11B1_PCR9_r	145		10
HSD11B1 -PCR10	11B1_PCR10_f	138	42.0	10
	11B1_PCR10_r	138		10
HSD11B2 -PCR1	11B2_PCR1_f	204	43.1	10
	11B2_PCR1_r	204		10
PPARg_PCR	PPRG_PCR_f	233	44.6	10
	PPRG_PCR_r	233		10
Pool B				
HSD11B2 -PCR2	11B2_PCR2_f	219	72.1	20
	11B2_PCR2_r	219		20
HSD11B2 -PCR3	11B2_PCR3_f	325	60.6	10
	11B2_PCR3_r	325		10
Gender	AMELXY_f	106		10
	AMELXY_r	106		10
Pool C				
HSD11B1 -PCR10	11B1_PCR10_f	138	42.0	10
	11B1_PCR10_r	138		10
HSD11B1-PCR2	11H1_PCT2_f	149	41	10
	11H1_PCT2_r	149		10
HSD11B1-PCR6	11H1_PCT6_f	233	43,7	10
	11H1_PCT6_r	233		43,7
Gender	AMELXY_f	106		10
	AMELXY_r	106		10
Pool D				
HSD11B1-PCR1	11H1_PCT1_f	105	31,4	10
	11H1_PCT1_r			10
HSD11B1-PCR2	11H1_PCT2_f	149	41	10
	11H1_PCT2_r			10
HSD11B1-PCR3	11H1_PCT3_f	174	46	10
	11H1_PCT3_r			10
HSD11B1-PCR4	11H1_PCT4_f	216	37,5	10
	11H1_PCT4_r			10
HSD11B1-PCR5	11H1_PCT5_f	230	47,3	10
	11H1_PCT5_r			10
HSD11B1-PCR6	11H1_PCT6_f	233	43,7	10
	11H1_PCT6_r			10
HSD11B1-PCR7	11H1_PCT7_f	107	43,4	10
	11H1_PCT7_r			10
HSD11B1-PCR8	11H1_PCT8_f	102	35,3	10
	11H1_PCT8_r			10

Tabelle 7 Primerpools mit Angabe der Länge der amplifizierten Fragmente, deren GC-Gehalt und der Menge (µl) in ddH₂O.

2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine leicht durchzuführende Methode zur Trennung von Nukleinsäuren. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern dabei entlang eines elektrischen Feldes zum positiven Pol. Das Polysaccharid Agarose bildet Polymere, die sich untereinander vernetzen und für die Gelierfähigkeit des Agars sorgen. Die Netzdicke ist mit der Menge der verwendeten Agarose proportional und bestimmt die Fließgeschwindigkeit der Nukleinsäuren im Trägermedium. Zur Herstellung eines 2% Agarose-Gels (für Fragmente bis max. 1 kb) wurden 50 ml TBE-Puffer mit 1 g Agarose mittels Magnetrührer vermischt und aufgeköcht bis eine schlierenfreie Flüssigkeit entstand. Nach leichter Abkühlung wurden 2,5 µl Ethidiumbromid, welches nach Einlagerung in dsDNA fluoresziert, eingemischt. Hatte die Flüssigkeit eine Temperatur von ca. 40-50 °C, wurde diese in einen Gelträger mit Kamm gegossen. Nachdem sich das Gel verfestigt hatte, wurde der Kamm entfernt und der Gelträger in die mit 0,5x TBE-Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. In die äußere Tasche wurden 5 µl eines Längenmarkers (100 bp-Leiter) gegeben. Bei einer konstanten Spannung von 120 V an der Elektrophoresekammer liefen die Proben ca. 30 min. Unter UV-Licht wurde das Gel mit dem Fluor-S™ Multilmager betrachtet. Die Auswertung erfolgte mit der Software Quantity One® S Version 4.2.1.

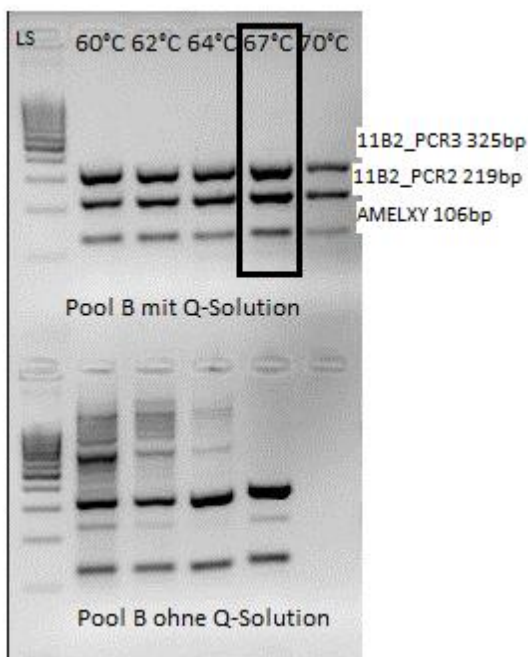


Abbildung 2 Gelfoto einer Multiplex-Gradienten-PCR von Pool B mit und ohne *Q-Solution*. Über den Spuren die jeweiligen Annealing-Temperaturen. Links wurde der Längenstandard (LS) aufgetragen. Die Beschriftung rechts gibt die Primerbezeichnung und die erwartete Fragmentlänge der jeweiligen Bande an. Optimale Bedingungen fanden sich bei 67 °C mit *Q-Solution*.

2.2.6 Genotypisierung mittels Primerextension (SNaPshot™)

Alle 15 SNPs, in den Genen *HSD11B1* und *HSD11B2* wurden mittels Primerextensionsmethode bestimmt. Deren Prinzip beruht darauf, dass ein spezifischer SNaPshot™-Primer direkt vor der zu bestimmenden SNP bindet. Im Vergleich zu einer PCR enthält der SNaPshot™-Reaktionmix keine dNTPs, sondern ddNTPs, welchen am 3'-Ende die Hydroxygruppe fehlt. Es kann sich so nur ein komplementäres Nukleotid an den Primer anheften. Die ddNTPs sind dabei mit einem jeweils unterschiedlich fluoreszierenden Farbstoff markiert.

ddNTP	Verwendeter Fluoreszenzfarbstoff	Farbe des Fluoreszenzfarbstoffes
A	dR6G	Grün
C	dTAMRA™	Schwarz
G	dr110	Blau
T	dROX™	Rot

Tabelle 8 Fluoreszenz-Markierung der ddNTPs bei SNaPshot™-Reaktion.

Die Primer sind an ihrem 5'-Ende durch Non sense-Basenabfolgen unspezifisch verlängert, wodurch eine Separation mehrerer SNPs in einem Reaktionsansatz im Sequenzierer ermöglicht wird.

Die flankierende Region des zu analysierenden Polymorphismus wird zunächst mittels PCR (hier mit Multiplex-PCR, s.o.) vervielfältigt. Die PCR-Produkte müssen vor der SNaPshot™-Reaktion von verbliebenen Primerpaaren und dNTPs gereinigt werden. Hierzu wurden die Restriktionsenzyme Exo1 (für Primer) und SAP (für dNTPs) verwendet. Pro 11 µl PCR-Produkt wurden 0,2 µl Exo1 (10 U/µl) und 2,5 µl SAP (1 U/µl) plus 0,9 µl SAP-Puffer hinzugefügt. Nach einer Stunde bei 37 °C im Inkubator, wurden die Enzyme für 15 min bei 80 °C im Thermocycler inaktiviert, damit sie bei der folgenden Reaktion nicht die ddNTPs und Primer verdauen.

Die anschließende SNaPshot™-Reaktion erfolgte im 5 µl-Maßstab in einer 384-Well-Platte. Zu 3 µl Reaktionsansatz, bestehend aus 0,5 µl SNaPshot™-Mastermix (ABI PRISM SNaPshot™-Multiplex-Kit), 0,5 µl SNaPshot™-Primerpool (Endkonzentration eines Primers 0,2 - 1,2 µM) und 2 µl ddH₂O, wurden per 8-Kanal-Pipette 2 µl des gereinigten PCR-Produktes dazugegeben. Die Reaktion erfolgte im 384-iger Thermocycler gemäß den Angaben des Herstellers. Um nicht gebundene ddNTPs aus der Reaktion zu entfernen, wurden die Reaktionsprodukte mit 1 µl einer 1:1

Mischung aus FASTAP und FASTAP-Puffer aufgereinigt. Dazu wurden die Proben eine Stunde im Inkubator bei 37 °C gelagert und anschließend das Enzym für 15 min bei 75 °C im Thermocycler inaktiviert. Dies ist notwendig, da es ansonsten schon bei Raumtemperatur zu unerwünschten Nebenreaktionen kommen kann, die bei der Analyse im Sequenzierer stören könnten.

Zur Analyse im Sequenzierer wurde 10 µl einer 1:200-Verdünnung des Längenstandards Genescan™-LIZ®120 mit HiDi-Formamid in die Wells einer Sequenzierplatte gebracht und 1 µl von der SNaPshot-Reaktion hinzugefügt. Zur Denaturierung der extendierten Primer wurden die Proben bei 95 °C für 5 min im 96-Well-Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde die Platte sofort auf Eis gestellt. Dies sollte, neben dem Formamid, die Renaturierung verhindern. Nach ca. 10 min auf dem Eis wurde die Platte in einen Träger eingespannt und zur Analyse in das Sequenziergerät gestellt. Die Auswertung erfolgte mit der Software Genescan™ Analysis Version 3.5.1. Einen schematischen Überblick über die SNaPshot™-Reaktion und die Entstehung der Signalpeaks zeigt Abbildung 3. Abbildungen 4-7 zeigen Beispiele für die Ergebnisse der Sequenzierung der jeweiligen Pools.

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden 30% der Proben stichprobenartig nochmals sequenziert und abgeglichen.

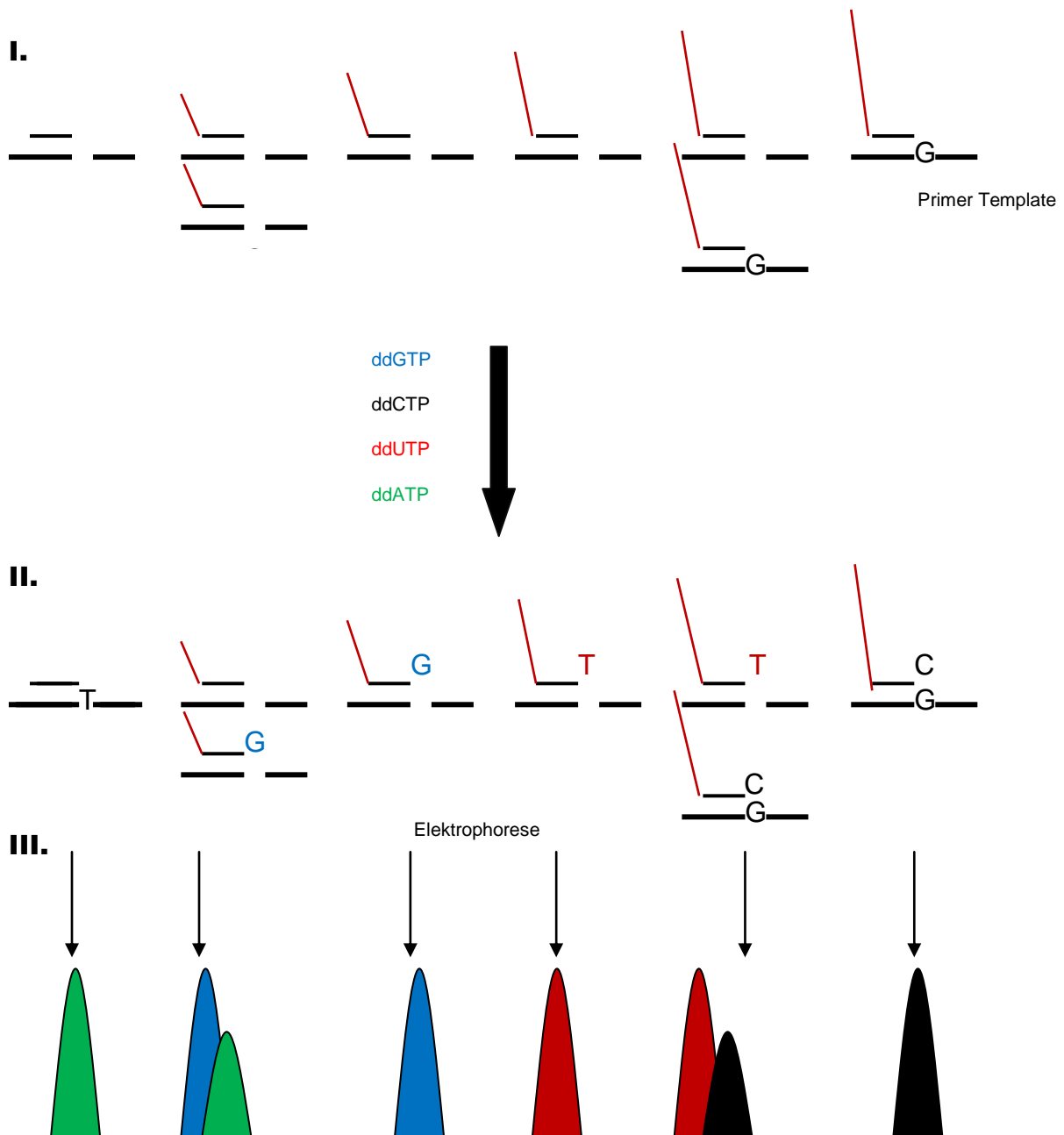


Abbildung 3 SNaPShot Multiplex Prozess Diagramm.

I. Durchführen einer PCR-Amplifikation und Anlagerung unterschiedlich lang designer Primer direkt vor der polymorphen Stelle.

II. Single Base Extension Reaktion mit den im SNaPShot Multiplex Kit enthaltenen ddNTPs.

III. Auftrennen der Fragmente und Kapillarelektrophorese zur Detektion der Single Base Extension Produkte. Liegt ein einzelner Peak gleicher Farbe vor ist der SNP-Träger homozygot. Bei zwei Peaks unterschiedlicher Farbe ist der SNP-Träger heterozygot.

Abbildung modifiziert nach ABI Application Note 2002

Primer ID	Gen	Länge	Major Allel	Minor Allel
Pool A				
A12P_rs1805192	<i>PPAGR</i>	21	C	G
rs6499129	<i>HSD11B2</i>	30	T	G
rs932335	<i>HSD11B1</i>	34	C	G
rs12059226	<i>HSD11B1</i>	38	T	C
rs1000283	<i>HSD11B1</i>	42	G	A
Pool B				
AMELX/Y		20	G	A
rs56057545	<i>HSD11B2</i>	25	C	T
rs13306425	<i>HSD11B2</i>	30	G	A
rs45483293	<i>HSD11B2</i>	34	C	T
rs45598932	<i>HSD11B2</i>	38	G	A
rs5479	<i>HSD11B2</i>	43	G	T
Pool C				
AMELX/Y		20	G	A
rs760951	<i>HSD11B1</i>	28	T	C
rs932335	<i>HSD11B1</i>	34	C	G
rs11811440	<i>HSD11B1</i>	44	C	A
Pool D				
rs17317033	<i>HSD11B1</i>	20	T	G
rs846906	<i>HSD11B1</i>	25	G	A
rs760951	<i>HSD11B1</i>	28	T	C
rs10863782	<i>HSD11B1</i>	32	G	A
rs3753519	<i>HSD11B1</i>	36	C	T
rs13306421	<i>HSD11B1</i>	40	G	A
rs11811440	<i>HSD11B1</i>	44	C	A
rs12059226	<i>HSD11B1</i>	52	A	G

Tabelle 9 SNaPshot™-Primerpools mit rs-Nummer, zugehörigem Gen, Länge der Primer und der Farbkodierung des Polymorphismus.

Pool A

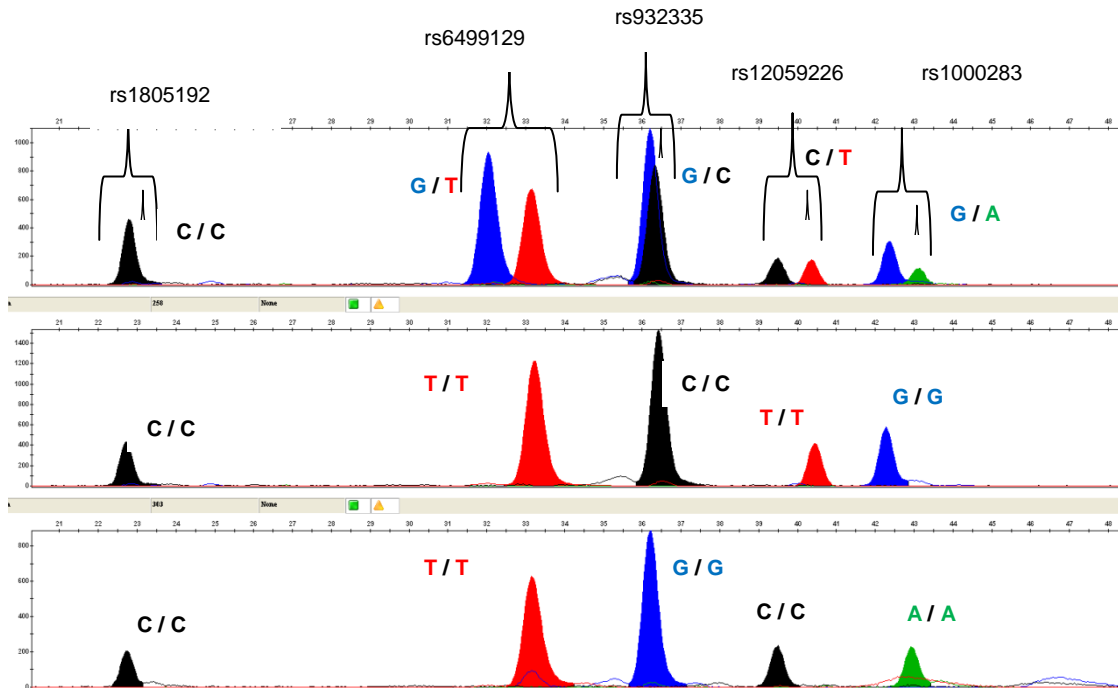


Abbildung 4 Elektropherogramm von Pool A. Untereinander jeweils die Signalpeaks der gleichen SNP. Zunehmende Primerlänge von links nach rechts. Tritt nur ein Signalpeak auf, liegt ein homozygoter Genotyp vor. Bei zwei Peaks an einer Position liegt ein heterozygoter Genotyp vor.

Pool B

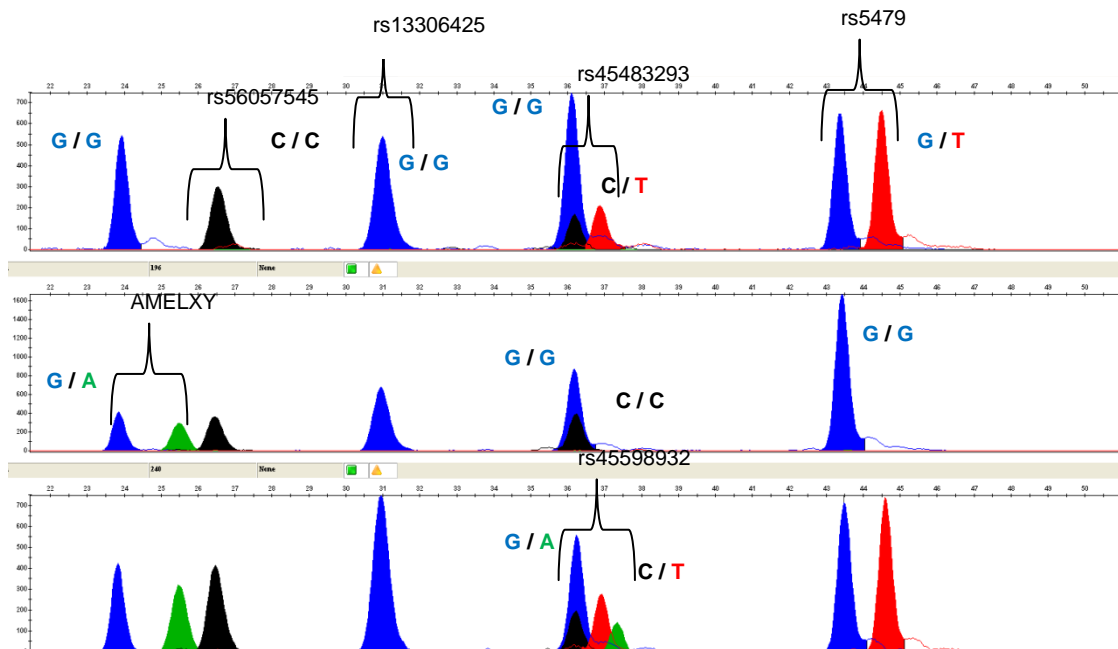


Abbildung 5 Elektropherogramm von Pool B. Ansonsten wie Abb. 4.

