# Untersuchungen zur Regulation des Knochenumbaus durch den Wnt-Signalweg

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften

des Department Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

vorgelegt von Jochen Heiner Schulze

aus Hamburg

Hamburg 2010

Genehmigt vom Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Herr Priv.-Doz. Dr. T. SCHINKE Weiterer Gutachter der Dissertation: Professor Dr. H.-P. MÜHLBACH Tag der Disputation: 09. Juli 2010

Hamburg, den 24. Juli 2010



. laum A

Professor Dr. Axel Temming Leiter des Departments Biologie

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Der Knochen	1
1.1.1 Die Knochenentwicklung	1
1.1.2 Der Knochenumbau	2
1.1.2.1 Die Knochenbildung bzw. Knochenformation	2
1.1.2.2 Die Knochenresorption	3
1.1.2.3 Die Regulation des Knochenumbaus	4
1.1.3 Störungen des Knochenumbaus	5
1.2 Der Wnt-Signalweg	7
1.2.1 Der Wnt-Signalweg und seine Bedeutung für den Knochen	9
1.3 Vorarbeiten zur potentiellen Bedeutung von Krm2 im Osteoblasten	10
1.4 Zielsetzung	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Laborgeräte	13
2.1.2 Glas-und Plastikwaren	14
2.1.3 Chemikalien	15
2.1.4 Puffer und Lösungen	15
2.1.5 Bakterien	20
2.1.6 Sonstige Reagenzien	20
2.1.7 Antikörper	21
2.1.8 Primer	22
2.2 Methoden	23
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	23
2.2.1.1 Restriktionsverdau von DNA	23
2.2.1.2 Modifikation von DNA-Enden	23
2.2.1.3 Ligation von DNA-Enden	24
2.2.1.4 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren	24
2.2.1.5 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	25
2.2.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	25
2.2.1.7 Transformation von kompetenten Bakterien	25

2.2.1.8 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien im Miniprep- und	26
Maxiprepformat	
2.2.1.9 Isolierung von genomischer DNA aus Mäuseschwänzen	26
2.2.1.10 RNA-Isolation aus Geweben und Zellen	26
2.2.1.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
2.2.1.12 RT-PCR und qRT-PCR	28
2.2.1.13 Northernblot- und Southernblot-Analyse	29
2.2.1.14 Affymetrix-Genchip-Analyse	31
2.2.1.15 DNA-Sequenzierung	31
2.2.2 Zellbiologische Methoden	32
2.2.2.1 Generierung primärer Osteoblasten	32
2.2.2.2 Generierung von Osteoklasten aus Knochenmarkzellen	32
2.2.2.3 Kultivierung von Zelllinien	33
2.2.2.4 SDS-Gelelektrophorese und Westernblot	34
2.2.2.5 Proliferationsassay mit BrdU	35
2.2.2.6 Osteoprotegerin-ELISA	35
2.2.2.7 Durchflusszytometrie (FACS)	35
2.2.3 Histologie und Morphologie	36
2.2.3.1 Kontaktröntgen und µCT-Analyse	36
2.2.3.2 Acrylat-und Paraffin-Histologie	37
2.2.3.3 von Kossa/van Gieson-Färbung	37
2.2.3.4 Toluidinblau-Färbung	38
2.2.3.5 Calceinmarkierung	38
2.2.3.6 Analyse der Osteoklastenzahl durch TRAP-Färbung	38
2.2.3.7 Hämatoxylin/Eosin-Färbung	39
2.2.3.8 Anti-p-STAT3-Immunhistologie	39
2.2.3.9 Histomorphometrie	39
2.2.4 Statistik	40

