

Aus der Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und Plastische Chirurgie
(Prof. Dr. med. W. Lehmann)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Analyse der RANKL-Inhibition durch
Virus-like Partikel vermittelte RNA-
Interferenz im Osteoporose-Modell der
Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Delia Deppe

aus

Hannover

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer: Prof. Dr. med. S. Sehmisch

Ko-Betreuerin: Prof. Dr. med. H. Siggelkow

Prüfungskommission

Referent: PD Dr. med. D. Hoffmann

Ko-Referentin: Prof. Dr. med. H. Siggelkow

Datum der mündlichen Prüfung: 20.04.2022

Hiermit erkläre ich, Delia Deppe, die Dissertation mit dem Titel "Analyse der RANKL-Inhibition durch Virus-like Partikel vermittelte RNA-Interferenz im Osteoporose Modell der Ratte" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Hannover, den 23.12.2020

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Hoffmann DB, Gruber J, Böker KO, **Deppe D**, Schmisch S, Schilling AF, Lemus-Diaz N, Komrakova M, Schneider S (2018): Effects of RANKL Knockdown by Virus-like Particle-Mediated RNAi in a Rat Model of Osteoporosis. *Mol Ther Nucleic Acids* 12, 443–452

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	II
1 Einleitung	1
1.1 Osteoporose.....	1
1.2 Einflussfaktoren des Knochenstoffwechsels.....	3
1.3 RNA-Interferenz.....	5
1.4 Virus-like particles.....	6
1.5 Zielsetzung.....	8
2 Material und Methoden	9
2.1 Herstellung von Virus-like particles.....	9
2.2 Versuchstiere.....	10
2.3 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion.....	13
2.4 Western-Blot-Technik.....	16
2.5 Serum-Analyse von β -Crosslaps.....	18
2.6 Biomechanische Untersuchung.....	19
2.7 Mikro-Computertomographie.....	22
2.8 Auswertung und Statistik.....	29
3 Ergebnisse.....	30
3.1 Einteilung der Versuchstiere.....	30
3.2 Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion.....	31
3.3 Ergebnisse der Western-Blot-Technik.....	32
3.4 Ergebnisse der Serum-Analyse von β -Crosslaps.....	34
3.5 Gewicht der Versuchstiere, Futteraufnahme und Uterusgewicht.....	35
3.6 Ergebnisse der biomechanischen Untersuchungen.....	37
3.7 Ergebnisse der Mikro-Computertomographie.....	39
4 Diskussion.....	47
4.1 Schlussfolgerung.....	53
5 Zusammenfassung.....	55
6 Literaturverzeichnis	57

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
cDNA	complementary DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure Ribonukleinsäuren
dsRNA	doppelsträngigen
DTT	Dithiothreitol
DXA	Dual-ray-Absorptiometry
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
HKG	Housekeeping Gene
5-HT _{2a} -Rezeptor	Serotonin-5-Hydroxytryptamin-Rezeptor
LWK	Lendenwirbelkörper
Mikro-CT	Mikro-Computertomographie
mRNA	messenger ribonucleic acid
OPG	Osteoprotegerin
OVX	Ovariectomiert
PEG 8000	Polyethylenglycol 8000
qPCR	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
RANK	Receptor Activator of NF- κ B
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA-Interferenz
ROX	(5-carboxy-X-rhodamin, succinimidyl ester)
shRNA	small hairpin ribonucleic acid
siRNA	small interfering RNA
TBST	Tris-buffered Saline Tween
TEMED	Tetramethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktoren
Tris	Trometamol
VLPs	Virus-like particles

1 Einleitung

1.1 Osteoporose

Die Osteoporose wird definiert als eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes charakterisiert ist. Daraus folgt eine gesteigerte Knochenbrüchigkeit mit einem erhöhten Frakturrisiko (NIH Consensus Development Panel 2001).

Die Osteoporose stellt die häufigste Knochenerkrankung im höheren Lebensalter dar. Am häufigsten zu beobachten ist die primäre Osteoporose, dazu zählen die sehr seltene idiopathische Osteoporose junger Menschen, die senile Osteoporose (Typ-II-Osteoporose), die bei beiden Geschlechtern im Alter von > 70 Jahren exponentiell zunimmt und letztlich die postmenopausale Osteoporose (Typ-I-Osteoporose), die den Hauptanteil der primären Osteoporose darstellt (Herold 2016). Etwa 30% der Frauen entwickeln nach der Menopause eine klinisch relevante Osteoporose mit einem deutlichen Rückgang der Knochenmasse (Bartl und Bartl 2004). Mit zunehmendem Alter nehmen die Knochenmasse und die Knochenarchitektur stetig ab. Zwischen dem 50. und 90. Lebensjahr verdoppelt sich das Frakturrisiko der „*Major Osteoporotic Fractures*“ mit jeder Lebensdekade (Kanis et al. 2001; 2005; van der Klift et al. 2004; Felsenberg et al. 2002; Siminoski et al. 2007; Bagger et al. 2006; Pluijm et al. 2009; Nguyen et al. 2007). Die Männer haben im Vergleich zu Frauen ein um 50% vermindertes Risiko für osteoporotische Frakturen (Herold 2016). Frauen im Alter zwischen 50 und 79 Jahren erleiden zu 1% nachweisbare Wirbelkörper- und zu 1,9% periphere Frakturen, bei Männern liegt die Inzidenz bei 0,6% und 0,7% vergleichsweise niedriger (Baum und Peters 2008). Die Klinik der Osteoporose verläuft zunächst symptomlos und manifestiert sich erst durch das Auftreten von Frakturen (manifeste Osteoporose). Durch die Zusammensinterung der Wirbelkörper kommt es zur Kyphosierung der Brustwirbelsäule mit Rundrückenbildung, Keil- oder Fischwirbeldeformitäten, sowie zu einer möglichen Körpergrößenabnahme (> 4 cm) (Herold 2016). Ebenfalls kommt es zu spontanen Frakturen ohne Trauma oder zu Sturzfrakturen. Diese Deformitäten und Frakturen können zu erheblichen akuten oder chronischen Schmerzen führen, was zur Immobilisation führt und das Fortschreiten der Osteoporose begünstigt (Baum und Peters 2008). Hierbei ist die proximale Schenkelhalsfraktur die folgenschwerste, die Wirbelkörperfraktur die häufigste osteoporosebedingte Fraktur (Locher et al. 2009).

Der Typus der Osteoporose lässt sich in Fast-loser- und einen Slow-loser-Patienten einteilen. Der Fast-loser-Patient ist durch einen trabekulären Knochenmassenverlust von $> 3\%$ jährlich bei gesteigertem Umbau („high turnover“) charakterisiert. Typisch für diesen Verlauf ist die frühe postmenopausale Osteoporose. Frauen sind in den ersten zehn Jahren nach der Menopause davon betroffen. Der Slow-loser-Patient zeigt einen Knochenverlust bei reduziertem Umbau („lowturnover“) und Verlust der trabekulären Knochendichte $< 3\%$ jährlich. Dieser Verlauf ist für die spätere postmenopausale Osteoporose, zehn Jahren nach der Menopause typisch (Herold 2016).

Zur spezifischen Diagnostik der Osteoporose ist eine Osteodensitometrie (Knochendichtemessung) erforderlich. Die Methode der Wahl ist die DXA (Dual-ray-Absorptiometry). Hierbei wird die Flächendichte des Knochenmineralgehalts (g/cm^2) an der Lendenwirbelsäule (LWK 1 - 4), am proximalen Gesamtfemur und am Femurhals gemessen. Die Therapie richtet sich nach dem Minimalwert dieser drei vorgenommenen Messungen. Des Weiteren wird der T-Wert (T-score) gemessen, welcher die Standardabweichung vom Durchschnittswert der Knochendichte der Bevölkerung im Alter von 30 Jahren angibt. Ab einem T-Wert von -1 wird von Osteopenie und ab einem T-Wert von -2,5 von Osteoporose gesprochen (Baum und Peters 2008). Die Messwerte der Knochendichtemessung sollten jedoch immer in Bezug auf Alter, Geschlecht sowie vorrausgegangene Wirbelkörperfrakturen betrachtet werden, um eine bessere Risikoeinschätzung vorzunehmen (Hillier et al. 2007). Ebenfalls können Abbauprodukte des Knochens mit Hilfe von Blut- und Urintests nachgewiesen werden. Marker für die Osteoblastenaktivität sind vor allem die alkalische Phosphatase, das Osteocalcin und das Osteonektin. Als Marker der Osteoklastenaktivität dienen Pyridinium Crosslinks im Serum, aus Urinproben oder aus dem Knochen. Mithilfe dieser Parameter lassen sich Rückschlüsse in Bezug auf die Geschwindigkeit des Knochenabbaus ziehen und somit „highturnover“ von den „lowturnover“ Osteoporose Patienten unterscheiden (Bartl 2012).

Anhand der Zusammenfassung der einzelnen Diagnoseergebnisse kann ein optionaler Therapieplan der postmenopausalen Osteoporose erhoben und das Ansprechen auf die Therapie beurteilt werden.

1.2 Einflussfaktoren des Knochenstoffwechsels

Der Knochen unterliegt einem ständigen Ab- und Aufbau. Die Synthese des Knochengewebes wird durch Osteoblasten und Osteoklasten gesteuert. Das Zusammenspiel der beiden Zelltypen ist entscheidend für die präzise Koordinierung von Knochenabbau- und Bildung.

Das Protein RANKL („Receptor Activator of NF- κ B Ligand“) stammt aus der Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF) und ist an der Regulation des Knochenstoffwechsels beteiligt (Hofbauer et al. 2000; Karsenty 2003). Es reguliert vor allem die Synthese und Aktivität der Osteoklasten und somit die Resorption des Knochens. RANKL wird unter anderem von Osteoblasten sezerniert, bindet an den passenden RANK-Rezeptor von monozytären Osteoklasten-Vorläuferzellen und veranlasst deren Differenzierung zu funktionsfähigen Osteoklasten (Suda et al. 1999). Der Gegenspieler des RANK-Ligands ist das Osteoprotegerin (OPG), das ebenfalls von den Osteoblasten sezerniert wird. Es neutralisiert den „receptor activator of NF-kappaB“ und verhindert, dass RANKL an seinen Rezeptor (RANK) binden kann (Abb. 1). OPG wird aus diesem Grund auch als RANKL-Fangrezeptor bezeichnet und dient als Inhibitionsfaktor der Osteoklastogenese (Tsuda et al. 1997; Simonet et al. 1997).

Das Sexualhormon Östrogen stellt einen natürlichen Suppressor von RANKL dar. Die Östrogene gehören neben den Gestagenen zu den weiblichen Sexualhormonen. Sie werden hauptsächlich in den Granulosazellen der Ovarialfollikel, aber auch in der Plazenta, im Hoden und in der Nebennierenrinde zyklusabhängig produziert (Dettmer 2013). Die wichtigsten Östrogene sind das Östradiol, das Östron und das Östriol. Sie gehören zu der Gruppe der Steroidhormone mit 18 Kohlenstoffatomen und einem ungesättigten aromatischen A-Ring (Dettmer 2013). Die Biosynthese des Östrogens verläuft ausgehend vom Cholesterin zum Pregnenolon weiter zum Androstendion und Testosteron, welches dann in Östrogen umgewandelt wird. Der Transport im Körper erfolgt im Blut an Proteine gebunden und die Ausscheidung wird über die Niere und Galle reguliert.

Östrogene haben die Aufgabe die primären und sekundären Geschlechtsmerkmale auszubilden, ebenfalls haben sie beeinflussende Wirkung auf den Knochenstoffwechsel (Dettmer 2013). Der Wirkmechanismus des Östrogens am Knochen ist komplex und reguliert mehrere Funktionen.

Zum einen stimuliert das Hormon die Kollagensynthese in den Osteoblasten, verbessert die Durchblutung im Knochen und fördert die gastrointestinale Kalziumresorption. Die Kalzitonausschüttung aus den C-Zellen der Schilddrüse wird erhöht und die Sekretion des Parathormons antagonistisch beeinflusst. Durch die östrogenbedingte Verbesserung der

zentralnervösen Funktionen, kommt es zu einer Verringerung der Fallneigung und minimiert die Sturzgefahr (Bartl 2011).

Zum anderen beeinflusst das Hormon die Osteoklastenaktivität, indem es die RANKL-Wirkung und somit die Entstehung und Aktivierung der Osteoklasten hemmt. Die Lebensdauer der Osteoklasten verkürzt und die OPG-Bildung erhöht (Hofbauer et al. 1999). Es kommt zu einer Stagnierung des Knochenabbaus und zu einer positiven Knochenbilanz (Lüllmann-Rauch 2006).

Die Ursache der postmenopausalen Osteoporose ist der in der Menopause entstehende Östrogenmangel. Dieser Mangel führt zu einer Verschiebung des RANK/RANKL/OPG-Gleichgewichts (Yasuda 2013). Folge ist eine vermehrte Osteoklastenbildung mit erhöhter Lebensdauer. Der Abbau des Knochens wird verstärkt, verliert an Struktur, Stabilität und wird letztendlich osteoporotisch mit erhöhter Frakturneigung.

Einige Hormone, wie beispielsweise Parathormon, Calcitriol und Östrogen, greifen in das RANK/RANKL/OPG-System ein und nehmen eine entscheidende Rolle in der Regulation des Knochenmetabolismus ein (Bartl und Bartl 2004; Trouvin und Goëb 2010). Ein monoklonaler Antikörper gegen RANKL (Denosumab), ist bereits in der klinischen Anwendung zur Verminderung der Knochenresorption bei Osteoporose und Knochentumoren eingesetzt worden (McClung et al. 2006; Cummings et al. 2009). Jedoch zeigt die Behandlung mit Denosumab zahlreiche systemische Nebenwirkungen. Der Antikörper verursacht Knochen-, Gelenk- und Muskelschmerzen, Harnwegsprobleme, Infektionen der oberen Atemwege, Katarakt, Hautveränderungen und Verdauungsprobleme. Diese werden hauptsächlich darauf zurückgeführt, dass RANKL neben seiner Hauptfunktion in der Regulation der Knochenresorption weitere wichtige Steuerfunktionen in anderen Organen übernimmt (EMA 2015). Des Weiteren zeigen neue Erkenntnisse, dass es beim Absetzen von Denosumab zu multiplen Wirbelfrakturen kommen kann (Popp et al. 2016).

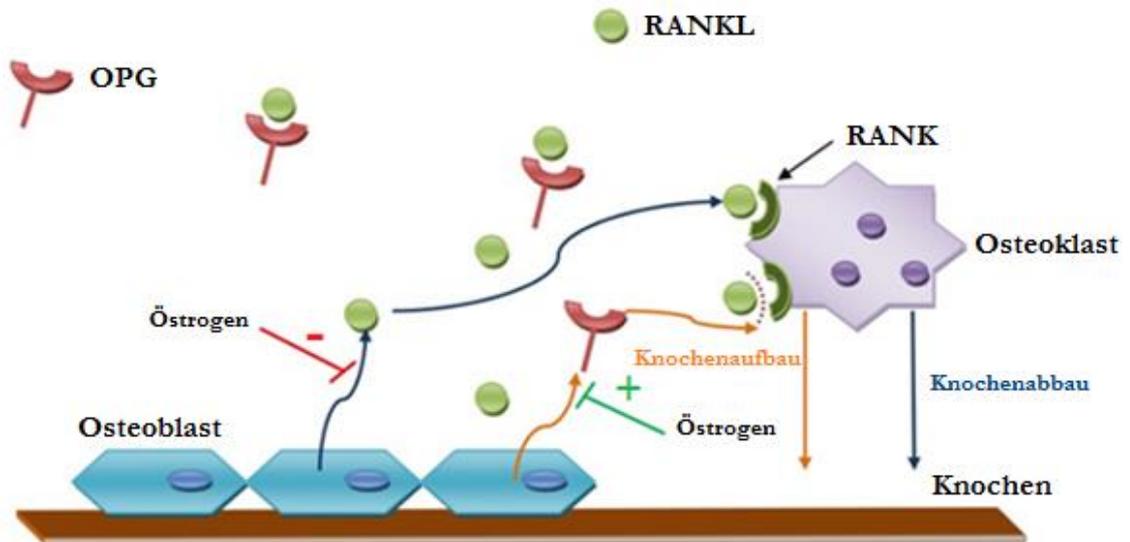


Abbildung 1: RANKL/RANK/OPG-System. RANKL wird von den Osteoblasten sezerniert und bindet an den passenden RANK-Rezeptor von monozytären Osteoklasten-Vorläuferzellen, veranlasst deren Differenzierung zu funktionsfähigen Osteoklasten und bewirkt den Knochenabbau. Der Gegenspieler des RANK-Ligands ist das Osteoprotegerin (OPG), das ebenfalls von den Osteoblasten sezerniert wird. Osteoprotegerin (OPG) bindet an RANKL und inhibiert so die Aktivierung des RANK-Rezeptors. Das Sexualhormon Östrogen ist ein natürlicher Suppressor von RANKL und fördert die Bildung von OPG.

1.3 RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein regulatorischer Mechanismus von eukaryotischen Zellen, der die transkriptionelle- als auch die posttranskriptionelle Genaktivität reguliert (Elbashir et al. 2001a; Elbashir et al. 2001b). Der Mechanismus der RNA-Interferenz wird durch small interfering RNA (siRNA), kleine doppelsträngige RNA-Moleküle, die eine Länge von 20 - 25 Basenpaaren haben, ausgelöst. Die siRNA entsteht durch die Endoribonuklease Dicer aus langen doppelsträngigen Ribonukleinsäuren (dsRNA) oder kurzer small hairpin RNA (shRNA). Des Weiteren können sie durch biochemische Verfahren künstlich hergestellt werden (Zhang et al. 2004).

Die aufgenommene siRNA bewirkt im Zytoplasma der Osteoblastenzelle eine Aktivierung des RISC-Komplexes, indem sie an ihn bindet und die komplementäre mRNA zerlegt (Agrawal et al. 2003). Dadurch kommt es zur Spaltung der mRNA und die Translation des Ziel-Proteins wird verhindert (Siomi and Siomi 2009). Das Resultat ist ein Knockdown des Ziel-Proteins.

Damit die synthetisch hergestellte small interfering RNA (siRNA) in den tierischen Zellen transportiert und zellspezifisch reguliert werden kann, dienen in der vorliegenden Arbeit als Transportmedium Virus-like particles (VLPs).

1.4 Virus-like particles

VLPs bestehen aus einem multimeren Proteinkomplex, welcher sich vom VP1-Capsidproteins des Polyoma JC Virus ableitet und als Abgabe- und Transportmolekül für Nukleinsäuren, einschließlich synthetisch hergestellter siRNA und andere Moleküle dient (Chang et al. 2011; Petry et al. 2003). Die VP1-Proteine wurden rekombinant in Insektenzellen über ein baculovirales System mit multiplen VP1 Expressionskassetten hergestellt (Bieniossek et al. 2012; Bieniossek et al. 2008). Die gereinigten VLPs bestehen aus identisch aufgebauten, pentameren Untereinheiten (Kapsomere), die sich wiederum zum vollständigen Kapsid, bestehend aus 72 Kapsomeren zusammensetzten, bei einem Durchmesser von etwa 40 nm (Abb. 2).



Abbildung 2: Zusammensetzung der VP1-VLP-Kapsomere. VP1-Proteine bilden pentamere Kapsomere. 72 dieser Kapsomere bilden das VP1-VLP-Kapsid.

Die Beladung der VLPs mit der entsprechenden siRNA gelang durch einen in-vitro Dissoziations- und Reassoziationszyklus. Durch die Dissoziation wurden die VP1-VLPs in VP1 Pentamere zerlegt und in Gegenwart der Cargo-Nukleinsäure reassembliert. Der nach Innen gerichtete N-terminus des Polyoma-VP1 besitzt eine natürliche Affinität gegenüber Nukleinsäuren, was das Verpacken der selbigen fördert (Hurdiss et al. 2016). Die Dialyse führte zur Rückfaltung der Kapside und es entstanden letztlich die VLPs mit der beladener siRNA gegen RANKL (Hoffmann et al. 2016).

Die Aufnahme der VLPs in die entsprechenden Zellen wird vor allem durch die Wechselwirkung mit dem spezifischen Serotonin-5-Hydroxytryptamin-Rezeptor vermittelt (5-HT_{2a}-Rezeptor) (Neu et al. 2010; Assetta et al. 2013; Maginnis et al. 2010; Maginnis et al. 2015). Der 5-HT_{2a}-Rezeptor ist sowohl bei menschlichen als auch bei Rattenzellen an der Neurotransmitter übermittelten Dynamik der Knochenorganisation beteiligt (Galli et al. 2013; Bliziotis et al. 2002; Bliziotis et al. 2006). Durch den Uptake-Rezeptor erfolgte die Anlagerung der VLPs an den Zellen des Zielgewebes (Hoffmann et al. 2016). Dies geschieht über den endosomalen Weg, indem die transferierte siRNA im Endosomen aufgrund des niedrigen pH-Wertes angesäuert wird und an die endosomale Membran inserieren kann. Es kommt zur Freisetzung der siRNA im Cytosol und bewirkt die Aktivierung des RISC-Komplexes. Als Folge wird die mRNA gespalten und die Translation des Ziel-Proteins verhindert.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte erfolgreich der Transfer von RANKL-siRNA durch VLPs in gesunde Ratten gezeigt werden (Hoffmann et al. 2016).

1.5 Zielsetzung

Eine bedeutende Ursache der postmenopausalen Osteoporose ist unter anderem eine durch den Östrogenmangel entstehende Dysregulation im RANKL/RANK/OPG-System (Yasuda 2013). Dieses System reguliert die Funktion und Differenzierung von Osteoklasten und somit die Knochenresorption (Suda et al. 1999; Boyle et al. 2003; Simonet et al. 1997). Durch den Östrogenmangel kommt es zu einer Dysregulation der RANKL-Wirkung und zu einer verminderten Produktion von OPG. Die Entstehung und Aktivierung von Osteoklasten wird gesteigert und somit die negative Bilanz des Knochenumsatzes erhöht. Die Folge ist ein osteoporotischer Knochen mit einer erhöhten Frakturneigung (Lüllmann-Rauch 2006). In der klinischen Anwendung wurde bereits ein relevanter monoklonaler Antikörper gegen RANKL (Denosumab) zur Verminderung der Knochenresorption bei Osteoporose und bei Knochentumoren eingesetzt (McClung et al. 2006; Papapoulos et al. 2015; Bone et al. 2008; Genant et al. 2010; Cummings et al. 2009). Jedoch ist der Antikörper Denosumab mit zahlreichen systemischen Nebenwirkungen behaftet, wodurch die Therapie der postmenopausalen Osteoporose mit Risiken verbunden ist. Des Weiteren zeigten neue Erkenntnisse, dass es beim Absetzen von Denosumab zu Rebound-assoziierten Wirbelfrakturen kommt, sodass ein beenden der Therapie mit dem monoklonalen Antikörper nicht ohne weiteres erfolgen kann (Popp et al. 2016). Daher sind weitere Studien zur bestmöglichen Modifikation des RANKL/RANK/OPG-Systems bei Osteoporose notwendig. Wünschenswert wäre dabei eine knochenspezifische Wirkung der RANKL-Suppression.