Pool C

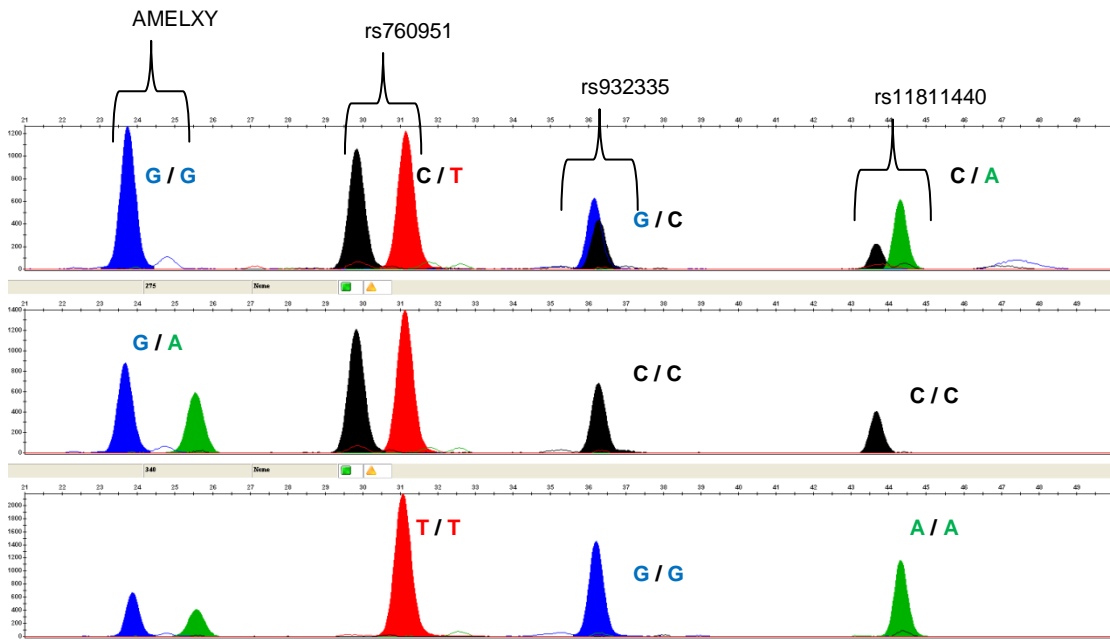


Abbildung 6 Elektropherogramm von Pool C. Ansonsten wie Abb. 4.

Pool D

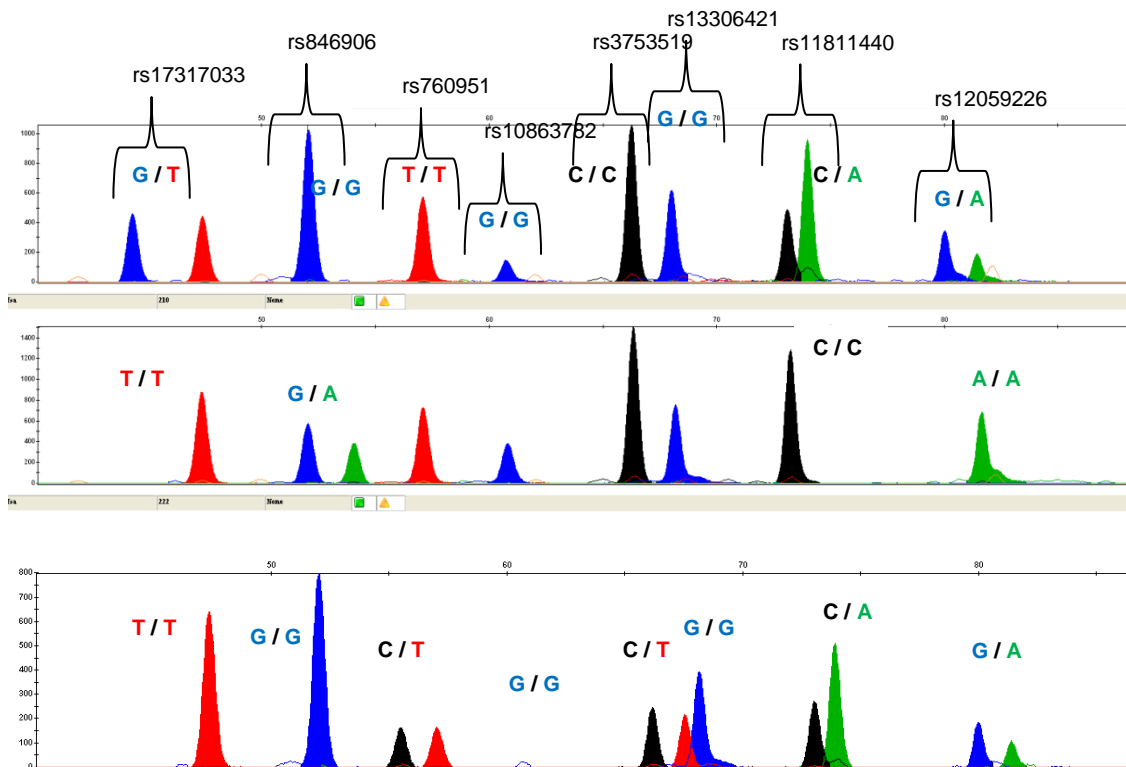


Abbildung 7 Elektropherogramm von Pool D. Ansonsten wie Abb. 4.

2.2.7 Bioinformatik

Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)

Das HWE beschreibt, dass die Häufigkeiten von homozygoten und heterozygoten Genotypen sich im Gleichgewicht befinden und sich somit nicht verändern. Ausgegangen wird hierbei von einer idealen Population, in der sich die Allelfrequenzen nicht durch Evolution ändern. Bei großen, sich im Gleichgewicht befindenden Populationen lässt sich dieses Modell annähernd auf die Realität übertragen. Die Formel lautet:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$
$$p + q = 1$$

p : relative Häufigkeit des Auftretens des Allels A
 q : relative Häufigkeit des (zu A komplementären) Allels a

Mit Hilfe des HWE kann man, wenn die Genotypen bekannt sind, die Allelfrequenz berechnen. Die Allelfrequenzen vieler SNPs sind in Datenbanken zu finden und können mit den eigenen Ergebnissen abgeglichen werden.

Linkage Disequilibriums (LD)





Zur Beschreibung des LDs, also der nicht-zufälligen Assoziation von Allelen an verschiedenen Loci, wird der Kopplungsungleichgewichtskoeffizient r^2 und Lewontin's D' verwendet. Beide geben, unter Annahme von HWE, den paarweisen Zusammenhang zwischen zwei Markern an. Korrelieren zwei SNPs vollständig miteinander, ist $r^2 = 1$. D' beschreibt die Assoziation zweier Allele als Bruchteil ihrer maximalen Assoziation ($D' = 1$, „komplettes“ LD). Beides wäre der Fall, wenn zwei SNPs denselben Ursprung haben und nicht durch Rekombination getrennt wurden. Analysiert man mehrere SNPs in unmittelbarer Nähe auf einem Gen, kann man ihre Assoziation zueinander mit beiden Parametern erfassen und sie in einem LD-Block zusammenfassen.

Haplotypblocks

Sind mehrere SNPs stark miteinander gekoppelt, bezeichnet man diese auch als Haplotypblock. Diese Methode erlaubt es, SNPs zu identifizieren, die aufgrund ihrer Kopplung Aussagen über die Allelkombinationen des Haplotypblockes zulassen, ohne die Vielzahl der anderen Polymorphismen in ihm zu bestimmen. Per Definition müssen diese *haplotyp-tagging*-SNPs in der Lage sein, mindestens 80% der häufigen Haplotypen zu beschreiben.

2.2.8 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Studie erfolgte größtenteils mit der Software PASW Statistics 18 von IBM. Die Korrelation der SNPs zu den unterschiedlichen Knochendichteparametern und dem supprimierten Cortisol erfolgte mittels Spearman- Rangkorrelation. In der explorativen Datenanalyse des ersten Kollektivs wurden alle Tests zweiseitig durchgeführt. Im zweiten Bestätigungskollektiv hingegen wurde die Spearman-Rangkorrelation einseitig berechnet. Der p-Wert drückt die Signifikanz aus und ist wie folgend verschlüsselt:

$p \leq 0,01$	sehr signifikant **	Dunkelrot	
$p \leq 0,05$	signifikant *	Rot	
$p < 0,1$	Tendenz zur Signifikanz	Gelb	
$p > 0,05$	nicht signifikant		

Um mögliche Genotypisierungsfehler oder eine Stichproben-Stratifizierung zu erkennen, wurde jede SNP-Genotypisierung auf signifikante Abweichungen (p-Wert < 0,05) vom HWE mittels Chi-Quadrat-Test geprüft.

Die beobachteten Allelfrequenzen wurden mit den erwarteten Frequenzen aus der Datenbank dbSNP abgeglichen. Mit der Software PHASE 2.1 wurden die Haplotypen der Probanden rekonstruiert. Die drei bzw. vier häufigsten Haplotypen wurden weiter für die Genotyp-Phänotyp Assoziation verwendet. Die statistischen Tests der SNPs und der Haplotypen wurden sowohl mit additiver als auch mit dominanter und rezessiver Modellannahme durchgeführt (Berechnung siehe Tab.10).

Test	Berechnung
Additiv	AA = 0 Aa = 1 aa = 2
Dominant	AA = 0 Aa , aa = 1
Rezessiv	AA , Aa = 0 aa = 1

Tabelle 10 A = häufiges Allel , a = seltenes Allel

Zur Herstellung einer LD-Karte wurde die Software Haploview 4.2 verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Population

Insgesamt konnten die Daten von 452 Patienten ausgewertet werden. Dieses Gesamtkollektiv wurde in ein exploratives Kollektiv und in ein Validierungskollektiv unterteilt. Dem anfänglich untersuchten explorativen Kollektiv wurden alle Patienten, für die ein supprimierter Cortisolwert vorlag, zugeordnet. Für die Unterteilung in OPO-Untergruppen wurden die Patienten mit einer primären OPO und diejenigen mit normalen DXA-Befunden zusammengruppiert und mit der Gruppe der sekundären OPO verglichen. Die OPO wurde als primäre Form beschrieben, wenn sich keine ätiologischen Hinweise für eine verminderte Knochendichte fanden und die Patienten jünger als 50 Jahre waren. Hierzu wurden ebenfalls Frauen, älter als 50 Jahre und ohne ätiologische Faktoren für die verminderte Knochendichte, im Sinne einer postmenopausal bedingten primären OPO gezählt. Patienten, die älter als 70 Jahre waren und keine gegensätzlichen ätiologischen Faktoren aufzeigten, wurden mit altersbedingter primärer OPO diagnostiziert. Gab es eindeutige Hinweise auf Faktoren, die die Knochendichte negativ beeinflussen, wurde diesen Patienten eine sekundäre Form der OPO zugeordnet. Die Zuordnung wurde von einer Person durchgeführt.

Das explorativ untersuchte Kollektiv bestand aus insgesamt 304 genotypisierten Patienten, davon 227 Frauen (75% Frauenanteil) und 77 Männer (25% Männeranteil). Der Anteil an postmenopausalen Frauen betrug 158 (69% der Frauen). Werte für den Dexamethason-Hemmtest lagen für 287 Proben vor. Knochendichteparameter wurden für 270 Patienten erhoben. Von den Patienten dieses Kollektivs wurden 135 als primäre OPO, 114 als sekundäre OPO und 25 als normal diagnostiziert. Das Bestätigungskollektiv bestand aus insgesamt 148 Patienten, davon 98 (66%) Frauen. Der Anteil an postmenopausalen Frauen betrug 87 (59% der Frauen). Werte für das supprimierte Cortisol lagen in diesem Kollektiv nicht vor. Knochendichteparameter wurden für 112 Patienten erhoben. Im zweiten Kollektiv hatten 43 Probanden eine primäre OPO, 62 eine sekundäre OPO und 11 wurden als gesund diagnostiziert.

Die häufigsten Ursachen für sekundäre OPO in unserem Kollektiv waren bedingt durch Endokrinopathien (15 %), durch Steroidtherapie (13 %), gastrointestinale

Erkrankungen (13 %) sowie durch Hyperkalziurie (11 %). Die Prävalenz der sekundären OPO bei Männern lag in unserem Kollektiv mit 52 % höher als bei den Frauen (44 %). Einen Überblick gibt Tabelle 11.

	Kollektiv Exploration				Kollektiv Validation				Additiv			
	Min	Max	MW	± SD	Min	Max	MW	± SD	Min	Max	MW	± SD
Frauen	227				98				325			
Männer	77				50				127			
Primäre OPO	160				54				214			
Sekundäre OPO	114				62				176			
Alter [Jahre]	16	87	58	14	18	90	54	15	16	90	57	14
YSM [Jahre]	0	40	17	11	0	40	16	11	0	40	16	11
BMI [kg/m²]	15	41	25	4	16	45	25	5	15	45	25	5
Größe [cm]	1,46	1,95	1,65	0,1	1,38	1,93	1,65	0,1	1,38	1,95	1,64	0,1
Gewicht [kg]	40	125	68	14	40	115	68	15	40	125	68	14
PDC [µg/dl]	0,2	8,1	1,4	1,1					0,2	8,1	1,4	1,1
BMD Femurhals [g/cm²]	0,2	1,0	0,7	0,1	0,5	1,0	0,7	0,1	0,2	1,0	0,7	0,1
Femurhals Z-score	-5,5	5,7	-0,6	1,1	-3,9	2,1	-1,0	1,1	-5,5	5,7	-0,7	1,1
Femurhals T-score	-6,6	3,8	-2,0	1,2	-4,4	3,5	-2,1	1,2	-6,6	3,8	-2,1	1,2
BMD Wirbelsäule [g/cm²]	0,5	1,5	0,8	0,2	0,5	1,3	0,8	0,2	0,5	1,5	0,8	0,2
Wirbelsäule Z-score	-4,4	5,2	-1,1	1,6	-4,7	3,8	-1,2	1,6	-4,7	5,2	-1,1	1,6
Wirbelsäule T-score	-5,3	3,9	-2,3	1,5	-4,9	1,7	-2,1	1,4	-5,3	3,9	-2,2	1,5

Tabelle 11 Basisdaten der Kollektive, Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD), Jahre seit Menopause (YSM), Post-Dexamethason-Cortisolwerte (PDC), *Body Mass Index* (BMI) und Knochendichtewerte.

3.2 Supprimiertes Cortisol nach Dexamethason-Hemmtest

Bereits in der Vorgängerstudie von Bozkurt et al. wurde gezeigt, dass hohe supprimierte Cortisolwerte nach Dexamethason-Hemmtest signifikant mit niedriger Knochendichteausprägung zusammenhängen (Bozkurt 2007). Wir konnten in unserem Kollektiv bestätigen, dass die Höhe der supprimierten Cortisolspiegel mit zunehmendem Alter steigt. Dazu wurden die klinischen Parameter der Knochendichte und das Alter mittels Spearman-Rangkorrelation mit den Post-Dexamethason-Cortisolwerten (PDC) verglichen. Die PDC-Werte im Gesamtkollektiv lagen zwischen 0,2 und 8,1 µg/dl. Dabei gab es eine Anzahl von Patienten bei denen das supprimierte Cortisol unterhalb des messbaren Bereiches lag. In diesem Fall wurde der Wert der untersten nachweisbaren Standardkonzentration des Messassays angegeben (<0,2 µg/dl). Der Ausschluss dieser Patienten führte teilweise zu noch besseren p-Werten in den Analysen, sodass wir für alle Korrelationen das Gesamtkollektiv benutzen konnten und weiterhin signifikante p-Werte erhielten. Hierzu ist der Zusammenhang zwischen Alter und PDC-Werten im Gesamtkollektiv in Abbildungen 8 dargestellt. Unsere Patienten zeigten dabei höhere PDC-Werte mit steigendem Alter ($n=287$, $R=0.274$, $p<10^{-5}$). Diese Korrelation zwischen Alter und PDC-Werten blieb bei Korrektur für den BMI signifikant ($p=0,002$). Der BMI alleine war dabei nicht signifikant mit den PDC-Werten assoziiert ($p=0,34$).

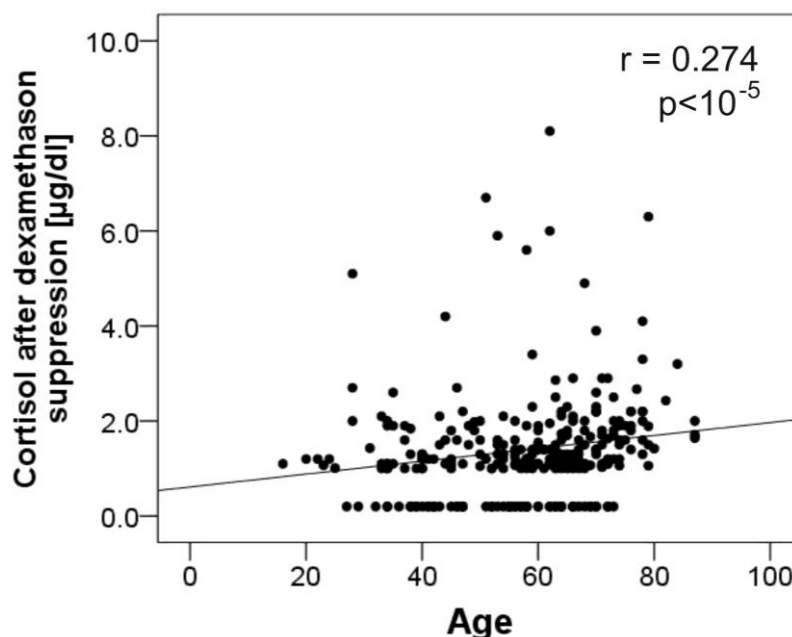


Abbildung 8 Scatterplot und Spearman-Korrelation (oben re.) zwischen PDC-Werten und Alter (Siggelkow et al. 2014).

Bei der Korrelation zwischen PDC-Werten und der Knochendichte unterteilten wir zunächst nach Geschlecht. Neben dem Gesamtkollektiv zeigte die Gruppenanalyse dabei signifikante Werte hauptsächlich am Femur bei Frauen. Je höher die PDC-Werte waren, desto niedriger zeigte sich die Knochendichte am Femur. Eine Übersicht bietet Tabelle 12.

Korrelation von supprimiertem Cortisol mit der Knochendichte beim Gesamtkollektiv									
	Alle			Frauen			Männer		
	R	p	N	R	p	n	R	p	N
WS (g/cm ²)	-,004	,947	254	-,067	,359	189	,251	,043	65
WS Z-score	,133	,037	247	,017	,816	184	,322	,010	63
WS T-score	,001	,982	256	-,089	,221	192	,265	,034	64
Femur (g/cm ²)	-,278	,000	258	-,293	,000	192	-,115	,359	66
Femur Z-score	-,030	,636	250	-,118	,109	186	,133	,296	64
Femur T-score	-,238	,000	258	-,309	,000	194	,010	,935	64

Tabelle 12 Darstellung der Rangkoeffizienten R, der p-Werte und der Fallzahl bei 2-seitiger Spearman-Rangkorrelation von supprimiertem Cortisol mit der Knochendichte beim Gesamtkollektiv an der Wirbelsäule (WS) und am Femurhals.

Im Gesamtkollektiv zeigte sich am Femur eine hochsignifikante negative Assoziation zwischen der Gesamtdichte mit der Höhe des supprimierten Cortisols ($R=-0,278$, $p<0,001$, Abb. 9).