3. Ergebnisse	41
3.1 Genotypisierung der Collal-Krm2 Mäuse und Bestimmung der Krm2-	41
Überexpression	
3.2 Analyse des Knochenphänotyps Collal-Krm2 transgener Mäuse	42
3.3 Analyse der zellulären und molekularen Ursachen des Phänotyps Collal-Krm2	49

transgener Mäuse	
3.4 Der Einfluss von IL-33 auf den Knochenumbau	53
3.5 Die Rolle des Wnt-Signalweges bei der Pathogenese des humanen Prostata-	64
Karzinoms	
4. Diskussion	74
4.1 Die Rolle von Krm2 für die Regulation des Wnt/β-Catenin-Signalwegs in	74
Osteoblasten	
4.2 Die Rolle von IL-33 im Knochenumbau	77
4.3 Die Rolle des Wnt-Signalwegs bei der Pathogenese des Prostatakarzinoms	80
4.4 Ausblick	83
5. Zusammenfassung	85
6. Literaturverzeichnis	87
7. Anhang	102
7.1 Danksagung	102
7.2 Publikationen	103

# Abkürzungen

α:	Alpha
β:	Beta
γ:	Gamma
Δ:	Delta
μ:	Mikro
APC:	Adenomatous polyposis coli
ATF:	Activating transcription factor
B2m:	Beta-2-Microglobulin
BFR:	Bone formation rate
Bglap:	Bone gla protein
BMD:	Bone mineral density
BrdU:	Bromodeoxyuridin
BSA:	Bovines Serum Albumin
BV/TV:	Bone volume per tissue volume
C.Th.:	Cortical thickness
Calcr:	Calcitonin receptor
CD:	Cluster of differentiation
cDNA:	copy DNA
CKI:	Casein kinase
C <sub>T</sub> :	Threshold cycle
DEPC:	Diethylpyrocarbonat
Dkk:	Dickkopf
Dmp:	Dentin matrix acidic phosphoprotein
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
dNTP:	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECL:	Enhanced chemiluminescence
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA:	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER:	Östrogenrezeptor
EtOH:	Ethanol
FACS:	Fluorescence activated cell sorting

FCS:	Fötales Kälberserum
g:	Gramm
GAPDH:	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSK:	Glykogensynthase-Kinase
HRP:	Horseradish Peroxidase
Ibsp:	Integrin-binding sialoprotein
IL:	Interleukin
Illrl1:	Interleukin 1 receptor-like 1
Kremen:	Kringle containing transmembrane protein
Krm:	Kremen
Lef:	Lymphoid enhancer binding factor
Lrp:	Low density lipoprotein receptor-related protein
M:	Molarität
MAPK:	Mitogen-activated protein kinase
M-Csf:	Macrophage colony-stimulating factor
MDA:	MDA-Pca-2b
MEM:	Modified Eagle Medium
MeOH:	Methanol
MMTV:	Mouse mammary tumor virus
MOPS:	3-N-(Morpholino)propansulfonsäure
N:	Kraft
Nfatc:	Nuclear factor of activated T-cells
NOb/BPm:	Number of osteoblasts per bone perimeter
NOc/BPm:	Number of osteoclasts per bone perimeter
Opg:	Osteoprotegerin
Oscar:	Osteoclast associated receptor
PBS:	Phosphate buffered saline
Pcolce2:	Procollagen C-endopeptidase enhancer 2
PCP:	Planar cell polarity
PCR:	Polymerase-Kettenreaktion
Phex:	Phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X
	chromosome
PTH:	Parathormon
qRT-PCR:	Quantitative RT-PCR

Rankl:	Receptor activator of NF-kappa-B ligand
RIPA:	Radio Immuno Precipitation Assay
RNA:	Ribonukleinsäure
RT:	Reverse Transkription
RT:	Raumtemperatur
Runx2:	Runt related transcription factor 2
SDS:	Natriumdodecylsulfat
Smpd3:	Sphingomyelin phosphodiesterase 3
Sost:	Sklerostin
ST2:	Interleukin 1 receptor-like 1
Stat:	Signal-transducer and activator of transcription protein
TAE:	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
Tb.Sp.:	Trabecular spacing
Tb.th.:	Trabecular thickness
TCF:	Transcription factor
Tnf:	Tumor necrosis factor
TG:	Transgen
Tgf:	Transforming growth factor
Traf:	TNF-receptor-associated factor
TRAP:	Tartrate resistant acid phosphatase
Tris:	Tris(hydroxylmethyl)aminomethan
Wnt:	Wingless-related mouse mammary tumor virus integration site
WT:	Wildtyp