Die Expression der RANKL-Synthese kann unter anderem durch small interfering RNA (siRNA) reduziert werden. Die Virus-like particles (VLPs) dienen als Transport-Carrier um die siRNA in den Knochenmetabolismus zu transferieren. Als Uptake-Rezeptor in die Zellen wird der Serotonin-5-Hydroxytryptamin-Rezeptor (5HT_{2a}-Rezeptor) genutzt (Chang et al. 2011; Petry et al. 2003). In einer vorangegangenen Studie (Hoffmann et al. 2016) konnte bereits der erfolgreiche Knockdown von RANKL durch VLP-vermittelte RNA-Interferenz in der gesunden Ratte gezeigt werden.

Ziel dieser Studie ist die Evaluation der Auswirkung der RANKL-Inhibition durch VLP vermittelte siRNA auf den osteoporotischen Knochen. Hierzu wurde das etablierte Rattentiermodell der postmenopausalen Osteoporose genutzt (Kalu 1991). Um den Effekt der RANKL-Inhibition zu verdeutlichen, wurden Tibia und Wirbelkörper der Ratten in unterschiedlichen analytischen Verfahren untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Herstellung von Virus-like particles

JC VP1 DNA wurde als für die baculovirale Expression codonoptimiertes Konstrukt von der Firma GENEART bezogen. Die Amplicons wurden als BamHI/HindIII und SphI/NcoI-Fragment in den Zielvektor (2xPFBDM) kloniert. Das VP1-Gen enthaltene Baculovirus wurde, wie durch *Fitzgerald et al.* beschrieben, in Hi5-Zellen produziert und anschließend für die Expression von JC VP1 verwendet. Dies erfolgte gemäß den Herstellerangaben (Invitrogen, CA, USA) (*Fitzgerald et al.* 2006).

Nach erfolgreicher VP1 Expression wurde der virushaltige Zellüberstand zentrifugiert (30 min, 10000 * g) und durch einen 0,45 µm großen Filter filtriert. Danach erfolgte die Fällung des Kapsid durch Zugabe von Polyethylenglycol 8000 (PEG 8000), (Endkonzentration 7,5% Gew./Vol.) bei Raumtemperatur. Der Niederschlag wurde durch erneutes Zentrifugieren (30 min, 10000 * g) abgetrennt und in 20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) (PH 7,4) welches jeweils 150 mM NaCl, 15 mM Ethylenglycol-bis(aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) und Dithiothreitol (DTT) als Dissoziationspuffer enthielt, resuspendiert. Nach zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Taumelschüttler wurde der verbleibende Niederschlag durch Zentrifugation (30 min, 210000 * g bei 4°C) entfernt. Danach erfolgte der Schritt der Reassoziaton. Dazu wurde der VP1 enthaltende Überstand gegen 5 L/20 mM HEPES (PH 7,4) in einen Puffer aus 150 mN Natriumchlorid (NaCl) und 1 mM Calciumchlorid (CaCl₂), bei 4°C unter konstantem Rühren über Nacht dialysiert (MWCO 6 - 8 kDa). Die dialysierte Probe wurde zentrifugiert (30 min, 21000 * g bei 4°C) und danach über Größenausschlusschromatographie unter Verwendung einer Gelfiltrationssäule (Sephacryl S-300), die mit dem ÄKTA Avant System verbunden war, gereinigt. Die Säulen wurden mit einem Reassoziationspuffer äquilibriert und die viralen Kapside eluiert. Unter Verwendung einer Vivaspin-Säule mit MWCO 30 kDa (Sartorius, Deutschland) bei 4°C, wurde die Probe auf eine Konzentration von 0,8 - 1 mg/ml konzentriert.

Für die Beladung der RANKL-siRNA oder der Kontroll-RNA wurde die gewünschte Menge an VP1 in den Dissoziationspuffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für die RANKL-siRNA wurden pro 25 µg VP1, 7 µl einer 20 µM RANKL-siRNA (J-094995-09 und J-094995-10, GE Healthcare) oder Kontroll-siRNA (D-001100-01, GE Healthcare oder Cy3 labeled control, AM17120, Thermo Scientific, CA, USA) zugegeben und um weitere 30 Minuten inkubiert. VP1 wurden in einem 5 L Reassemblierungspuffer über Nacht dialysiert, was zur Rückfaltung der Kapside führte und schließlich VLPs mit der siRNA gegen RANKL

hervorbrachte. Die leeren viralen Kapside wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert (Hoffmann et al. 2018).

2.2 Versuchstiere

In dieser Studie wurden zur Analyse der RANKL-Inhibition in osteoporotischen Ratten, als Modellorganismus 56 drei Monate alte weibliche *Sprague Dawley* Ratten (Fa. Winkelmann, Borchon, Deutschland, Tierschutznummer 33.9-42502-04-11/0560) verwendet.

Die Versuchstiere wurden während des gesamten Versuchs in der zentralen tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen gehalten und nach dem deutschen Tierschutzgesetz gepflegt. Die Tierversuche wurden durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) (Kreis Oldenburg, Oldenburg, Deutschland) genehmigt. Zu Beginn des Versuches wurde bei 48 Ratten eine bilaterale Ovariectomie unter Inhalationsanästhesie mit Isofluran durchgeführt. Die weiblichen Ratten waren zum Zeitpunkt der Ovariectomie drei Monate alt und somit geschlechtsreif. Zunächst wurden die Ratten zwischen dem Rippenbogen und den Hinterläufen rasiert und desinfiziert. Danach erfolgte die Eröffnung der Bauchhöhle, durch einen längsverlaufenden Hautschnitt und die Freipräparierung des Peritoneums. Anschließend wurden die Ovarien entfernt und die Bauchhöhle durch eine Vicryl-Naht verschlossen. Durch die Entfernung der Ovarien und dem daraus resultierenden Hormonmangel, kam es zu einer Verschiebung des Hormonhaushaltes. Die Versuchstiere produzierten unzureichende Mengen an Östrogen und entwickelten eine herbeigeführte postmenopausale Osteoporose (Kalu 1991).

Eine Gruppe erhielt keine Ovariectomie und keine spezielle pharmakologische Behandlung (*Non Ovx*). Die ovariectomierten Tiere hingegen wurden in sechs unterschiedliche Gruppen zu je acht Tieren eingeteilt. Die Gruppen 2 und 3 erhielten eine Behandlung mit VLPs und Kontroll-siRNA (*Ovx siCtrl Tb/Pr*), die Gruppen 4 und 5 mit VLPs und RANKL-siRNA (*Ovx siRANKL Tb/Pr*) und die Gruppen 6 und 7 mit 17β -Estradiol (*Ovx EB Tb/Pr*) (Tab. 1).

Tabelle 1: Behandlungsoptionen der unterschiedlichen Versuchsgruppen. Gruppe 1 repräsentiert die nicht ovariectomierte-Gruppe. Die Gruppen 2 - 7 wurden in Prophylaxe- und Therapiegruppen unterteilt und erhielten unterschiedliche Behandlungsoptionen. Die Gruppen 2 und 3 erhielt eine intraperitoneale Injektion mit VLPs und Kontroll-siRNA. Die Gruppen 4 und 5 eine Injektion mit VLPs und funktionell beladener RANKL-siRNA. Die Gruppen 6 und 7 erhielten zusätzlich zum sojafreien Futter, Östrogenzusatzstoffe, die dem Futter beigemischt wurden.

Gruppen	Behandlung	Bezeichnung
Gruppe 1 (8 Tiere)	Nicht ovariectomierte Tiere, keine Behandlung	Non Ovx
Gruppe 2 (8 Tiere)	Ovariectomierte siRNA-Therapiekontrollgruppe	Ovx siCtrl Th
Gruppe 3 (8 Tiere)	Ovariectomierte siRNA-Prophylaxekontrollgruppe	Ovx siCtrl Pr
Gruppe 4 (8 Tiere)	Ovariectomierte RANKL-siRNA-Therapiegruppe	Ovx siRANKL Th
Gruppe 5 (8 Tiere)	Ovariectomierte RANKL-siRNA-Prophylaxegruppe	Ovx siRANKL Pr
Gruppe 6 (8 Tiere)	Ovariectomierte 17 β -Estradiol-Therapiegruppe	Ovx EB Th
Gruppe 7 (8 Tiere)	Ovariectomierte 17 β -Estradiol-Prophylaxegruppe	Ovx EB Pr

Dazu erfolgte zusätzlich eine Einteilung aller ovariectomierten Tiere in Prophylaxe- und Therapiegruppen (Abb. 3).

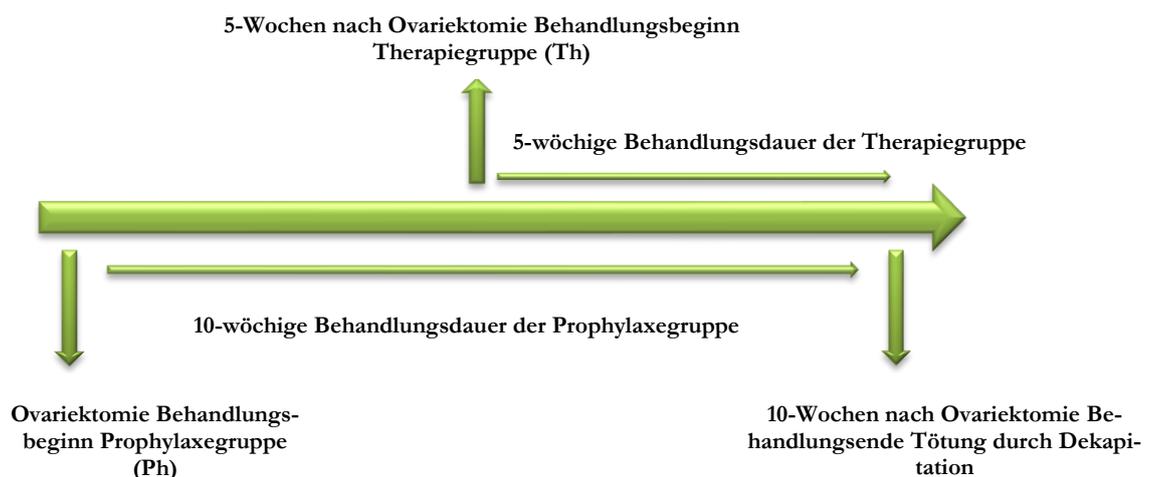


Abbildung 3: Einteilung der ovariectomierten Tiere in Prophylaxe- und Therapiegruppen (Pr/Th). Die Ovx-Pr-Gruppen erhielten direkt nach Ovx eine 10-wöchige Behandlung. Die Ovx-Th-Gruppen erhielt eine 5-wöchige Behandlung, 5 Wochen nach Ovx (Hoffmann et al. 2018).

Die Prophylaxegruppen erhielten direkt nach der Ovariectomie eine zehn Wochen lange Behandlung. Die Ratten, die in den Therapiegruppen waren, erhielten fünf Wochen nach Ovariectomie für fünf Wochen eine Behandlung, da zu diesem Zeitpunkt von einer manifesten Osteoporose auszugehen ist (Hoffmann et al. 2018).

Die Gruppen die eine intraperitoneale Injektion mit Kontroll-siRNA beladenen VLPs erhielten (*Ovx siCtrl Th/Pr*), (150 µg VLP, enthalten 11,2 µg Kontroll-siRNA/Injektion oder 0,5 mg/kg Körpergewicht/Woche) repräsentierten die unbehandelten ovariectomierten Kontrollgruppen. Die anderen Gruppen erhielten VLPs mit funktionell beladener RANKL-siRNA (*Ovx siRANKL Th/Pr*) (150 µg VLP mit 11,2 µg RANKL-siRNA/Injektion oder 0,5 mg/kg Körpergewicht, IP-injektion 1*/Woche), um die RANKL-Expression zu inhibieren. Die nicht ovariectomierte-Gruppe (*Non Ovx*) sowie die 17β-Estradiolgruppen (*Ovx EB Th/Pr*) dienten in diesem Versuch als Behandlungskontrollgruppen und erhielten keine Behandlung mit siRNA.

Alle Tiere erhielten während des gesamten Versuches eine sojafreie Diät. Die Gruppen 7 und 8 erhielten zusätzlich zum sojafreien Futter Östrogenzusatzstoffe. Diese wurden in Form von 17β-Estradiolbenzoat, in einer Dosis von 10 mg/kg dem Futter beigemischt. Dies entspricht pro Versuchstier einer Aufnahme von 0,6 mg/kg Körpergewicht/Tag. Diese Gruppe repräsentiert in der durchgeführten Studie die Behandlung der Osteoporose (Gambacciani and Vacca 2004). Einmal wöchentlich wurde das Futter gewogen und das Restfutter auf 1500 g aufgefüllt. Der Futterverbrauch sowie das Gewicht der einzelnen Tiere ist ebenfalls einmal pro Woche bestimmt und notiert wurden.

Die 56 Versuchstiere wurden zehn Wochen nach Versuchsbeginn in einer CO₂-Anästhesie durch Dekapitation getötet. Serum, Tibiae und Lendenwirbelsäule wurden für die Analysen entfernt. Die linken Tibiae und die fünften Lendenwirbelkörper wurden für die Mikro-Computertomographie (Mikro-CT) und die biomechanischen Untersuchungen verwendet. Die rechten Tibiae und die vierten Lendenwirbelkörper wurden für die Genexpression- und Proteinexpressionsanalyse aufbereitet. Die Serumproben dienten für die Analyse der β-Crosslaps-Messungen. Die Tibiae und LWKs für die Mikro-CT, die biomechanische Untersuchung sowie für die Serumproben wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Für die Gen- und Proteinexpressionsanalyse wurden die Knochenproben bei -80°C gekühlt.

2.3 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) ist eine spezielle Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren. Am Anfang wurde die RNA aus dem zuvor pulverisierten Knochen isoliert und mittels Absorptionsmessung festgestellt, ob und wie viel RNA in der Knochenprobe vorhanden ist. Daraufhin erfolgte die Umschreibung der RNA-Abschnitte in die hitzestabile cDNA, um abschließend den zu replizierenden Genabschnitt, in diesem Fall das RANKL-Gen und B2M (beta-2-Microglobulin), in der qPCR zu vervielfältigen.

Zur Vorbereitung wurden zunächst die Tibia und die Lendenwirbelkörper mittels Mörser zerkleinert und mit dem Micro-Dismembrator S (Sartorius, Göttingen, Deutschland) pulverisiert. Der gesamte Vorgang wurde unter Stickstoff-gekühlten Bedingungen durchgeführt, um die im Knochen enthaltenen RNA nicht zu beschädigen. Die zerkleinerten Knochenstücke wurden in einen Stickstoffgekühlten Behälter gegeben und für 60 Sekunden bei 2500 Umdrehungen in dem Micro-Dismembrator pulverisiert. Das entstandene Knochenpulver aus den Tibiae und Lendenwirbelkörpern wurde jeweils auf zwei für jeden Knochen unterschiedliche Eppendorf-Cups aufgeteilt. Ein Eppendorf-Cup beinhaltete nur das Knochenpulver und diente als Sicherheitsprobe, wohingegen einen Lyse-Puffer aus 10 µl Mercaptoethanol und 1 ml Lysepuffer enthielt. Der enthaltene Puffer in der Knochenprobe bewirkte eine Lyse der Zellen, indem die Disulfidbrücken zu Thiolen reduziert wurden, was zu einer Denaturierung der enthaltenen Proteine und Enzyme führte. Dadurch kam es zur Freisetzung der mRNA und ermöglicht ihre Isolation zur Durchführung der weiteren Schritte.

Die homogenisierte Probe aus Knochenpulver und Lysepuffer wurde zunächst für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine vollständige Dissoziation der Nukleoproteine zu erreichen. Es erfolgte die Zugabe von 0,1 ml Chloroform auf 0,5 ml Trizol-Reagenz (Invitrogen, CA, USA) und das anschließende Schütteln der Probe für 15 Sekunden. Nach weiterer Inkubationszeit von drei Minuten bei Raumtemperatur wurde die Suspension für 15 Minuten bei einer Temperatur von 4°C mit 12000 xg zentrifugiert. Nach der Zentrifugation trennte sich die Suspension in unterschiedliche Phase. Im unteren Teil des Cups befand sich die Phenol-Phase, darüber die DNA-Phase, welche von einer wässrigen Phase mit der enthaltenen RNA überdeckt wurde. Anschließend erfolgte das Isolieren der RNA-Bestandteile aus der wässrigen Phase mit einer Pipette und die Überführung in einem neuen Eppendorf-Cup, um die Fällung der RNA durchzuführen. Zur wässrigen Phase wurden 0,5 ml Isopropanol (100%ig) auf 0,25 ml Trizol-Reagenz dazugegeben, bei Raumtemperatur für zehn Minuten inkubiert und anschließend nochmals für zehn Minuten bei 4°C mit 12000 xg zentrifugiert. Durch das Zentrifugieren hat sich das RNA-Pellet auf dem Boden des Cups abgesetzt und konnte im letzten Schritt der

RNA Isolation gereinigt werden. Dazu wurde der Überstand in dem Cup mit einer Pipette entfernt und zu dem reinen RNA-Pellet 1 ml Ethanol (75%ig) auf 0,5 ml Trizol-Reagenz dazugegeben. Anschließend wurde die RNA-Resuspension ein letztes Mal für fünf Minuten bei 4°C mit 7500 xg zentrifugiert und mit 20 – 40 µl RNase freiem Wasser aufgefüllt. Das Endprodukt ist dann bei -80°C gefroren gelagert worden.

Im nächsten Schritt fand die UV-Photometrie statt, um festzustellen wie viel RNA in den einzelnen Proben vorhanden war. Dazu wurde der *Fluoreszenz-Reader Synergy* von der Firma *BioTek* verwendet. Zunächst fand die Kalibrierung des UV-Photometers statt, indem reines Wasser in die Probenküvette gefüllt worden ist und der Wert der gemessenen Extinktion als Nullwert genommen wurde. Die Auswertung der photometrischen Messung erfolgt mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetz.

Bei der Probemessung wurden jeweils 1 µl Probenmaterial eingesetzt und bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Es wurde festgestellt, ob und wie viel RNA in der Probe war und bei Konzentrationsunterschieden wurde das Missverhältnis durch Verdünnung der Probe ausgeglichen. Damit in der zuvor isolierten RNA ausschließlich die Produktinformationen des RANKL-Proteins vorhanden waren, wurde mittels Reverser Transkription die 2000 ng RNA in eine hitzestabile cDNA (complementary DNA) umgeschrieben. Zu den RNA Proben wurde der Mastermix hinzugegeben (Tab. 2).

Tabelle 2: Produkte des Mastermix

RNA or mRNA	2000 ng
5 * TransAmp Buffer	4 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
RNase freies Wasser	20 µl

Daraufhin wurden die Proben mit folgenden Temperaturen in einen Thermoblock inkubiert (Tab. 3).

Tabelle 3: Temperaturangaben der einzelnen Reaktionsschritte

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Anlagerung der Primer	25°C	10 Minuten
Reverse Transkription	42°C	15 Minuten
Inaktivierung der Reverse Transkriptase	85°C	5 Minuten
Herunterkühlen	4°C	

Die Synthese der cDNA fand unter bestimmten Temperatureinstellungen statt, um optimale Bedingungen für die Enzyme zu schaffen. Des Weiteren wurde das *SensiFAST cDNA Synthesis Kit* der Firma *Bioline* verwendet, welches das Enzym „Reverse Transkriptase“ für den Schritt der Umschreibung von RNA in cDNA und die benötigten Primer (oligo dT) beinhaltet. Die Primer dienten als Startpunkt für die Synthese der komplementären mRNA und schrieben ausschließlich die Sequenz der RNA in cDNA um, welche für den Versuch benötigt wurden. Ebenso beinhaltete das *SensiFAST cDNA Synthesis Kit*, Oligo-dt-Primer zur Analyse von poly-A-tragender mRNA, die aus mehreren Thymin-Basen bestehen und komplementär am 3'-Ende des Poly-A-Schwanzes ansetzte.

Im letzten Schritt wurde die hergestellte cDNA in der qPCR vervielfältigt. Zu den Proben (1000 ng) wurde der Master Mix SensiMix SYBR low-ROX (20 µl) hinzugefügt. Der SYBR-Green Mix beinhaltet die DNA-Polymerase, dNTP's, den Referenzfarbstoff ROX (5-carboxy-X-rhodamin, succinimidyl ester) und den Reporterfarbstoff SYBR-Green, welche für die qPCR notwendig waren. Für die RANKL-Probe wurde folgender Ansatz für die qPCR vorbereitet (Tab. 4).

Tabelle 4: Ansatz für die qPCR

Gen	Gesamtvolu- men	Primer	Wasser	SYBR- Green	cDNA
RANKL (PrimerQT00195125) β2M (QT00176295)	20 µl	1 µl	8 µl	10 µl	1 µl

Anschließend wurden die cDNA-Proben der Tibia und der Lendenwirbelkörper auf eine PCR-Platte pipettiert und in dem qPCR-System (*StepOnePlusreal-time-PCR-System*) analysiert. Es wurde das RANKL-Gen und beta-2-Microglobulin in verschiedenen Temperaturprogrammen vervielfältigt. Die qPCR läuft in 40 Zyklen ab und unterteilt sich in Denaturierung, Annealing und Extension. Bei der Denaturierung wird die DNA auf 95°C erhitzt, so dass durch die Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen die DNA in ihre Einzelstränge aufgetrennt wurde. Danach erfolgte bei 60°C das Anlagern (Annealing) der Primer (QuantiTect-Primer-Assays Qiagen, Hilden, Deutschland) an das 3' Ende der komplementären DNA-Einzelstränge. Am Ende wurde die Temperatur auf 70°C erhöht, damit die Primer von 3' nach 5' Ende mit der Anlagerung der komplementären Basen beginnen konnten. Die DNA-Polymerase synthetisierte den komplementären Matrizenstrang bis wieder ein kompletter DNA-Doppelstrang entstanden war. Bei der Amplifikation lagerte sich der Fluoreszenzfarbstoff (SYBR-Green) an die Doppelstrang-DNA an und ermöglichte die Messung der Konzentration der bestimmten DNA-Sequenz. Ein Maß für die Quantität der vorliegenden DNA ist der CT-Wert (cycle Treshold / Schwellenwert) bei der Analyse der qPCR. Er beschreibt den Punkt, an dem die Fluoreszenz den der Hintergrundfluoreszenz erstmalig überschreitet. Dieser Vorgang geschieht umso früher, desto mehr Kopien in der Ausgangsprobe enthalten waren und ermöglicht somit eine Aussage über das Vorhandensein der ursprünglichen Anzahlen der Kopien der mRNA. Die relative Expression von RANKL (Primer QT00195125) wurde mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Methode unter Verwendung eines nicht regulierenden „Housekeeping Gene“ (HKG) in diesen Fall beta-2-Microglobulin (QT00176295) berechnet. Alle Proben wurden als technische Triplikate gemessen.