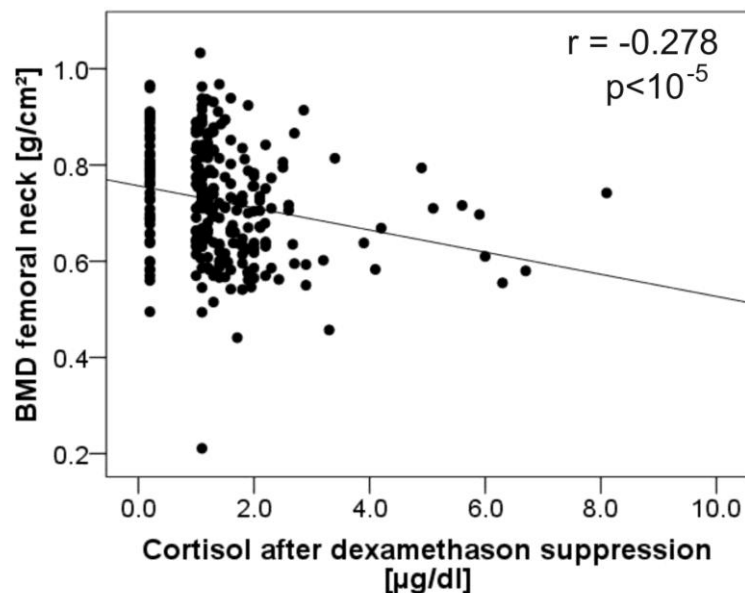


Abbildung 9 Scatterplot und Spearman-Korrelation (oben re.) zwischen der Knochendichte am Femur und den PDC-Werten im Gesamtkollektiv.

Bezüglich des T-Score war diese Korrelation ebenfalls hochsignifikant ($R=-0,238$, $p<0,001$). Beide Korrelationen sind nur bei den Frauen des Gesamtkollektives hochsignifikant und noch leicht stärker assoziiert vorzufinden als im Gesamtkollektiv (Gesamtdichte: $R=-0,293$, $p=0,001$; T-Score $R=-0,309$, $p=0,001$). Bei Männern konnten wir keine signifikante Korrelation am Femurhals finden. Hingegen fanden wir bei den Männern eine signifikant positive Korrelation zu allen drei BMD-Werten der Wirbelsäule (Gesamtdichte $p=0,043$; Z-Score $p=0,01$; T-Score $p=0,034$). Im Gesamtkollektiv zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zur BMD an der Wirbelsäule lediglich am Z-Score, im weiblichen Unterkollektiv hingegen gar nicht. Diese positive Korrelation an der Wirbelsäule würde bedeuten, dass dort bei Männern höhere supprimierte Cortisolwerte mit einer höheren Knochendichte einhergehen. Bei der Analyse der Osteoporose-Untergruppen stellte sich heraus, dass das supprimierte Cortisol bei der primären und der sekundären Osteoporose ebenfalls eine Rolle spielt. Einen Überblick bietet Tabelle 13 für Primäre OPO und Tabelle 14 für Sekundäre OPO.

	Korrelation von supprimiertem Cortisol mit der Knochendichte bei Patienten mit Prim. OPO								
	Alle			Frauen			Männer		
	R	p	n	R	p	n	R	p	N
WS (g/cm ²)	,072	,408	135	-,010	,917	107	,350	,068	28
WS Z-score	,184	,033	135	,096	,325	107	,328	,088	28
WS T-score	,038	,655	140	-,053	,577	112	,315	,102	28
Femur (g/cm ²)	-,195	,021	139	-,200	,037	109	-,130	,494	30
Femur Z-score	,136	,113	137	,099	,309	107	,149	,432	30
Femur T-score	-,147	,082	141	-,212	,025	112	,073	,705	29

Tabelle 13 Darstellung der Rangkoeffizienten R und der p-Werte bei 2-seitiger Spearman-Rangkorrelation von supprimiertem Cortisol mit der Knochendichte bei Patienten mit primärer OPO

	Korrelation von supprimiertem Cortisol mit der Knochendichte bei Patienten mit Sek. OPO								
	Alle			Frauen			Männer		
	R	p	n	R	p	n	R	p	n
WS (g/cm ²)	-,099	,336	97	-,118	,359	62	,139	,425	35
WS Z-score	,057	,591	90	-,128	,343	57	,252	,157	33
WS T-score	-,087	,402	94	-,171	,190	60	,193	,275	34
Femur (g/cm ²)	-,341	,001	96	-,358	,004	62	-,147	,406	34
Femur Z-score	-,185	,081	90	-,345	,008	58	,061	,740	32
Femur T-score	-,322	,002	94	-,387	,002	61	-,055	,759	33

Tabelle 14 Darstellung der Rangkoeffizienten R und der p-Werte bei 2-seitiger Spearman-Rangkorrelation von supprimiertem Cortisol mit der Knochendichte bei Patienten mit sekundärer OPO

Bei Patienten mit primärer OPO zeigten sich ähnliche Befunde wie im Gesamtkollektiv, allerdings weniger signifikant. Die negativen Effekte von höheren PDC-Werte auf die Knochendichte waren weiterhin am Femur im Gesamtkollektiv signifikant nachweisbar ($R=-0,195$, $p<0,05$). Dabei erneut nur signifikant in der Untergruppe der Frauen mit primärer OPO ($R=-0,20$, $p<0,05$) und nicht bei Männern. Bei den Männern mit primärer OPO zeigten sich, analog zum Kollektiv mit allen männlichen Patienten, wiederum Hinweise auf eine positive Korrelation zur Knochendichte der Wirbelsäule und den PDC-Werten ($R=0,35$, $p=0,068$). Der Z-Score an der Wirbelsäule von Patienten mit primärer OPO ist, wie im Gesamtkollektiv auch, signifikant positiv mit höheren PDC-Werten assoziiert ($R=0,184$, $p<0,05$). Im Kollektiv der sekundären OPO Patienten zeigte sich der stärkste Effekt der PDC-Werte auf alle drei Knochendichteparameter des Femurs. Im Vergleich zum Gesamtkollektiv und den Patienten mit primärer OPO waren hier die R- und p-Werte der Korrelationen zur Femurdichte trotz niedriger Fallzahlen signifikanter. Bei den Frauen mit sekundärer OPO war dieser negative Effekt der hohen PDC-Werte auf die Knochendichte am Femur am deutlichsten erkennbar (Gesamtdichte: $R=-0,358$, $p=0,001$). Bei den Männern mit sekundärer OPO zeigte sich keine relevante Korrelation.

Um den Zusammenhang der Knochendichte mit den PDC-Werten im Alter genauer zu untersuchen, führten wir obige Analysen erneut nur bei Patienten durch, die älter als 65 Jahre waren. Eine Übersicht zeigt Tabelle 15.

	Korrelation von supprimiertem Cortisol mit der Knochendichte bei Patienten Alter \geq 65								
	Alle			Frauen			Männer		
	R	p	n	R	p	n	R	p	n
WS (g/cm ²)	-,009	,927	95	-,036	,744	86	,303	,429	9
WS Z-score	,066	,531	92	,050	,651	84	,275	,509	8
WS T-score	-,011	,917	99	-,042	,691	90	,412	,271	9
Femur (g/cm ²)	-,329	,001	99	-,365	,000	91	-,108	,799	8
Femur_Z-score	-,130	,210	94	-,186	,085	87	,321	,482	7
Femur_T-score	-,311	,002	101	-,383	,000	93	,287	,490	8

Tabelle 15 Darstellung der Rangkoeffizienten R und der p-Werte bei 2-seitiger Spearman-Rangkorrelation von supprimiertem Cortisol mit der Knochendichte bei Patient Alter \geq 65 Jahre.

Passend zu unserem Ergebnis, dass die PDC-Werte mit höherem Alter steigen (vgl. Abb. 8), zeigten Frauen älter als 65 Jahre einen größeren negativen Effekt dieser auf die Knochendichte ($R=-0,365$, $p<0,0001$) und den T-Score am Femurhals ($R=-0,383$, $p<0,0001$) als das Gesamtkollektiv. Der Effekt auf den T-Score war auch im Gesamtkollektiv signifikant nachweisbar ($R=-0,309$, $p<0,0001$), allerdings mit einer niedrigeren Effektgröße. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass mit steigendem Alter höhere Cortisolspiegel einen stärkeren negativen Effekt auf die Knochendichte am Femur haben.

Fasst man zusammen, so deuten die Ergebnisse der Untergruppenanalyse an, dass erhöhte supprimierte Cortisolwerte stärkeren negativen Einfluss auf die Knochendichte am Femur im Vergleich zur Wirbelsäule haben. Das bedeutet, je höher das supprimierte Cortisol ist, desto niedriger ist die Knochendichte am Femur. Vorwiegend sind dabei Frauen betroffen, während bei Männern der Zusammenhang unklar bleibt. Probanden höheren Alters wiesen, passend zum höheren Cortisolspiegel im Alter, stärkere negative Effekt auf die BMD am Femur auf.

3.3 Genotypisierung

Auswahl der SNPs

Die Auswahl der zu analysierenden SNPs fand unter Berücksichtigung bereits beschriebener klinischer Effekte, Genbereiche mit genetischer Selektion und diese charakterisierende *tagging-SNPs* statt. Obwohl sich die meisten Polymorphismen nicht in Exonbereichen befinden, wurde bereits für viele SNP ein funktioneller Einfluss auf klinische Parameter in anderen Studien nachgewiesen (siehe Tab. 16). Insgesamt wurden im ersten Kollektiv 10 SNPs im Gen *HSD11B1*, 6 SNPs im Gen *HSD11B2* und ein SNP im Gen *PPARG* erfolgreich bestimmt.

Gen	SNP	Position	Chromosom	Lokalisation	Funktioneller Einfluss	Referenz
<i>HSD11B1</i>	rs17317033	207923249	1	Promotor		(Feigelson et al. 2008)
<i>HSD11B1</i>	rs846906	207954341	1	Promotor	Brustkrebs	(Li et al. 2010)
<i>HSD11B1</i>	rs760951	207928148	1	Promotor	Brustkrebs	(Li et al. 2010)
<i>HSD11B1</i>	rs10863782	207939213	1	Promotor		
<i>HSD11B1</i>	rs3753519	207942138	1	Promotor	BMD	(Andres 2009)
<i>HSD11B1</i>	rs13306421	207944909	1	5'UTR, affects Kosak sequence	Enzymexpression	(Malavasi et al. 2010)
<i>HSD11B1</i>	rs11811440	207949523	1	Intron 5		
<i>HSD11B1</i>	rs932335	207972357	1	Intron 5	BMD, vertebrales Frakturrisiko, Brustkrebs	(Hwang et al. 2009)
<i>HSD11B1</i>	rs12059226	207973298	1	Intron 5	Brustkrebs	(Li et al. 2010)
<i>HSD11B1</i>	rs1000283	207961284	1	Intron 5	BMD, vertebrales Frakturrisiko	(Hwang et al. 2009)
<i>HSD11B2</i>	rs56057545	66022395	16	promoter, disrupts Sp1 site	Salzsensitivität	(Alikhani-Koupaei et al. 2007)
<i>HSD11B2</i>	rs13306425	66027206	16	H147R	Essentieller Hypertonus	(Mariniello et al. 2005)
<i>HSD11B2</i>	rs45483293	66027416	16	silent cSNP	Essentieller Hypertonus	(Mariniello et al. 2005)
<i>HSD11B2</i>	rs45598932	66022312	16	promoter, disrupts NF1 site	Salzsensitivität	(Alikhani-Koupaei et al. 2007)
<i>HSD11B2</i>	rs6499129	66015752	16	far-upstream promoter	Essentieller Hypertonus	(Mariniello et al. 2005)
<i>HSD11B2</i>	rs5479	66027234	16	silent cSNP	Essentieller Hypertonus	(Mariniello et al. 2005)
<i>PPARG</i>	rs1805192	12396238	3			

Tabelle 16 Übersicht der analysierten SNPs mit relativer Lokalisation und deren Bedeutung auf den Genen sowie in der Literatur beschriebenem klinischem Einfluss.

Mittels Chi-Quadrat-Test wurde nach HWE berechnet, in wie weit die Genotyp-Verteilung mit den Allelfrequenzen übereinstimmt (siehe auch Tab. 17). Damit HWE angenommen werden konnte, sollte dieser Testwert jeweils $> 0,01$ sein (HWE p-Wert). Für alle SNPs, mit Ausnahme von rs17317033 (grenzwertig signifikant $p=0,04$), ergaben sich keine relevanten Abweichungen vom HWE. Die Häufigkeiten der selteneren Allele (*minor allele frequency*= MAF) im *HSD11B1*-Gen lagen zwischen 10-22%. Insbesondere die SNPs mit hoher MAF sind dabei vielversprechendere Kandidaten bezüglich der statistischen Analyse. Im *HSD11B2*-Gen war die MAF nur bei rs6499129 $>10\%$, ansonsten alle $<5\%$. Somit zeigten die von uns ausgewählten SNPs im *HSD11B2*-Gen geringere Variabilität als die *HSD11B1*-SNPs. Damit wird es aufgrund der niedrigeren Fallzahl schwieriger, signifikante Ergebnisse bei der statistischen Analyse zu erhalten. Die SNPs rs13306421 (*HSD11B1*), rs56057545 (*HSD11B2*), rs13306425 (*HSD11B2*) und rs1805192 (*PPARG*) stellten sich monomorph da, also ohne nachweisbaren Polymorphismus in unserem Kollektiv (MAF= 0). Deshalb wurden sie nicht weiter analysiert.

Gen	SNP	MAF, beo	MAF, erw	HWE p-Wert	Genotypverteilung			
<i>HSD11B1</i>	rs17317033	0,107	0,12	0,0432	TT=239	GT=65	GG=0	n=304
<i>HSD11B1</i>	rs846906	0,153	0,112	0,5047	GG=216	GA=83	AA=5	n=304
<i>HSD11B1</i>	rs760951	0,117	0,125	0,1885	TT=240	CT=57	CC=7	n=304
<i>HSD11B1</i>	rs10863782	0,151	0,175	0,632	GG=152	GA=51	AA=6	n=209
<i>HSD11B1</i>	rs3753519	0,097	0,11	1,0	CC=248	CT=53	TT=3	n=304
<i>HSD11B1</i>	rs13306421	0,0		-	GG=304	GA=0	AA=0	n=304
<i>HSD11B1</i>	rs11811440	0,178	0,167	1,0	CC=205	CA=90	AA=9	n=304
<i>HSD11B1</i>	rs932335	0,217	0,237	1,0	CC=186	GC=104	GG=14	n=304
<i>HSD11B1</i>	rs12059226	0,217	0,224	1,0	TT=186	CT=104	CC=14	n=304
<i>HSD11B1</i>	rs1000283	0,211	0,233	1,0	GG=189	GA=102	AA=13	n=304
<i>HSD11B2</i>	rs56057545	0,0	0,048	-	CC=304	CT=0	TT=0	n=304
<i>HSD11B2</i>	rs13306425	0,0	0,009	-	GG=304	GA=0	AA=0	n=304
<i>HSD11B2</i>	rs45483293	0,04	0,039	0,7549	CC=280	CT=22	TT=1	n=303
<i>HSD11B2</i>	rs45598932	0,033	0,024	1,0	GG=284	GA=20	AA=0	n=304
<i>HSD11B2</i>	rs6499129	0,118	0,075	1,0	TT=236	GT=64	GG=4	n=304
<i>HSD11B2</i>	rs5479	0,043	0,034	1,0	GG=277	GT=25	TT=1	n=303
<i>PPARG</i>	rs1805192	0,0	0,00	-	CC=304	CG=0	GG=0	n=304

Tabelle 17 Häufigkeitsverteilung der 17 bestimmten Genvarianten im explorativem Kollektiv. Jeder Polymorphismus als eindeutige rs-Nummer. MAF, erw = erwartete Frequenz des selteneren Allels (*minor allele frequency*), MAF, beo = beobachtete MAF. HWE p-Wert = Chi-Quadrat-Test zum Vorliegen des HWE. Die weiter analysierten SNPs sind farblich hervorgehoben.

Nach Analyse des explorativen Kollektivs, wurden aufgrund der Genotyp-Phänotyp-Assoziation und der Haplotypanalyse die SNPs rs760951, rs11811440, rs932335 ausgewählt und im Bestätigungskollektiv erneut bestimmt. Dabei ergab sich folgende Verteilung:

Gen	SNP	MAF, beo	MAF, erw	HWE p-Wert	Genotypverteilung			
HSD11B1	rs760951	0,151	0,125	0,9286	TT=108	CT=37	CC=4	n=148
HSD11B1	rs11811440	0,168	0,167	0,5707	CC=105	CA=38	AA=6	n=148
HSD11B1	rs932335	0,191	0,237	0,7144	CC=99	GC=43	GG=7	n=148

Tabelle 18 Häufigkeitsverteilung der 3 farblich markierten SNPs im Bestätigungs-Kollektiv. Ansonsten wie Tab. 17

Die für 30% der Proben durchgeführten unabhängigen Wiederholungsmessungen im jeweiligen Kollektiv ergaben keine Widersprüche.

HSD11B1

Um genauer herauszubekommen welche SNPs untereinander gekoppelt sind, erstellten wir mit der Software Haploview die unten gezeigten Linkage Disequilibriums-Karten (Abb. 10). Als Parameter hierfür dienen die r^2 -Werte und die D' -Werte. Je höher diese sind, desto stärker sind die SNPs miteinander verlinkt. Genauer zur Berechnung siehe Bioinformatik 2.2.7.

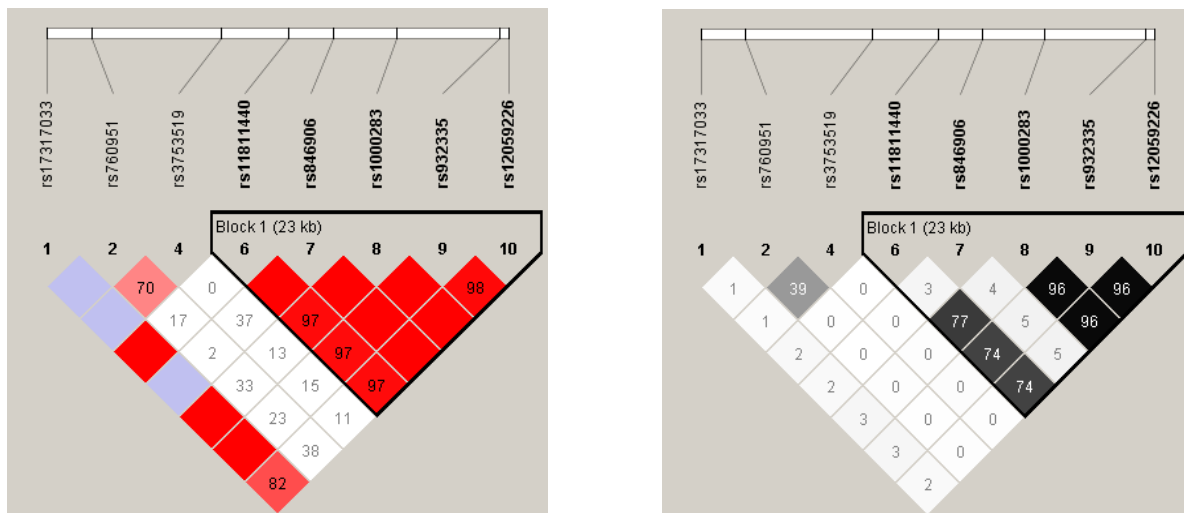


Abbildung 10 LD-Plot der analysierten SNPs im HSD11B1-Gen. Fünf SNPs können aufgrund hoher Kopplung zu einem Block zusammengefasst werden (LD-Block1). Oben die relative Lage auf der DNA zu einander. Links: angegeben sind die Kommastellen des D' -Wert (z. B. 70=0,7), dunklere Töne deuten signifikantere Allelassoziation an (bis $D'=1$, ohne Zahl im Block). Rechts: statt dem D' -Wert ist hier der r^2 -Wert angegeben, ansonsten wie links (Siggelkow et al. 2014)

Die Analyse des LDs zeigte, dass die SNPs rs11811440, rs846906, rs1000283, rs932335 und rs12059226 stark untereinander gekoppelt sind (jeweils $D' > 0,97$). Diese SNPs sind als LD-Block 1 zusammengefasst. Die r^2 -Analyse hat ergeben, dass die drei SNPs rs1000283, rs932335 und rs12059226 stark voneinander abhängig sind und es ausreicht eine von ihnen zu bestimmen um mit hoher Wahrscheinlichkeit ($r^2=0,96$) die anderen richtig zu berechnen. Für die fünf SNPs im LD-Block 1 wurden dann mit Hilfe der Software PHASE die Haplotypen der Probanden berechnet (Tab. 19). Alle Zuteilung wurden als valide betrachtet, da diese mit einer Sicherheit von $>80\%$ erfolgte. Die vier häufigsten Haplotypen wurden bei der Genotyp-Phänotyp-Assoziation weiter verwendet.

	rs11811440_A	rs846906_A	rs1000283_A	rs932335_G	rs12059226_C	Frequenz
HT1	C	G	G	C	T	0,623
HT2	A	G	A	G	C	0,174
HT3	C	A	G	C	T	0,152
HT4	C	G	A	G	C	0,036

Tabelle 19 Die vier häufigsten Haplotypen (HT) im HSD11B1-LD-Block mit ihrer Frequenz. Farblich markiert sind die SNPs die im Validierungskollektiv wieder bestimmt wurden.