### 1. Einleitung

#### 1.1 Der Knochen

Entgegen der landläufigen Meinung stellt der Knochen nicht nur ein starres Gerüst dar, sondern ist ein dynamisches Gewebe, welches einem steten Umbau unterworfen ist. So werden jährlich etwa 10% der Knochenmasse komplett erneuert (Cohen, 2006). Durch den Knochen werden vielfältige Aufgaben erfüllt, da dieser nicht nur einen Stützapparat darstellt, der Bewegung ermöglicht und den inneren Organen als Schutz vor physikalischer Gewalteinwirkung dient, vielmehr ist er auch ein Reservoir für Mineralien und dient als wichtiger Regulator der Mineralhomeostase (Zaidi, 2007). Humaner Knochen ist zu ca. 60% mineralisiert, was durch die Einlagerung von Hydroxylapatit ( $[Ca_3(PO_4)_2]_3Ca(OH)_2$ ) geschieht. Der Hauptbestandteil der nicht mineralisierten Matrix ist Typ I-Kollagen (etwa 95%). Daneben enthält Knochen auch andere Matrixproteine, wie die RGD-Domänen enthaltenden Glykoproteine Fibronektin, Osteopontin, Thrombospondin, Bone sialoprotein (*Ibsp*) und Dentin Matrix Protein-1 (*Dmp1*), sowie Vitamin K-abhängige Gla-Proteine, wie z.B. Osteocalcin. Diese Bestandteile leiten zu einer weiteren Funktion des Knochens über. So gilt das Matrixprotein Osteocalcin als wichtiger Regulator des Glukosehaushaltes, wodurch der Knochen als Regulator des Energiestoffwechsels fungiert (Lee *et al.*, 2007).

In unmittelbarer Nähe der Knochenzellen bzw.-Matrix liegt das Knochenmark. Diese räumliche Nähe bietet zahlreiche Möglichkeiten der Interaktion der Knochenzellen mit diversen anderen Zellen, wie z.B. B-Zellen und T-Zellen. Die Gesamtheit der Interaktionen des Knochens und der immunrelevanten Zellen wird dabei auch als Osteoimmunologie bezeichnet. Hierbei nehmen die unterschiedlichen Systeme wechselseitig Einfluss aufeinander. So beeinflussen Osteoblasten z.B. die B-Zellreifung und B-Zellen die Regulation der Knochenmasse (Wu *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2007). Dies macht den Knochen zu einem wichtigen Regulator verschiedenster Funktionen des Immunsystems.