2.4 Western-Blot-Technik

Die Western-Blot-Technik ist ein Verfahren zum Nachweis von Proteinkonzentrationen. Hierzu werden die Proteine nach Größentrennung mittels Natriumdodecylsulfat (SDS) Gelelektrophorese getrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und anschließend durch Antikörperfärbung nachgewiesen. Die Western-Blot-Technik dient dazu den Nachweis des Knockdowns des Zielproteins (RANKL) auf Proteinebene nachzuweisen. Hierzu wurden Proben der Tibia genutzt.

Die Proteine wurden aus dem Knochenmaterial durch Zugabe der Pufferlösung von 25 mM Trometamol (Tris), pH-Wert 7 (enthält 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 0,5% Natriumdesoxycholat, 1 mM NP-40 (Radioimmunpräzipitationspuffer)) extrahiert und durch die SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Gele wurden in Novex™-Kassetten wie folgt hergestellt (Tab. 5).

Tabelle 5: Bestandteile des Trenn- und Sammelgels

Substanz	Trenngel (10%)	Trenngel (12,5%)	Sammelgel
H ₂ O	2,5 ml	2,19 ml	3,13 ml
40% Acrylamid/Bisacrylamid	1,25 ml	1,56 ml	0,62 ml
1,5 M Tris, pH 6,8	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml
10% APS (Ammoniumperoxodisulfat)	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED (Tetramethyldiamin)	5 µl	5 µl	5 µl

Nach der Polymerisation der Gele wurden diese in die Elektrophoresekammer (Novex, Thermo Fischer, MA, USA) eingeführt und mit dem Elektrophoresepuffer gefüllt. Die Proben wurden mit dem Laemmli-Puffer gemischt, bei 95°C für zehn Minuten inkubiert und auf das Gel (10 µg Gesamtproteine) geladen. Um die Größe der Proteine zu bestimmen, wurden 3 µl Pagerruler-Protein-Ladder (Fermentas, MA, USA) verwendet. Anschließend erfolgte die Elektrophorese bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA über eine Stunde. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und bei einer konstanten Spannung von 25 V innerhalb einer Stunde transferiert. Daraufhin erfolgte die Blockierung der Membran in TBST (Tris-buffered Saline Tween) (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,2% Tween 20, PH 7,4), mit 5% Milchpulver. Im Anschluss wurde der primäre Antikörper (Anti-RANKL ab22113 oder Anti-GAPDH ab8245, Abcam, MA, USA) in TBST (anti-RANKL 1:1000 und anti-GADPH 1:4000) für 16 Stunden bei 4°C mit der Membran inkubiert. Nach drei Waschungen mit TBST wurde der sekundäre Antikörper (Anti-Maus G-21040 oder Anti-Kaninchen G-21234, 1:10000, LifeTechnologies, CA, USA) für eine Stunde bei Raumtemperatur zugegeben. Die Membran wurde erneut dreimal mit TBST gewaschen und mit HRP-Substrat (Luminata Forte, Merck, Deutschland) versetzt. Die Proteinbanden wurden mit Hilfe einer Chemilumineszenz-Reaktion unter Verwendung einer ECL-Maschine (Chemocam Imager, INTAS, Deutschland) nachgewiesen.

2.5 Serum-Analyse von β -Crosslaps

Der Enzymimmuntest RatLaps CTX-I (AC-06F1, Immundiagnostic System Holdings PLC, Boldon Colliery, UK) wurde verwendet, um β -Crosslaps-Spiegel in Serumproben zu messen. Das RatLaps-Verfahren ist ein enzymbeschichteter Immunabsorptionstest zur quantitativen Bestimmung von knochenbezogenen Abbauprodukten von C-terminalen Telopeptiden des Typ-I-Kollagens, welche im Ratten Serum, in Urinproben und aus dem Knochen durch die freigesetzten Zellkulturüberstände durch die Osteoklasten nachgewiesen werden können.

Die Serumproben der Tiere wurden bei -20°C bis zum Beginn des Versuches konserviert und zu Anfang des Enzymimmuntests bei Raumtemperatur mit den zugehörigen Reagenzien äquilibriert. Danach wurden jeweils $100\ \mu\text{l}$ des biotinylierten RatLaps Antigen (Ag Biotin, EKS-QDGGR) in die vorgegebenen Vertiefungen der ELISA-Platte pipettiert, mit einem Dichtungsband verschlossen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im zweiten Schritt wurden die Immuno-Streifen mehrmals in einer $300\ \mu\text{l}$ Waschlösung (WASHBUF 50x) gereinigt. In die geleerten Vertiefungen wurden anschließend die jeweiligen Rattenserum pipettiert, gefolgt von $100\ \mu\text{L}$ des primären Antikörpers (polyklonales Kaninchen IgG) und über Nacht bei 8°C inkubiert. Nach dem ersten Inkubationsschritt erfolgte eine erneute Waschung und Leerung der Vertiefungen. Im zweiten Inkubationsschritt wurden $100\ \mu\text{l}$ des Peroxidase-konjugierten zweiten Antikörpers (Ziegen-anti-Kaninchen Antikörpers IgG, ENZYMCNJ) hinzugefügt und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin erfolgte eine erneute Waschung der ELISA-Platten und die Zugabe von $100\ \mu\text{l}$ des chromogenen Substrats (TMB), welches für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Abschließend wurde die Farbreaktion durch Zugabe von $100\ \mu\text{l}$ Schwefelsäure gestoppt und die Extinktion bei $450\ \text{nm}$ gemessen (immundiagnosticssysteme 2014).

2.6 Biomechanische Untersuchung

Die biomechanische Untersuchung ist ein etablierter Widerstandstest zur Messung der Stabilität des Knochens bei einer axialen Krafteinwirkung. Durch den Test können Rückschlüsse in Bezug auf die Festigkeit des Knochengewebes im Vergleich von einem gesunden zu einem osteoporotischen Knochen gezogen werden. Die vorher durchgeführte Validierung und der standardisierte 3-Punkt Biegetest für die Tibia wurde von *Stürmer et al.* (Stürmer et al. 2006) etabliert und im Rahmen anderer Studie von *Sehmisch et al.* (Sehmisch et al. 2009a) ein Kompressionsversuchs für den Wirbelkörper entwickelt.

Die Werte werden als Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt. Da die durchgeführten Testverfahren zum Teil untersucherabhängig waren, wurde bei dem Versuch des biomechanischen Kompressionstests, sowie bei dem Versuch, der mit Hilfe des Mikro-Computertomographen stattfand, eine vorige Validierung durchgeführt. Die Validierung des Untersuchers wurden jeweils an zehn Probeknochen, jeweils rechte und linke Tibia und Lendenwirbelkörper LWK 4/5 durchgeführt.

Zur Vorbereitung wurden sowohl Tibiae und Lendenwirbelkörper aufbereitet, indem sie entnommen, vom Weichteilgewebe getrennt und bei -20°C konserviert wurden. Bei den Tibiae wurden zusätzlich die Kondylen vom Tibiaschaft entfernt, um die Eigenschaften des Knochengewebes genau zu analysieren.

Zu Beginn des Versuchs wurden die aufbereiteten Knochen bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend erfolgte die Positionierung der Lendenwirbelkörper auf eine anatomisch für den Wirbel angepasste Aluminiumbasis, welche danach in das mechanische Kompressionsgerät (Typ 145660Z020/TND Zwick, Ulm, Deutschland) eingespannt wurde. Der kaudale Anteil des Knochens zeigte dabei nach oben und diente als Kontaktfläche des Stempels. Die Ausrichtung der Wirbel wurde gewählt, um ein vorzeitiges Abbrechen vom Processus spinosus (Dornfortsatz) oder Processus transversus (Querfortsätze) vorzubeugen und somit ein Verfälschen der Testergebnisse zu verhindern. Danach erfolgte das Einschalten der *testXpert* Software (Zwick/Roell, Ulm, Deutschland), die sowohl die Steuerung des Gerätes als auch die Aufzeichnungen der Daten, in Form eines Kraft-Weg-Diagramms, übernahm. Damit eine senkrecht axiale Kraft auf das kaudale Ende des Wirbelkörpers simuliert werden konnte, wurde ein Metallstempel mit einer abgeschrägten Fläche verwendet. Die Kraftübertragung des Stempels erfolgte zunächst mit einer Vorlast, die bei einem Newton automatisch anhielt, um eventuelle Korrekturen an der Positionierung des Knochens durchzuführen (Fürst 2014). Danach wurde die Aufzeichnung gestartet, indem das Kompressionsgerät den Stempel mit einer Antriebskraft von 1 N mit einer Geschwindigkeit von 5 mm/min auf den Knochen absenkte. In einem

Vorschubintervall von 0,1 mm wurde die kontinuierlich zunehmend einwirkende Kraft des Stempels durch die *testXpert* Software mit einer relativen Genauigkeit von 0,2% - 0,4%, in einem Bereich von 2 – 500 N festgehalten und in Form eines Kraft-Weg-Diagramms dokumentiert. Die Testmaschine stoppte automatisch, sobald die Linie der Kurve um mehr als 10 N abnahm (Hoffmann et al. 2018; Stürmer et al. 2006).

Die Tibiae wurden ebenfalls auf einen Aluminiumblock platziert, welcher jedoch zwei eingesetzte Rillen am Boden der Platte aufwies. Die Rillen dienten als Orientierungspunkt für die Einspannung der einzelnen Knochen, so dass in der längsverlaufenden Rille der Tibiaschaft eingespannt und mit jeweils zwei seitlich liegenden Inbusschrauben fixiert wurde, um das seitliche Verrutschen und Kippen zu verhindern. Mit der zweiten querverlaufenden Rille wurde das Tibiaplateau abgeschlossen. Nach der korrekten Fixierung und Einspannung der Knochen erfolgte, ähnlich wie bei den Wirbelkörpern, die Kraftausübung durch den Stempel, der jedoch eine andere Form, als der Stempel für die Wirbelkörper besaß (Weidemann 2014). Der Stempel bestand aus einer zylindrischen Form mit einer Einkerbung in der Mitte, die bei der Kompression oberhalb der Tuberositas tibiae aufsetzte, um die Kompressionskraft auf den kompletten Knochenabschnitt zu verteilen.

Die weiteren Arbeitsschritte sowie die Auswertung der Rohdaten mittels der Software „*testXpert*“ wurden tabellarisch mit *Microsoft Excel*® gleichermaßen bei den Lendenwirbelkörpern als auch bei den Tibiae dargestellt und ausgewertet. Ein Beispiel eines solchen Kraft-Weg-Diagramms zeigt die nachfolgende Abbildung (Abb. 4).

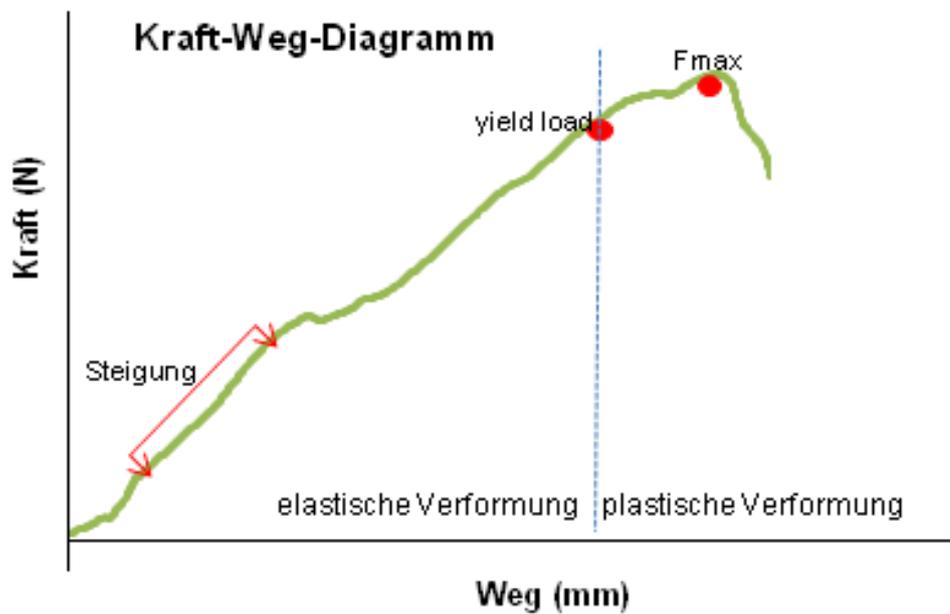


Abbildung 4: Kraft-Weg-Diagramm. Die Grafik zeigt die axiale Krafteinwirkung auf den Knochen. Die anfängliche Steigung entspricht der elastischen Verformung des Knochengewebes bis zum yield load. Nach überschreiten des Punktes kommt es zur irreversiblen, plastischen Verformung bis zum Erreichen der maximalen Kraft (F_{max}).

Die von dem Kompressionsgerät ausgeübte axiale Kraft auf den Knochen bewirkt zunächst einen linearen Anstieg, der als Steigung im Kraft-Weg-Diagramm dargestellt ist. Diese Initiale Steigung, auch als Steifheit definiert, steht für die Elastizität des Knochens. Bei zunehmender Krafteinwirkung und Erreichen des yield load (Streckgrenze) kommt es zur irreversiblen Verformung des Knochens bis zum Heranreichen der maximalen Kraft (F_{max}). Beim Unterschreiten des yield load kehrt der Knochen nach Kraftentlassung elastisch in seine ursprüngliche Form zurück, beim Überschreiten der Kraft kommt es zur ersten irreversiblen Formveränderung, zu sogenannter plastischen Verformung im Knochengewebe. Der Wendepunkt der Verformung des Knochens charakterisiert der yield load und wird in Newton N angegeben. Bei Überschreitung der Maximalkraft (F_{max}) erfolgt ein kontinuierlicher Abfall der Kurve und es kommt zur vollständigen Zerstörung der Knochenstruktur und somit zu Frakturen (Stürmer et al. 2006; Schmisch et al. 2009a).

2.7 Mikro-Computertomographie

Die Mikro-Computertomographie (Mikro-CT) ist eine 3D-Röntgenbildgebung, mit der Schnittbilder des Körpers angefertigt werden können. Dieser Versuch wurde an den Lendenwirbelkörper und an den Tibiae durchgeführt. Im Folgenden wird die Anfertigung der Schnittbilder, die nachfolgende Bearbeitung der ermittelten Bilddaten sowie die erhobenen Messdaten beschrieben.

Für die Anfertigung der Röntgenaufnahmen wurde ein *Quantum FX micro-CT* des Herstellers Caliper Sciences (Hopkinton, Massachusetts, USA) verwendet. Die Durchführung der Scans erfolgte mithilfe von definierten Scanparametern, welche in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet sind (Tab. 6).

Tabelle 6: Scanparameter des Scanprotokolls

Scan Parameter	Werte und Einheiten
Anzahl der Projektionen (360° Scan)	3600
Röhrenspannung	70 kVp
Röhrenstrom	200 μ A
Scanzeit	2 min
Voxelgröße	40 * 40 * 40 μ m ³

In jedem Scan wurden entweder zwei Tibiae oder zwei Wirbel mit einem Dichtephantom aus 5 Hydroxylapatiten mit bekannten Mineraleichtendichten gescannt. Dadurch konnten die Ergebnisse der Dichtemessung der einzelnen Knochengewebe mittels eines angewandten Algorithmus, ausgehend von den grey values Werten, in BMD-Einheiten umgerechnet werden. Die BMD entspricht somit nur dem mineralisierten Knochengewebe der ausgehenden Proben und werden in der Einheit g/cm³ angegeben (Fürst 2014). Zur Berechnung der Knochenparameter wurde nach der amerikanischen Gesellschaft für Knochen- und Mineralforschung (ASBMR) die in unserem Labor entwickelte dreidimensionale Software (3 D Osteoanalyse v 1.000.4) verwendet. Die Darstellung der einzelnen Knochen erfolgte in einem 3D-Modell und als Graustufe als 2D-Modell, um eine detailgetreue Darstellung zu erhalten (Abb. 5).

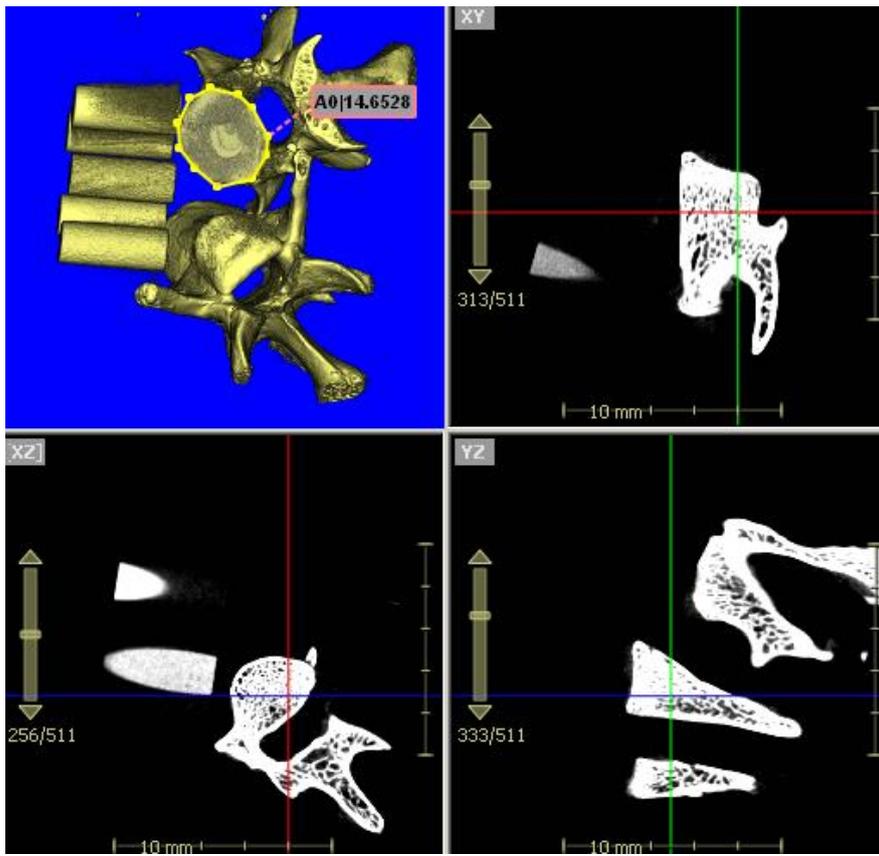


Abbildung 5: Darstellung der Lendenwirbelkörper im Bearbeitungsprogramm 3D-Osteoanalyse.

Für die weitere Knochenanalyse wurde der Corpus vertebrae isoliert. Es war von besonderer Bedeutung, dass die einzelnen Wirbelkörper exakt gleich umrandet und ausgeschnitten werden mussten, indem der kraniale, dickere Abschnitt des Wirbelkörpers als Orientierungshilfe diente und die erforderliche Umrandung vorgab, um die späteren Dichte- und Volumenparameter der einzelnen Wirbel präzise ermitteln zu können (Abb. 6 - 8).



Abbildung 6: Zurechtschneiden des Wirbelkörpers

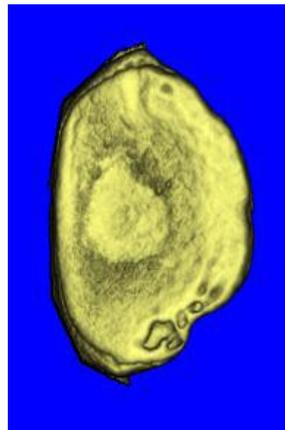


Abbildung 7: Corpus vertebrae Ansicht von kranial

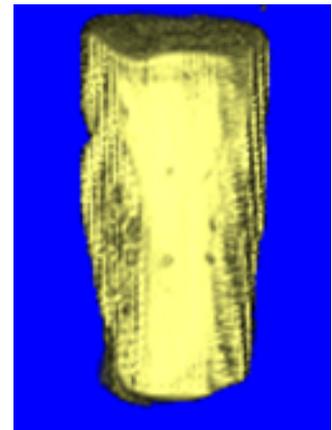


Abbildung 8: Corpus vertebrae Ansicht von ventral

Im Anschluss wurde Mittels des Programms zunächst die Dichte von Luft aus dem zuvor ausgeschnittenen Bereich ausgeblendet, sodass nur die Beschaffenheit des Knochens zur Auswertung bereitstand (Abb. 9). Das gereinigte Histogramm in Bezug auf das Knochengewebe setzt sich aus Kortikalis, Trabekel und Weichteilgewebe zusammen.

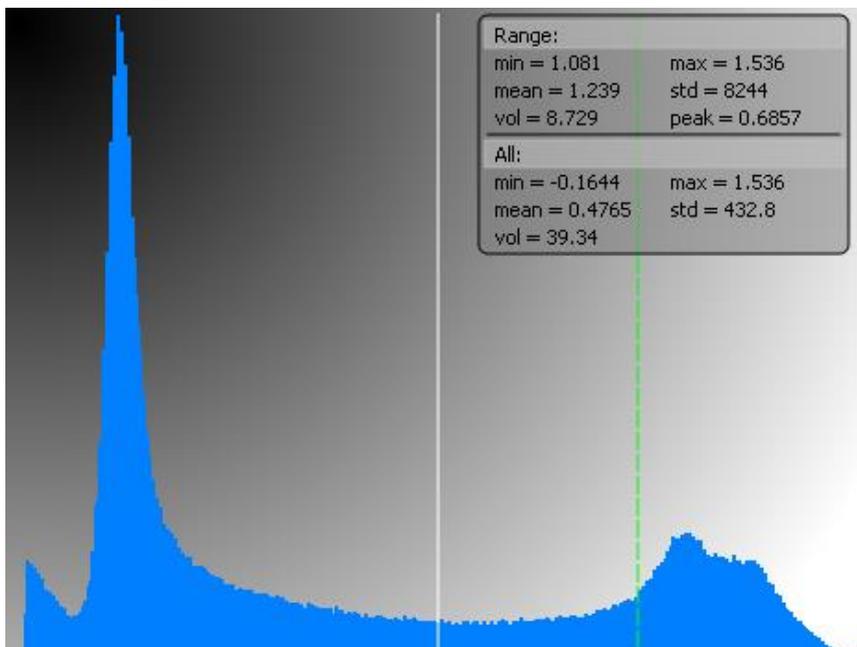


Abbildung 9: Histogramm zur Ausblendung der Dichte von Luft

Damit eine einheitliche Auswertung von Dichte- und Volumina der einzelnen Knochen erfolgen konnte, wurden vor der Analyse definierte untere Schwellenwerte festgelegt (Tab. 7).