HSD11B2

Die vier im Gesamtkollektiv polymorphen SNPs im *HSD11B2*-Gen wurden ebenfalls mit Hilfe der Software Haploview und PHASE in Hinsicht auf LD und Haplotypen analysiert. Hierbei zeigte sich eine Kopplung von rs5479 und rs45483293 ($D'=0,95$, $r^2=0,84$). Da sich bei der Korrelation der vier SNPs und der vier häufigsten Haplotypen keine eindeutigen Hinweise auf deren direkten Einfluss auf die Knochendichteparameter oder auf das supprimierte Cortisol ergaben, wurde sie nicht in der Validierungsstudie berücksichtigt.

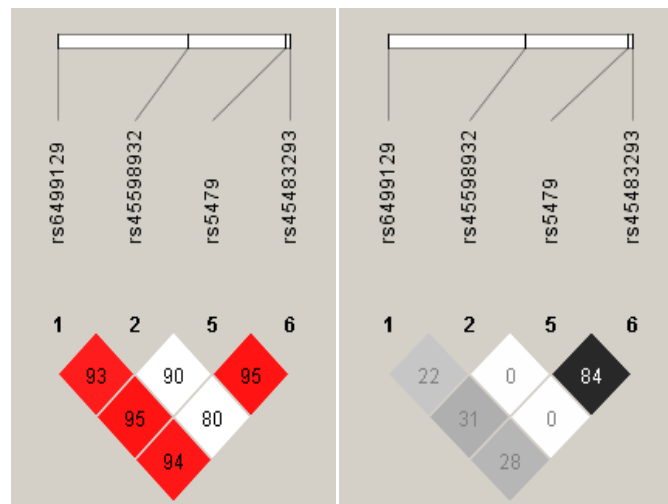


Abbildung 11 LD-Plot der analysierten SNPs im HSD11B2-Gen. Ansonsten wie Abb. 10

	rs6499129_G	rs45598932_A	rs5479_T	rs45483293_T	Frequenz
HT1	T	G	G	C	0.879
HT2	G	G	G	C	0.042
HT3	G	G	T	T	0.037
HT4	G	A	G	C	0.031

Tabelle 20 Die vier häufigsten Haplotypen (HT) im HSD11B2-Gen mit ihrer Frequenz.

3.4 Phänotyp-Genotyp-Assoziation

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit ist auf das Aufzeigen möglicher Assoziationen zwischen Polymorphismen im Cortisolstoffwechsel und deren Einfluss auf den supprimierten Cortisolwert und auf die Knochendichteparameter gerichtet. Daher wurden zunächst alle untersuchten Genvarianten auf mögliche Assoziation mit den klinischen Phänotypen im 304 Probanden umfassenden Kollektiv explorativ ausgewertet. Drei der 10 SNPs im *HSD11B1*-Gen (rs760951, rs11811440, rs932335) wurden, aufgrund ihrer Korrelation sowohl zur BMD als auch zu den PDC-Werten, ausgewählt und im Validierungskollektiv (n=148) erneut analysiert. Für *HSD11B2* fanden sich keine relevanten SNPs die mit den PDC-Werten oder den Parametern der Knochendichte korrelierten. Hier sind nur die ebenfalls in der Bestätigungsanalyse untersuchten Polymorphismen dargestellt.

Supprimiertes Cortisol

Aus dem *HSD11B1*-LD-Block im Intron 5 korrelierten die SNPs rs11811440 (R=-0,128; p= 0,03), rs932335 (R=-0,135; p= 0,02) und rs1000283 (R=-0,125; p= 0,03) mit den PDC-Werten bei allen Patienten. Probanden mit dem Minor-Allel für SNP rs11811440 wiesen im Vergleich zum Wildtyp (CC) niedrigere Cortisolspiegel auf (Abb.12). Der Effekt ist bei homozygoten Trägern des Allels (AA) ausgeprägter als bei heterozygoten (CA). Gleiches gilt für die SNPs rs1000283 und rs932335. Ein Vergleich der PDC-Werte nach Genotyp zeigt Tab. 21 und Abb. 12. Für SNP rs11811440 beispielsweise nehmen die mittleren PDC-Werte von 1,47 µg/dl bei CC-Trägern, über 1,25 µg/dl bei CA-Trägern, auf bis zu 0,93 µg/dl bei AA-Trägern ab.

SNP	Genotyp mit Mittelwert und Standardfehler der PDC-Werte (µg/dl)		
rs11811440	CC 1,47 ± 0,08	CA 1,25 ± 0,11	AA 0,93 ± 0,19
rs932335	CC 1,48 ± 0,08	GC 1,31 ± 0,10	GG 0,86 ± 0,14
rs1000283	GG 1,47 ± 0,08	GA 1,31 ± 0,11	AA 0,85 ± 0,16

Tabelle 21 SNPs und deren Mittelwerte des supp. Cortisol unterteilt nach Genotypen.

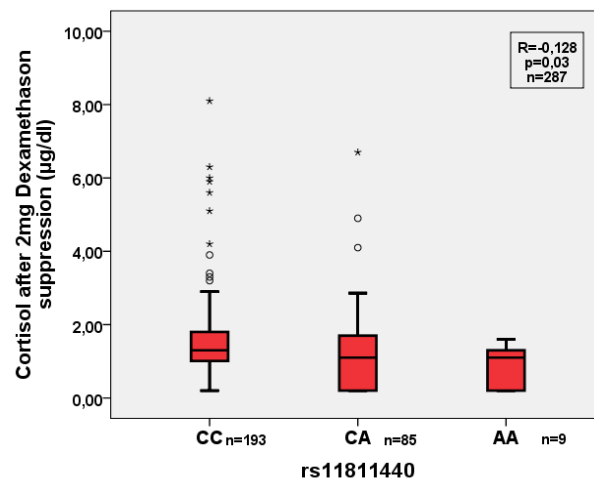


Abbildung 12 Boxplot und Spearman-Korrelation (oben re.) zwischen supp. Cortisol und SNPs mit der jeweiligen Genotypverteilung (Siggelkow et al. 2014).

Korrelation zu den Knochendichteparametern

Von den SNPs aus dem LD-Block im *HSD11B1*-Gen zeigte rs11811440 bei den meisten Tests die beste Korrelation zu den klinischen Parametern. Die Ergebnisse der SNP rs932335, welche ebenfalls im zweiten Kollektiv validiert wurden, waren sehr ähnlich zu denen der vorherigen SNP. Aufgrund dessen und der Kopplung der SNPs, soll hier die Auswertung von rs11811440 repräsentativ die Polymorphismen im Intron 5 beleuchten. Alle Ergebnisse hier sind aus dem Gesamtkollektiv berechnet, wurden aber vorher unabhängig in den beiden Unterkollektiven bestätigt.

Unserer Ergebnisse zeigen, dass rs11811440 negativ mit dem supprimierten Cortisol und positiv mit der BMD an der Wirbelsäule und am Femurhals korreliert. Träger des AA-Genotyps dieser SNP wiesen sowohl höhere PDC-Werte als auch niedrigere Knochendichte an der Wirbelsäule und am Femur auf. Diese Effekte von rs11811440 blieben nach Korrektur für Geschlecht, Alter, BMI und Osteoporoseform signifikant (Tab. 22). Damit sind der rs11811440-Genotyp, Alter, BMI und Osteoporoseform, nicht aber das Geschlecht, unabhängige Indikatoren für die Knochendichte an der Wirbelsäule. Zusätzlich wurden die Calcium- und 25(OH)-Vitamin-D3-Spiegel in Hinblick auf die rs11811440-Genotypen untersucht. Dabei zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang, sodass der Effekt der SNP auf die Knochendichte nicht durch Calcium- oder Vitamin-D-Spiegel zu erklären ist (siehe auch Abb. 15).

Parameter	β	p
Geschlecht	-0,012	0,82
Alter [Jahre]	-0,123	0,03
BMI [kg/m ²]	0,270	5,2x10 ⁻⁷
Osteoporoseform [Primäre oder Sekundäre]	-0,274	1,2x10 ⁻⁷
rs11811440-Genotyp [Anzahl der variablen Allele]	0,178	3,7x10 ⁻⁴

Tabelle 22 Multiple Regressionsanalyse der Effekte genetischer und klinischer Parameter auf die BMD der Wirbelsäule. β = standardisierter Koeffizient ; p = p-Wert

An der Wirbelsäule korreliert die Gesamtdichte ($R=0,166$ $p=0,001$) und der T-Score ($R=0,11$ $p=0,03$) signifikant mit dem Genotyp von rs11811440. Die Mittelwerte der Knochendichte an der Wirbelsäule nehmen dabei mit Anzahl der A-Allele von $0,81\pm 0,01$ g/cm² bei CC-Trägern, über $0,86\pm 0,01$ g/cm² bei CA-Trägern, auf $0,89\pm 0,04$ g/cm² bei AA-Trägern zu ($p<0,001$; vgl. Abb.13).

Am Femur zeigte rs11811440 eine signifikante positive Assoziation zur Gesamtdichte ($R=0,170$ $p=0,001$), zum Z-Score ($R=0,137$ $p=0,008$) und zum T-Score ($R=0,149$ $p=0,004$). Die Mittelwerte der Knochendichte am Femurhals nehmen dabei mit Anzahl der A-Allele von $0,70 \pm 0,11$ g/cm² bei CC-Trägern und bei CA-Trägern, auf $0,82 \pm 0,12$ g/cm² bei AA-Trägern zu ($p<0,001$; vgl. Abb.13).

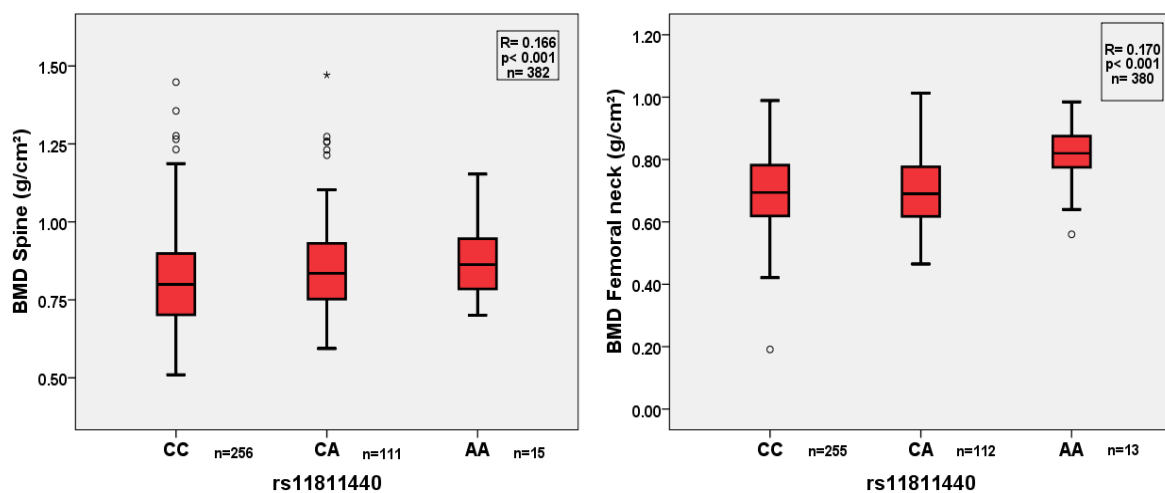


Abbildung 13 Boxplot und Spearman-Korrelation (oben re.) zwischen BMD an der WS (links), am Femur (rechts) und SNP mit der jeweiligen Genotypverteilung im Gesamtkollektiv

In unserem Kollektiv fanden sich von 452 Patienten 109 mit Wirbelkörperfrakturen und 80 Patienten mit peripheren Frakturen. Einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Genotyp von rs11811440 und der Häufigkeit von Frakturen konnten wir nicht nachweisen. Wir fanden lediglich einen leichten Trend bezüglich abnehmender Frequenz von Wirbelsäulenfrakturen mit steigender Anzahl von A-Allelen. Von 254 CC-Trägern wiesen dabei 58 eine Fraktur an der Wirbelsäule auf (22,8%), bei homozygoten AA-Trägern lag die Frequenz bei 14,3% (2 Frakturen von 14 Patienten) (siehe auch Abb. 15). Die Trennschärfe dieser Ergebnisse ist allerdings mit 18% bei Wirbelkörperfrakturen und 5% bei peripheren Frakturen bei einem Typ-1 Fehler von 0,05 zu gering um daraus Schlussfolgerungen zu ziehen.

Bei der Analyse der Untergruppen fiel auf, dass bei Männern (n=107) kaum relevante Assoziationen zur BMD zu finden waren und die größere Untergruppe der Frauen (n=275) im Vergleich zum Gesamtkollektiv durchgängig stärkere und signifikantere Korrelationen aufzeigte. Einen Überblick über die Korrelationsanalyse der Untergruppen für rs11811440 zeigt Tabelle 23.

	rs11811440											
	DXA WS			WS T-Score			DXA Femur			Femur T-Score		
	R	p	n	R	p	n	R	p	n	R	p	n
Alle	,166	,001	382	,111	,030	382	,170	,001	380	,149	,004	380
Alle älter 65	,292	,001	116	,179	,025	120	,157	,044	120	,156	,043	122
Frauen	,205	,001	275	,144	,017	276	,133	,028	274	,134	,026	276
Frauen älter 65	,285	,002	101	,183	,031	105	,098	,160	106	,153	,057	108
Primäre OPO	,198	,027	124	,172	,052	128	,089	,319	126	,081	,363	126
Primäre OPO älter 65	,236	,030	64	,153	,108	67	,024	,426	65	,020	,435	67
Sekundäre OPO	,251	,010	104	,195	,047	104	,050	,671	75	,117	,238	103
Sekundäre OPO älter 65	,458	,001	40	,340	,016	40	,200	,106	41	,229	,075	41

Tabelle 23 Darstellung der Rangkoeffizienten R, der p-Werte und der Fallzahl bei 2-seitiger Spearman Rangkorrelation vom rs11811440-Genotyp mit den Knochendichteparametern der analysierten Untergruppen.

Ein weiterer Faktor, der das Ausmaß der Korrelation erhöhte, war die Unterteilung zwischen sekundärer und primärer Ursache für die OPO. Dabei zeigten Patienten mit sekundärer OPO einen stärkeren Einfluss ($R=0,251$) des rs11811440-Genotyps auf die Knochendichte an der Wirbelsäule als Patienten mit primärer OPO ($R=0,198$) oder das Gesamtkollektiv ($R=0,166$). In Abbildung 14 ist der Vergleich der Untergruppen grafisch anhand der Höhe der Korrelationskoeffizienten zur DXA der Wirbelsäule dargestellt.

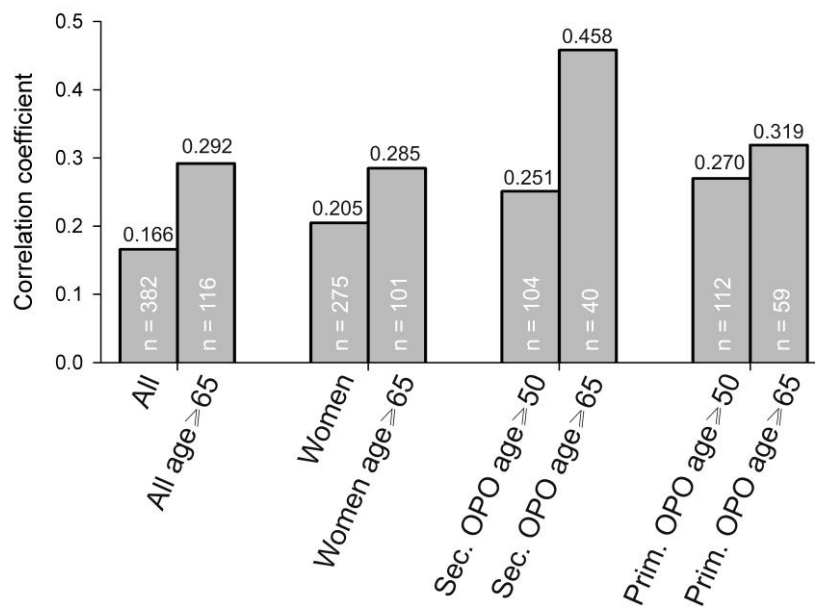


Abbildung 14 Dargestellt sind die Korrelationskoeffizienten R der SNP mit der BMD an der WS der jeweiligen Untergruppen. Alle p-Werte <0,05 (Siggelkow et al. 2014).

Im Hinblick auf den Einfluss der Polymorphismen im *HSD11B1*-Gen auf die Knochendichte bei älteren Teilnehmern konnten wir bei der DXA der WS einen stärkeren Effekt bei Patienten im Alter über 65 Jahre feststellen ($R=0,292$; $p<0,001$). Insbesondere Probanden mit sekundärer OPO im Alter über 65 Jahre zeigten die stärkste Assoziation der SNP rs11811440 zur DXA WS ($R=0,458$; $p=0,001$) aller Untergruppen. Auch der Vergleich des mittleren T-Score zeigte eine deutliche Zunahme des Einflusses der SNP mit steigendem Alter. Die Höhe des Einflusses der Genotypen von rs11811440 auf die Knochendichte der Wirbelsäule bei älteren Patienten ist in Abbildung 15 anhand des Median des T-Score visualisiert. Patienten im Alter über 65 Jahre, welche homozygot für das seltenere Allel A waren, wiesen im Vergleich zu den Patienten mit dem Genotyp CC einen um ca. 0,8 höheren T-Score auf (Abb. 15 B). Diese Differenz betrug bei allen Probanden des Kollektivs lediglich 0,3 (Abb. 15 A). Lagen zusätzliche Risikofaktoren, wie bei einer sekundären OPO vor, betrug die Differenz des T-Score bereits ca. 2,5 (Abb. 15 C). Der Einfluss des rs11811440-Genotyps auf die Knochendichte am Femurhals zeigte ebenfalls signifikante Unterschiede im Median des T-Score. Zwischen CC-Trägern und AA-Trägern im Gesamtkollektiv ergab sich dabei ein Unterschied von 1,0 (Abb. 15 D). Bei Patienten im Alter über 65 Jahre erhöhte sich diese Differenz auf 1,6 (Abb. 15 E).

Aufgrund der niedrigen Fallzahl ist dies allerdings nur als Trend zu betrachten. Weiterhin zeigt Abb. 15 die Anzahl und Prozentzahl der Wirbelsäulenfrakturen (A-C) und der peripheren Frakturen (D-E) in den jeweiligen Untergruppen. Zusätzlich sind die Serumspiegel für Calcium und 25(OH)-Vitamin-D3 abgebildet.