## 1.1.1 Die Knochenentwicklung

Knochen wird durch das Zusammenspiel verschiedener Zellen gebildet und umgebaut. Hierbei werden zwei Arten der Knochenbildung voneinander unterschieden. Bei der enchondralen Ossifikation, welche unter anderem für die Bildung der Röhrenknochen wie z.B. für die des Femurs verantwortlich ist, kommt es zuerst zu einer Kondensation mesenchymaler Vorläuferzellen. Diese differenzieren zu Chondrozyten, welche Typ II-Kollagen produzieren. Für die Differenzierung der mesenchymalen Vorläuferzellen zu Chondrozyten ist der Transkriptionsfaktor Sox9 essenziell. Das darauf folgende Geschehen kann in mehrere Phasen unterteilt werden. Nach einer Phase der Proliferation hypertrophieren die Chondrozyten. Hypertrophe Chondrozyten produzieren nun mehr kein Typ II-Kollagen sondern Typ X-Kollagen. Der Übergang von proliferierenden Chondrozyten zu hypertrophen Chondrozyten wird durch die Moleküle Indian hedgehog (Ihh) und Pthrp reguliert. Zeitgleich zum Auftreten von hypertrophen Chondrozyten exprimieren mesenchymale Zellen im Perichondrium Runx2. Bei diesem Gen handelt es sich um den Schlüsselfaktor der Osteoblastendifferenzierung (Ducy et al., 1997). Diese Zellen im Perichondrium bilden den sogenannten "Bone collar", welcher die Vorlage für den kortikalen Knochen darstellt. Hypertrophe Chondrozyten sterben letztendlich ab und bilden auf diese Weise durch die und Aggrecan eine ideale Vorlage für die hinterlassene Matrix aus Typ X-Kollagen Mineralisation. Schließlich kommt es zur Einsprossung von Gefäßen, über die dann Osteoblasten einwandern können. Diese produzieren eine Typ I-Kollagen haltige Matrix, wodurch eine Primär-Spongiosa gebildet wird. Bei diesem Gebilde handelt es sich um die Vorlage des zukünftigen trabekulären Knochens (Karsenty et al, 2009). Bei der desmalen Ossifikation, die für die Bildung der platten Knochen, wie z.B. die des Schädels und des Schulterblattes verantwortlich ist, kommt es jedoch nicht zur Bildung einer Knorpelvorlage, hier differenzieren mesenchymale Vorläuferzellen direkt zu Osteoblasten (Hartmann, 2009).

## 1.1.2 Der Knochenumbau

#### **1.1.2.1 Die Knochenbildung bzw. Knochenformation**

Für die Knochenbildung sind die Osteoblasten verantwortlich, welche sich, wie schon oben beschrieben, von mesenchymalen Vorläuferzellen ableiten. Für die Differenzierung der Vorläuferzellen zu Osteoblasten ist Runx2 der Schlüsselfaktor (Ducy *et al*, 1997). Zusätzlich sind zwei weitere Transkriptionsfaktoren, welche prädominant im Osteoblasten exprimiert werden für dessen Differenzierung absolut notwendig: Osterix und Atf4 (Karsenty *et al.*, 2009). Durch Osteoblasten wird eine extrazelluläre Matrix aufgebaut, die hauptsächlich aus Typ-I Kollagen besteht und im unmineralisierten Zustand auch als Osteoid bezeichnet wird. Durch noch nicht vollständig verstandene Prozesse wird dann Mineral eingelagert. An diesem Prozess ist das Enzym Alkalische Phosphatase beteiligt, welches anfallendes Pyrophosphat

spaltet (Wennberg *et al.*, 2000, Narisawa *et al.*, 1997). Nach dem Auffüllen der resorbierten Fläche wird die Knochenformation durch noch nicht genau aufgeklärte Mechanismen beendet. Bei diesem Vorgang spielt höchstwahrscheinlich der Osteozyt eine zentrale Rolle, da durch diese Zellart Sost, ein löslicher Inhibitor der Knochenformation, welcher an den Wnt-Korezeptor Lrp5 bindet, sezerniert wird (Winkler *et al*, 2003). Bei Osteozyten handelt es sich um terminal differenzierte Osteoblasten, welche durch den Knochenformationsprozess in der Matrix "gefangen" werden. Sie zeichnen sich durch die Expression von Markern wie *Phex* oder *Dmp1* aus (Paic *et al.*, 2009). Diesen Genen kommt auch eine entscheidende Rolle bei der Matrixmineralisation zu. So kodiert *Phex* für eine Endopeptidase, deren Inaktivierung in der Maus eine Hypophosphatamie zur Folge hat und in einer gestörten Matrixmineralisation (Osteomalazie) resultiert (Yuan *et al.*, 2008). Inaktivierende Mutationen von *Dmp1* sind Ursache einer autosomal rezessiven Mineralisationsstörung, die ebenfalls mit einer Hypophosphatamie einhergeht (Feng *et al.*, 2006).