Tabelle 7: Darstellung der ermittelten Schwellenwerte

Unterer Schwellenwert Kortikalis	Unterer Schwellenwert trabekulärer Knochen
1,08 g/cm ³	0,5 g/cm ³

Da der optimale Schwellenwert von der Beschaffenheit des Knochens abhängig ist, wurde ein Mittelwert aus den einzelnen Gruppen berechnet. Dazu wurden jeweils drei Wirbelkörper von nicht ovariektomierten-Tieren und drei Wirbelkörper von ovariektomierten-Tieren zufällig ausgewählt und deren Mittelwert bestimmt. Mit diesen definierten Schwellenwerten konnte jeder einzelne Wirbelkörper ausgewertet werden. Der obere Schwellenwert musste nicht einzeln ermittelt werden, da der untere Schwellenwert einer Gewebsmessung dem oberen Schwellenwert dieser Messung entsprach (Fürst 2014). Nach Berechnung des unteren Schwellenwertes konnten die einzelnen Dichte- und Volumenmessungen an den Lendenwirbelkörpern für fünf verschiedene Bereiche stattfinden.

Zunächst wurden das Kortikalisvolumen und die Kortikalisdichte mit Hilfe des unteren Schwellenwertes bestimmt. Danach erfolgte die Eingrenzung des restlichen Knochengewebes, sowie die Dichte- (mg/cm³) und Volumenbestimmung (mm³) vom Gesamtknochen, Kortikalis, Kortikalis und Trabekel, Trabekel und Weichteilgewebe.

Die Darstellung der Messparameter mit definiertem Schwellenwert sowie die Einheiten und die Bedeutung werden in der nachfolgenden Tabelle erläutert (Tab. 8).

Tabelle 8: Darstellung der Messparameter

Messparameter	Einheit	Bedeutung
Kortikalisvolumen	mm ³	Volumen im Kortikalisbereich
Kortikalisdichte	mg/cm ³	Dichte im Kortikalisbereich
Trabekelvolumen	mm ³	Volumen im Trabekelbereich
Trabekeldichte	mg/cm ³	Dichte im Trabekelbereich
Mineralisierter Knochen	mm ³	Volumen des Trabekel- und Kortikalisbereichs
Mineralisierter Knochen	mg/cm ³	Dichte des Trabekel- und Kortikalisbereichs
Weichteilvolumen	mm ³	Volumen im Weichteilbereich
Weichteildichte	mg/cm ³	Dichte im Weichteilbereich
Gesamtvolumen	mm ³	Volumen Weichteil, Trabekel, Kortikalis, Trabekel und Kortikalis
Gesamtdichte	mg/cm ³	Dichte Weichteil, Trabekel, Kortikalis, Trabekel und Kortikalis
Gesamtvolumen/Knochenvolumen	%	Anteil mineralisierter Knochen am Gesamtvolumen des Knochens

Nach der Ermittlung der Volumina und Dichten der einzelnen Knochengewebe erfolgte die Kortikalismessung des Lendenwirbelkörpers. Dazu wurde zunächst ein definierter Bereich des Wirbelkörpers bestimmt, indem eine Millimeter genaue Fläche bei jedem einzelnen Knochen exakt gleich gewählt wurde. Von dem zuvor ausgeschnittenen Corpus vertebrae wurde als erstes eine 2 mm lange Strecke von dem oberen und unteren Abschnitt des Knochens gemessen. Danach erfolgte die exakte Eingrenzung der Fläche zwischen diesen beiden Strecken, indem eine Fläche mit 4 mm Höhe bestimmt wurde (Abb. 10). Dieser eingegrenzte Bereich wurde im nächsten Schritt isoliert, um die Kortikalismessung durchzuführen. Dazu wurde der ausgeschnittene Abschnitt gedreht, sodass der Wirbel im Querschnitt gesehen werden konnte. Nachdem man eine Queransicht des Knochens geschaffen hatte, erfolgte die Umrandung der inneren und äußeren Kortikalisfläche (Abb. 11, 12). Anschließend wurden diese Werte notiert und das Ergebnis der inneren Kortikalisfläche von der äußeren Kortikalisfläche subtrahiert, sodass man am Ende die gesamte Kortikalisfläche in der Einheit mm² erhielt.

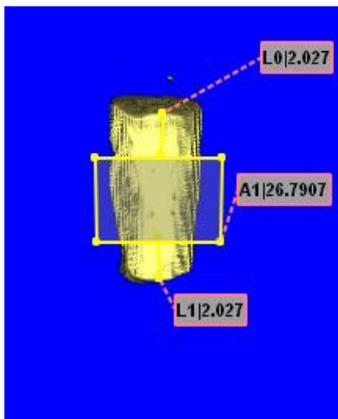


Abbildung 10: Eingrenzung des definierten Abschnitts zur Berechnung der Kortikalisfläche.

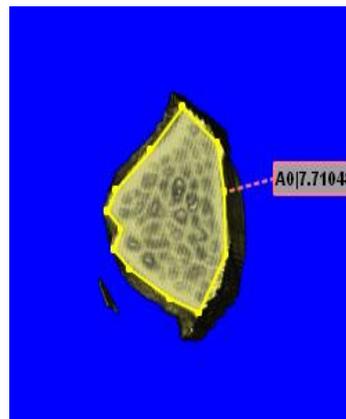


Abbildung 11: Querschnitt des Wirbelkörpers, Berechnung der äußeren Kortikalisfläche

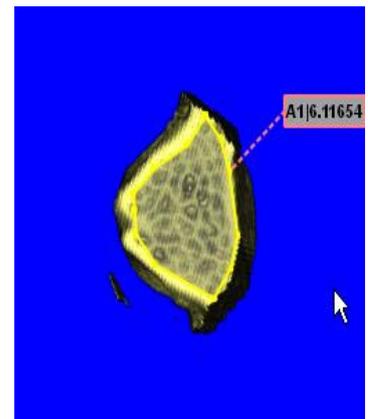


Abbildung 12: Querschnitt des Wirbelkörpers, Berechnung der inneren Kortikalisfläche

Im letzten Teil des Mikro-CT erfolgte die Knochenstrukturmessung, durch Isolierung der Kortikalis, am trabekulären Knochen. Die Berechnung der einzelnen Werte fand an dem zuvor abgesonderten Querschnitt des Knochens statt. Durch die Programmaktivierung „*measure frame*“ isolierte man einen Abschnitt der trabekulären Knochenstruktur, markierte und trennte die Trabekelfläche (Abb. 13 - 15). Dieses Gesamtvolumen der isolierten Fläche entspricht nach der Nomenklatur dem *tissue volume* des Wirbelkörpers. Im letzten Schritt wurde die *bones analyze* gestartet und die Knochenstrukturmessung in einem neuen Histogramm berechnet.

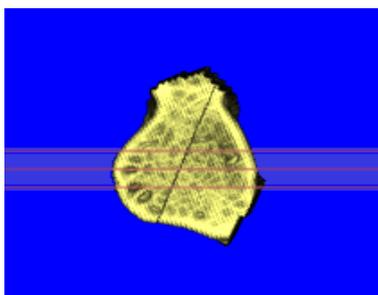


Abbildung 13: Aktivierung des measure frame

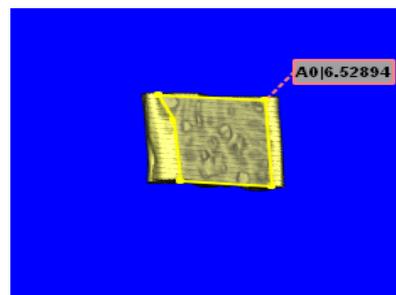


Abbildung 14: Isolation der Trabekulärenstruktur, entspricht dem Gesamtvolumen des Wirbels

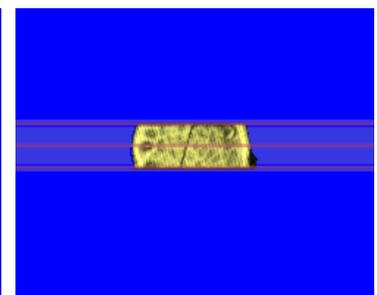


Abbildung 15: Ansicht des Wirbels im Längsschnitt

Dazu wurden folgende Parameter für den feinstrukturellen Aufbau des Knochens bestimmt:

- Anzahl gefundenen Trabekel (Tb.)
- Mittlerer Abstand der Trabekelknoten (Tb.S) in μm
- Anzahl Trabekelknoten (Nodes)
- Mittlere Trabekeldicke (Tb.Th) in μm
- Mittlere Anzahl der Trabekelkreuzungen (Tb.N)

Bone volume (BV) in mm^3 :

- beinhaltet den mineralisierten Knochen und das Osteoid

Gesamtvolumen (TV) in mm^3 :

- das TV beinhaltet den mineralisierten Knochen, das Osteoid, das Knochenmark und das Weichgewebe

Verhältnis von BV/TV in Prozent

- entspricht dem Anteil an Knochen und Osteoid am Gesamtvolumen gemessen

Die Tibiae wurden mit derselben Vorgehensweise wie die zuvor untersuchten Lendenwirbelkörper untersucht. Die Analyse begann ebenfalls mit dem Anfertigen der Schnittbilder und des Uploads der rekonstruierten Bilder mit Hilfe des 3D-Osteoanalyse-Programms. Beim zu vorigen präparieren wurden die Kondylen vom Tibiakopf entfernt, um eine präzise Berechnung der Volumina, der Dichten und der Analyse der Feinstruktur des Knochengewebes durchzuführen (Abb. 16, 17).

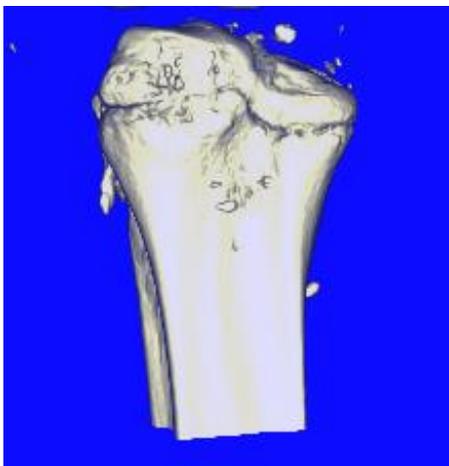


Abbildung 16: Tibia mit Kondylen

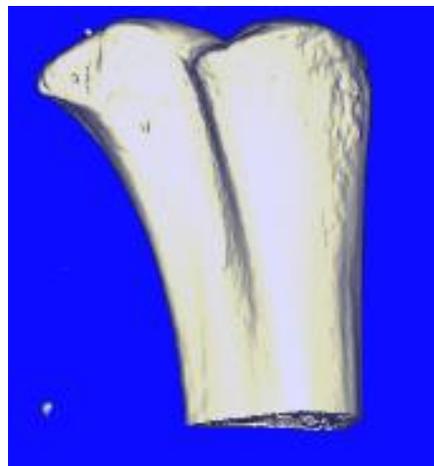


Abbildung 17: Tibia ohne Kondylen

Die zu ermittelnde Fläche erhielt man, indem zwei Messungen von jeweils 3 mm und 5 mm ausgehend an der Grenze der Wachstumsfuge durchgeführt wurden (Abb. 18). Die entstandene Fläche zwischen den beiden Messungen betrug 4 mm in der Höhe, welche im nächsten Schritt isoliert wurde (Abb. 19).

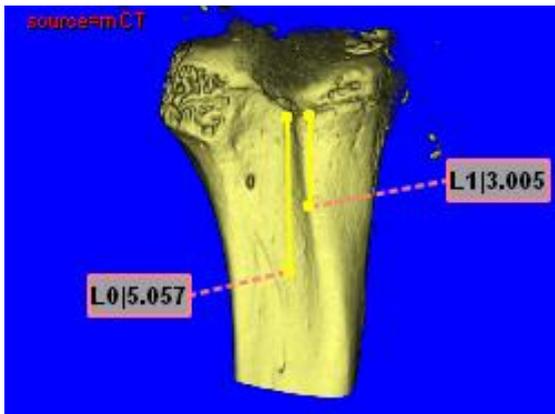


Abbildung 18: Messung ausgehend von der Wachstumsfuge

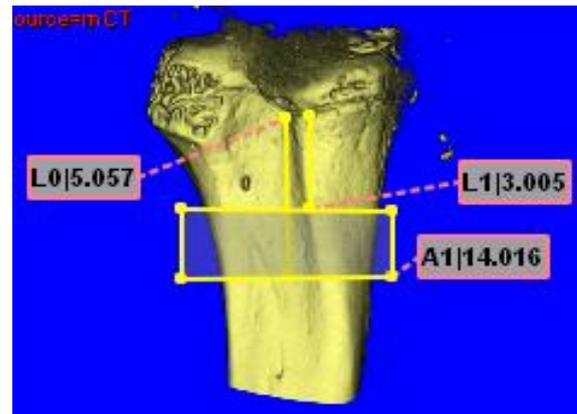


Abbildung 19: Einzugrenzende Fläche

Die ermittelte Fläche galt als Richtwert für die weitere Analyse der Tibiae und wurde bei allen Knochen gleichermaßen eingegrenzt. Die weiteren Schritte zur Analyse der Dichte- und Voluminabestimmung, sowie die Berechnung der Kortikalisfläche und die Messung der Knochenstruktur erfolgte durch dieselbe Vorgehensweise wie bei den zuvor bearbeiteten Lendenwirbelkörpern.

2.8 Auswertung und Statistik

Die erhobenen Messwerte wurden gruppenweise untereinander verglichen. Die statistische Analyse der signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen erfolgte durch *one-way ANOVA* Test und wurde mit einem Turkey-Kramer post hoc Test (GraphPad prism, la Jolla, CA, USA) exakter differenziert. Als Richtwert für das Signifikanzniveau wurde ein p- Wert $< 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Einteilung der Versuchstiere

Die ovariectomierten Versuchstiere wurden zu Beginn in „Prophylaxe-“ und „Therapiegruppen“ unterteilt. Die Prophylaxegruppen (Pr) erhielten unmittelbar nach der Ovariectomie für zehn Wochen eine Behandlung. Die Ratten, die in den Therapiegruppen (Th) waren erhielten fünf Wochen nach der Ovariectomie für fünf Wochen eine Behandlung. Die Langzeitanwendung von VLPs mit beladener siRNA zeigte keine Anzeichen von Toxizität. Zehn Wochen nach der Ovariectomie wurden die Proben zusammengetragen. Die Unterteilung sowie die Behandlung der einzelnen Gruppen werden in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Unterteilung und Behandlung der Versuchstiere

Unterteilung der Tiere	Behandlung
Non Ovx	Nicht ovariectomierte Tiere, keine Behandlung
Ovx siCtrl Th	Ovariectomierte siRNA-Therapiekontrollgruppe
Ovx siCtrl Pr	Ovariectomierte siRNA-Prophylaxekontrollgruppe
Ovx siRANKL Th	Ovariectomierte RANKL-siRNA-Therapiegruppe
Ovx siRANKL Pr	Ovariectomierte RANKL-siRNA-Prophylaxegruppe
Ovx EB Th	Ovariectomierte 17 β -Estradiol-Therapiegruppe
Ovx EB Pr	Ovariectomierte 17 β -Estradiol-Prophylaxegruppe

3.2 Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Die Ergebnisse der qPCR an den untersuchten Lendenwirbelkörpern, zeigten einen signifikanten Knockdown der RANKL-mRNA, bei den Tieren, die eine 17 β -Estradiol Therapie (*Ovx EB Th/Pr*) erhielten. Bei den RANKL-siRNA-Gruppen (*Ovx siRANKL Th/Pr*) zeigte sich ebenfalls eine Herunterregulierung der RANKL-mRNA, jedoch ohne statistische Signifikanz (Abb. 20).

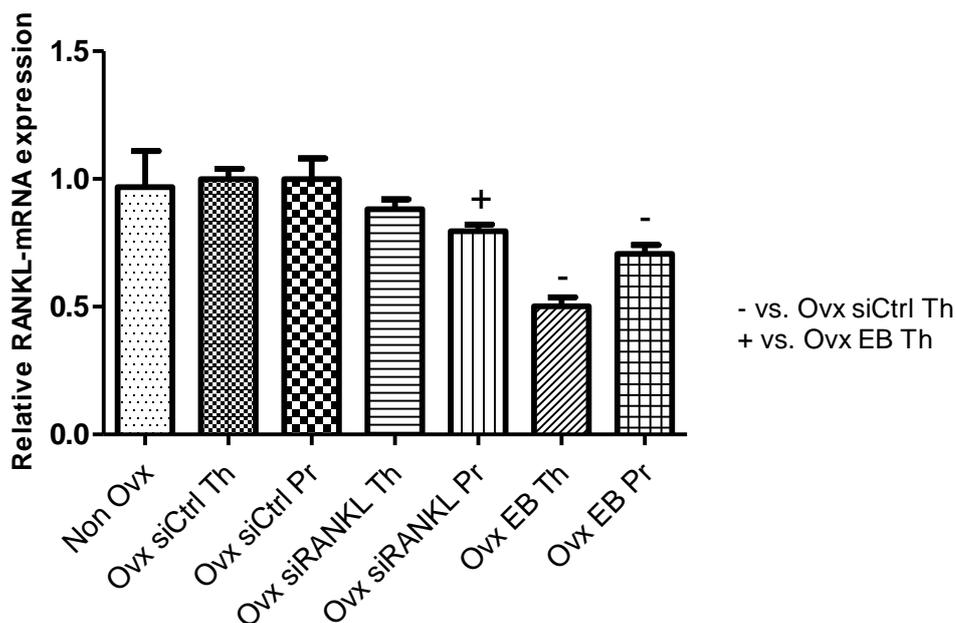


Abbildung 20: qPCR von RANKL-mRNA in LWK. Knockdown berechnet im Vergleich zu Ovx siCtrl Th/Pr. Die Behandlung mit RANKL-siRNA zeigte eine Herunterregulierung der RANKL-mRNA in den Ovx-siRANKL-Th/Pr-Gruppen. Ebenfalls wurde ein signifikanter Knockdown von RANKL-mRNA in den 17 β -Estradiol verabreichten Gruppen sichtbar. – $p < 0,05$ vs. Ovx siCtrl Th, + vs. Ovx EB Th. Standard deviation (SD).

Die Analyse der RANKL-mRNA mittels qPCR zeigte bei den untersuchten Tibiae, im Vergleich zu den qPCR-Ergebnissen der Lendenwirbelkörper, eine signifikante Herunterregulierung der RANKL-mRNA in den RANKL-siRNA-Therapie- und Prophylaxegruppen (*Ovx siRANKL Th/Pr*). In den 17 β -Estradiolgruppen (*Ovx EB Th/Pr*) zeigte sich ebenfalls, wie bei den untersuchten Lendenwirbelkörpern, eine Herunterregulierung von RANKL-mRNA. Insbesondere bei den Tieren, die eine sofortige Therapie mit 17 β -Estradiol (*Ovx EB Th*) erhielten (Abb. 21).

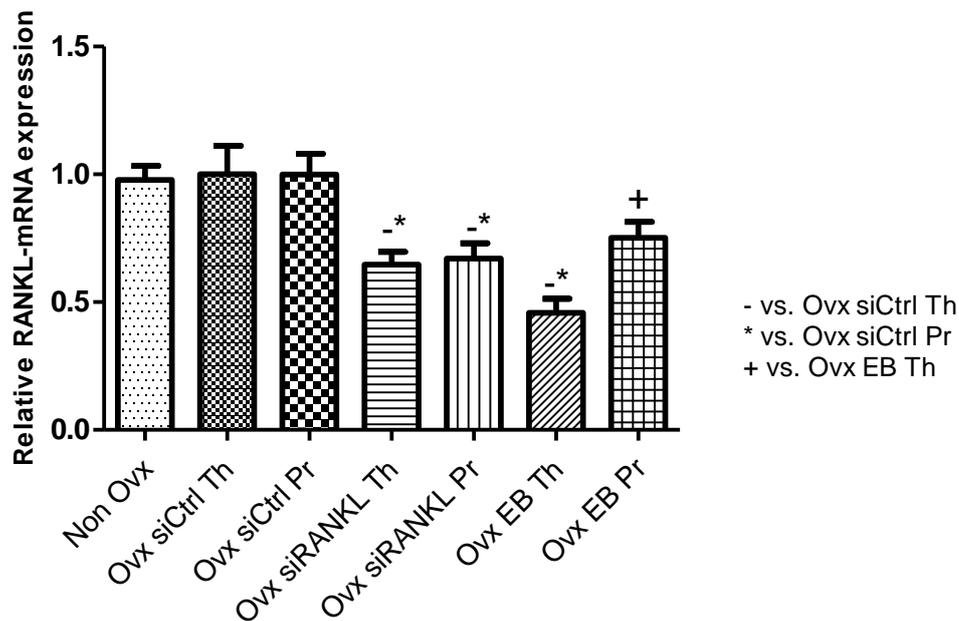


Abbildung 21: qPCR von RANKL-mRNA in Tibiae. Knockdown berechnet im Vergleich zu Ovx siCtrl Th/Pr. Die Behandlung von RANKL-siRNA zeigte einen signifikanten Knockdown von RANKL (etwa 35%) in den Ovx-siRANKL-Th/Pr -Gruppen. In der Ovx-EB-Th-Gruppe zeigte sich ebenfalls eine signifikante Herunterregulierung von RANKL-mRNA. – $p < 0,05$ vs. Ovx siCtrl Th, * $p < 0,05$ vs. Ovx siCtrl Pr, + $p < 0,05$ vs. Ovx EB Th. Standard deviation (SD) (Hoffmann et al. 2018).

3.3 Ergebnisse der Western-Blot-Technik

Die Western-Blot-Technik bestätigte eine deutlich verminderte Expression des RANKL-Proteins in Tibiae in den RANKL-siRNA (*Ovx siRANKL Th*) und 17 β -Estradiol-Therapiegruppen (*Ovx EB Th*). Bei den Tieren, die in der RANKL-siRNA (*Ovx siRANKL Pr*) und der 17 β -Estradiol-Prophylaxegruppe (*Ovx EB Pr*) waren, zeigte sich keine Herunterregulierung des RANKL-Proteins (Abb. 22).