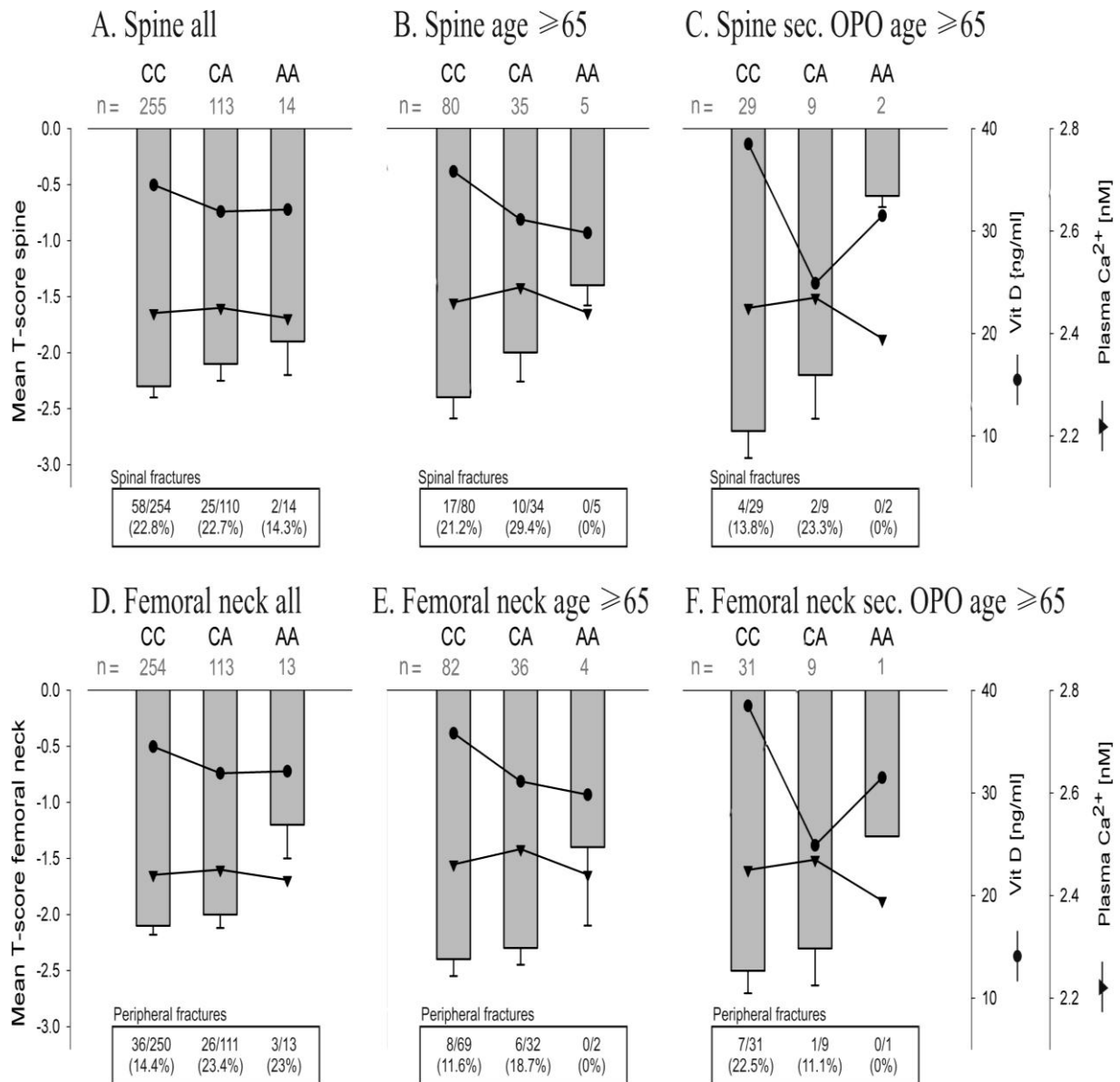


Abbildung 15 Unterschiede im T-Score, Ca²⁺ und Vit.-D-Spiegel sowie Frakturrate an Wirbelsäule (A-C) und Femurhals (D-E) der rs11811440-Genotypen im Gesamtkollektiv (A,D) und bei Probanden älter 65 Jahre ohne sekundäre OPO (B,E) und mit sekundärer OPO (C,F). Die Anzahl der Patienten mit Fraktur ist dabei extra unterhalb der Graphen angeben, da nicht für alle T-Score-Werte auch Frakturdaten vorlagen (n, oberhalb der Graphen) (Siggelkow et al. 2014).

Neben der Analyse der einzelnen SNPs, die für rs11811440 repräsentativ dargestellt wurde, führten wir ebenfalls eine Analyse der häufigen Haplotypen durch. Der Unterschied liegt dabei darin, dass sich der Haplotyp aus mehreren SNPs zusammensetzt und so den kombinierten Einfluss dieser auf die Knochendichte widerspiegelt.

Der Haplotyp *HSD11B1* HT1 war dabei in unserem Kollektiv der häufigste Haplotyp mit einer Frequenz von ca. 62%. HT1 korreliert bei allen Patienten negativ zur DXA an der Wirbelsäule ($R=-0,142$; $p=0,019$; $n=269$) und am Femur ($R=-0,132$; $p=0,031$; $n=269$). Bezüglich rs11811440 ist HT1 dabei passenderweise aus dem C-Allel aufgebaut. Dieses führte in der Einzelanalyse ebenfalls zu einem negativen Einfluss auf die Knochendichte.

Der mit 17% zweithäufigste Haplotyp *HSD11B1* HT2 hingegen weist das A-Allel von rs11811440 auf. Dieser scheint wiederum, wie bei der einzelnen SNP, einen protektiven Einfluss auf die Knochendichte zu haben und korreliert bei allen Patienten positiv zur DXA WS ($R=0,137$; $p=0,022$; $n=270$) und zur DXA Femur ($R=0,144$; $p=0,018$; $n=270$). Dies konnte im Validierungskollektiv separat bestätigt werden (DXA WS $R=0,202$ $p=0,016$ $n=112$; DXA Femur $R=0,170$ $p=0,039$ $n=109$).

Da die Ergebnisse der Haplotyp-Analyse verglichen mit der einzelnen SNP keine weiteren Aufschlüsse zu bringen schienen, soll hier auf eine genauere Auswertung verzichtet werden.

Abgesehen von den gekoppelten SNPs im Intron 5 des *HSD11B1*-Genes haben wir einige Kandidaten SNPs aus dem Promotorbereich analysiert. Von den analysierten Polymorphismen im Promotorbereich von *HSD11B1* zeigte rs760951 am ehesten einen relevanten Einfluss auf die Knochendichte. Die SNP korreliert negativ mit der DXA der WS ($R=-0,117$ $p=0,023$ $n=382$). Ebenfalls konnten wir einen Zusammenhang mit der DXA und dem T-Score am Femur feststellen (DXA: $R=0,124$ $p=0,016$ $n=380$; T-Score: $R=0,121$ $p=0,018$ $n=380$). Probanden, die homozygot das Minor-Allel C tragen, wiesen einen niedrigeren mittleren T-Score am Femur ($-2,6 \pm 1,1$) auf als der TT-Genotyp ($-2,3 \pm 1,1$). Einen signifikanten Einfluss auf das supprimierte Cortisol konnten wir nicht nachweisen.

4 Diskussion

Glucocorticoide beeinflussen den Knochenstoffwechsel, und erhöhte Cortisolspiegel tragen zur Osteoporoseentstehung bei. Es gibt deutliche Unterschiede zwischen Individuen bezüglich des physiologischen Cortisolstoffwechsels, und in dieser Studie an 452 Osteoporosepatienten untersuchten wir, inwieweit sich dies auf die Knochendichte und auf das Frakturrisiko auswirkt. Die Enzyme 11 β HSD1 und 11 β HSD2, die intrazellulär Glucocorticoide aktivieren und inaktivieren, spielen dabei eine Schlüsselrolle. Funktionelle Genpolymorphismen in diesen Enzymen könnten somit einen pathophysiologischen Einfluss auf die Osteoporoseentstehung haben und teilweise die individuelle Sensitivität des Knochens auf Glucocorticoide erklären. Zusätzlich gibt es Ähnlichkeiten zwischen Veränderungen im Knochen durch Glucocorticoide und denen, die im höheren Alter auftreten. In Osteoblasten von älteren Menschen wird das Enzym 11 β HSD1 stärker exprimiert, sodass ihm eine wichtige Rolle bei der Entstehung der senilen Osteoporose zukommen könnte (Cooper et al. 2002). Um diesen Fragen auf den Grund zu gehen, führten wir Genanalysen bei unseren Probanden durch und korrelierten diese mit den klinischen Parametern des Cortisolstoffwechsels und der Knochendichte. Unsere Ergebnisse zeigen, dass höhere Cortisolverfügbarkeit zu niedrigerer Knochendichte führt und 11 β HSD1 dabei als lokaler Aktivator eine wichtige Schnittstelle in diesem Mechanismus ist, welcher gerade im Alter eine zunehmende Rolle spielt.

Eines der Ziele dieser Studie war es, zunächst zu untersuchen, inwieweit der physiologische Cortisolstoffwechsel Einfluss auf die Genese einer Osteoporose hat. Als Messparameter für den Cortisolstoffwechsel dienten uns Dexamethason-supprimierte Cortisolspiegel, die laut unserer Hypothese negativ mit der Knochendichte zusammenhängen müssten. Bei der Korrelation von Knochenparametern mit den physiologischen Cortisolspiegeln ist die zirkadiane Rhythmik des Cortisolstoffwechsels ein Problem bei ambulanten Patienten, die zu verschiedenen Zeiten am Tag in der Ambulanz vorstellig werden. In dem hier vorgestellten Kollektiv wurde ein 2 mg Dexamethason-Hemmtest durchgeführt, um ein Cushing-Syndrom auszuschließen. Dexamethason sorgt für eine Suppression der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA) und somit für den Abfall der Cortisolkonzentration im Serum. Die Messung des Serumcortisols um 8

Uhr am nächsten Morgen nach 0,5-2 mg Dexamethason abends um 22-23 Uhr gilt als akzeptierter Screeningtest für endogenen Hypercortisolismus und weist eine hohe diagnostische Sicherheit auf (Makras et al. 2006). Damit wurde bei allen Patienten morgens um 8 Uhr die Laborprobe zu Bestimmung des supprimierten Cortisols gewonnen. In anderen Studien wird der Dexamethason-Hemmtest zumeist mit 1 mg durchgeführt, was im Vergleich mit unseren Daten vermutlich zu einem weniger stark supprimierten Cortisolwert und möglicherweise zu höherer Sensitivität führen könnte (Chiodini et al. 2007). Andere Autoren sehen einen gravierender dosisabhängigen Unterschied aber als eher unwahrscheinlich, da eine maximale Suppression für 1mg und 2 mg Dosen vermutet wird (Pasquali et al. 2002). Eine andere im Folgende zitierte Studie von Kann et al verwendete einen mit 3 mg noch höher dosierten Dexamethason-Hemmtest und zeigte dabei ebenso Unterschiede in der Cortisolsekretion zwischen Gesunden und Patienten mit primärer OPO (Kann et al. 2001).

In unserer Studie zeigten nur 21% der Patienten eine vollständige Suppression des Cortisols nach Dexamethason (Werte $<0.2 \mu\text{g/dl}$). Die übrigen Patienten wiesen stark unterschiedliche PDC-Werte (zwischen 1 und $8 \mu\text{g/dl}$) auf. Ein klinisches Cushing Syndrom ist dabei ausgeschlossen worden. Diese unvollständige Suppression der Cortisolproduktion nach Dexamethason bei Osteoporosepatienten wurde bereits in einigen Studien beobachtet (Chiodini et al. 2007; Kann et al. 2001; Pasquali et al. 2002; Stewart et al. 1999). Zum Vergleich zeigten in einer Studie von Kann et al. mit dem 3 mg-Dexamethason-Hemmtest 12 von 78 Osteoporosepatienten PDC-Werte von bis zu $6,6 \mu\text{g/dl}$ (Kann et al. 2001). Wie genau die individuelle Höhe der supprimierten Cortisolwerte zustande kommt, ist bis jetzt noch nicht ausreichend geklärt. Einflussfaktoren könnten dabei unterschiedliche Dexamethasonabsorption und -metabolismus, Sensitivität der HPA oder auch unterschiedlicher peripherer Cortisolstoffwechsel sein. Zu den individuellen Faktoren, die die Werte dieses Testes beeinflussen, zählen dabei Metabolisierungsstörungen des Dexamethasons, Medikamente, psychische Erkrankungen, Stress, Alkoholismus, Hypothyreose und chronisches Nierenversagen (Barzon et al. 2001; Borcharding et al. 1992; Jubiz et al. 1970; Kapcala et al. 1984; Putignano et al. 1998; Tiller et al. 1988). Weiterhin scheinen auch das Geschlecht und Übergewicht einen Einfluss auf die supprimierten Cortisolwerte zu haben. In der Studie von Pasquali et al. wiesen Männer nach oraler Gabe, unabhängig vom BMI, höhere Plasma-Dexamethasonspiegel als Frauen auf.

Übergewichtige Frauen hatten im Vergleich zu normgewichtigen Frauen signifikant höhere Plasma-Dexamethasonspiegel. Der dosisabhängige Anstieg der Dexamethasonkonzentration im Plasma scheint bei normgewichtigen Männern höher als bei normgewichtigen Frauen zu sein, während bei Übergewichtigen kein signifikanter Geschlechtsunterschied bestand. Bei allen Untergruppen dieser Studie war jedoch ein eindeutiger Einfluss dieser Plasma-Dexamethasonspiegel auf die prozentualen Veränderungen der Serum-Cortisol- und ACTH-Spiegel nachweisbar (Pasquali et al. 2002). Wir konnten in unserer Studie ebenfalls belegen, dass neben den oben genannten Faktoren auch das Alter eine Rolle spielt. Die Höhe der supprimierten Cortisolwerte nahm dabei mit steigendem Alter unserer Patienten zu. Neben diesen individuellen Faktoren, die die Höhe des supprimierten Cortisols beeinflussen, sind lokale Regulationsmechanismen beteiligt. Der Effekt des Dexamethasons auf den supprimierten Cortisolspiegel wird dabei über Glucocorticoidrezeptoren im Hypothalamus und in der Nebennierenrinde vermittelt, sodass ein Einfluss des Glucocorticoidrezeptors oder auch der lokalen Cortisolspiegel denkbar wäre (Pasquali et al. 2002). Der Erklärungsansatz über lokale Cortisolspiegel führt dabei wieder in Richtung des Enzyms 11β HSD1. Es wurde bereits gezeigt, dass 11β HSD1 nach der Suppression der HPA durch Dexamethason aktiv bleibt (Diederich et al. 2011) und somit Einfluss auf die supprimierten Cortisolspiegel über die periphere Synthese nehmen kann.

Einige Studien beschreiben, dass die periphere Cortisol synthese trotz unterdrückter Hypophyse nachts oder auch in Situationen erhöhten Bedarfs, wie zum Beispiel Stress, weiterhin maßgeblich durch 11β HSD1 reguliert wird (Quinkler et al. 2001; Stewart 1996). Dies geschieht dabei unabhängig von den systemischen Cortisolspiegeln (Tomlinson et al. 2004).

Zusammenfassend würde dies also dafür sprechen, dass die Cortisol synthese durch 11β HSD1 in peripheren Geweben wie Leber, Fett und Knochen, die Cortisolwerte im Blut unabhängig vom ACTH beeinflusst.

Unsere Analyse der supprimierten Cortisolspiegel bestätigte, dass der *HSD11B1*-Genotyp einen Einfluss auf deren Höhe bei Osteoporosepatienten hat. Um nun zunächst eine Verbindung von der individuell unterschiedlichen Höhe der supprimierten Cortisolspiegel zur Osteoporose zu ziehen, untersuchten wir die Korrelation zur Knochendichte.

Wir konnten in unserer Studie bestätigen, dass höhere supprimierte Cortisolwerte mit niedrigerer Knochendichte einhergehen. Einen signifikanten direkten Einfluss der Cortisolwerte auf die Frakturrate konnten wir in unserem Kollektiv jedoch nicht nachweisen. Andere Studien zeigen, dass ein erhöhter supprimierter Cortisolwert negative Auswirkungen auf die Knochendichte hat und eine Osteoporose begünstigt. In einer Studie mit 3 mg Dexamethason-Hemmtest wurde gezeigt, dass postmenopausale Frauen mit primärer vertebraler Osteoporose höhere supprimierte Cortisolspiegel aufwiesen als Patienten ohne Osteoporose. In diesem Kollektiv wurde dann bei 15% der Osteoporosepatienten sogar ein subklinischer Hypercortisolismus diagnostiziert (Kann et al. 2001). In den vorgestellten Daten waren Patienten mit einer pathologischen Cortisolerhöhung bereits ausgeschlossen. Zu einem ähnlichen Ergebnisse kommt eine Studie über Frauen mit subklinischen Hypercortisolismus aufgrund eines Nebenniereninzidentaloms. Diese wiesen im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv niedrigere Knochendichtewerte am Femur und der Wirbelsäule auf (Torlontano et al. 1999).

Die Beurteilung der Knochendichte der Osteoporosepatienten wird neben der individuellen Gesamtdichte (DXA), welche sich nur bedingt mit Referenzgruppen vergleichen lässt, anhand des T-Score und des Z-Score durchgeführt. Beide vergleichen die gemessene Knochendichte mit Werten von gesunden Referenzgruppen um ein erhöhtes Frakturrisiko beurteilen zu können, wobei der Z-Score mit einer gleichaltrigen Gruppe vergleicht und der T-Score mit einer Gruppe ca. 30-jähriger Frauen, die die höchste Knochendichte im Lebensverlauf aufweisen (Kanis 1997). Da der Z-Score alterskorrigiert ist, eignet er sich gut um beispielsweise Faktoren wie postmenopausalen Status und physiologischen Knochenverlust im Alter auszublenden (Moyad 2003). Bei der klinischen Beurteilung des individuellen Frakturrisikos spielen diese Faktoren aber eine wichtige Rolle, sodass sich eine Beurteilung anhand des T-Score und der WHO Definition durch diesen in der Praxis und den meisten Studien etabliert hat (Blake und Fogelman 2007). Eine Abnahme des T-Score um eine Standardabweichung (-1 als Wert) ist dabei annähernd gleichbedeutend mit einer um 10-15% erniedrigten Knochendichte und einem etwa verdoppelten Frakturrisiko (Kanis 1997). Bezüglich unserer Analyse der Veränderungen der Knochendichte durch Glucocorticoide im Zusammenhang mit höherem Alter ist deshalb der T-Score der geeignetere Maßstab.

Generell weisen die Veränderungen am Knochen durch ein erhöhtes PDC-Level Ähnlichkeiten mit denen eines subklinischen oder manifesten Cushing-Syndroms sowie denen durch exogenen Glucocorticoide auf (Sartorio et al. 1998; Tauchmanova et al. 2001; Torlontano et al. 1999). Der durch Glucocorticoide verursachte Knochenverlust betrifft den trabekulären Knochen stärker als den kortikalen, vermutlich aufgrund des größeren Oberflächen-Volumen-Verhältnis da der Knochenumbau hierbei hauptsächlich an der Oberfläche stattfindet. Patienten mit endogenen Hypercortisolismus scheinen deshalb zunächst deutlicheren Knochenverlust an der hauptsächlich aus trabekulärem Knochen bestehenden Wirbelsäule als am Femurhals, der größtenteils kortikale Anteile hat, zu zeigen (Chiodini et al. 1998; Di Somma et al. 1998; Hermus et al. 1995). Auf lange Sicht hingegen führt erhöhte Glucocorticoidverfügbarkeit allerdings zu einem Knochenverlust an allen Lokalisationen, wobei Frakturen an der Wirbelsäule im Krankheitsverlauf schneller auftreten als Hüftfrakturen (Maldague et al. 1984). Neben der reinen Höhe eines endogenen Hypercortisolismus scheint, wie bei exogenen Glucocorticoiden auch, die Dauer dieses Zustandes ein wichtiger Faktor für das Ausmaß des Knochenverlustes zu sein (Tauchmanova et al. 2001).