# 1.1.2.2 Die Knochenresorption

Osteoklasten, welche die einzigen Zellen darstellen, die in der Lage sind Knochen abzubauen, leiten sich aus der hämatopoetischen Linie ab. Hierbei handelt es sich um multinukleäre Zellen, welche positiv für das Enzym Tartrate-resitant-acid-phosphatase (TRAP) sind und durch Fusionierung myeloider Vorläuferzellen entstehen (Novack und Teitelbaum, 2008). Schlüsselfaktoren der Osteoklastogenese sind M-Csf und Rankl. M-Csf übt über seinen Rezeptor c-fms sowie Akt- und MAPK-abhängige Signalwege einen positiven Einfluss auf die Proliferation und das Überleben von Osteoklastenvorläufern aus (Takayanagi, 2007). Rankl ist der entscheidende Faktor für die Differenzierung zu funktionsfähigen Osteoklasten, welcher nicht nur von Osteoblasten sondern auch von aktivierten T-Zellen sezerniert wird (Takayanagi, 2007). Rankl wirkt über seinen Rezeptor Rank und Traf6 auf Signalwege wie z.B. NFkB-, MAPK- und PI3K-abhängige Signalwege und aktiviert über die Regulation des intrazellulären Calciumspiegels den Transkriptionsfaktor Nfatc1. Die Expression dieses Transkriptionsfaktors ist für die Osteoklastogenese zwingend erforderlich (Takayanagi, 2007). Zudem existiert ein wichtiger Rankl-Gegenspieler, das sogenannte Osteoprotegerin (Opg), welches durch das Gen Tnfrsf11b kodiert wird. Opg regelt maßgeblich die Osteoklastogenese durch seine Bindung und Inhibtion von Rankl (Simonet et al., 1997). Nach der Migration von Osteoklastenvorläufern und deren Fusionierung adhärieren diese über αvβ3-Integrine an RGD-Domänen enthaltende Matrix-Proteine. Durch Ausbildung einer

"sealing zone", die durch Entstehung eines Aktin-Ringes ermöglicht wird, kann der Osteoklast seiner "ruffled border" (Einfaltungen der Zellmembran) unter ein Resorptionskompartiment erzeugen. Hier kommt es durch die Aktivität einer Carboanhydrase, einer H+ATPase dem Chlorid-Kanal und Clc-7 zu einer Ansäuerung des Resorptionskompartiments, was ein Herauslösen des Minerals aus dem Knochen zur Folge hat (Novack und Teitelbaum, 2008, Schinke et al., 2009). Die organische Matrix (hauptsächlich Typ-I Kollagen) wird dabei durch die saure Protease Cathepsin K, welche in das Resorptionskompartiment sezerniert wird, abgebaut.

#### 1.1.2.3 Die Regulation des Knochenumbaus

Ein andauernder Knochenumbau ist absolut entscheidend, da ansonsten die Knochenqualität bzw. die mechanische Belastbarkeit durch so genannte "Microcracks" stetig abnehmen würde, was in einer erhöhten Frakturrate resultieren würde. Dieser stetige Umbau der Knochenmasse wird durch zahlreiche Mechanismen reguliert. So erfolgt z.B. die zentrale Regulation der Knochenmasse über das Hormon Leptin, welches von weißem Fettgewebe sezerniert wird. Leptin wirkt über den Hypothalamus, wo es den Sympathikustonus stimuliert, welcher dann in Osteoblasten über  $\beta$ 2-adrenerge Rezeptoren den Transkriptionsfaktor Atf4 aktiviert und damit die *Rankl*-Expression induziert. Gleichzeitig wird die Expression der Clock-Gene im Osteoblasten durch Stimulation der  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptoren induziert, diese wirken dann inhibitorisch auf die Expression von c-myc und die Proliferation der Osteoblasten, wodurch es zu einer erniedrigten Knochenformation kommt (Elefteriou *et al*, 2005, Fu *et al.*, 2005).