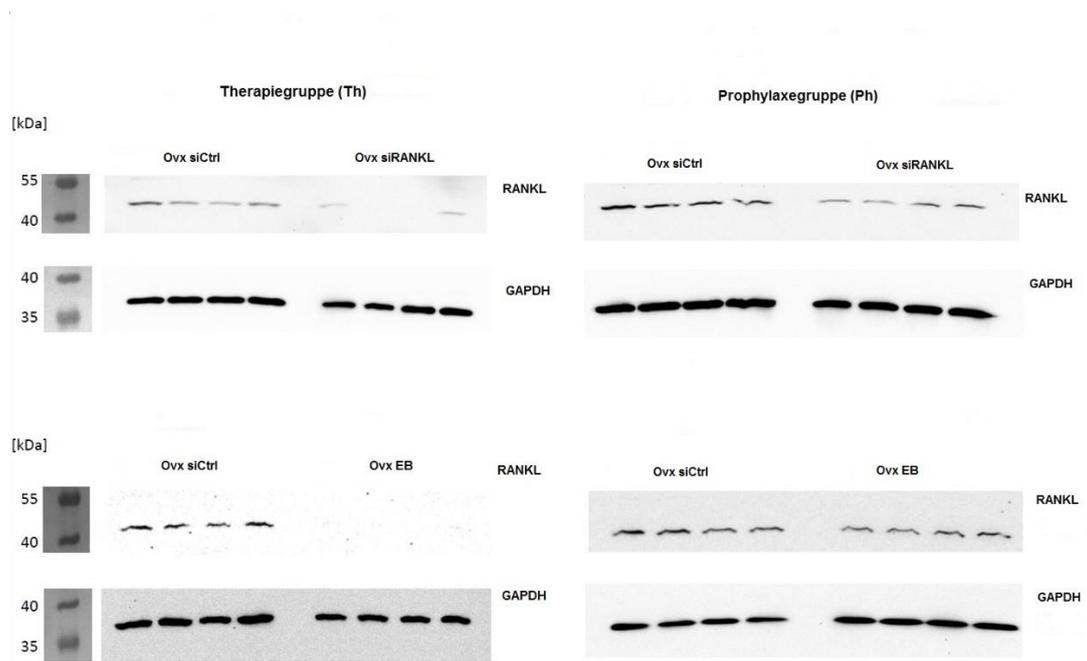


Abbildung 22: Western Blot Analyse des RANKL-Proteins in den Tibiae. Die Behandlung mit 17β -Estradiol (Ovx EB Th) und RANKL-siRNA (Ovx siRANKL Th) zeigte einen offensichtlichen RANKL Knockdown in den Therapiegruppen (Th). In den Prophylaxegruppen (Ph) konnte kein Knockdown auf Proteinebene nachgewiesen werden (Hoffmann et al. 2018).

Die Western Blot Analyse zeigte keine Inhibition von RANKL auf Proteinebene, bei ovariektomierten Ratten, die mit nicht codierender Kontroll-siRNA behandelt worden (*Ovx siCtrl Th*) (Abb. 23).

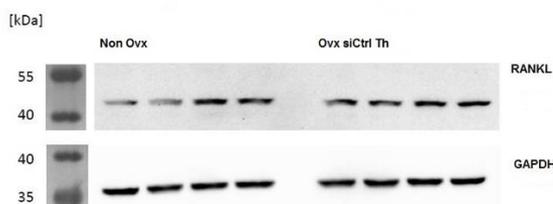


Abbildung 23: Western Blot Analyse des RANKL-Proteins in den Tibiae. Die Behandlung mit Kontroll-siRNA (*Ovx siCtrl Th*) zeigte keinen Effekt auf die Proteinexpression von RANKL (Hoffmann et al. 2018).

3.4 Ergebnisse der Serum-Analyse von β -Crosslaps

Die Serum-Analyse von β -Crosslaps zeigte erniedrigte Werte bei den nicht ovariectomierten Tieren (*Non Ovx*) und den mit 17β -Estradiol (*Ovx EB Th/Pr*) behandelten Tieren gegenüber den Tieren, die Kontroll-siRNA (*Ovx siCtrl Th/Pr*) und RANKL-siRNA (*Ovx siRANKL Th/Pr*) erhielten. Die ovariectomierten Ratten in der Therapiegruppe, welche mit Kontroll-siRNA (*Ovx siCtrl Th*) behandelt wurden, wiesen den höchsten Serumspiegel auf. Die RANKL-siRNA-Therapiegruppe (*Ovx siRANKL Th*) zeigte einen signifikanten Anstieg des β -Crosslaps-Spiegels im Vergleich zu den nicht ovariectomierten Ratten (*Non Ovx*) und ähnliche Spiegel wie bei den Ratten, die in der Therapiegruppe mit Kontroll-siRNA (*Ovx siCtrl Th*) behandelt wurden. In der Prophylaxegruppe hatten die Ratten, die mit RANKL-siRNA (*Ovx siRANKL Pr*) behandelt wurden, signifikant erhöhte β -Crosslaps im Vergleich zu nicht ovariectomierten Ratten (*Non Ovx*) und Ratten, die unmittelbar nach der Ovariectomie 17β -Estradiol verabreicht bekamen. Jedoch zeigten die Ratten in der Prophylaxegruppe, die mit Kontroll-siRNA (*Ovx siCtrl Pr*) behandelt wurden, keine erhöhten Werte im Vergleich zu nicht ovariectomierten Tieren (*Non Ovx*) (Abb. 24).

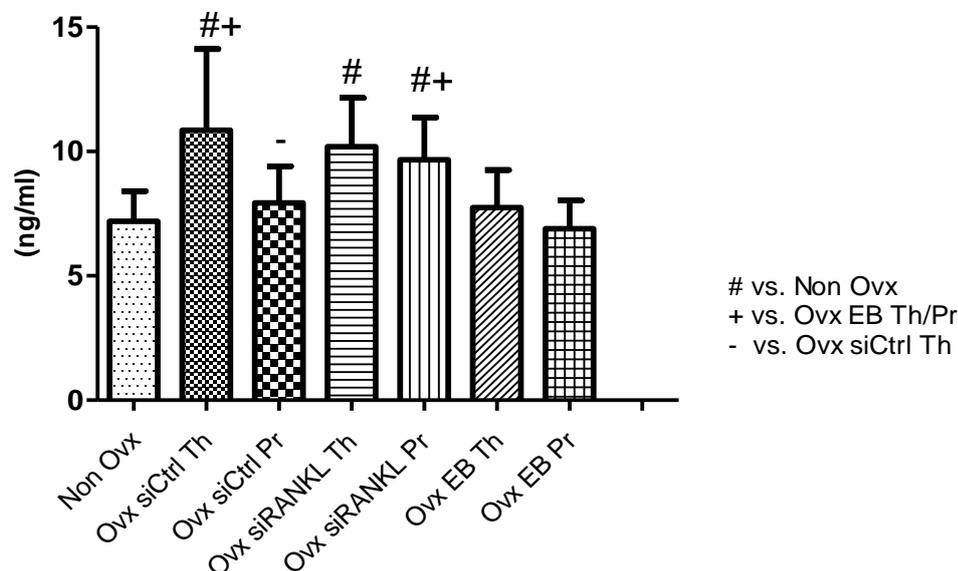


Abbildung 24: Serum-Analyse von β -Crosslaps (ng/ml). Die mit 17β -Estradiol behandelten Tiere wiesen vergleichbare Mengen an β -Crosslaps wie die Non Ovx Tiere auf. Die Behandlung mit RANKL-siRNA hatte keinen Effekt auf den β -Crosslap Spiegel. Tiere, die mit Ovx siCtrl behandelt wurden zeigten in der Therapiegruppe vergleichbare Werte wie die Ovx-siRANKL-Gruppen. In der Ovx-siCtrl-Prophylaxegruppe zeigten sich erniedrigte β -Crosslaps-Spiegel. # $p < 0,05$ vs. Non Ovx, + $p < 0,05$ vs. Ovx EB Th/Pr, - $p < 0,05$ vs. Ovx siCtrl Th. Standard deviation (SD) (Hoffmann et al. 2018).

3.5 Gewicht der Versuchstiere, Futteraufnahme und Uterusgewicht

Zu Beginn der Studie hatten alle Versuchstiere annähernd das gleiche Körpergewicht ($311,5 \pm 12,8$ g). Im Verlauf nahm das Gewicht in allen Gruppen wachstumsbedingt zu. Die ovariektomierten Ratten zeigten eine signifikant ausgeprägte Gewichtszunahme. Die direkte Behandlung mit 17β -Estradiol nach Ovariektomie in der Prophylaxegruppe (*Ovx EB Pr*) verhindert eine Zunahme des Körpergewichts. Die Gabe von 17β -Estradiol fünf Wochen nach Ovariektomie in der Therapiegruppe (*Ovx EB Th*) zeigte eine Gewichtsreduktion in den ersten zwei Wochen der Behandlung. Das Gewicht reduzierte sich auf ungefähr die gleichen Werte wie bei der nicht ovariektomierten-Gruppe (*Non Ovx*) und folgte deren Kurve. Die Behandlung mit RANKL-siRNA (*Ovx siRANKL*) oder Kontroll-siRNA (*Ovx siCtrl*) zeigte keine Auswirkung auf das Körpergewicht (Abb. 25).

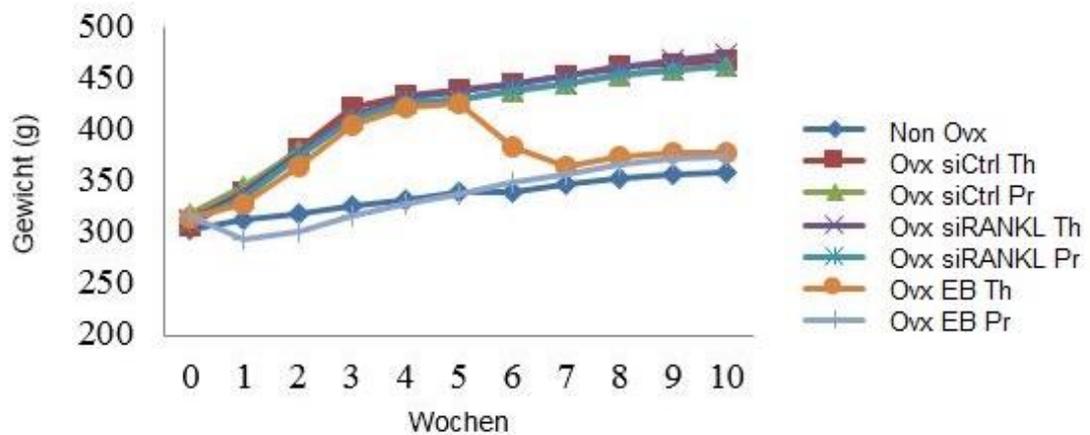


Abbildung 25: Darstellung des mittleren Körpergewichts (g) der Tiere jeder Therapiegruppe pro Woche. Non Ovx und Ovx EB Pr zeigten ein vermindertes Körpergewicht gegenüber den anderen Tieren. Ratten, die einer Ovariectomie unterzogen wurden nahmen deutlich an Gewicht zu. Bei der Ovx-EB-Th-Gruppe zeigte sich eine Gewichtsreduktion unter der Behandlung mit 17 β -Estradiol. Die Behandlung mit VLPs hatte keinen Einfluss auf das Körpergewicht. Standard deviation (SD) (Hoffmann et al. 2018).

Die durchschnittliche Futteraufnahme der Versuchstiere war in der 17 β -Estradiol-Therapiegruppe (*Ovx EB Th*) ab der fünften Woche nach Versuchsbeginn kurzzeitig vermindert, dennoch ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Futteraufnahme der Tiere. Tendenziell zeigten die ovariectomierten-Gruppe (*Ovx*) einen höheren Futterverbrauch, im Vergleich zu der nicht ovariectomierten-Gruppe (*Non Ovx*) und der 17 β -Estradiol-Prophylaxe-Gruppe (*Ovx EB Pr*) (Abb. 26).

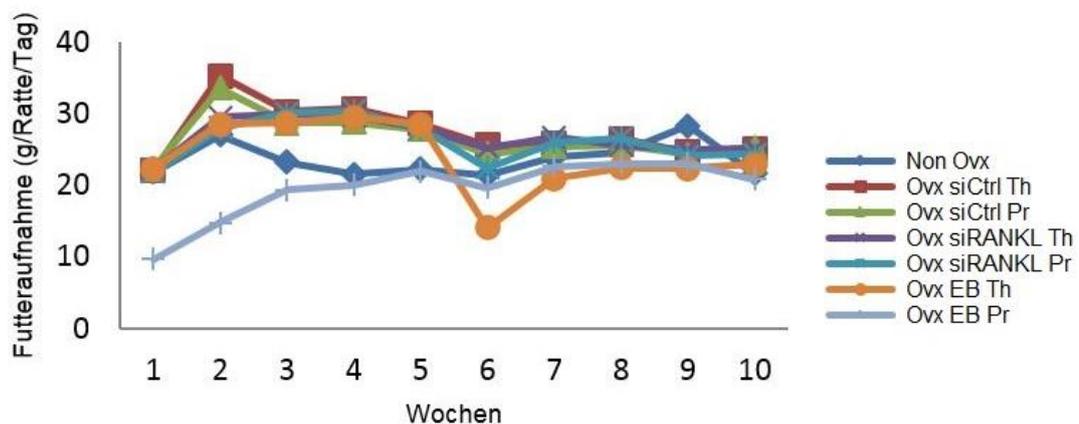


Abbildung 26: Darstellung der durchschnittlichen Futteraufnahme (g/Ratte/Tag) pro Woche. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, $p = 0,05$. Standard deviation (SD) (Hoffmann et al. 2018).

Das Uterusgewicht war bei den 17β -Estradiolgruppen (*Ovx EB Th/Pr*) gegenüber den ovariectomierten Kontroll-siRNA-Gruppen (*Ovx siCtrl Th/Pr*) und den Gruppen die RANKL-siRNA (*Ovx siRANKL Th/Pr*) erhielten, signifikant erhöht. Die Behandlung mit VLPs zeigte keine Auswirkung auf das Uterusgewicht (Abb. 27).

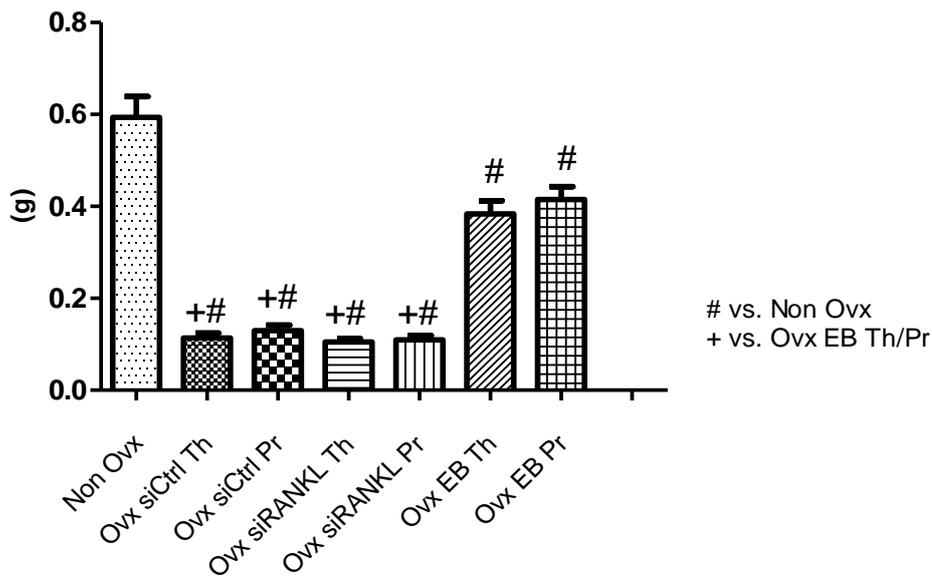


Abbildung 27: Gewicht der entnommenen Uteri in g. Das Uterusgewicht nahm bei allen Ovx Tieren, im Vergleich zu Non Ovx Tieren ab. Gruppen, denen Östrogene verabreicht wurden, zeigten im Vergleich zu VLP-Gruppen ein signifikant erhöhtes Uterusgewicht. # $p < 0,05$ vs. Non Ovx, + $p < 0,05$ vs. Ovx EB Th/Pr. Standard deviation (SD) (Hoffmann et al. 2018).

3.6 Ergebnisse der biomechanischen Untersuchungen

Bei der gemessenen Maximalkraft (F_{max}) an den Lendenwirbelkörpern erreichte die 17β -Estradiol-Prophylaxegruppe (*Ovx EB Pr*) höhere Werte, im Vergleich zu der 17β -Estradiol-Therapiegruppe (*Ovx EB Th*) und der nicht ovariectomierten-Gruppe (*Non Ovx*). Die ovariectomierten Ratten in der Therapiegruppe, die RANKL-siRNA (*Ovx siRANKL Th*) transfiziert bekamen, wiesen die höchste Maximalkraft auf. Die direkte Behandlung mit 17β -Estradiol und RANKL-siRNA (*Ovx EB Pr*, *Ovx siRANKL Pr*) nach Ovariectomie zeigte signifikant erhöhte Mittelwerte im Vergleich zu den Tieren, die fünf Wochen nach Ovariectomie Kontroll-siRNA (*Ovx siCtrl Th*) transfiziert bekamen. Bezüglich der gemessenen Steigung (N/mm) an den Lendenwirbelkörpern besteht keine Signifikanz unter den einzelnen Gruppen. Die RANKL-siRNA-

Therapiegruppe (*Ovx siRANKL Th*) wies die höchsten Mittelwerte auf, jedoch ohne statistische Signifikanz. Bei den Versuchsergebnissen der volumenkorrelierten Streckgrenze (*Yieldload*) an den Lendenwirbelkörpern erreichte die RANKL-siRNA-Therapiegruppe (*Ovx siRANKL Th*) die höchsten signifikanten Mittelwerte im Vergleich zu der Kontroll-siRNA-Therapiegruppe (*Ovx siCtrl Th*) und wies vergleichbare Werte wie bei den nicht ovariektomierten Tieren auf. Des Weiteren bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der siRNA-Therapie- (*Ovx siCtrl Th*) und der 17 β -Estradiol-Prophylaxegruppe (*Ovx EB Pr*) (Abb. 28).

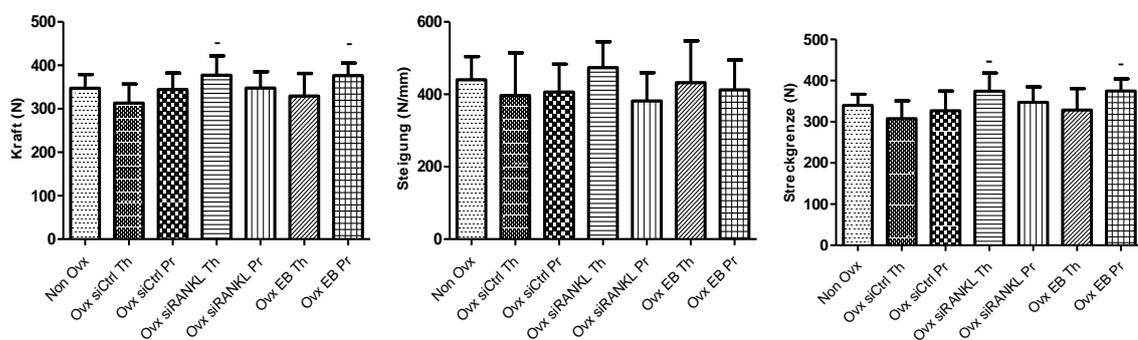


Abbildung 28: Biomechanische Analyse der Lendenwirbelkörper (LWK). Fmax in N, Steigung in N/mm, volumenkorrelierte Streckgrenze in N. Die Ovx EB Pr und die Ovx-siRANKL-Pr-Gruppen, zeigten signifikant erhöhte Mittelwerte in Fmax. In Bezug auf die Steigung war keine Signifikanz unter den Gruppen erkennbar. Bei den Ergebnissen der volumenkorrelierten Streckgrenze erreichte die Ovx-siRANKL-Th-Gruppe die höchsten signifikanten Mittelwerte und vergleichbare Ergebnisse wie die Non Ovx Tiere. Zwischen der Ovx-siCtrl-Th-Gruppe und der Ovx-EB-Pr-Gruppe bestand ein signifikanter Unterschied im Yield Load. – p < 0,05 vs. Ovx siCtrl Th. Standard deviation (SD).

Bei den gemessenen Ergebnissen der Maximalkraft an den Tibiae, wiesen die nicht ovariektomierten Tiere (*Non Ovx*) und die mit 17 β -Estradiol behandelten Tiere aus der Prophylaxegruppe (*Ovx EB Ph*) höhere Mittelwerte, im Vergleich zu den Kontroll-siRNA (*Ovx siCtrl Th/Pr*) und RANKL-siRNA (*Ovx siRANKL Th/Pr*) transfizierten Gruppen auf. Die Behandlung mit VLPs, zeigte in der RANKL-siRNA-Therapiegruppe (*Ovx siRANKL Th*) die höchsten signifikanten Mittelwerte, gegenüber der nicht ovariektomierten-Gruppe (*Non Ovx*). In Bezug auf die ermittelten Werte der Steigung an den Tibiae, zeigten sich in der RANKL-siRNA-Therapiegruppe (*Ovx siRANKL Th*) höhere Mittelwerte im Vergleich zu den Kontroll-siRNA-Gruppen (*Ovx siCtrl Th/Pr*). Diese Erhöhung ist jedoch ohne statistische Signifikanz. Die nicht ovariektomierte-Gruppe (*Non Ovx*) sowie die 17 β -Estradiol-Prophylaxegruppe (*Ovx EB Pr*), wiesen in Bezug auf die Steigung die höchsten signifikanten Werte gegenüber der Kontroll-siRNA-Therapie- (*Ovx*

siCtrl Th) und der RANKL-siRNA-Prophylaxegruppe (*Ovx siRANKL Pr*) auf. Ein signifikanter Unterschied innerhalb der VLPs transfizierten Gruppen besteht nicht.

Bei den Ergebnissen der Streckgrenze an den Tibiae zeigten die nicht ovariektomierten Tiere (*Non Ovx*) und die 17 β -Estradiol-Prophylaxegruppe (*Ovx EB Pb*) signifikant höhere Werte als die Kontroll-siRNA- (*Ovx siCtrl Th/Pr*) und die RANKL-siRNA-Gruppen (*Ovx siRANKL Th/Pr*). Eine Signifikanz innerhalb der VLPs transfizierten Gruppen in Bezug auf die volumenkorrelierte Streckgrenze ergab sich nicht (Abb. 29).