In unserem Kollektiv konnten wir einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem supprimierten Cortisol und der Knochendichte am Femur bei allen Probanden feststellen. Gesamtdichte und T-Score am Femur waren umso niedriger je höher die supprimierten Cortisolspiegel gemessen wurden. Differenziert man zwischen Geschlechtern zeigt sich, dass dieser statistische Zusammenhang wohl hauptsächlich durch die größere Untergruppe der Frauen zustande kommt. Bei den 25% Männern in unsere Studie konnten wir keinen signifikanten Zusammenhang der Cortisolspiegel mit der Knochendichte am Femur feststellen, während bei Frauen die Korrelation im Vergleich zum Gesamtkollektiv höher lag.

An der Wirbelsäule hingegen konnten wir hauptsächlich bei den Männern einen signifikanten Zusammenhang zum supprimierten Cortisol finden. Ein höherer Wert beim supprimierten Cortisol führte zu einer höheren Gesamtdichte des Knochens an der Wirbelsäule, wobei passend dazu der T-Score und der Z-Score ebenfalls signifikant positivere Werte zeigten. Im Gesamtkollektiv war lediglich der Z-Score signifikant assoziiert, wobei die Signifikanz vermutlich durch die Männer im Kollektiv zustande kommt. Bei Frauen hingegen konnten wir keinen signifikanten

Zusammenhang zwischen dem supprimierten Cortisol und den Knochendichteparametern an der Wirbelsäule finden. Ganz ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie von Reynolds et al. in der die Cortisolsekretion im Zusammenhang mit der Knochendichte bei 150 gesunden Probanden im Alter zwischen 61 und 73 Jahre über einen Zeitraum von 4 Jahre untersucht wurde (Reynolds et al. 2005). Hierbei fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Spitzen-Plasma-Cortisolwerten und einem verstärktem Knochenverlust an der Wirbelsäule nur bei den Männern, während sich bei den Frauen ein Zusammenhang mit verstärktem Knochenverlust und niedrigerer Gesamtdichte nur am Femurhals feststellen ließ. Einen Zusammenhang mit den supprimierten Cortisolwerten fand diese Studie im Vergleich zu unserer allerdings nicht, wobei dort der Suppressionstest mit 0,25 mg Dexamethason durchgeführt wurde. Dies lässt vermuten, dass bei Frauen an der Wirbelsäule andere Faktoren - wie zum Beispiel der Östrogenmangel in der Postmenopause - größeren Einfluss auf die Knochendichte haben als die relativ erhöhten supprimierten Cortisolspiegel. Andere Studien die hier einen Zusammenhang fanden, zeigten Gruppenvergleiche zwischen gesunden Frauen und Frauen mit Osteoporose und keine Korrelationsdaten zwischen den Parametern (Chiodini et al. 2007; Kann et al. 2001; Torlontano et al. 1999). In diesen Studien waren die supprimierten Cortisolspiegel in der Gruppe mit Wirbelkörperfrakturen am höchsten (Chiodini et al. 2007; Kann et al. 2001). Es gibt jedoch andere Untersuchungen die zeigen, dass die Wirbelkörperfrakturrate nicht mit der Knochendichte der Patienten mit oraler Glucocorticoidtherapie korreliert und noch andere Faktoren involviert sein müssen (Van Staa et al. 2003). Ebenso in einer anderen Studie hatten Patienten unter Glucocorticoidtherapie im Vergleich zu Patienten ohne Glucocorticoideinnahme häufiger Frakturen, obwohl die Knochendichte in beiden Gruppen gleich war (Stockbrugger et al. 2002). Die mittels DXA bestimmte Knochendichte muss also nicht zwangsläufig verändert sein, damit es zu Frakturen aufgrund von Glucocorticoideffekten kommt. Ein weiterer Faktor der die fehlende Signifikanz bei Frauen an der Wirbelsäule erklären könnte, ist der alters- und geschlechtsabhängige Unterschied bei trabekulärer und kortikaler Knochendichte, Knochenmasse und geometrischer Verteilung. Es wurde beschrieben, dass die kortikale Knochendichte bei Frauen im Vergleich zu Männern dreimal stärker mit dem Alter linear abnimmt (Christiansen et al. 1993). Der trabekuläre Knochen bei Frauen reagiert sehr sensitiv auf Östrogenmangel und

möglicherweise spielt der physiologische Cortisolstoffwechsel eine untergeordnete Rolle an der Wirbelsäule bei Frauen. Weiterhin wurde bei Mäusen mit gestörtem endogenen Glucocorticoidsignalweg gezeigt, dass die Knochenstruktur, das Knochenwachstum und die Knochenstärke bei männlichen und weiblichen Tieren variieren (Sher et al. 2004). Zusammen mit den Einflüssen des Geschlechts auf den supprimierten Cortisolspiegel, zeigen diese Daten Anhaltspunkte die unsere unterschiedlichen Ergebnisse bei Männern und Frauen erklären könnten.

Wir konnten beobachten, dass der Zusammenhang zwischen Knochendichte und supprimiertem Cortisol bei Patienten mit sekundärer Osteoporose stärker signifikant ist als bei Patienten mit primärer Osteoporose. Zusätzliche Risikofaktoren scheinen also den negativen Einfluss des Cortisols auf den Knochen zu verstärken.

Unsere Daten zeigten außerdem eine höhere Korrelation zwischen den supprimierten Cortisolspiegeln und der Knochendichte am Femur bei älteren Frauen als beim Gesamtkollektiv. Der Effekt höherer physiologischer Cortisolspiegel scheint also im Alter wichtiger zu werden. Für die erhöhte Frakturrate im Alter trägt der Östrogenmangel bei Frauen einen Teil der Verantwortung, ein anderer scheint die altersabhängige niedrigere Knochenbildung zu sein. Ein Effekt, der über die erniedrigte Osteoblastenfunktion vermittelt wird (Brockstedt et al. 1993; Clarke et al. 1996; Martinez et al. 1999). Die negative Wirkung von Glucocorticoiden auf die Osteoblastenfunktion und damit auf die Entstehung einer Osteoporose wurde hinreichend nachgewiesen (Dempster 1989; Weinstein et al. 1998). Ebenso weisen die Veränderungen in der Knochenhistomorphometrie im höheren Alter Ähnlichkeiten mit denen aufgrund erhöhter Glucocorticoidverfügbarkeit auf (Dalle Carbonare et al. 2001). Es scheint allerdings so, dass der Anstieg der zirkulierenden mittleren Glucocorticoidspiegel im höheren Alter nicht als alleinige Erklärung ausreicht (Cooper et al. 2002; Van Cauter et al. 1996). Eine Erklärung hierfür könnte die erhöhte lokale Synthese von Cortisol im Osteoblasten geben. Diese ist maßgeblich durch 11 β HSD1 reguliert. In unserer Studie zeigte sich, dass die Höhe des supprimierten Cortisols mit zunehmendem Alter steigt. Die Aktivität und die Expression von 11 β HSD1 steigt ebenfalls im Alter (Cooper et al. 2002), was ein Einfluss von 11 β HSD1 auf die supprimierten Cortisolspiegel nahe legt.

11 β HSD1 bietet also sowohl für die individuelle Höhe des supprimierten Cortisols als auch für den steigenden Effekt dieses Parameters auf die Knochendichte im Alter einen Erklärungsansatz.

Um nun den Einfluss der Enzyme 11 β HSD1 und 11 β HSD2 auf den Knochenstoffwechsel zu untersuchen, haben wir insgesamt 10 Polymorphismen im *HSD11B1*-Gen und 6 Polymorphismen im *HSD11B2*-Gen erfolgreich analysiert. Nach der Analyse dieser Single-Nukleotid-Polymorphismen in einem explorativen Kollektiv, bestätigten wir die Assoziation der Genotypen mit den klinischen Parametern bei 3 SNPs im *HSD11B1*-Gen in einem unabhängigen Kontrollkollektiv. Durch diese Untersuchung können wir Aussagen darüber treffen, ob und wie sich die unterschiedlichen Genotypen auf den Phänotyp auswirken. Zusätzlich deutet ein Zusammenhang des *HSD11B1*-Genotyps mit den klinischen Parametern des Knochen- und Cortisolstoffwechsels den Einfluss des Enzyms auf diese Vorgänge an.

Bei den untersuchten SNPs in *HSD11B2* konnten wir keine durchgängig signifikante Korrelation zur Knochendichte oder zum supprimierten Cortisol feststellen. Für die ausgewählten SNPs wurden durchaus bereits Einflüsse auf andere Krankheitsbilder wie essentieller Hypertonus und Salzsensitivität des Blutdruckes beschrieben (Alikhani-Koupaei et al. 2007; Mariniello et al. 2005). Für die SNPs rs56057545 und rs45598932 im Promoterbereich von *HSD11B2* fand sich beispielsweise ein funktioneller Einfluss auf die Expression des Enzyms (Alikhani-Koupaei et al. 2007). Die Hauptaktivität von 11 β HSD2 findet in der Niere statt, und in der Literatur finden sich Anhaltspunkte dafür, dass 11 β HSD2 nur einen geringen Einfluss auf den Knochen hat. Im Knochen wird *HSD11B2* lediglich in Osteoblasten und auf niedrigem Level exprimiert (Cooper et al. 2000). Unsere Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass 11 β HSD2 im Knochen nur eine geringe Rolle spielt und 11 β HSD1 das wichtigere Enzym in diesem Zusammenhang ist.

Von den im *HSD11B1*-Gen analysierten SNPs fanden wir für eine SNP im Promotorbereich (rs790951) und für einen Block von fünf miteinander gekoppelten SNPs in Intron 5 (rs11811440, rs932335, rs1000283, rs12059226, rs846906) einen signifikanten Einfluss auf die Knochendichte und das supprimierte Cortisol. Probanden mit einem Genotyp, der zu höheren supprimierten Cortisolspiegeln führt,

wiesen niedrigere Knochendichtewerte auf und scheinen folglich eine hohe 11 β HSD1- Aktivität zu haben. Umgekehrt wiesen die Probanden mit einem Genotyp, der zu niedrigeren supprimierten Cortisolspiegeln führt, eine höhere Knochendichte auf. Die Haplotypanalyse der gekoppelten SNPs zeigte, dass die zwei häufigsten Haplotypen HT1(62%) und HT2 (17%) dabei gegensätzliche Auswirkungen auf die Knochendichte und das supprimierte Cortisol haben. HT2 scheint im Vergleich zu HT1 protektiven Einfluss auf die Knochendichte auszuüben und ist passend dazu mit niedrigerem supprimierten Cortisolwerten assoziiert. HT2 wird, im Vergleich zu HT1, aus den selteneren Allelen der auch einzeln assoziierten SNPs (rs11811440, rs932335, rs1000283, rs12059226) gebildet. Dabei waren die Korrelationsergebnisse von HT2 sehr ähnlich mit denen von rs11811440. Tatsächlich scheint rs11811440 von den untersuchten SNPs den signifikantesten Einfluss auf die klinischen Parameter zu haben, wobei das auch im HT2 vertretene A-Allel zu höheren Knochendichtewerten und niedrigerem supprimierten Cortisol führt. Das A-Allel kommt dabei mit einer Frequenz von ca. 17% in unserem Kollektiv aus Osteoporosepatienten vor, womit kein Unterschied zu den in der Literatur angegebenen Häufigkeiten in der europäischen Bevölkerung vorliegt.

Für die anderen gekoppelten SNPs aus Intron 5 finden sich in der Literatur ebenfalls Hinweise auf einen funktionellen Einfluss auf das Enzym, wobei rs11811440 selbst noch nicht untersucht wurde. Bezüglich des Einflusses dieser SNPs auf den Knochen liegt eine koreanische Studie mit 1300 postmenopausalen Frauen von 2009 vor, in der Hwang et al. für die SNPs rs932335 und rs1000283 einen Einfluss auf die Knochendichte am Femurhals und der Frakturrate der Wirbelkörper fanden (Hwang et al. 2009). In unserer Analyse konnten wir ebenfalls einen funktionellen Einfluss dieser SNPs bestätigen, wobei wir den Effekt auf die Knochendichte an der Wirbelsäule nachweisen konnten. In der hier durchgeführten Analyse konnte jedoch erstmals eine signifikante Korrelation der beiden SNPs auch direkt zum supprimierten Cortisol nachgewiesen werden und somit neue Informationen bezüglich der Relevanz von 11 β HSD1 für den Knochenstoffwechsel gewonnen werden. Die mit den obengenannten SNPs gekoppelte SNP rs11811440 zeigt eine dazu noch signifikantere und stärkere Korrelation sowohl zur Knochendichte am Femurhals als auch an der Wirbelsäule und dem supprimierten Cortisol. Dadurch erscheint sie als besserer genetischer Marker. Im Vergleich zur koreanischen Studie

konnten wir in unserem Kollektiv keine signifikanten Hinweise auf einen Einfluss der SNPs auf die Frakturrate der Wirbelkörper finden. Allerdings fanden wir eine Tendenz zu weniger Wirbelkörperfrakturen beim protektiven A-Allel von rs11811440, was prinzipiell auch zu der besseren Knochendichte in dieser Gruppe passt. In der koreanischen Studie wurde bei allen Probanden ein Röntgenbild angefertigt und die Frakturbeurteilung im Bereich der Wirbelsäule anhand einer 15 % Höhenreduktion im Vergleich zum Vorbild oder 4 mm Höhenminderung in einer der gemessenen Wirbelkörperhöhen (anterior, medial, posterior) durchgeführt (Hwang et al. 2009). In unserem Kollektiv hingegen, wurde nur ein Röntgenbild bei klinischer Indikation angefertigt und eine Fraktur ab 20 % Höhenminderung definiert (Eastell et al. 1991; Melton et al. 2006). Daher erscheint das Studiendesign von Hwang et al. sensitiver für vertebrale Frakturen. Dies und die unterschiedliche Zusammensetzung des Kollektivs aus postmenopausalen koreanischen Frauen im Vergleich zu unserem, in der Anzahl der Probanden kleinerem Kollektiv aus kaukasischen Frauen und insbesondere auch zusätzlich aus Männern, erklären möglicherweise die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Wirbelkörperfrakturen. Eine direkte Analyse des Cortisolstoffwechsels der koreanischen Probanden fand nicht statt, sodass unsere Studie auch diesbezüglich neue Aspekte bezüglich der Rolle von 11 β HSD1 für den lokalen und systemischen Cortisol- und Knochenstoffwechsel aufzeigt.

Ähnlich unseren Ergebnissen bezüglich des Einflusses des supprimierten Cortisols auf die Knochendichte, lässt sich auch bei den Daten der SNP-Analysen ein deutlicher Geschlechtsunterschied finden. Die signifikanten Ergebnisse bei allen Probanden scheinen wiederum durch die größere Untergruppe der Frauen zustande zu kommen, welche durchgehend einen stärkeren Einfluss der *HSD11B1*-SNPs zeigte. Bei Männern konnten wir keine signifikanten Korrelationen diesbezüglich finden, was vermutlich zum einen an der geringen Anzahl liegen könnte, da in unserem Kollektiv das supprimierte Cortisol mit der Knochendichte an der männlichen Wirbelsäule umgekehrt im Vergleich zu den Frauen korreliert. Zum anderen wären die oben diskutierten Ergebnissen von Pasquali et al. bezüglich der geschlechtsspezifischen Unterschiede der Dexamethasonwirkung auf die Serumcortisol- und ACTH-Spiegel, eine weitere Erklärungsmöglichkeit (Pasquali et al. 2002).

Bei Frauen älter als 64 Jahre zeigte der Genotyp einen wesentlich höheren Einfluss auf die Knochendichte als beim Gesamtkollektiv. Dies war insbesondere an der Wirbelsäule der Fall. Die Expression von *HSD11B1* im Osteoblasten nimmt im Alter zu (Cooper et al. 2002), sodass ein funktioneller Polymorphismus stärker ins Gewicht fallen würde. Ebenso konnten wir einen stärkeren Effekt bei postmenopausalen Frauen im Vergleich zu prämenopausalen Frauen feststellen. Östrogen scheint keinen Einfluss auf die 11 β HSD1-Aktivität *in vitro* zu haben, was eine direkte Wirkung des postmenopausalen Östrogenmangels auf die 11 β HSD1-Funktion unwahrscheinlich erscheinen lässt (Cooper et al. 2002). Der stärkere SNP-Effekt könnte somit teilweise durch das höhere Alter der postmenopausalen Frauen erklärt werden.

Neben dem Alter scheinen allerdings auch zusätzliche Risikofaktoren für Osteoporose wie endokrine Erkrankungen, Vitamin D- und Calciummangel oder Medikamente die den Knochenmetabolismus beeinflussen, den Effekt der SNP zu potenzieren. Solche Patienten mit sekundärer Osteoporose wiesen deutlich höhere Unterschiede zwischen den Genotypen auf als Patienten denen eine primäre Osteoporose zugeordnet wurde. Ein logischer Risikofaktor wäre dabei erhöhte Glucocorticoidverfügbarkeit, wie zum Beispiel bei einem subklinischen Hypercortisolismus, der über den *fast-forward*-Mechanismus des Enzyms bei genetisch bedingter höherer Aktivität stärker ausgeprägt sein könnte. Zusätzlich gibt es Belege dafür, dass die *HSD11B1*-Expression bei entzündlichen Prozessen Interleukin-vermittelt zunimmt (Cooper et al. 2002; Kaur et al. 2010). Dies wäre gerade dann relevant, sollte die Entzündung womöglich mit Glucocorticoiden behandelt werden. Bedenkt man in diesem Zusammenhang, dass 11 β HSD1 und oben genannter *fast-forward*-Mechanismus auch durch medikamentöse Glucocorticoide aktiviert werden, könnte dieses Enzym umso interessanter für neue therapeutische Ansätze bei der Altersosteoporose und der Glucocorticoid-induzierten Osteoporose sein. Dieser Effekt zusätzlicher Risikofaktoren steigt ebenfalls mit höherem Alter an, wobei in der Gruppe von sekundären Osteoporosepatienten im Alter über 64 Jahre die SNP die deutlichsten Unterschiede zwischen den Genotypen zeigte.

Wie stark das Effektausmaß der *HSD11B1*-SNPs auf die Knochendichte in unserer Studie ist, verglichen wir anhand des T-Score. Zum Vergleich wurden in einer

umfangreichen Kandidaten-Gen Studie von Richards et al. (Richards et al. 2009) häufige genetische Varianten in 150 Genen, die mit der Pathogenese der Osteoporose in Verbindung gebracht werden, systematisch bei 19.000 Individuen evaluiert. Der Effekt der SNPs auf die Knochendichte war dabei mit 0,04 bis 0,18 T-Score Punkten pro Allel recht gering. *HSD11B1* wurde allerdings nicht untersucht. In unsere Studie, zeigten sich bei der SNP rs11811440 deutlichere Unterschiede, insbesondere zwischen den homozygoten Genotypen. Im Gesamtkollektiv wiesen Probanden mit dem protektiven AA-Genotyp eine um 0,3 T-Score Punkte höhere Knochendichte an der Wirbelsäule auf als Probanden mit dem CC-Genotyp. Am Femur betrug diese Differenz 1,0 T-Score Punkte. Noch deutlicher war der Unterschied zwischen den homozygoten Probanden im Alter über 64 Jahre, wobei die Differenz an der Wirbelsäule auf 0,8 T-Score Punkte und am Femur auf 1,5 T-Score Punkte anstieg. Zusätzliche Risikofaktoren wie bei einer sekundären Osteoporose erhöhten ebenso diesen Trend. Der Unterschied zwischen Probanden mit dem CC-Genotyp und denjenigen die den heterozygoten CA-Genotyp aufwiesen, war deutlich geringer. Liegt der Polymorphismus also nur auf einem Chromosom vor, scheint bei diesen Heterozygoten (~29 % der Probanden) die BMD durch die erniedrigte 11 β HSD1-Aktivität oder Expression nur mild beeinflusst. Bei den 3,4 % der Probanden mit dem homozygoten AA-Genotyp fand unsere Studie hingegen einen deutlicheren protektiven Einfluss auf die BMD bei vermutlich entsprechend stärkerem Einfluss der Mutation auf die 11 β HSD1-Aktivität oder Expression.

