

Kerstin Helene Karin Schmeckenbecher

Dr. med.

## **Unterschiede in der Genexpression humaner Kallus- und Knochenproben bei zeitgerechter und verzögerter/ausbleibender Frakturheilung**

Geboren am 14.05.1979 in Mannheim

2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 12.11.2008 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Chirurgie

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. A. Wentzensen

Trotz intensiver Bemühungen konnten die Gründe für das Versagen der regulären Knochenheilung bislang nicht ausreichend geklärt werden. Bei den meisten der zu diesem Thema durchgeführten Studien handelt es sich um in-vitro-Studien oder Tiermodelle; die wenigen Studien am Menschen fanden hauptsächlich in Form systemischer Konzentrationsmessungen einzelner, für die Knochenheilung wichtiger Zytokine und Wachstumsfaktoren statt. Bislang gibt es keine Studie am Menschen, in der die lokale Genexpression in Gewebeproben aus dem Frakturspalt für ein umfassendes Spektrum an Zytokinen und Matrixbestandteilen untersucht wurde. Wir haben eine solche Untersuchung durchgeführt mit dem Ziel, die Genexpressionsprofile von Patienten mit zeitgerechter und verzögerter/ausbleibender Frakturheilung zu analysieren und mögliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen aufzuzeigen.

Hierzu wurden von 110 Patienten Gewebeproben im Rahmen regulärer Korrekturingriffe gewonnen. Abhängig vom Frakturzeitpunkt wurden die Patienten in eine Gruppe mit zeitgerechter und eine Gruppe mit verzögerter bzw. ausbleibender Frakturheilung eingeteilt. Als Ausschlußkriterien für die Studie galten schwere systemische Erkrankungen, regelmäßige Medikamenteneinnahme und Nikotingenuss.

11 Patienten aus der Gruppe mit verzögerter Frakturheilung konnten passenden Matching-Partner aus der Kontrollgruppe mit zeitgerechter Heilung zugeordnet werden. Gematcht wurde nach Geschlecht, Alter (+/- 5 Jahre) und Frakturlokalisation.

Die Genexpressionsanalysen wurden mittels eines in der Forschungsabteilung der Orthopädischen Klinik in Schlierbach entwickelten cDNA-Array durchgeführt. Auf diesem Array werden 230 knorpel- und knochenrelevante Gene repräsentiert.

Zur Untersuchung wurden die tiefgefrorenen Gewebeproben zunächst pulverisiert und die mRNA eluiert. Die isolierte mRNA wurde mit genspezifischen Primern in radioaktiv markierte cDNA umgeschrieben, welche anschließend mit den Array-Filtern hybridisiert wurde. Die Expression der untersuchten Gene wurde in Relation zu Genen des allgemeinen Zellstoffwechsels gesetzt, um eine quantitative Aussage und eine statistische Auswertung zu

ermöglichen. Nach Normalisierung wurden die Daten mit Hilfe der SAM (Significance Analysis of Microarrays) –Software durchgeführt.

Außerdem stand von 4 Patienten (2 Kontrollen und 2 Pseudarthrosen) noch ausreichend Material zur Anfertigung histologischer Präparate zur Verfügung, welche mit Toluidinblau und Safranin O - Fast green angefärbt wurden, was eine Differenzierung von Knorpel- und Knochengewebe sowie die Unterscheidung nach dem Mineralisationsgrad des knorpeligen Kallus erlaubt.

In der Gruppe mit verzögerter/ausbleibender Frakturheilung wurde ein Gen signifikant 4fach höher exprimiert im Vergleich zu den Kontrollen. Bei diesem Gen handelt es sich um MTRNR2, ein mitochondriales Gen, welches für 16 S rRNA der Mitochondrien kodiert. Innerhalb der Studiengruppe zeigt die Expression von MTRNR2 ein recht inhomogenes Bild: Die Expression war bei Patienten, bei denen die Fraktur weniger als 8 Monate vor der Probenentnahme lag, extrem erhöht, wohingegen sie bei Patienten mit manifesten Pseudarthrosen etwa den Werten der Kontrollen entsprach.

Die histologischen Aufnahmen der Patienten mit zeitgerechter Frakturheilung zeigen regelrecht aufgebauten Frakturkallus mit beginnender, teils fortgeschrittener Mineralisation. In den Pseudarthrosepräparaten finden sich ebenfalls einzelne Bereiche mit knorpeligem Kallusgewebe und teilweiser Kalzifikation. Die Abgrenzung zum umgebenden lockeren Bindegewebe ist nur schwer möglich. Das Kallusgewebe weist eine faserige Struktur auf und wirkt insgesamt weniger organisiert.

Microarrays haben sich als wertvolles Instrument für globale Genexpressionsanalysen in Zell- oder Gewebeproben erwiesen. Obwohl durch diese Art der Analyse keine direkten Aussagen über die Gründe für eine veränderte Genexpression bei Patienten mit verzögerter im Vergleich zu zeitgerechter Frakturheilung getroffen werden können, deuten die Ergebnisse dieser Studie jedoch an, dass Mitochondrien im Rahmen der Knochenbruchheilung eine viel größere Rolle spielen, als bislang angenommen wurde.

Die extrem erhöhte Expression des mitochondrialen Gens MTRNR2 könnte Ausdruck eines gesteigerten ATP-Bedarfs sowie einer mangelnden Kalziumspeicherung bei verzögerter Frakturheilung sein.