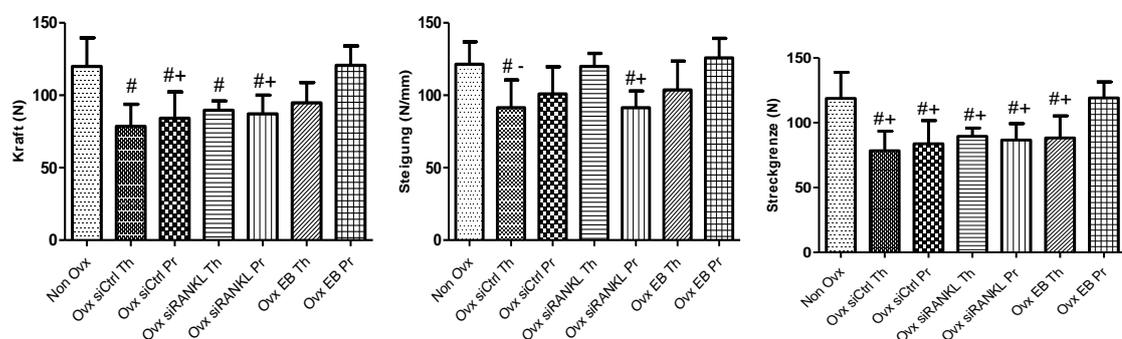


Abbildung 29: Biomechanische Beurteilung der Tibiae. Fmax in N, Steigung in N/mm, volumenkorrelierte Streckgrenze in N. Die Non Ovx- und die Ovx-EB-Pr-Gruppen wiesen die höchsten Mittelwerte in Fmax auf. Ein signifikanter Unterschied in Fmax zeigte sich in der Ovx-siRANKL-Th-Gruppe. In der Steigung zeigten sich, mit die höchsten Mittelwerte in der Ovx-siRANKL-Th-Gruppe, ohne statistische Signifikanz. Die Non-Ovx- und Ovx-EB-Pr-Gruppen wiesen die höchsten signifikanten Mittelwerte in der Steigung auf. Bei den Ergebnissen der Streckgrenze zeigten sich signifikant höhere Mittelwerte bei den Non-Ovx- und den Ovx-EB-Th-Gruppen. Eine Signifikanz innerhalb der VLPs transfizierten Gruppen in Bezug auf die Steigung und der volumenkorrelierten Streckgrenze bestand nicht. # $p < 0,05$ vs. Non Ovx, + $p < 0,05$ vs. Ovx EB Th/Pr, - $p < 0,05$ vs. Ovx siCtrl Th. Standard deviation (SD) (Hoffmann et al. 2018).

3.7 Ergebnisse der Mikro-Computertomographie

Die Mikro-Computertomographieergebnisse an den Lendenwirbelkörpern zeigten erhöhte Werte in der RANKL-siRNA-Prophylaxegruppe (*Ovx siRANKL Pr*) im Vergleich zu den Gruppen, die 17 β -Estradiol (*Ovx EB Th/Pr*) erhielten und den nicht ovariektomierten-Gruppen (*Non Ovx*). Ein signifikanter Unterschied ist bei der RANKL-siRNA-Prophylaxegruppe (*Ovx siRANKL Pr*), bei den Werten der Trabekelanzahl und der Trabekelknoten, im Vergleich zu der 17 β -Estradiol-Prophylaxegruppe (*Ovx EB Pr*) zu erkennen. Die siRNA-RANKL-Prophylaxegruppe (*Ovx siRANKL Pr*), weist meist höhere Mittelwerte in den trabekulären

Knocheneigenschaften als die intakten Tiere auf. Jedoch ohne statistische Signifikanz. Innerhalb der VLPs transfizierten Gruppen, besteht ebenfalls kein signifikanter Unterschied (Tab. 10).

Tabelle 10: Mikro-Computertomographie Knochenstrukturmessung. LWK. Die Ovx-siRANKL-Pr-Gruppe zeigte erhöhte Werte im Vergleich zu der Ovx-EB-Th/Pr- und der Non-Ovx-Gruppe. Ein signifikanter Unterschied ist bei der Ovx-siRANKL-Pr-Gruppe gegenüber der Ovx-EB-Pr-Gruppe in Bezug auf die Trabekelanzahl und Trabekelknoten erkennbar. Die Ovx-siRANKL-Pr-Gruppe weist tendenziell die höchsten Mittelwerte in den trabekulären Knocheneigenschaften auf, ohne statistische Signifikanz. Ein signifikanter Unterschied innerhalb der VLPs transfizierten Gruppen besteht nicht. # $p < 0,05$ Non Ovx, + $p < 0,05$ EB Pr. Standard deviation (SD).

	Non Ovx		siCtrl Th		siCtrl Pr		siRANKL Th		siRANKL Pr		EB Th		EB Pr	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
Trabekelanzahl (Tb.)	128,4	34,6	121,9	52,5	135,3	60,1	91,5	32,5	183,7	+ 46,8	125,6	28,4	98,0	14,0
Abstand der Trabekelknoten (Tb.S) μm	331,5	20,2	349,4	47,2	347,9	29,3	393,8	#+ 69,1	336,9	42,9	327,1	27,2	343,8	17,2
Trabekelknoten (Nodes)	156	43	145,6	66,4	161,5	78,8	109,8	39,3	204,9	+ 86,2	149,9	36,1	116,4	18,2
Trabekeldicke (Tb.Th) in μm	140,8	47,2	139,2	71,1	148,8	67,1	195,0	57,6	147,6	78,9	139,5	47,6	203,5	49,9
Trabekelkreuzungen (Tb.N)	2,4	0,1	2,4	0,1	2,3	0,2	2,4	0,1	2,4	0,1	2,3	0,1	2,3	0,1
Bonevolume (BV) in mm^3	8,1	2,1	6,2	2,1	8,0	0,8	8,4	1,6	7,8	1,4	7,1	1,4	8,2	1,3
Gesamtvolumen (TV) in mm^3	92,1	10,1	84,9	12,9	95,1	16,1	90,8	8,9	103,6	15,3	87,7	9,8	91,7	9,6
BV/TV %	72,7	3,9	72,4	5,1	72,1	4,1	75,5	3,5	68,7	4,1	73,3	3,7	74,3	5,6

Die ausgewerteten Ergebnisse der Mikro-Computertomographie an den Tibiae, zeigten verminderte trabekuläre Knocheneigenschaften in den 17 β -Estradiolgruppen (*Ovx EB Th/Pr*), in den Kontroll-siRNA-Gruppen (*Ovx siCtrl Th/Pr*) und in den RANKL-siRNA-Gruppen (*Ovx siRANKL Th/Pr*) im Vergleich zu den nicht ovariektomierten Ratten (*Non Ovx*). Die 17 β -Estradiol-Prophylaxegruppe (*Ovx EB Pr*), wies in diesem Versuch die höchsten signifikanten Mittelwerte in dem feinstrukturellen Knochenaufbau gegenüber den VLPs transfizierten Gruppen auf. In den RANKL-siRNA-Gruppen (*Ovx siRANKL Th/Pr*) ist keine signifikante Verbesserung in den Knocheneigenschaften im Vergleich zu den Kontroll-siRNA-Gruppen (*Ovx siCtrl Th/Pr*) zu erkennen. Innerhalb der ovariektomierten Kontroll- und RANKL-siRNA-Gruppen (*Ovx siCtrl Th/Pr*, *Ovx siRANKL Th/Pr*) besteht kein signifikanter Unterschied (Tab. 11).

Tabelle 11: Mikro-Computertomographie Knochenstrukturmessung. Tibiae. Die Ovx-EB-Th/Pr-Gruppen, die Ovx-siCtrl-Th/Pr-Gruppen und die Ovx-siRANKL-Th/Pr-Gruppen zeigten verminderte trabekuläre Knocheneigenschaften. Die Ovx-EB-Pr-Gruppe wies die höchsten signifikanten Mittelwerte gegenüber den VLPs transfizierten Gruppen auf. Die OVX-siRANKL-Th/Pr-Gruppen zeigten keinen signifikanten Unterschied zu den OVX siCtrl Th/Pr transfizierten Gruppen. Ein signifikanter Unterschied innerhalb der VLPs transfizierten Gruppen besteht nicht. # $p < 0,05$ Non Ovx, + $p < 0,05$ EB Pr. Standard deviation (SD) (Hoffmann et al. 2018).

	Non Ovx		siCtrl Th		siCtrl Pr		siRANKL Th		siRANKL Pr		EB Th		EB Pr	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
Trabekelanzahl (Tb.)	187,9	60,9	20,4##+	30,3	39,6##+	22,3	26,9 ##+	12,9	19,5##+	8,5	32,6##	16,8	104,1##	45,9
Abstand der Trabekelknoten (Tb.S) μm	259,2	28,2	314,8	79,2	323,2	13,3	306,9	96,5	285,7	92,1	263,9	70,6	267,2	39,3
Trabekelknoten (Nodes)	223,7	72,5	19,9##+	29,9	39,9 ##+	24,5	22 ,1##+	12,5	18,5##+	9,8	33,6##	12,8	113,6##	54,5
Trabekeldicke (Tb.Th) in μm	176,7	63,7	67,8##+	8,2	67,4##+	10,4	73##+	9,5	66,6##+	9,1	67,8##	7,5	111,3##+	25,1
Trabekelkreuzungen (Tb.N)	28,9	8,6	8,6##+	3,1	9,6##+	7,1	8,9##+	4,3	8,5##+	5,1	7,8##+	3,3	29,2	9,2
Bone volume (BV) in mm^3	3,1	1,53.	0,47##+	0,49	0,81##	0,38	0,51##+	0,22.	0,29##+	0,13	0,54##+	0,24	1,83##	0,85
Gesamtvolumen (TV) in mm^3	52,9	11,8	38,8	10,5	43,6	12,8	47,0	10,5	42,8	6,2	47,1	13,9	41,1	6,7
BV/TV %	53,8	9,1.	44,5	6,2	40,4##	7,2	40,5##	7,5	40,3##	3,7	39,4##+	6,8	50,8	4,4

Bei den gemessenen Ergebnissen der Dichten und Volumina an den Lendenwirbelkörpern weisen die RANKL-siRNA-Gruppen (*Ovx siRANKL Th/Pr*) im Durchschnitt die höchsten Mittelwerte im Vergleich zu den intakten Tieren (*Non Ovx*), der 17 β -Estradiol-Prophylaxegruppe (*Ovx EB Pr*) und der Kontroll-siRNA-Therapiegruppe (*Ovx siCtrl Th*) auf. Die RANKL-siRNA-Prophylaxegruppe (*Ovx siRANKL Pr*) zeigt signifikante Unterschiede in der Trabekeldichte, Trabekel- und Kortikalisdichte, sowie in der Gesamtdichte gegenüber der 17 β -Estradiol-Prophylaxegruppe (*Ovx EB Pr*). Des Weiteren konnte ein signifikanter Vergleich zwischen der siRNA-RANKL-Prophylaxegruppe (*Ovx siRANKL Pr*) und der Kontroll-siRNA-Therapiegruppe (*Ovx siCtrl Th*) in Bezug auf das Gesamtvolumen gezogen werden. Die RANKL-siRNA-Therapiegruppe (*Ovx siRANKL Th*) weist den höchsten Mittelwert im Kortikalisvolumen auf und ist signifikant zur nicht ovariectomierten-Gruppe (*Non Ovx*). Die Kontroll-siRNA-Therapiegruppe (*Ovx siCtrl Th*) hatte annähernd gleich hohe signifikante Werte, in Bezug auf die Trabekeldichte und die Trabekel- und Kortikalisdichte, wie die 17 β -Estradiol-Prophylaxegruppe (*Ovx EB Pr*). In den kortikalen Eigenschaften wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet (Tab. 12).

Tabelle 12: Volumina in mm³ und Dichten g/cm³. LWK. Die OvX-siRANKL-Th/Pr-Gruppen wiesen im Durchschnitt die höchsten Mittelwerte auf. Die OvX-siRANKL-Pr-Gruppe zeigt signifikante Unterschiede in der Trabekeldichte, Trabekel- und Kortikalisdichte, sowie in der Gesamtdichte. Im Gesamtvolumen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der OvX-siRANKL-Pr-Gruppe und der OvX-siCtrl-Th-Gruppe gezogen werden. Die OvX-siRANKL-Th-Gruppe wies im Kortikalisvolumen die höchsten signifikanten Mittelwerten gegenüber der der Non-OvX-Gruppe auf. Die OvX-siCtrl-Th-Gruppe hatte signifikante Werte in der Trabekeldichte und in der Trabekel- und Kortikalisdichte. Zwischen den einzelnen Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied. # p < 0,05 Non OvX, + p < 0,05 EB Pr, - p < 0,05 OvX siRNA. Th. Standard deviation (SD).

	Non OvX		siCtrl Th		siCtrl Pr		siRANKL Th		siRANKL Pr		EB Th		EB Pr	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
Kortikalisvolumen mm³	26,6	4,4	26,6	4,1	28,3	5,9	34,4#	5,5	28,2	2,8	27,7	4,9	31,4	4,1
Kortikalisdichte mg/cm³	1031	29,4	1002	47,8	1001	37,9	1033	14,8	999,2	16,4	1041	58,4	1011	42,1
Trabekelvolumen mm³	40,4	8,1	36,2	4,9	39,9	10,2	33,8	3,9	42,1	5,4	36,4	7,9	34,2	3,7
Trabekeldichte mg/cm³	577,0	18,6	556,9+	16,9	566,7.	9,8	575,8-	7,5	558,7+	8,9	561,5	11,4	582,8	4,2
Trabekel-& Kortikalisvolumen mm³	67,1	9,9	61,01	6,8	68,5	11,0	68,6	7,6	70,8	9,0	64,2	7,2	67,3	5,2
Trabekel-& Kortikalisdichte mg/cm³	758,9	27,2.	744,6+	25,9	750,7	51,6	80,6	29,4	738,5+	20,6	764,0	50,8	804,1	38,8
Weichteilvolumen mm³	24,8	2,8	24,2	6,62.	6,7	6,9	22,3	3,6	32,7	7,6	24,2	4,7	23,8	7,0
Weichteildicht mg/cm³	86,6	11,1	93,3	9,7	91,7	26,6	75,3	8,8	91,6	15,6	73,8	11,6	71,1	34,4
Gesamtvolumen mm³	92,1	10,1	84,9	12,9.	95,2	16,1	90,8	8,9	103,6-	15,3	87,7	9,8	91,1	9,6
Gesamtdichte mg/cm³	575,6	35,6	564,3	43,1	567,1	48,1	628,3	46,1	535,8	35,4	581,2	58,4	613,3	63,8
Gesamtvolumen/Knochen-volumen %	72,7	3,9	72,4	5,1	72,1	4,0	75,5	3,6	68,7	3,9	73,3	3,7	74,3	5,6
Kortikalisfläche µm	235,4	55,7	221,9	60,4	252,0	45,9	231,3	44,7	249,4	45,6	230,7	39,4	209,1	31,2

In Bezug auf die gemessenen Ergebnisse der Volumina und Dichten an den Tibiae wiesen die nicht ovariectomierten Tiere (*Non Ovx*) die höchsten signifikanten Mittelwerte im Vergleich zu den VLPs induzierten- und zu den Ratten, die 17 β -Estradiol verabreicht bekamen, auf. Des Weiteren bestehen signifikante Unterschiede zwischen der 17 β -Estradiol-Prophylaxegruppe (*Ovx EB Pr*) und den RANKL-siRNA-Gruppen (*Ovx siRANKL Tb/Pr*), in der Trabekel- und der Weichteildichte. Ebenso wie in den Kontroll-siRNA-Therapiegruppen. Eine statistische Signifikanz unter den VLPs transfizierten Gruppen bestand nicht (Tab. 13).

Tabelle 13: Volumina in mm³ und Dichten g/cm³. Tibiae. Die Non-Ovx-Gruppe wies die höchsten signifikanten Mittelwerte auf. In Bezug auf die Trabekel- und Weichteildichte konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Ovx-EB-Pr-Gruppe und den Ovx-siRANKL-Th/Pr-Gruppen, sowie der Ovx-siCtrl-Th-Gruppe gezeigt werden. Eine statistische Signifikanz unter den VLPs transfizierten Gruppen bestand nicht. # p < 0,05 Non Ovx, + p < 0,05 EB Pr. Standard deviation (SD) (Hoffmann et al. 2018).

	Non Ovx		siCtrl Th		siCtrl Pr		siRANKL Th		siRANKL Pr		EB Th		EB Pr	
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
Kortikalisvolumen mm³	13,1	2,0	11,5	0,6	10,9	2,0	11,6	1,8	11,4	1,6	10,8	1,1	11,7	9,1
Kortikalisdichte mg/cm³	1484	254	1335	32,9	1305#	37,3	1253#	59,9	1298#	84,9	1304#	31,8	1333	40,0
Trabekelvolumen mm³	14,9	7,1	5,2#	1,7	6,1#	1,9	6,8#	1,4	5,7#	1,3	5,6#	1,4	9,1#	2,6
Trabekeldichte mg/cm³	750,5	16,4	796,8##+ 9,9		792,0##+ 13,0 7		96,7##+ 11,3		793,0##+ 12,2		789,8#	9,1	749,8	13,3
Trabekel-& Kortikalisvolumen mm³	28,0	7,8	16,7#	2,1	17,0#	2,9	18,5#	2,4	17,1#	1,7	16,2#	1,9	20,9#	3,9
Trabekel-& Kortikalisdichte mg/cm³	1069	119,7	1173#	61,2	1123	58,7	1102	40,9	1148	52,2	1128	44,8	1081	56,6
Weichteilvolumen mm³	24,2	7,5	22,1	8,5	26,7	10,6	28,6	9,4	25,7	5,2	30,9	14,5	20,3	3,9
Weichteildicht mg/cm³	178,3	41,9.	69,1##+ 19,2.		483,0#	37,1	87,7##+ 43,4.		61,9##+ 32,1.		67,5	47,5	19,1	29,5
Gesamtvolumen mm³	52,1	11,8	38,8	10,5	43,6	12,8	47,0	10,5	42,8	6,2	47,1	13,9	41,1	6,7
Gesamtdichte mg/cm³	649,5	142,5	542,4	88,4.	504,2	109,5	498,6	122,2	500,5	69,9	486,9	94,5	641,6	142,5
Gesamtvolumen/Knochen-volumen %	68,3	12,7	7,7##+ 8,8		20,8##+ 13,5		9,6##+ 7,7		6,5##+ 1,6		15,2#	5,8.	43,9#	20,5
Kortikalisfläche μm	477,3	76,4	476,8	67,3	464,6	69,8	460,6	54,9	456,1	56,7	444,1	48,9	478,9	75,5

4 Diskussion

In einer kürzlich vorangegangenen Studie von *Hoffmann et al.* konnte zum ersten Mal die Möglichkeit demonstriert werden, die RANKL-Expression an Knochen gesunder Ratten durch VLP vermittelte siRNA-Transduktion zu verringern (Hoffmann et al. 2016). Das Ziel dieser Studie war es, die Wirkung der RANKL-Inhibition durch VLP vermittelte siRNA im frühen Stadium der Osteoporose am standardisierten Osteoporose-Modell der Ratte zu evaluieren (Kalu 1991).

Da sich in mehreren Studien die Ratte als Modellorganismus in Bezug auf die Auswirkungen des Östrogenmangels auf den Knochenstoffwechsel etabliert hat, wurden für diesen Versuch ebenfalls die drei Monate alten weiblichen *Sprague Dawley Ratten* ausgewählt (Kalu 1991; Barlet et al. 1994). Die bisherigen Studien zeigten, dass die bilaterale Ovariectomie bei den weiblichen *Sprague Dawley Ratten* zu einem Östrogenmangel führte und es in Folge zu einem Knochenverlust kommt. Dieser Knochenverlust ist in seinen charakteristischen Eigenschaften mit dem Knochenverlust der postmenopausalen Osteoporose vergleichbar (Kalu 1991). Der resultierende Hormonmangel führte innerhalb einiger Wochen zu einem Verlust an trabekulärem Knochen und über einen längeren Zeitraum ebenfalls zu einem Knochenverlust am kortikalen Knochen. Vor allem betroffen sind der distale Radius, der proximale Femur, die Wirbel und die proximalen Tibiae (Chen et al. 2013). Durch die Supplementierung von Östrogenen kann der Knochenverlust aufgehalten und die Auswirkungen von Östrogen auf den Knochenmetabolismus gezeigt werden (Kalu 1991; Thompson et al. 1995; Ishihara et al. 1999; Yang et al. 2003). In mehreren anderen Studien zeigte sich, dass sich die Knochenmasse im Bereich der Tibia bei Ratten innerhalb von drei Monaten nach Ovariectomie um 50% reduziert hat (Seidlová-Wuttke et al. 2003). Bereits drei Tage nach Ovariectomie wurden vermehrt Osteoklasten nachgewiesen und im Folgenden dargelegt, dass sich die Trabekeldicke innerhalb von zwei Monaten signifikant reduzierte (Yamaura et al. 1996).

Um den Effekt des VLP vermittelten Knockdown von RANKL zu bewerten wurden die Ergebnisse mit 17 β -Estradiol verglichen. Des Weiteren wurden zwei verschiedene Rattenkohorten untersucht, die unterschiedliche Behandlungsoptionen erhielten. Dazu wurden die Versuchstiere in Therapie- und Prophylaxegruppen unterteilt. Die Therapiegruppe erhielt erst fünf Wochen nach der Ovariectomie, im frühen Stadium der Osteoporose, für fünf Wochen eine Behandlung. Die Prophylaxegruppen wurden direkt nach der Ovariectomie zehn Wochen lang behandelt.