Unsere Analysen in den Untergruppen decken sich insgesamt mit den Analysen des Einflusses vom supprimierten Cortisol auf die Knochendichte, der ebenfalls im Alter und bei sekundärer Osteoporose stärker ausgeprägt war. Eine Erklärungsmöglichkeit diesbezüglich findet sich aufgrund der mit dem Alter steigenden Aktivität und Expression des 11 β HSD1-Enzyms in Osteoblasten (Cooper et al. 2002), wobei dementsprechend die von uns untersuchten Mutationen stärker zum Tragen kommen würden und sich deren protektiver Einfluss auf die BMD vermehrt verdeutlicht.

In der Zusammenfassung bestätigen unsere Ergebnisse den Einfluss von 11 β HSD1 auf die mit dem Alter steigenden intrazellulären Cortisolspiegel und deren möglicher Rolle beim altersbedingten Knochenstrukturwandel.

Neben den direkten Effekten von 11 β HSD1 auf den Knochen, beeinflusst die Expression des Enzyms im Fettgewebe den BMI (Draper et al. 2002; Rask et al. 2002), welcher indirekt auch die Knochendichte beeinflusst. Für die SNPs die Einfluss auf die Knochendichte haben, konnten wir keine Assoziation zum BMI feststellen und der Effekt der SNPs auf den Knochen blieb signifikant, egal ob bei der statistischen Analyse für BMI und Gewicht korrigiert wurde oder nicht. Dies deutet ebenfalls an, dass diese SNPs den Knochen direkt über die lokal aktiven Cortisolspiegel beeinflussen. Gleiches traf auch für die SNPs in der koreanischen Studie zu (Hwang et al. 2009).

Ein zentraler Punkt unserer Studie ist, dass die nach Dexamethason supprimierten Cortisolspiegel die Rolle von 11 β HSD1 als wichtiges Enzym im peripheren Cortisolstoffwechsel auch widerspiegeln. Nachgewiesen wurde bereits, dass 11 β HSD1 unabhängig von den zirkulierenden Cortisolspiegeln, eine wichtige Rolle für die lokal aktiven Cortisolspiegel in vielen unterschiedlichen Geweben spielt (Cooper et al. 2002; Tomlinson et al. 2004). Eine genaue Erklärung über den Einfluss der 11 β HSD1-Funktion auf Laborparameter, die den endogenen Glucocorticoidhaushalt widerspiegeln, ist durch die komplexe Regulation der HPA aber schwierig. Im Gehirn wird 11 β HSD1 in der vorderen Hypophyse, im Hypothalamus und im Hippocampus exprimiert und könnte dort überall in die HPA-Regulation eingreifen. Beim Dexamethason-Test wird die HPA durch direkte Aktivierung von GC-Rezeptoren im Hypothalamus und der Hypophyse supprimiert (Makras et al. 2006). Dieser Prozess ist prinzipiell unabhängig von der 11 β HSD1-Aktivität. Allerdings zeigen Daten mehrerer Studien, dass Dexamethason in einigen Geweben wie Leber und Knochen zu einer Hochregulation von 11 β HSD1 führen kann (Cooper et al. 2002; Diederich et al. 2002; Gathercole et al. 2013). Daraus könnte man schlussfolgern, dass der Dexamethason-Test sogar zu einem deutlicheren Unterschied zwischen den Ergebnissen der Genotypen von 11 β HSD1 führen könnte, als es die alleinigen Serumcortisolwerte vermögen. Weiterhin werden die Effekte der Aktivität von 11 β HSD1 auch von der HPA-Regulation maskiert und sind deshalb nicht durch die Analyse der Serumcortisolspiegel nachweisbar (Gathercole et al. 2013). Eine Studie mit genetisch veränderten Mäusen, die keine 11 β HSD1-Aktivität in der Leber aufwiesen, zeigte bei diesen Tieren keine Veränderung in den zirkulierenden Serumcortisolspiegeln, dafür aber eine

kompensatorische Vergrößerung der Nebennieren. Dabei wurde die periphere Corticosteroid-Synthese (das Pendant der Cortisol synthese des Menschen in der Maus) durch 11 β HSD1 in der Leber auf 40 % des Gesamthaushaltes geschätzt (Lavery et al. 2012). Einige Studien kommen zu dem Schluss, dass die periphere Cortisol synthese durch 11 β HSD1 auch beim Menschen in Situation vermehrten Bedarfs wie Stress oder dem nächtlichem Tiefpunkt der Sekretion eine wichtige Rolle spielt (Quinkler et al. 2001; Stewart 1996). Eine weitere Studie mit solchen *HSD11B1*-Knockout-Mäusen zeigte, dass die HPA-Achse eine weniger sensitive Suppression auf exogenes Cortisol aufwies (Harris et al. 2001). 11 β HSD1 würde demnach das Glucocorticoid-Feedback auf den endokrinen Regelkreis verstärken. Weiterhin wurde in einer Studie über Patienten mit polyzystischen Ovarialsyndrom von Gambineri et al. gezeigt, dass ein funktioneller Polymorphismus im *HSD11B1*-Gen (rs12086634), der zu einer niedrigeren peripheren Regeneration von Cortisol führt, mit niedrigeren morgendlichen Serumcortisolspiegeln assoziiert ist (Gambineri et al. 2006). Ausgehend davon, dass in unserer Studie der Genotyp, der zu einer niedrigeren 11 β HSD1-Funktion führt, ebenfalls zu einer stärkeren Supprimierbarkeit der HPA beiträgt, lässt vermuten, dass dies eher aufgrund von dauerhaft erniedrigten Cortisolspiegel und damit sensitiveren Reaktion auf Dexamethason der Fall sein könnte. Eine Studie von Diederich et al. unterstützt diese Annahme. Dabei wurde nachgewiesen, dass 11 β HSD1 nach Dexamethason-Suppression der HPA-Regulation weiterhin aktiv bleibt und Cortisol in peripheren Geweben zu Verfügung stellen kann (Diederich et al. 2011). Diese Daten machen deutlich, dass 11 β HSD1 eine wichtige Rolle bei den supprimierten Cortisolspiegeln inne hat. Diese Ergebnisse zeigen zusammen mit unseren Daten den Einfluss von 11 β HSD1 auf den periphereren Cortisolstoffwechsel im Knochen und das die supprimierten Cortisolspiegel diesen adäquat wiedergeben können. Es lässt sich jedoch nicht endgültig ausschließen, dass die Effekte der SNPs in *HSD11B1* auch durch die HPA- Regulation vermittelt sein könnten.

Die 11 β HSD1-Aktivität kann also sowohl peripher als auch zentral den Cortisolstoffwechsel mitbestimmen. Daher bekräftigt der Einfluss der *HSD11B1*-SNPs auf den supprimierten Cortisolspiegel den Zusammenhang zwischen diesem Enzym und einem subklinischen Hypercortisolismus.

Bei unserer Analyse der Patienten mit erhöhtem Cortisolspiegel nach Dexamethason zeigt sich eine negative Korrelation zu den Knochendichteparametern. Der Effekt der funktionellen SNPs im *HSD11B1*-Gen zeigte sich dabei sowohl an der Knochendichte als auch dazu passend gegensätzlich an dem supprimierten Cortisolspiegel. Dieser Zusammenhang bietet einen wichtigen Erklärungsansatz für den Einfluss des Enzyms 11 β HSD1 auf die endogene Cortisolregulation und deren Wirkung auf den Knochen. Die in unserer Studie relevanten SNPs könnten somit zum Teil die beobachtete individuell unterschiedliche Höhe der supprimierten Cortisolspiegel erklären und ebenso Erklärungsmöglichkeiten für die persönliche Sensitivität eines Patienten auf exogene Glucocorticoide bieten. Unsere Daten zeigten außerdem einen weiteren Hinweis, dass die senile Osteoporose in Zusammenhang mit dem Glucocorticoidstoffwechsel steht und die 11 β HSD1-Funktion hier eine stärkere Rolle für die Knochendichte spielt.

Was noch offen bleibt ist, den genetischen Mechanismus dieser Polymorphismen im *HSD11B1*-Gen nachzuweisen und somit unsere Assoziation zu beweisen. Alle relevant assoziierten SNPs befinden sich in Intronen oder im Promoter, sodass ein kodierender Einfluss auf das Enzym nicht nachgewiesen werden kann. Grundsätzlich sind Exonbereiche im Gen stärker konserviert und Polymorphismen seltener. Dies erschwert bei Assoziationsstudien oft den Nachweis funktioneller Einflüsse von SNPs in Exonen aufgrund ihrer niedrigen Frequenz. Wahrscheinlicher finden sich wie bei uns Einflüsse von SNPs in Intronen und Promotorregionen, die dann aber eine funktionelle Erklärung verkomplizieren. Faktoren, die von den Polymorphismen beeinflusst werden, sind dann möglicherweise Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, welche über eine veränderte Expression des Gens auf den Phänotyp wirken (Stranger et al. 2007). Hinweise auf einen Einfluss der SNPs im Intron 5 auf die Expression von *HSD11B1* fanden Hwang et al. für die SNP rs932335 (Hwang et al. 2009). Aufgrund der starken Kopplung dieser SNPs ist es wahrscheinlich, dass unseren Beobachtungen der gleiche Mechanismus zu Grunde liegt. Eine weitere Einschränkung unserer Studie war die geringe Fallzahl, weshalb auch die Frakturanalyse nicht ausreichend signifikant möglich war. Ebenso ist die Effektgröße der SNPs auf den T-Score zunächst in einem größeren Kollektiv zu bestätigen, bevor man definitive Aussagen über deren Einflussgröße auf die

Knochendichte machen kann. Unserer Meinung nach würde es sich daher lohnen, diese Polymorphismen in einem größeren Kollektiv der Allgemeinbevölkerung zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Sowohl endogene als auch exogene Glucocorticoide beeinflussen den Knochenstoffwechsel entscheidend und spielen eine wichtige Rolle bei der Genese der Osteoporose. Ein Hypercortisolismus wirkt sich negativ auf die Knochensubstanz aus und kann mit einer Osteoporose einhergehen. Ein adäquater Parameter, um den physiologischen Cortisolstoffwechsel zu beurteilen ist der Cortisolspiegel nach Dexamethason, welcher bei den hier untersuchten Osteoporosepatienten individuell unterschiedlich war und mit deren Knochendichte korrelierte. Schlüsselenzyme für die Aktivierung und Inaktivierung von Glucocorticoiden sind die zwei Isoenzyme 11 β HSD1 und 11 β HSD2. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, inwieweit Polymorphismen in diesen Enzymen Einfluss auf den physiologischen Cortisol- und Knochenstoffwechsel bei Osteoporosepatienten haben. Dazu wurden mehrere SNPs in einem zuvor klinisch charakterisierten Kollektiv von 452 Osteoporosepatienten bestimmt. Die Genotypen dieser Patienten wurden in Zusammenhang mit den Parametern des Cortisolstoffwechsels, der röntgenologisch bestimmten Knochendichte und der Frakturrate der Osteoporosepatienten analysiert. Unsere Ergebnisse zeigten dabei zunächst einen Zusammenhang zwischen erhöhten Cortisolspiegeln und erniedrigter Knochendichte am Femur. Einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Frakturrate konnten wir in unserem Kollektiv aufgrund der niedrigen Fallzahl nicht nachweisen. Die Analyse der *HSD11B1*-Polymorphismen bestätigte anschließend den Einfluss des Enzyms auf sowohl die Knochendichte, als auch auf die Höhe der Cortisolspiegel. Das A-Allel des Genotyps der SNP rs11811440 geht dabei mit einem niedrigeren Cortisolspiegel nach Dexamethason-Hemmtest und einer höheren Knochendichte an der Wirbelsäule und am Femur einher. Somit bietet die Funktion des Enzyms 11 β HSD1 einen Erklärungsansatz für die individuelle Regulation des Cortisolstoffwechsels und den damit einhergehenden Auf- und Abbau von Knochensubstanz. Wir fanden Hinweise, dass der Einfluss dieser Mechanismen mit steigendem Alter zunimmt und damit 11 β HSD1 und der Glucocorticoidstoffwechsel eine Rolle bei der Genese des senilen Knochenverlustes spielen. Einen Einfluss von *HSD11B2*-Polymorphismen auf den Knochen konnten wir nicht nachweisen und damit die These unterstützen, dass 11 β HSD1 das wichtigere Isoenzym für den Knochenstoffwechsel ist. Weiterhin bleibt offen, den genetischen

Mechanismus der Polymorphismen für die Enzymfunktion zu analysieren und die Beobachtungen in einem größeren Kollektiv der Allgemeinbevölkerung zu bestätigen.

6 Literaturverzeichnis

- Adachi JD, Adami S, Miller PD, Olszynski WP, Kendler DL, Silverman SL, Licata AA, Li Z, Gomez-Panzani E (2001): Tolerability of risedronate in postmenopausal women intolerant of alendronate. *Aging (Milano)* 13, 347-54
- Alikhani-Koupaei R, Fouladkou F, Fustier P, Cenni B, Sharma AM, Deter HC, Frey BM, Frey FJ (2007): Identification of polymorphisms in the human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene promoter: functional characterization and relevance for salt sensitivity. *Faseb J* 21, 3618-28
- Andres J : Untersuchungen über Regulationsmechanismen der 11beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Typ 1. Mol.Bio.Diss. Potsdam (2009)
- Andrews RC, Walker BR (1999): Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. *Clin Sci (Lond)* 96, 513-23
- Angeli A, Guglielmi G, Dovio A, Capelli G, de Feo D, Giannini S, Giorgino R, Moro L, Giustina A (2006): High prevalence of asymptomatic vertebral fractures in post-menopausal women receiving chronic glucocorticoid therapy: a cross-sectional outpatient study. *Bone* 39, 253-9
- Arnaldi G, Angeli A, Atkinson AB, Bertagna X, Cavagnini F, Chrousos GP, Fava GA, Findling JW, Gaillard RC, Grossman AB, et al. (2003): Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 5593-602
- Barzon L, Fallo F, Sonino N, Boscaro M (2001): Overnight dexamethasone suppression of cortisol is associated with radiocholesterol uptake patterns in adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol* 145, 223-4
- Barzon L, Sonino N, Fallo F, Palu G, Boscaro M (2003): Prevalence and natural history of adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol* 149, 273-85
- Blake GM, Fogelman I (2007): The role of DXA bone density scans in the diagnosis and treatment of osteoporosis. *Postgrad Med J* 83, 509-17
- Borcherding SM, Baciewicz AM, Self TH (1992): Update on rifampin drug interactions. II. *Arch Intern Med* 152, 711-6
- Bozkurt S: Risikofaktoren der Osteoporose unter besonderer Berücksichtigung von Homocystein, supprimiertem Cortisol und Laktose-Intoleranz. Med.Diss. Göttingen (2007)
- Brockstedt H, Kassem M, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F (1993): Age- and sex-related changes in iliac cortical bone mass and remodeling. *Bone* 14, 681-91
- Canalis E, Bilezikian JP, Angeli A, Giustina A (2004): Perspectives on glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone* 34, 593-8
- Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, Bilezikian JP (2007): Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporos Int* 18, 1319-28
- Catargi B, Rigalleau V, Poussin A, Ronci-Chaix N, Bex V, Vergnot V, Gin H, Roger P, Tabarin A (2003): Occult Cushing's syndrome in type-2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 5808-13
- Chiodini I, Carnevale V, Torlontano M, Fusilli S, Guglielmi G, Pileri M, Modoni S, Di Giorgio A, Liuzzi A, Minisola S, et al. (1998): Alterations of bone turnover and bone mass at different skeletal sites due to pure glucocorticoid excess: study in eumenorrheic patients with Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 1863-7
- Chiodini I, Mascia ML, Muscarella S, Battista C, Minisola S, Arosio M, Santini SA, Guglielmi G, Carnevale V, Scillitani A (2007): Subclinical hypercortisolism among outpatients referred for osteoporosis. *Ann Intern Med* 147, 541-8
- Chiodini I, Torlontano M, Scillitani A, Arosio M, Bacci S, Di Lembo S, Epaminonda P, Augello G, Enrini R, Ambrosi B, et al. (2005): Association of subclinical hypercortisolism with type 2 diabetes mellitus: a case-control study in hospitalized patients. *Eur J Endocrinol* 153, 837-44
- Christiansen P, Steiniche T, Brockstedt H, Mosekilde L, Hesse I, Melsen F (1993): Primary hyperparathyroidism: iliac crest cortical thickness, structure, and remodeling evaluated by histomorphometric methods. *Bone* 14, 755-62

- Clarke BL, Ebeling PR, Jones JD, Wahner HW, O'Fallon WM, Riggs BL, Fitzpatrick LA (1996): Changes in quantitative bone histomorphometry in aging healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 2264-70
- Cohen A, Shane E (2003): Osteoporosis after solid organ and bone marrow transplantation. *Osteoporos Int* 14, 617-30
- Cohen S, Levy RM, Keller M, Boling E, Emkey RD, Greenwald M, Zizic TM, Wallach S, Sewell KL, Lukert BP, et al. (1999): Risedronate therapy prevents corticosteroid-induced bone loss: a twelve-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Arthritis Rheum* 42, 2309-18
- Cooper MS, Blumsohn A, Goddard PE, Bartlett WA, Shackleton CH, Eastell R, Hewison M, Stewart PM (2003): 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity predicts the effects of glucocorticoids on bone. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 3874-7
- Cooper MS, Rabbitt EH, Goddard PE, Bartlett WA, Hewison M, Stewart PM (2002): Osteoblastic 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity increases with age and glucocorticoid exposure. *J Bone Miner Res* 17, 979-86
- Cooper MS, Walker EA, Bland R, Fraser WD, Hewison M, Stewart PM (2000): Expression and functional consequences of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human bone. *Bone* 27, 375-81
- Crandall C (2002): Parathyroid hormone for treatment of osteoporosis. *Arch Intern Med* 162, 2297-309
- Dalle Carbonare L, Arlot ME, Chavassieux PM, Roux JP, Portero NR, Meunier PJ (2001): Comparison of trabecular bone microarchitecture and remodeling in glucocorticoid-induced and postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 16, 97-103
- Dempster DW (1989): Bone histomorphometry in glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res* 4, 137-41
- Di Somma C, Colao A, Pivonello R, Klain M, Faggiano A, Tripodi FS, Merola B, Salvatore M, Lombardi G (1998): Effectiveness of chronic treatment with alendronate in the osteoporosis of Cushing's disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 48, 655-62
- Diederich S, Eigendorff E, Burkhardt P, Quinkler M, Bumke-Vogt C, Rochel M, Seidelmann D, Esperling P, Oelkers W, Bahr V (2002): 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2: an important pharmacokinetic determinant for the activity of synthetic mineralo- and glucocorticoids. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 5695-701
- Diederich S, Quinkler M, Mai K, Schoneshofer M, Baehr V, Pfeiffer A, Oelkers W, Eigendorff E (2011): In vivo activity of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in man: effects of prednisolone and chenodesoxycholic acid. *Horm Metab Res* 43, 66-71
- Draper N, Echwald SM, Lavery GG, Walker EA, Fraser R, Davies E, Sorensen TI, Astrup A, Adamski J, Hewison M, et al. (2002): Association studies between microsatellite markers within the gene encoding human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and body mass index, waist to hip ratio, and glucocorticoid metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 4984-90
- Draper N, Walker EA, Bujalska IJ, Tomlinson JW, Chalder SM, Arlt W, Lavery GG, Bedendo O, Ray DW, Laing I, et al. (2003): Mutations in the genes encoding 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase interact to cause cortisone reductase deficiency. *Nat Genet* 34, 434-9
- DVO (2009): DVO-Leitlinien 2009 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Erwachsenen. Schattenauer, o.O. 2009
- DVO (2014): Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Männern ab dem 60. Lebensjahr und bei postmenopausalen Frauen. Schattenauer, o.O. 2014
- Eastell R, Cedel SL, Wahner HW, Riggs BL, Melton LJ, 3rd (1991): Classification of vertebral fractures. *J Bone Miner Res* 6, 207-15
- Feigelson HS, Teras LR, Diver WR, Tang W, Patel AV, Stevens VL, Calle EE, Thun MJ, Bouzyk M (2008): Genetic variation in candidate obesity genes ADRB2, ADRB3, GHRL, HSD11B1, IRS1, IRS2, and SHC1 and risk for breast cancer in the Cancer Prevention Study II. *Breast Cancer Res* 10, R57