In der quantitativen Echtzeit Polymerasekettenreaktion-Analyse (qPCR) an den untersuchten Lendenwirbelkörpern konnte eine signifikante Abnahme der RANKL-mRNA in den 17 β -

Estradiol-Therapiegruppen, verglichen mit der ovariectomierten-siRNA-Therapiekontrollgruppe, gezeigt werden. Eine Herunterregulierung der RANKL-mRNA zeigte sich ebenfalls bei den RANKL-siRNA-Gruppen, jedoch ohne statistische Signifikanz. Die Expression der RANKL-mRNA an den untersuchten Tibiae war sowohl in den Therapiegruppen als auch in den Prophylaxegruppen signifikant um bis zu 35% verringert. Die Prophylaxegruppe, die mit 17 β -Estradiol behandelt wurde, zeigte ebenfalls einen deutlichen Knockdown von RANKL-mRNA. Jedoch war die verringerte Expression von RANKL-mRNA in den Therapiegruppen, vor allem bei den Tieren, die mit 17 β -Estradiol behandelt wurden, stärker ausgeprägt als in den Prophylaxegruppen.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen des Western-Blot überein. Bei der Western-Blot-Analyse konnte ebenfalls ein offensichtlicher Knockdown des RANKL-Proteins bei den 17 β -Estradiol- und den RANKL-siRNA-Therapiegruppen gezeigt werden. In den Prophylaxegruppen wurde kein deutlicher Unterschied in der RANKL-Proteinexpression nach Behandlung mit RANKL-siRNA als auch mit 17 β -Estradiol nachgewiesen. Gründe für diesen Effekt sind letztlich unklar. Ursache dafür könnte sein, dass ein Rebound-Mechanismus die Synthese von RANKL als Antwort auf einen langfristigen Knockdown Effekt steigert (Hoffmann et al. 2018). Die intakten, nicht ovariectomierten Ratten wiesen keinen Unterschied des RANKL-mRNA Spiegels im Vergleich zu ovariectomierten Ratten, die mit nicht codierender Kontroll-siRNA behandelt wurden auf. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Studien, die den Anstieg von RANKL-mRNA nach Ovariectomie im Vergleich zu nicht ovariectomierten Ratten zeigen (Ikeda et al. 2001; Zhang et al. 2009). Der Grund für diese abweichenden Ergebnisse könnte die unterschiedliche Versuchsanordnung von *Ikeda et al.* sein, welche die Auswirkungen bereits drei Wochen nach Ovariectomie untersuchten. Darüber hinaus zeigte eine andere Studie die erhöhte Genexpression von RANKL-mRNA in ovariectomierten Ratten hauptsächlich in den Chondrozyten von hypertrophen Wachstumsplatten an Femora. In den Proben des kortikalen Knochens war die Expression von RANKL-mRNA wiederum nicht erhöht und im Vergleich zu acht Wochen alten nicht ovariectomierten Tieren sogar unterdrückt (Ikeda et al. 2001). In der vorliegenden Studie wurden die Auswirkungen zehn Wochen nach Ovariectomie anhand von Stichproben der gesamten Tibiae und den Lendenwirbelkörpern untersucht. Weiterhin konnte in vorherigen Studien unserer Arbeitsgruppe ebenfalls kein signifikanter Anstieg der RANKL-mRNA nach Ovariectomie im Vergleich zu scheinoperierten oder intakten Ratten gezeigt werden (Komrakova et al. 2014; Hoffmann et al. 2017).

Wie schon in vorherigen Studien beobachtet werden konnte, hatten zu Beginn der Studie alle Versuchstiere annähernd das gleiche Körpergewicht. Im Verlauf nahm das Gewicht aufgrund

des physiologischen Wachstums in allen Gruppen zu (Komrakova et al. 2009; Komrakova et al. 2010; Komrakova et al. 2015). Die ausgeprägte Gewichtszunahme bei den ovariectomierten Tieren war auf die typischen Veränderungen im Metabolismus nach Ovariectomie zurückzuführen (Hoffmann et al. 2018). Wie zu erwarten stagnierte das Körpergewicht bei den Ratten, die 17 β -Estradiol direkt nach der Ovariectomie erhielten und verringerte sich in den ersten zwei Wochen nach Behandlung in der 17 β -Estradiol-Therapiegruppe. Auch die Futteraufnahme war bei den ovariectomierten Tieren im Vergleich zu den nicht ovariectomierten Ratten und der 17 β -Estradiol-Prophylaxegruppe tendenziell höher. Fünf Wochen nach Ovariectomie sank das Körpergewicht in der 17 β -Estradiol-Therapiegruppe ebenfalls. Es ist bekannt, dass ein Abfall des Östrogenspiegels zu einer geminderten körperlichen Aktivität führt (Izumo et al. 2012) und die Östrogengabe hingegen die körperliche Aktivität steigert (Diaz-Veliz et al. 1991; Thomas et al. 1986). Ein weiterer Grund für die Zunahme des Körpergewichts ist ein Anstieg der Fettmasse, der häufig ebenfalls bei postmenopausalen Frauen, aufgrund des Östrogenmangels beobachtet wird (Lovejoy 2003; Kim et al. 2014).

Die Versuchstiere, welche eine Therapie mit VLPs erhielten, wiesen im Vergleich zu den intakten Tieren und den mit 17 β -Estradiol behandelten ovariectomierten Tieren ein verringertes Uterusgewicht auf. Dieser Zusammenhang zeigt sich ebenso bei postmenopausalen Frauen, die durch den Östrogenmangel eine Atrophie des Uterus erleiden (Costa et al. 2006). Die VLP vermittelte RNA-Interferenz hatte in unseren Ergebnissen folgend keinen Einfluss auf das Uteruswachstum.

Da die postmenopausale Osteoporose mit einem erhöhten Abbau der Knochensubstanz einher geht, kann mit Hilfe von Serum-Crosslaps der Abbau der organischen Knochenmatrix nachgewiesen werden. Im Rahmen des Knochenabbaus werden die Crosslaps infolge der Osteoklasten-Aktivität freigesetzt. Dabei werden die knochenbezogenen Abbauprodukte von C-terminalen Telopeptiden des Typ-I-Kollagens im Serum der Ratten nachgewiesen. Bei erhöhtem Knochenabbau werden verstärkt β -Crosslaps freigesetzt. Bei dem Knochenaufbau hingegen sinkt die Ausscheidung der Serumbiomarker (Bartl 2012). Hiermit übereinstimmend zeigen sich in unserer Studie erhöhte β -Crosslaps-Werte bei den ovariectomierten Ratten, die nur mit Kontroll-siRNA für fünf Wochen behandelt wurden und erniedrigte Werte bei intakten Ratten und ovariectomierten Ratten, die mit 17 β -Estradiol eine wirksame Behandlung erhielten. Die Behandlung mit VLPs vermittelter RANKL-siRNA hatte dagegen keinen Einfluss auf den durch den Östrogen-Mangel bedingten Knochenabbau mit erniedrigten Werten von β -Crosslaps.

Ein Grund für das nicht Ansprechen der RANKL-Inhibition könnte die geringe Sensitivität der Crosslinks sein (Behre et al. 2001). Ein weiterer Grund für die erhöhten β -Crosslaps bei den

RANKL-siRNA Gruppen könnte mit dem zu geringen Knockdown zusammenhängen. Der Grund warum die ovariectomierten Ratten mit Behandlung nicht codierender Kontroll-siRNA in der Prophylaxegruppe verringerte Mengen an β -Crosslaps aufwies bleibt letztlich unklar.

Um den Einfluss der RANKL-Expression auf den osteoporotischen Knochen weiter zu untersuchen wurden biomechanische Untersuchungen durchgeführt. Die Ergebnisse der Maximalkraft (F_{max}), der Steigung und der volumenkorrelierten Elastizität wurden innerhalb der unterschiedlichen Gruppen in Bezug auf die Stabilität des Knochens analysiert. Es konnte bei den Ergebnissen der getesteten Lendenwirbelkörper gezeigt werden, dass wie erwartet alle drei Messparameter in den ovariectomierten siRNA-Kontrollgruppen verminderte Werte in Bezug auf die Knochenstabilität aufwies im Vergleich zu den nicht ovariectomierten Tieren und den 17β -Estradiol behandelten Ratten. Des Weiteren bestätigte der Test verbesserte Knocheneigenschaften bei den mit 17β -Estradiol behandelten Gruppen, was der Behandlung von osteoporosebetroffener Knochen entspricht. Es zeigten sich jedoch deutlich bessere Werte bei der 17β -Estradiol-Prophylaxegruppe, die zehn Wochen lang nach der Ovariectomie eine 17β -Estradiol Behandlung erhielten. Bei der Behandlung fünf Wochen nach Ovariectomie konnten ähnliche Veränderungen auf den Knochen nicht nachgewiesen werden, obwohl sich die systemische Wirkung von 17β -Estradiol durch ein erhöhtes Gewicht der Uteri, verringertes Körpergewicht und verringerte β -Crosslaps widerspiegelte.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu früheren Studien. Jedoch gibt es auch Studien, die nach sechs Behandlungswochen keinen signifikanten Effekt von Östrogenen zeigen konnten (Kavuncu et al. 2003). Die RANKL-siRNA-Therapiegruppe weist in der biomechanischen Beurteilung an den Lendenwirbelkörpern in allen Bereichen die höchsten Werte auf. Davon sind die Ergebnisse der Maximalkraft und der Streckgrenze signifikant gegenüber den ovariectomierten siRNA-Kontrollgruppen. Die RANKL-siRNA-Prophylaxegruppe weist keine signifikante Verbesserung der Knochenstabilität auf.

In den Ergebnissen des biomechanischen Kompressionstests an den Tibiae bestätigt sich das Modell ebenfalls. Die intakten Tiere und die 17β -Estradiol-Prophylaxegruppe erreichten signifikant höhere Werte in der Knochenstabilität als die mit VLPs behandelten Tiere. Eine positive Wirkung der transfizierten RANKL-siRNA konnte dahingegen nicht gezeigt werden, außer bei der Steigung nach Gabe von RANKL-siRNA wies die Therapiegruppe signifikant höhere Werte, im Vergleich zu der ovariectomierten siRNA-Therapiekontrollgruppe auf.

Es kann mehrere Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den Lendenwirbelkörpern und den Tibiae geben. Zum einen ist der morphologische Aufbau der beiden Knochen in Bezug auf die Kompakta und die Spongiosa mit ihrem unterschiedlich ausgerichteten

Trabekelsystem, ein möglicher Grund für die unterschiedliche Knochenfestigkeit. Die Spongiosaarchitektur der Lendenwirbelkörper dient der Aufnahme axialer Kräfte und besteht aus vertikalen Drucktrabekeln, die sich mit den horizontal ausgerichteten Zugtrabekeln kreuzen. Der Röhrenknochen besteht hingegen aus parallel angeordneten, zur größten Biegebeanspruchung ausgerichteten Trabekeln am proximalen Ende, welche der Epiphyse eine hohe Stabilität verleihen (Welsch und Deller 2011; Aumüller und Wurzinger 2010).

Zum anderen kann es an den heterogenen Veränderungen der verschiedenen Skelettanteile bei Osteoporose liegen (Chen et al. 2013; Ritzel et al. 1997; Amling et al. 1996). Es sind nicht alle Knochen gleichermaßen stark von Osteoporose betroffen (Chen et al. 2013). Frühere Studien zeigten unterschiedliche Wirkung auf Wirbelkörper und Femora nach einer Osteoporose-Therapie (Kavuncu et al. 2003).

Zur Untersuchung des Einflusses auf den strukturellen Knochenaufbau erfolgten μ CT-Untersuchungen. Die nicht ovariektomierten Tiere wiesen die höchsten Mittelwerte in Bezug auf die Knochenstruktur im Vergleich zu den ovariektomierten Tieren auf. Es zeigte sich, dass die trabekulären Eigenschaften an den untersuchten Tibiae bei den VLPs transfizierten Gruppen und den Gruppen, denen 17β -Estradiol für nur fünf Wochen verabreicht wurden, im Vergleich zu den nicht ovariektomierten Tieren verringert waren. Dagegen wies die 17β -Estradiol-Prophylaxegruppe die höchsten Mittelwerte gegenüber den VLP transfizierten Gruppen auf. Eine Behandlung mit VLPs erbrachte somit nicht den erwünschten positiven Effekt auf den Knochen. Diese Ergebnisse zeigten, dass ein Östrogenmangel, wie er bei postmenopausalen Frauen auftritt mit einer erheblichen Verminderung des feinstrukturellen Aufbaus des Knochens einhergeht. Die Ergebnisse wurden ebenfalls in vorigen Studien beobachtet, wodurch der resultierende Östrogenmangel durch die bilaterale Ovariektomie zu einer Verminderung der Trabekel-eigenschaften führte (Komrakova et al. 2013). Vor allem die reduzierte Trabekeldicke an den Tibiae bei Östrogen-defizitären Tieren ist kohärent zu früheren Studien., die eine verminderte Dicke der Trabekel bei ovariektomierten Ratten zeigte (Schmisch et al. 2009b, Fürst 2014). Die Behandlung mit 17β -Estradiol für zehn Wochen bestätigte auch in diesem Versuch, verglichen zu den VLPs transfizierten Gruppen, erhöhte Werte im feinstrukturellen Knochenaufbau.

Bei den untersuchten Wirbelkörpern zeigten die nicht ovariektomierten Tiere höhere Mittelwerte in Bezug auf die Knochenstruktur im Vergleich zu den Tieren, die mit 17β -Estradiol behandelt wurden und den VLPs transfizierten Gruppen. Die Tiere, die über zehn Wochen mit RANKL-siRNA behandelt wurden, wiesen im Vergleich zu den mit 17β -Estradiol behandelten Tieren signifikant höhere Mittelwerte in der Trabekelanzahl- und Knoten auf. Jedoch sind diese

Ergebnisse auch höher als bei den intakten Tieren, was den protektiven Effekt der transfizierten RANKL-siRNA nicht erklären lässt.

Ein Grund für die unterschiedlichen Veränderungen der Trabekelstruktur zwischen den Wirbelkörpern und den Tibiae besteht in der verringerten Trabekeldicke der Tibia. Die Trabekel der Tibia sind im Vergleich zu denen der Wirbelkörper dünner und das Östrogendefizit zeigt einen schnelleren Verlust der Trabekelanzahl und der Trabekeldicke (Thompson et al. 1995). In Bezug auf die kortikalen Eigenschaften kann keine Veränderung zwischen intakten und ovariectomierten Tieren beobachtet werden. Dass die postmenopausale Osteoporose in erster Linie den trabekulären Knochen betrifft und erst über einen längeren Zeitraum Veränderungen am kortikalen Knochen hervorruft, konnte auch in diesem Versuch gezeigt werden (Chen et al. 2013). Letztendlich konnten die erhobenen Daten der Mikro-Computertomographie verminderte Werte im feinstrukturellen Aufbau des Knochens bei ovariectomierten Tieren bestätigen. Bei der 17 β -Estradiol-Therapiegruppe zeigte sich eine signifikante Verbesserung der Knochenqualität. Die erhoffte positive Wirkung der Verbesserungen der Knochenstruktur im frühen Stadium der postmenopausalen Osteoporose, unter Transfektion der RANKL-siRNA, trat nicht ein. Es kann mehrere Gründe für diese Ergebnisse geben.

Erstens war die Expression von RANKL-mRNA nur inkomplett mit einer 35%igen Herunterregulierung. Dies war möglicherweise zu gering, um signifikante Auswirkungen auf den Knochen auszulösen (Hoffmann et al. 2018).

Zweitens gibt es Hinweise darauf, dass der Knochenverlust im frühen Stadium der Osteoporose bei Nagetieren hauptsächlich auf eine verringerte osteoanabolische Wirkung durch Osteoblasten und nicht auf den Knochenverlust durch die Osteoklastenaktivität zurückzuführen ist (Seitz et al. 2012). Dies kann zum Teil bei den Ergebnissen des biomechanischen Kompressionstest der Lendenwirbelkörper in Bezug auf den Erhalt der Knochensteifheit und der verringerten Elastizität in der RANKL-siRNA-Therapiegruppe gezeigt werden. Die fehlende Aktivität der Osteoblasten nach Ovariectomie führt zu einem Mangel an Knochenmasse, wie es die Ergebnisse der Computertomographie zeigen. In Kombination der verminderten osteoklastischen Resorption und dem daraus resultierenden geminderten Netto-Remodelling kann es zu einem relativen Anstieg der Mineralisierung des Knochengewebes kommen, was zu einer höheren Steifheit des Knochengewebes führt (Hoffmann et al. 2018).

Drittens ist es möglich, dass der Knockdown von membranständigem RANKL durch zirkulierendes lösliches RANKL, welches von anderen Zellen mesenchymaler Herkunft, Endothelzellen und T-Zellen exprimiert wird, kompensiert wurde (Findlay and Atkins 2011; Horwood et

al. 1999; Collin-Osdoby et al. 2001). Diese Annahme korreliert mit den Ergebnissen der qPCR, die ausschließlich auf Protein-Ebene die Reduktion des membranösen RANKL zeigt.

Ein weiterer möglicher Grund für das Ausbleiben der verbesserten morphologischen- und biomechanischen Eigenschaftendurch VLP vermittelte Transfektion von RANKL-siRNA im osteoporotischen Knochen könnte der zelluläre Aufnahmerezeptor darstellen. In der vorliegenden Studie verwendeten wir den HT2a-Rezeptor als zellulären Aufnahmerezeptor für VLPs, der sowohl in Menschen als auch in Ratten vorhanden und an der Knochenbildung beteiligt ist (Galli et al. 2013; Tanaka et al. 2015). Wir verwendeten diesen Rezeptor aufgrund guter Knockdown-Ergebnisse in früheren Studien (Hoffmann et al. 2016). Möglicherweise besitzen Zellen, die lösliches RANKL produzieren nicht den HT2a-Rezeptor, sodass die Behandlung mit beladenen VLPs gegen RANKL-siRNA nicht effizient die RANKL-Produktion inhibieren konnte.

4.1 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass es möglich ist die Expression von membranständigem RANKL in osteoporotischen Knochen durch VLP vermittelte RNA-Interferenz zu verringern. Die Langzeitanwendung von VLPs zeigte keine Anzeichen von Toxizität in den durchgeführten Versuchen und ist somit ein vielversprechender Träger für die In-vivo-Abgabe von Nukleinsäuren (Hoffmann et al. 2018). Die erhobenen Daten der qPCR zeigten einen signifikanten Knockdown der RANKL-mRNA. Die Expression von RANKL-mRNA war sowohl in der Therapie- als auch in der Prophylaxegruppe um bis zu 35% herunterreguliert. Die Kontrollgruppe, die mit dem 17 β -Estradiol behandelt wurde, zeigte ebenfalls eine deutliche Reduzierung der RANKL-mRNA. Jedoch war der Knockdown nach fünfwöchiger Behandlung mit 17 β -Estradiol ausgeprägter als nach zehnwöchiger Behandlung. Die nicht ovariectomierten Ratten zeigten im Vergleich zu den Kontroll-siRNA-Gruppen keinen Unterschied in dem RANKL-mRNA-Spiegel. Mit der durchgeführten Western-Blot-Technik konnte ein Knockdown auch auf Proteinebene bei der RANKL-siRNA- und der 17 β -Estradiol-Therapiegruppe nachgewiesen werden, wobei sich bei den Prophylaxegruppen kein Knockdown von RANKL darstellte. Die Serum-Analyse der β -Crosslaps zeigte verminderte Serumwerte an β -Crosslaps bei den nicht ovariectomierten Tieren und bei den Tieren, die mit 17 β -Estradiol behandelt wurden. Lediglich die Kontroll-siRNA-Prophylaxegruppe wies unter den VLPs transfizierten Gruppen verringerte β -Crosslaps auf. Bei den Ergebnissen des biomechanischen Tests und bei der Mikro-Computertomographie-Untersuchung zeigte sich keine signifikante Verbesserung durch VLP vermittelte RANKL-siRNA Transfektion.

In dieser Studie hat sich die osteoanabole Wirkung von 17β -Estradiol bestätigt, wobei die Prophylaxegruppe meist bessere Werte aufwies. Der RANKL Knockdown durch RANKL-siRNA zeigte im frühen Stadium der Osteoporose nur wenig positiven Effekt auf den osteoporotischen Knochen. Es kann mehrere Gründe für die unterschiedlichen Versuchsergebnisse geben. Es zeigte sich zwar eine signifikante Abnahme der RANKL-mRNA, mit 35% Effizienz. Jedoch war dieses Ergebnis möglicherweise zu gering, um signifikante Auswirkungen auf den Knochen zu induzieren. Da der Versuch auf Ebene der RANKL-mRNA abzielte ist ebenfalls möglich, dass das Niveau von präexistentem RANKL nicht ausreichend verändert wurde (Hoffmann et al. 2018). Ebenfalls ist es möglich, dass das membranständige RANKL durch zirkulierendes lösliches RANKL, welches von anderen Zellen mesenchymaler Herkunft, Endothelzellen und T-Zellen exprimiert wird (Findlay and Atkins 2011; Horwood et al. 1999; Collin-Osdoby et al. 2001), kompensiert wurde. Da das alleinige Blockieren des membranständigen RANKL in osteoporotischen Knochen in den vorliegenden Untersuchungen keine Verbesserung der Knochenqualität zeigte, kann als Hinweis gesehen werden, dass das lösliche RANKL-Protein beim Pathomechanismus der Osteoporose eine wesentlichere Rolle spielt.

In dieser Studie wurde der 5-HT_{2a}-Rezeptor als zellulärer Aufnahmerezeptor für VLPs verwendet. Dieser Rezeptor wurde wegen seiner guten RANKL Knockdown-Ergebnisse im Knochen aus früheren Machbarkeitsstudien gewählt (McLendon et al. 2015). Möglicherweise besitzen Zellen die lösliches RANKL produzieren nicht den HT_{2a}-Rezeptor, sodass die Behandlung mit beladenen VLPs gegen RANKL-siRNA nicht effizient am Knochen angreifen konnte.

5 Zusammenfassung

Eine effektive Behandlung der postmenopausalen Osteoporose stellt die Medizin immer noch vor eine große Herausforderung und es bedarf weiterer Forschung zu den Prinzipien der verschiedenen Behandlungsoptionen. Bei der postmenopausalen Osteoporose ist vor allem der trabekuläre Knochenanteil (distale Radius, Oberschenkelhals, Wirbelkörper, proximale Tibiae) betroffen. Der Rezeptoraktivator des NF- κ B-Ligand/Osteoprotegerin-Systems (RANKL/RANK/OPG-System) spielt eine Hauptrolle in der Regulierung der Knochenbildung und des Knochenstoffwechsels. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde in den letzten Jahren der monoklonale RANKL-Antikörper Denosumab zur Behandlung der postmenopausalen Osteoporose sowie für Knochentumore eingesetzt. Die Behandlung mit Denosumab führt zu einer Reduktion des Knochenabbaus. Jedoch hemmt die systemische Gabe des Antiköpers (Denosumab) die RANKL Synthese nicht spezifisch am Knochen, sondern wirkt auf den gesamten Organismus, was zu schwerwiegenden systemischen Nebenwirkungen führen kann. Des Weiteren führt das Absetzen von Denosumab zu Rebound-assoziierten Wirbelfrakturen. Eine neue und vielversprechende Lösung für dieses Problem ist die Verwendung von Virus-like particles (VLPs), welche mit RANKL-siRNA beladen werden und als Ersatztherapie zu Denosumab in Frage kommen. Als Zellaufnahmerezeptor wurde der Serotonin-5-Hydroxytryptamin-Rezeptor (5-HT_{2a}-Rezeptor) genutzt. Dieser Rezeptor ist sowohl bei Menschen als auch bei Ratten vorhanden und an der Knochenbildung beteiligt.