- Ferrari E, Cravello L, Muzzoni B, Casarotti D, Paltro M, Solerte SB, Fioravanti M, Cuzzoni G, Pontiggia B, Magri F (2001): Age-related changes of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: pathophysiological correlates. *Eur J Endocrinol* 144, 319-29
- Franks PW, Knowler WC, Nair S, Koska J, Lee YH, Lindsay RS, Walker BR, Looker HC, Permana PA, Tataranni PA, et al. (2004): Interaction between an 11betaHSD1 gene variant and birth era modifies the risk of hypertension in Pima Indians. *Hypertension* 44, 681-8
- Gambineri A, Vicennati V, Genghini S, Tomassoni F, Pagotto U, Pasquali R, Walker BR (2006): Genetic variation in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 predicts adrenal hyperandrogenism among lean women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 2295-302
- Gathercole LL, Lavery GG, Morgan SA, Cooper MS, Sinclair AJ, Tomlinson JW, Stewart PM (2013): 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase 1: Translational and Therapeutic Aspects. *Endocr Rev* 2013, 23
- Gelernter-Yaniv L, Feng N, Sebring NG, Hochberg Z, Yanovski JA (2003): Associations between a polymorphism in the 11 beta hydroxysteroid dehydrogenase type I gene and body composition. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27, 983-6
- Glass DA, 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo MM, Long F, McMahan AP, Lang RA, et al. (2005): Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 8, 751-64
- Greendale GA, Barrett-Connor E, Ingles S, Haile R (1995): Late physical and functional effects of osteoporotic fracture in women: the Rancho Bernardo Study. *J Am Geriatr Soc* 43, 955-61
- Hall SE, Criddle RA, Comito TL, Prince RL (1999): A case-control study of quality of life and functional impairment in women with long-standing vertebral osteoporotic fracture. *Osteoporos Int* 9, 508-15
- Harris HJ, Kotelevtsev Y, Mullins JJ, Seckl JR, Holmes MC (2001): Intracellular Regeneration of Glucocorticoids by 11{beta}-Hydroxysteroid Dehydrogenase (11{beta}-HSD)-1 Plays a Key Role in Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: Analysis of 11{beta}-HSD-1-Deficient Mice. *Endocrinology* 142, 114-120
- Hermus AR, Smals AG, Swinkels LM, Huysmans DA, Pieters GF, Sweep CF, Corstens FH, Kloppenborg PW (1995): Bone mineral density and bone turnover before and after surgical cure of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 2859-65
- Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S (1999): Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 140, 4382-9
- Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL (2000): The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 15, 2-12
- Hofbauer LC, Rauner M (2009): Minireview: live and let die: molecular effects of glucocorticoids on bone cells. *Mol Endocrinol* 23, 1525-31
- Huang C, Ross PD, Wasnich RD (1996): Vertebral fracture and other predictors of physical impairment and health care utilization. *Arch Intern Med* 156, 2469-75
- Hwang JY, Lee SH, Kim GS, Koh JM, Go MJ, Kim YJ, Kim HC, Kim TH, Hong JM, Park EK, et al. (2009): HSD11B1 polymorphisms predicted bone mineral density and fracture risk in postmenopausal women without a clinically apparent hypercortisolemia. *Bone* 45, 1098-103
- Jubiz W, Meikle AW, Levinson RA, Mizutani S, West CD, Tyler FH (1970): Effect of diphenylhydantoin on the metabolism of dexamethasone. *N Engl J Med* 283, 11-4
- Kanis JA (1997): Bone density measurements and osteoporosis. *J Intern Med* 241, 173-5
- Kanis JA, Borgstrom F, De Laet C, Johansson H, Johnell O, Jonsson B, Oden A, Zethraeus N, Pflieger B, Khaltav N (2005): Assessment of fracture risk. *Osteoporos Int* 16, 581-9

- Kanis JA, Johansson H, Oden A, Johnell O, de Laet C, Melton IL, Tenenhouse A, Reeve J, Silman AJ, Pols HA, et al. (2004a): A meta-analysis of prior corticosteroid use and fracture risk. *J Bone Miner Res* 19, 893-9
- Kanis JA, Oden A, Johnell O, De Laet C, Jonsson B (2004b): Excess mortality after hospitalisation for vertebral fracture. *Osteoporos Int* 15, 108-12
- Kanis JA, Reginster JY (2008): European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women--what is the current message for clinical practice? *Pol Arch Med Wewn* 118, 538-40
- Kanis JA, Stevenson M, McCloskey EV, Davis S, Lloyd-Jones M (2007): Glucocorticoid-induced osteoporosis: a systematic review and cost-utility analysis. *Health Technol Assess* 11, iii-iv, ix-xi, 1-231
- Kann P, Laudes M, Piepkorn B, Heintz A, Beyer J (2001): Suppressed levels of serum cortisol following high-dose oral dexamethasone administration differ between healthy postmenopausal females and patients with established primary vertebral osteoporosis. *Clin Rheumatol* 20, 25-9
- Kapcala LP, Hamilton SM, Meikle AW (1984): Cushing's disease with 'normal suppression' due to decreased dexamethasone clearance. *Arch Intern Med* 144, 636-7
- Kaur K, Hardy R, Ahasan MM, Eijken M, van Leeuwen JP, Filer A, Thomas AM, Raza K, Buckley CD, Stewart PM, et al. (2010): Synergistic induction of local glucocorticoid generation by inflammatory cytokines and glucocorticoids: implications for inflammation associated bone loss. *Ann Rheum Dis* 69, 1185-90
- Khanine V, Fournier JJ, Requeda E, Luton JP, Simon F, Crouzet J (2000): Osteoporotic fractures at presentation of Cushing's disease: two case reports and a literature review. *Joint Bone Spine* 67, 341-5
- Lane NE, Yao W, Balooch M, Nalla RK, Balooch G, Habelitz S, Kinney JH, Bonewald LF (2006): Glucocorticoid-treated mice have localized changes in trabecular bone material properties and osteocyte lacunar size that are not observed in placebo-treated or estrogen-deficient mice. *J Bone Miner Res* 21, 466-76
- Lavery GG, Zielinska AE, Gathercole LL, Hughes B, Semjonous N, Guest P, Saqib K, Sherlock M, Reynolds G, Morgan SA, et al. (2012): Lack of significant metabolic abnormalities in mice with liver-specific disruption of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Endocrinology* 153, 3236-48
- Li J, Eriksson L, Humphreys K, Czene K, Liu J, Tamimi RM, Lindstrom S, Hunter DJ, Vachon CM, Couch FJ, et al. (2010): Genetic variation in the estrogen metabolic pathway and mammographic density as an intermediate phenotype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 12, R19
- Lukert BP, Raisz LG (1994): Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheum Dis Clin North Am* 20, 629-50
- Lunt M, Felsenberg D, Adams J, Benevolenskaya L, Cannata J, Dequeker J, Dodenhof C, Falch JA, Johnell O, Khaw KT, et al. (1997): Population-based geographic variations in DXA bone density in Europe: the EVOS Study. European Vertebral Osteoporosis. *Osteoporos Int* 7, 175-89
- Makras P, Toloumis G, Papadogias D, Kaltsas GA, Besser M (2006): The diagnosis and differential diagnosis of endogenous Cushing's syndrome. *Hormones (Athens)* 5, 231-50
- Malavasi EL, Kelly V, Nath N, Gambineri A, Dakin RS, Pagotto U, Pasquali R, Walker BR, Chapman KE (2010): Functional effects of polymorphisms in the human gene encoding 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 beta-HSD1): a sequence variant at the translation start of 11 beta-HSD1 alters enzyme levels. *Endocrinology* 151, 195-202
- Maldague B, Malghem J, de Deuxchaisnes C (1984): Radiologic aspects of glucocorticoid-induced bone disease. *Adv Exp Med Biol* 171, 155-90
- Mariniello B, Ronconi V, Sardu C, Pagliericcio A, Galletti F, Strazzullo P, Palermo M, Boscaro M, Stewart PM, Mantero F, et al. (2005): Analysis of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene (HSD11B2) in human essential hypertension. *Am J Hypertens* 18, 1091-8

- Martinez ME, del Campo MT, Medina S, Sanchez M, Sanchez-Cabezudo MJ, Esbrit P, Martinez P, Moreno I, Rodrigo A, Garces MV, et al. (1999): Influence of skeletal site of origin and donor age on osteoblastic cell growth and differentiation. *Calcif Tissue Int* 64, 280-6
- Melton LJ, 3rd, Eddy DM, Johnston CC, Jr. (1990): Screening for osteoporosis. *Ann Intern Med* 112, 516-28
- Melton LJ, 3rd, Wenger DE, Atkinson EJ, Achenbach SJ, Berquist TH, Riggs BL, Jiang G, Eastell R (2006): Influence of baseline deformity definition on subsequent vertebral fracture risk in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 17, 978-85
- Moyad MA (2003): Osteoporosis: a rapid review of risk factors and screening methods. *Urol Oncol* 21, 375-9
- Nair S, Lee YH, Lindsay RS, Walker BR, Tataranni PA, Bogardus C, Baier LJ, Permana PA (2004): 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase Type 1: genetic polymorphisms are associated with Type 2 diabetes in Pima Indians independently of obesity and expression in adipocyte and muscle. *Diabetologia* 47, 1088-95
- Nuttall ME, Gimble JM (2000): Is there a therapeutic opportunity to either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis? *Bone* 27, 177-84
- Ohnaka K, Tanabe M, Kawate H, Nawata H, Takayanagi R (2005): Glucocorticoid suppresses the canonical Wnt signal in cultured human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 329, 177-81
- Pasquali R, Ambrosi B, Armanini D, Cavagnini F, Uberti ED, Del Rio G, de Pergola G, Maccario M, Mantero F, Marugo M, et al. (2002): Cortisol and ACTH response to oral dexamethasone in obesity and effects of sex, body fat distribution, and dexamethasone concentrations: a dose-response study. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 166-75
- Patschan D, Loddenkemper K, Buttgerit F (2001): Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone* 29, 498-505
- Putignano P, Kaltsas GA, Satta MA, Grossman AB (1998): The effects of anti-convulsant drugs on adrenal function. *Horm Metab Res* 30, 389-97
- Quinkler M, Oelkers W, Diederich S (2001): Clinical implications of glucocorticoid metabolism by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases in target tissues. *Eur J Endocrinol* 144, 87-97
- Quinkler M, Zehnder D, Lepenies J, Petrelli MD, Moore JS, Hughes SV, Cockwell P, Hewison M, Stewart PM (2005): Expression of renal 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 is decreased in patients with impaired renal function. *Eur J Endocrinol* 153, 291-9
- Rask E, Walker BR, Soderberg S, Livingstone DE, Eliasson M, Johnson O, Andrew R, Olsson T (2002): Tissue-specific changes in peripheral cortisol metabolism in obese women: increased adipose 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3330-6
- Reincke M (2000): Subclinical Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 29, 43-56
- Reynolds RM, Dennison EM, Walker BR, Syddall HE, Wood PJ, Andrew R, Phillips DI, Cooper C (2005): Cortisol secretion and rate of bone loss in a population-based cohort of elderly men and women. *Calcif Tissue Int* 77, 134-8
- Richards JB, Kavvoura FK, Rivadeneira F, Styrkarsdottir U, Estrada K, Halldorsson BV, Hsu YH, Zillikens MC, Wilson SG, Mullin BH, et al. (2009): Collaborative meta-analysis: associations of 150 candidate genes with osteoporosis and osteoporotic fracture. *Ann Intern Med* 151, 528-37
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-4
- Sartorio A, Conti A, Ferrero S, Giambona S, Re T, Passini E, Ambrosi B (1998): Evaluation of markers of bone and collagen turnover in patients with active and preclinical Cushing's syndrome and in patients with adrenal incidentaloma. *Eur J Endocrinol* 138, 146-52
- Shaker JL, Lukert BP (2005): Osteoporosis associated with excess glucocorticoids. *Endocrinol Metab Clin North Am* 34, 341-56, viii-ix

- Sher LB, Woitge HW, Adams DJ, Gronowicz GA, Krozowski Z, Harrison JR, Kream BE (2004): Transgenic expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in osteoblasts reveals an anabolic role for endogenous glucocorticoids in bone. *Endocrinology* 145, 922-9
- Shi XM, Blair HC, Yang X, McDonald JM, Cao X (2000): Tandem repeat of C/EBP binding sites mediates PPARgamma2 gene transcription in glucocorticoid-induced adipocyte differentiation. *J Cell Biochem* 76, 518-27
- Siggelkow H, Etmanski M, Bozkurt S, Grobeta P, Koeppe R, Brockmoller J, Tzvetkov MV (2014): Genetic polymorphisms in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 correlate with the postdexamethasone cortisol levels and bone mineral density in patients evaluated for osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 99, E293-302
- Siris ES, Brennan SK, Barrett-Connor E, Miller PD, Sajjan S, Berger ML, Chen YT (2006): The effect of age and bone mineral density on the absolute, excess, and relative risk of fracture in postmenopausal women aged 50-99: results from the National Osteoporosis Risk Assessment (NORA). *Osteoporos Int* 17, 565-74
- Smektala R, Ohmann C, Paech S, Neuhaus E, Rieger M, Schwabe W, Debold P, Deimling A, Jonas M, Hupe K, et al. (2005): [On the prognosis of hip fractures. Assessment of mortality after hip fractures by analyzing overlapping segments of longitudinal data]. *Unfallchirurg* 108, 927-8, 930-37
- Smith E, Frenkel B (2005): Glucocorticoids inhibit the transcriptional activity of LEF/TCF in differentiating osteoblasts in a glycogen synthase kinase-3beta-dependent and -independent manner. *J Biol Chem* 280, 2388-94
- Soro A, Ingram MC, Tonolo G, Glorioso N, Fraser R (1995): Mildly raised corticosterone excretion rates in patients with essential hypertension. *J Hum Hypertens* 9, 391-3
- Steinbuch M, Youket TE, Cohen S (2004): Oral glucocorticoid use is associated with an increased risk of fracture. *Osteoporos Int* 15, 323-8
- Stewart PM (1996): 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase: implications for clinical medicine. *Clin Endocrinol (Oxf)* 44, 493-9
- Stewart PM, Boulton A, Kumar S, Clark PM, Shackleton CH (1999): Cortisol metabolism in human obesity: impaired cortisone-->cortisol conversion in subjects with central adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 1022-7
- Stockbrugger RW, Schoon EJ, Bollani S, Mills PR, Israeli E, Landgraf L, Felsenberg D, Ljunghall S, Nygard G, Persson T, et al. (2002): Discordance between the degree of osteopenia and the prevalence of spontaneous vertebral fractures in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 16, 1519-27
- Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, Ingle CE, Beazley C, Thorne N, Redon R, Bird CP, de Grassi A, Lee C, et al. (2007): Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science* 315, 848-53
- Tauchmanova L, Rossi R, Nuzzo V, del Puente A, Esposito-del Puente A, Pizzi C, Fonderico F, Lupoli G, Lombardi G (2001): Bone loss determined by quantitative ultrasonometry correlates inversely with disease activity in patients with endogenous glucocorticoid excess due to adrenal mass. *Eur J Endocrinol* 145, 241-7
- Teitelbaum SL (2000): Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289, 1504-8
- Terzolo M, Osella G, Ali A, Borretta G, Cesario F, Paccotti P, Angeli A (1998): Subclinical Cushing's syndrome in adrenal incidentaloma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 48, 89-97
- Tiller JW, Maguire KP, Schweitzer I, Biddle N, Campbell DG, Outch K, Davies BM (1988): The dexamethasone suppression test: a study in a normal population. *Psychoneuroendocrinology* 13, 377-84
- Tomlinson JW, Walker EA, Bujalska IJ, Draper N, Lavery GG, Cooper MS, Hewison M, Stewart PM (2004): 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocr Rev* 25, 831-66

- Torlontano M, Chiodini I, Pileri M, Guglielmi G, Cammisa M, Modoni S, Carnevale V, Trischitta V, Scillitani A (1999): Altered bone mass and turnover in female patients with adrenal incidentaloma: the effect of subclinical hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 2381-5
- Van Cauter E, Leproult R, Kupfer DJ (1996): Effects of gender and age on the levels and circadian rhythmicity of plasma cortisol. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 2468-73
- van Staa TP (2006): The pathogenesis, epidemiology and management of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 79, 129-37
- Van Staa TP, Laan RF, Barton IP, Cohen S, Reid DM, Cooper C (2003): Bone density threshold and other predictors of vertebral fracture in patients receiving oral glucocorticoid therapy. *Arthritis Rheum* 48, 3224-9
- van Staa TP, Leufkens HG, Cooper C (2002): The epidemiology of corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis. *Osteoporos Int* 13, 777-87
- Vande Berg BC, Malghem J, Lecouvet FE, Devogelaer JP, Maldague B, Houssiau FA (1999): Fat conversion of femoral marrow in glucocorticoid-treated patients: a cross-sectional and longitudinal study with magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum* 42, 1405-11
- Walker BR, Edwards CR (1993): 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase activity in hypertension and renal disease. *Adv Nephrol Necker Hosp* 22, 329-47
- Wallach S, Cohen S, Reid DM, Hughes RA, Hosking DJ, Laan RF, Doherty SM, Maricic M, Rosen C, Brown J, et al. (2000): Effects of risedronate treatment on bone density and vertebral fracture in patients on corticosteroid therapy. *Calcif Tissue Int* 67, 277-85
- Weinstein RS (2011): Clinical practice. Glucocorticoid-induced bone disease. *N Engl J Med* 365, 62-70
- Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC (1998): Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest* 102, 274-82
- Weinstein RS, Manolagas SC (2000): Apoptosis and osteoporosis. *Am J Med* 108, 153-64
- WHO (1991): Consensus development conference: prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 90, 107-10
- WHO (1994): Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 843, 1-129
- Yao W, Cheng Z, Pham A, Busse C, Zimmermann EA, Ritchie RO, Lane NE (2008): Glucocorticoid-induced bone loss in mice can be reversed by the actions of parathyroid hormone and risedronate on different pathways for bone formation and mineralization. *Arthritis Rheum* 58, 3485-97

Lebenslauf

Ich wurde am 16.10.1984 als Sohn der Eheleute Erika Etmanski (geb. Hofmann) und Dr. med. Georg Etmanski in Winsen an der Luhe geboren.

Von 1991 bis 1995 besuchte ich die Grundschule in Pattensen. Danach wechselte ich bis 1997 auf die Orientierungsstufe II und anschließend auf das Gymnasium in Winsen. Während der Gymnasialzeit verbrachte ich ein Schuljahr an der Wilson Central High, Nashville, USA. 2004 legte ich das Abitur ab. Anschließend absolvierte ich den Zivildienst im Rettungsdienst beim DRK – Harburg bis 2005.

Im WS 2005/2006 begann ich mit dem Studium der Humanmedizin an der Georg-August Universität Göttingen. Nach zehn Semestern beendete ich den theoretischen Teil des Studiums. Im Anschluss begann ich mit den Arbeiten zu meiner Dissertation und parallel als studentischer Mitarbeiter in der Endokrinologie und Gastroenterologie der Universität Göttingen. Von Februar 2011 bis Januar 2012 war ich als PJ-Student in den Abteilungen Radiologie/Strahlentherapie/Nuklearmedizin der Universitätsmedizin Göttingen, Innere des Brüderkrankenhauses Paderborn und Chirurgie des St. Vincenz Krankenhauses Paderborn tätig. Das Medizinstudium schloss ich im Juni 2013 mit dem Staatsexamen an der Universität Göttingen erfolgreich ab und erhielt meine Approbation als Arzt. Daraufhin setzte ich meine Arbeit an meiner Dissertation und den zusammenhängenden Forschungsprojekten als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Endokrinologie und Gastroenterologie der Universität Göttingen bis Februar 2014 fort.

Von April bis September 2014 war ich als Assistenzarzt in der Neuroradiologie der Universität Freiburg tätig. Von September 2014 arbeite ich als Assistenzarzt der Inneren Medizin im Nordwestkrankenhaus Frankfurt am Main, seit Dezember 2015 in der Kardiologie im Krankenhaus Bad Homburg. 2016 heiratete ich, und unsere Tochter Lilli wurde geboren. Ab September 2017 bin ich in einer Allgemeinmedizinpraxis in Frankfurt a. M. tätig.