Die Versuche wurden an 56 weiblichen *Sprague-Dawley* Ratten durchgeführt. Im Alter von drei Monaten wurde bei 48 Ratten eine bilaterale Ovariectomie durchgeführt. Die Entfernung der Ovarien und dem draus resultierenden Östrogenmangel führte zu einem osteoporotischen Knochenverlust. Die acht nicht ovariectomierten Tiere stellten die intakten Tiere da. Die Versuchstiere wurden in sieben unterschiedliche Gruppen zu je acht Tieren unterteilt, wovon 48 Tiere entweder mit 17 β -Estradiol, VLPs und RANKL-siRNA oder mit VLPs und Kontroll-siRNA behandelt wurden (n = 8/Gruppen). Die Injektion der beladenen VLPs mit RANKL-siRNA und Kontroll-siRNA erfolgte intraperitoneal mit Einzeldosen von 150 μ g VLP-Injektion (0,5 mg/kg KG) 1 x/Woche. Die Verabreichung des 17 β -Estradiolbenzonat erfolgte in einer oral verabreichten Dosis von 10 mg/kg Futter (0,6 mg/kg KG) täglich. Des Weiteren untersuchte diese Studie zwei verschiedene Rattenkohorten, die unterschiedliche Behandlungsoptionen erhielten. Dazu wurden die Versuchstiere nochmals in Therapie- und Prophylaxegruppen unterteilt. Die Therapiegruppe erhielt fünf Wochen nach der Ovariectomie, im frühen Stadium der Osteoporose, eine fünfwöchige Behandlung. Die Prophylaxegruppen wurden direkt nach der Ovariectomie über zehn Wochen behandelt.

Anschließend erfolgte die Versuchsauswertung mittels qPCR, Western-Blot, biomechanischer Test und Mikro-CT an den Tibiae und Wirbelkörpern. Im Serum wurden β -Crosslaps gemessen. Die anschließende Auswertung der ermittelten Daten erfolgte mit Hilfe von one-way ANOVA Test und mit einem Tukey-Kramer post hoc Test ($p < 0,05$). Die Ergebnisse zeigten bei der qPCR Analyse einen signifikanten Knockdown von RANKL-mRNA um bis zu 35% in der RANKL-siRNA Therapie- und Prophylaxegruppe. Mit der durchgeführten Western-Blot-Technik konnte ebenfalls eine Expression auf Proteinebene in den Therapiegruppen nachgewiesen werden. Die Serum-Analyse zeigte Verringerung an β -Crosslaps, bei den nicht ovariectomierten Tieren und bei den Tieren, die mit 17β -Estradiol behandelt wurden, gegenüber den Tieren die Kontroll-siRNA und RANKL-siRNA erhielten. Bei den Ergebnissen des biomechanischen Tests und bei der Mikro-Computertomographie-Untersuchung zeigte sich keine signifikante Verbesserung durch den RANKL-Knockdown.

In dieser Studie bestätigte sich die Möglichkeit, die Expression von RANKL in osteoporotischen Knochen durch VLP-vermittelte RNA-Interferenz zu verringern. Dennoch zeigten die Versuche, dass eine alleinige Blockierung des membranständigen RANKL keinen ausreichenden Effekt erzielt und somit das lösliche RANKL in Bezug auf den Pathomechanismus der postmenopausalen Osteoporose mit berücksichtigt werden muss. Deshalb könnte es von weiterem Interesse sein, VLPs mit einem spezifischen Tropismus für mesenchymale Stammzellen, Endothelzellen und T-Zellen zu entwerfen, um die relative Wichtigkeit der verschiedenen beitragenden Zellsysteme zu unterscheiden. Für die alleinige Knochenspezifität müsste ein neuer zellulärer Aufnahme Rezeptor geschaffen werden, damit die RANKL-Inhibition direkt und unmittelbar am Knochen angreifen kann.

6 Literaturverzeichnis

Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK (2003): RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 657–685

Amling M, Psl M, Ritzel H, Hahn M, Vogel M, Wening VJ, Delling G (1996): Architecture and distribution of cancellous bone yield vertebral fracture clues. *Arch Orthop Trauma Surg* 115, 262–269

Assetta B, Maginnis MS, Gracia Ahufinger I, Haley SA, Gee GV, Nelson CDS, O'Hara BA, Allen Ramdial S-aA, Atwood WJ (2013): 5-HT₂ receptors facilitate JC polyomavirus entry. *J Virol* 87, 13490–13498

Aumüller G, Wurzinger LJ: *Anatomie (Duale Reihe)*, 2. Auflage; Thieme, Stuttgart 2010

Bagger YZ, Tankó LB, Alexandersen P, Hansen HB, Qin G, Christiansen C (2006): The long-term predictive value of bone mineral density measurements for fracture risk is independent of the site of measurement and the age at diagnosis: results from the Prospective Epidemiological Risk Factors study. *Osteoporos Int* 17, 471–477

Barlet JP, Coxam V, Davicco MJ, Gaumet N (1994): Modèles animaux d'ostéoporose post-ménopausique. *Reproduction Nutrition Development* 34, 221–236

Bartl R: *Osteoporose: Prävention, Diagnostik, Therapie*, 4. Auflage; Thieme, Stuttgart 2011

Bartl R (2012): *Osteoporose - Diagnostik, Prävention und Therapie*. *Lege artis* 2, 174–181

Bartl R, Bartl C: *Osteoporose-Manual: Diagnostik, Prävention und Therapie*, 1. Auflage; Springer Verlag, Heidelberg 2004

- Baum E, Peters KM (2008): The diagnosis and treatment of primary osteoporosis according to current guidelines. *Dtsch Arztebl Int* 105, 573-81
- Behre A, Janott J, Pfohl M, Schatz H, Pfeiffer A (2001): Sind Crosslinks klinisch aussagekräftige Osteoporosemarker? Evaluation in einem Bevölkerungsquerschnitt. *Med Klin* 96, 378-382
- Bieniossek C, Imasaki T, Takagi Y, Berger I (2012): MultiBac: expanding the research toolbox for multiprotein complexes. *Trends Biochem Sci* 37, 49-57
- Bieniossek C, Richmond TJ, Berger I (2008): MultiBac: multigene baculovirus-based eukaryotic protein complex production. *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 5, Unit 5.20
- Bliziotis M, Eshleman A, Burt-Pichat B, Zhang XW, Hashimoto J, Wiren K, Chenu C (2006): Serotonin transporter and receptor expression in osteocytic MLO-Y4 cells. *Bone* 39, 1313-1321
- Bliziotis M, Gunness M, Eshleman A, Wiren K (2002): The role of dopamine and serotonin in regulating bone mass and strength: studies on dopamine and serotonin transporter null mice. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2, 291-295
- Bone HG, Bolognese MA, Yuen CK, Kendler DL, Wang H, Liu Y, San Martin J (2008): Effects of denosumab on bone mineral density and bone turnover in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 2149-2157
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003): Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337-342
- Chang CF, Wang M, Ou WC, Chen PL, Shen CH, Lin PY, Fang CY, Chang D (2011): Human JC virus-like particles as a gene delivery vector. *Expert Opin Biol Ther* 11, 1169-1175

Chen H, Zhou X, Fujita H, Onozuka M, Kubo K-Y (2013): Age-related changes in trabecular and cortical bone microstructure. *Int J Endocrinol* 2013, 213234

Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F, Nelson M, Maloney W, Osdoby P (2001): Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 276, 20659–20672

Costa S.D, Scharl A, Kaufmann M: *Die Gynäkologie*, 2 Auflage; Springer, Berlin 2006

Cummings SR, San Martin J, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, Delmas P, Zoog HB, Austin M, Wang A et al. (2009): Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 361, 756–765

Dettmer U: *Kurzlehrbuch Biochemie*, 1. Auflag; Urban & Fischer, München 2013

Diaz-Veliz G, Urresta F, Dussaubat N, Mora S (1991): Effects of estradiol replacement in ovariectomized rats on conditioned avoidance responses and other behaviors. *Physiology & Behavior* 50, 61–65

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001a): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494–498

Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001b): RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188–200

EMA (Hrsg.) : Zusammenfassung des EPAR für die Öffentlichkeit Prolia: EMA/681041/2015, 2015

Felsenberg D, Silman AJ, Lunt M, Armbrecht G, Ismail AA, Finn JD, Cockerill WC, Banzer D, Benevolenskaya LI, Bhalla A et al. (2002): Incidence of vertebral fracture in europe: results from the European Prospective Osteoporosis Study (EPOS). *J Bone Miner Res* 17, 716–724

Findlay DM, Atkins GJ (2011): Relationship between serum RANKL and RANKL in bone. *Osteoporos Int* 22, 2597–2602

Fitzgerald DJ, Berger P, Schaffitzel C, Yamada K, Richmond TJ, Berger I (2006): Protein complex expression by using multigene baculoviral vectors. *Nat Methods* 3, 1021–1032

Fürst B: Einfluss der vertikalen und horizontalen Ganzkörpervibration mit verschiedenen Frequenzen auf die Lendenwirbelsäule im Rattentiermodell. Göttingen, Georg-August Universität, Med. Diss. Göttingen 2014

Galli C, Macaluso G, Passeri G (2013): Serotonin: a novel bone mass controller may have implications for alveolar bone. *J Negat Results Biomed* 12, 12

Gambacciani M, Vacca F (2004): Postmenopausal osteoporosis and hormone replacement therapy. *Minerva Med* 95, 507–520

Genant HK, Engelke K, Hanley DA, Brown JP, Omizo M, Bone HG, Kivitz AJ, Fuerst T, Wang H, Austin M et al. (2010): Denosumab improves density and strength parameters as measured by QCT of the radius in postmenopausal women with low bone mineral density. *Bone* 47, 131–139

Herold G: Innere Medizin 2016: Gerd Herold (Verlag), Köln 2016

Hillier TA, Stone KL, Bauer DC, Rizzo JH, Pedula KL, Cauley JA, Ensrud KE, Hochberg MC, Cummings SR (2007): Evaluating the value of repeat bone mineral density measurement and

prediction of fractures in older women: the study of osteoporotic fractures. *Arch Intern Med* 167, 155–160

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, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL (1999): Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 140, 4367–4370

Hoffmann DB, Böker KO, Schneider S, Eckermann-Felkl E, Schuder A, Komrakova M, Sehmisch S, Gruber J (2016): In Vivo siRNA Delivery Using JC Virus-like Particles Decreases the Expression of RANKL in Rats. *Mol Ther Nucleic Acids* 5, e298

Hoffmann DB, Gruber J, Böker KO, Deppe D, Sehmisch S, Schilling AF, Lemus-Diaz N, Komrakova M, Schneider S (2018): Effects of RANKL Knockdown by Virus-like Particle-Mediated RNAi in a Rat Model of Osteoporosis. *Mol Ther Nucleic Acids* 12, 443–452

Hoffmann DB, Sehmisch S, Hofmann AM, Eimer C, Komrakova M, Saul D, Wassmann M, Stürmer KM, Tezval M (2017): Comparison of parathyroid hormone and strontium ranelate in combination with whole-body vibration in a rat model of osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 35, 31–39

Horwood NJ, Kartsogiannis V, Quinn JM, Romas E, Martin TJ, Gillespie MT (1999): Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 265, 144–150

Hurdiss DL, Morgan EL, Thompson RF, Prescott EL, Panou MM, Macdonald A, Ranson NA (2016): New Structural Insights into the Genome and Minor Capsid Proteins of BK Polyomavirus using Cryo-Electron Microscopy. *Structure* 24, 528–536

Ikeda T, Utsuyama M, Hirokawa K (2001): Expression profiles of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand, receptor activator of nuclear factor kappaB, and osteoprotegerin messenger RNA in aged and ovariectomized rat bones. *J Bone Miner Res* 16, 1416–1425

immunodiagnostic systems: RatLaps™(CTX-I) EIA: Enzyme immunoassay for the quantitative determination of fragments of type I collagen in rat/mouse serum or urine and released from rat/mouse bone into cell culture supernatants during bone resorption in vitro, 2014

Ishihara A, Sasaki T, Debari K, Furuya R, Kawawa T, Ramamurthy NS, Golub LM (1999): Effects of ovariectomy on bone morphology in maxillae of mature rats. *Journal of Electron Microscopy* 48, 465–469

Izumo N, Ishibashi Y, Ohba M, Morikawa T, Manabe T (2012): Decreased voluntary activity and amygdala levels of serotonin and dopamine in ovariectomized rats. *Behav Brain Res* 227, 1–6

Kalu DN (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone and mineral* 15, 175–191

Kanis JA, Borgstrom F, Laet C de, Johansson H, Johnell O, Jonsson B, Oden A, Zethraeus N, Pflieger B, Khaltsev N (2005): Assessment of fracture risk. *Osteoporos Int* 16, 581–589

Kanis JA, Johnell O, Oden A, Dawson A, Laet C de, Jonsson B (2001): Ten year probabilities of osteoporotic fractures according to BMD and diagnostic thresholds. *Osteoporos Int* 12, 989–995

Karsenty G (2003): The complexities of skeletal biology. *Nature* 423, 316–318

Kavuncu V, Sahin S, Baydas G, Ilhan N, Ozercan I, Yasar A, Pekkutucu I, Ilhan N, Ozercan R (2003): A comparison of estrogen and two different doses of calcitonin in ovariectomized rats. *Yonsei Med J* 44, 508–516

Kim JH, Cho HT, Kim YJ (2014): The role of estrogen in adipose tissue metabolism: insights into glucose homeostasis regulation [Review]. *Endocr J* 61, 1055–1067

Komrakova M, Sehmisch S, Tezval M, Ammon J, Lieberwirth P, Sauerhoff C, Trautmann L, Wicke M, Dullin C, Stuermer KM et al. (2013): Identification of a vibration regime favorable for bone healing and muscle in estrogen-deficient rats. *Calcif Tissue Int* 92, 509–520

Komrakova M, Stuermer EK, Tezval M, Stuermer KM, Dullin C, Schmelz U, Doell C, Durkaya-Burchhardt N, Fuerst B, Genotte T et al. (2014): Evaluation of twelve vibration regimes applied to improve spine properties in ovariectomized rats. *Bone Rep* 7, 172–180

Komrakova M, Stuermer EK, Werner C, Wicke M, Kolios L, Sehmisch S, Tezval M, Daub F, Martens T, Witzenhausen P et al. (2010): Effect of human parathyroid hormone hPTH (1-34) applied at different regimes on fracture healing and muscle in ovariectomized and healthy rats. *Bone* 47, 480–492

Komrakova M, Weidemann A, Dullin C, Ebert J, Tezval M, Stuermer KM, Sehmisch S (2015): The Impact of Strontium Ranelate on Metaphyseal Bone Healing in Ovariectomized Rats. *Calcif Tissue Int* 97, 391–401

Komrakova M, Werner C, Wicke M, Nguyen BT, Sehmisch S, Tezval M, Stuermer KM, Stuermer EK (2009): Effect of daidzein, 4-methylbenzylidene camphor or estrogen on gastrocnemius muscle of osteoporotic rats undergoing tibia healing period. *J Endocrinol* 201, 253–262

Locher H, Bischoff HP, Heisel J: *Praxis der konservativen Orthopädie*, 1. Auflage; Thieme, 2009

Lovejoy JC (2003): The menopause and obesity. *Primary Care: Clinics in Office Practice* 30, 317–325

Lüllmann-Rauch R: Taschenlehrbuch Histologie: 2. Auflage; Thieme, Stuttgart 2006

Maginnis MS, Haley SA, Gee GV, Atwood WJ (2010): Role of N-linked glycosylation of the 5-HT_{2A} receptor in JC virus infection. *J Virol* 84, 9677–9684

Maginnis MS, Nelson CDS, Atwood WJ (2015): JC polyomavirus attachment, entry, and trafficking: unlocking the keys to a fatal infection. *J Neurovirol* 21, 601–613

McClung MR, Lewiecki EM, Cohen SB, Bolognese MA, Woodson GC, Moffett AH, Peacock M, Miller PD, Lederman SN, Chesnut CH et al. (2006): Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 354, 821–831

McLendon JM, Joshi SR, Sparks J, Matar M, Fewell JG, Abe K, Oka M, McMurtry IF, Gerthoffer WT (2015): Lipid nanoparticle delivery of a microRNA-145 inhibitor improves experimental pulmonary hypertension. *J Control Release* 210, 67–75

Neu U, Maginnis MS, Palma AS, Ströh LJ, Nelson CDS, Feizi T, Atwood WJ, Stehle T (2010): Structure–function analysis of the human JC polyomavirus establishes the LSTc pentasaccharide as a functional receptor motif. *Cell Host Microbe* 8, 309–319

Nguyen ND, Eisman JA, Center JR, Nguyen TV (2007): Risk factors for fracture in nonosteoporotic men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 955–962

NIH Consensus Development Panel (2001): NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, March 7–29, 2000: highlights of the conference. *South Med J* 94, 569–573

Papapoulos S, Lippuner K, Roux C, Lin CJF, Kendler DL, Lewiecki EM, Brandi ML, Czerwiński E, Franek E, Lakatos P et al. (2015): The effect of 8 or 5 years of denosumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis: results from the FREEDOM Extension study. *Osteoporosis International* 26, 2773–2783

Petry H, Goldmann C, Ast O, Lüke W (2003): The use of virus-like particles for gene transfer. *Curr Opin Mol Ther* 5, 524–528

Pluijm SMF, Koes B, Laet C de, van Schoor NM, Kuchuk NO, Rivadeneira F, Mackenbach JP, Lips P, Pols HA, Steyerberg EW (2009): A simple risk score for the assessment of absolute fracture risk in general practice based on two longitudinal studies. *J Bone Miner Res* 24, 768–774

Popp AW, Zysset PK, Lippuner K (2016): Rebound-associated vertebral fractures after discontinuation of denosumab—from clinic and biomechanics. *Osteoporosis International* 27, 1917–1921

Ritzel H, Amling M, Pösl M, Hahn M, Delling G (1997): The thickness of human vertebral cortical bone and its changes in aging and osteoporosis: a histomorphometric analysis of the complete spinal column from thirty-seven autopsy specimens. *J Bone Miner Res* 12, 89–95

Schmisch S, Erren M, Rack T, Tezval M, Seidlova-Wuttke D, Richter J, Wuttke W, Stuermer KM, Stuermer EK (2009a): Short-term effects of parathyroid hormone on rat lumbar vertebrae. *Spine* 34, 2014–2021

Schmisch S, Galal R, Kolios L, Tezval M, Dullin C, Zimmer S, Stuermer KM, Stuermer EK (2009b): Effects of low-magnitude, high-frequency mechanical stimulation in the rat osteopenia model. *Osteoporos Int* 20, 1999–2008

Seidlová-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Christoffel V, Spengler B, Becker T, Wuttke W (2003): Evidence for selective estrogen receptor modulator activity in a black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) extract: comparison with estradiol-17beta. *European Journal of Endocrinology* 149, 351–362

Seitz S, Keller J, Schilling AF, Jeschke A, Marshall RP, Stride BD, Wintermantel T, Beil FT, Amling M, Schütz G et al. (2012): Pharmacological estrogen administration causes a FSH-independent osteo-anabolic effect requiring ER alpha in osteoblasts. *PLoS ONE* 7, e50301

Siminoski K, Leslie WD, Frame H, Hodsmann A, Josse RG, Khan A, Lentle BC, Levesque J, Lyons DJ, Tarulli G et al. (2007): Recommendations for bone mineral density reporting in Canada: a shift to absolute fracture risk assessment. *J Clin Densitom* 10, 120–123

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T et al. (1997): Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89, 309–319

Siomi H, Siomi MC (2009): On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 457, 396–404

Stürmer EK, Seidlová-Wuttke D, Sehmisch S, Rack T, Wille J, Frosch KH, Wuttke W, Stürmer KM (2006): Standardized bending and breaking test for the normal and osteoporotic metaphyseal tibias of the rat: effect of estradiol, testosterone, and raloxifene. *J Bone Miner Res* 21, 89–96

Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ (1999): Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20, 345–357

Tanaka K, Hirai T, Ishibashi Y, Izumo N, Togari A (2015): Modulation of osteoblast differentiation and bone mass by 5-HT_{2A} receptor signaling in mice. *Eur J Pharmacol* 762, 150–157

- Thomas DK, Storlien LH, Bellingham WP, Gillette K (1986): Ovarian hormone effects on activity, glucoregulation and thyroid hormones in the rat. *Physiology & Behavior* 36, 567–573
- Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ (1995): FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 17, 125–133
- Trouvin AP, Goëb V (2010): Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clin Interv Aging* 5, 345–354
- Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, Higashio K (1997): Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 234, 137–142
- van der Klift M, Laet CEDH de, McCloskey EV, Johnell O, Kanis JA, Hofman A, Pols HAP (2004): Risk factors for incident vertebral fractures in men and women: the Rotterdam Study. *J Bone Miner Res* 19, 1172–1180
- Weidemann A: Der Einfluss von Strontiumranelat auf die Frakturheilung osteopener Ratten. Göttingen, Georg-August Universität, Med. Diss. Göttingen 2014
- Welsch U, Deller T: Sobotta Lehrbuch Histologie: 3. Auflage; Urban Fischer Verlag, München, 2011
- Yamaura M, Nakamura T, Tsurukami H, Hijioka A, Narusawa K, Ohnishi H, Ohta T, Hosoda K (1996): Local bone turnover in the metaphysis of the proximal tibia and the lumbar vertebra during the early periods after ovariectomy in rats. *Calcif Tissue Int* 58, 52–59
- Yang J, Pham SM, Crabbe DL (2003): Effects of oestrogen deficiency on rat mandibular and tibial microarchitecture. *Dentomaxillofac Radiol* 32, 247–251

Yasuda H (2013): RANKL, a necessary chance for clinical application to osteoporosis and cancer-related bone diseases. *World J Orthop* 4, 207–217

Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W (2004): Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118, 57–68

Zhang Y, Dong X-L, Leung P-C, Wong M-S (2009): Differential mRNA expression profiles in proximal tibia of aged rats in response to ovariectomy and low-Ca diet. *Bone* 44, 46–52

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei den Menschen bedanken, die mich während der Fertigstellung dieser Dissertation unterstützt haben.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. med. Stefan Sehmisch für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung.

Meinen besonderen Dank möchte ich Dr. med. Daniel Hoffmann aussprechen. Für deine hervorragende wissenschaftliche und menschlich Unterstützung bei der Ausarbeitung dieser Arbeit. Du hattest immer ein offenes Ohr für jegliche Fragen und hast mir stets mit deinen Anregungen und aufmunternden Worten geholfen.

Herzlichen Dank an Dr. rer. nat. Kai Böker für die Hilfe und Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten. Danke das ich Teil an deinen Erfahrungen haben durfte und deiner tatkräftige Hilfe beim pipettieren.

Ein großer Dank gilt Dr. rer. Nat. Marina Komrakova, Anette Witt und Ramona Castro-Machguth. Vielen Dank für eure kompetente Unterstützung, aber vor allem für eure außergewöhnliche herzliche- und menschliche Art.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Stefan Schneider und Jens Gruber für die schnellen Korrekturen und die allzeit hilfreichen Anmerkungen.

Ich möchte mich aufrichtig bei euch allen bedanken. Durch eure Unterstützung, Hilfe und lieben Worte war es erst möglich meine Dissertation zu meiner Zufriedenheit fertigzustellen.