Die endokrine Kontrolle des Knochenumbaus erfolgt über Hormone wie PTH und Östrogen. So reguliert PTH, welches in der Nebenschilddrüse produziert wird, die Freisetzung von Calcium aus dem Knochen, erhöht indirekt über die Wirkung von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D die Aufnahme von Calcium aus dem Darm und fördert die vermehrte Rückabsorption dieses Minerals in der Niere (Quarles, 2008). Östrogen wirkt über Kernrezeptoren (über ER $\alpha$ ) auf den Osteoklasten, wo es die Apoptose durch erhöhte Expression von FasL induziert (Nakamura *et al*, 2007). Damit stellt Östrogen einen Inhibitor der Knochenresorption dar, was auch die erhöhte Resorption in postmenopausalen Osteoporose-Patientinnen erklärt.

Neben der zentralen und hormonellen Kontrolle des Knochenumbaus spielen lokale Mechanismen eine wichtige Rolle. Beispiele hierfür sind das EphrinB2-EphB4, das Osteoprotegerin (Opg)-Rankl System und das Wirken von Wachstumsfaktoren wie z.B. Tgf- $\beta$ / Bone morphogenic proteins (Bmps) und Wnt-Glykoproteinen. Zusätzlich spielen verschiedeneste Zytokine, wie z.B. IL-1, IL-18 und Chemokine, wie etwa Ccl2 und Cxcl12, für die Steuerung der Differenzierung bzw. der Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten eine entscheidende Rolle (Harada und Rodan, 2003, Deschaseaux *et* al, 2009, Takayanagi, 2007, Lorenzo *et al.*, 2008). Hervorzuheben ist, dass sich die Gegenspieler Osteoblasten und Osteoklasten wechselseitig beeinflussen. So sezernieren aktive Osteoklasten Faktoren wie z.B. Tgf- $\beta$  oder Sphingosin-1-Phosphat, welche die spätere Knochenneubildung durch Osteoblasten stimulieren (Tang *et al.*, 2009, Pederson *et al.*, 2008). Dieses Phänomen wird auch als funktionelle Kopplung der Knochenformation an die Knochenresorption (Englisch: "*Coupling*") bezeichnet. Entsprechend werden durch den Osteoblasten auch proresorptive Signale z.B. durch Sezernierung von Rankl und anti-resorptive Signale wie etwa durch Opg-Serzernierung vermittelt.

#### 1.1.3 Störungen des Knochenumbaus

Für die Funktion des Knochens ist es essenziell, dass Knochenformation und Knochenabbau genau aufeinander abgestimmt sind, denn jede Verschiebung des Gleichgewichts dieser zwei Vorgänge kann zu entscheidenden Veränderungen der Stabilität des Knochens, aber auch zu einer Störung der Mineralhomöostase führen. Eine Erniedrigung der Knochenmasse um mehr als 2,5 Standardabweichungen vom Mittelwert des entsprechenden Alters wird auch als Osteoporose bezeichnet (Rosen, 2005). Dieser Zustand tritt ein, wenn die Resorption gegenüber der Formation erhöht ist. Eine Erhöhung der Knochenmasse tritt ein, wenn die Formation gegenüber der Resorption erhöht ist, was als Osteosklerose bezeichnet wird. Gegenüber einer Osteopetrose, bei der die Osteoklasten nicht mehr adäquat Knochen resorbieren können, ist die Osteosklerose der angestrebte Zustand, da der Knochen hier eine erhöhte biomechanische Belastbarkeit aufweist. So kommt es bei der Osteopetrose neben schwerwiegenden Symptomen, wie z.B. einer Anämie, trotz der erhöhten Knochenmasse zu einem erhöhten Frakturrisiko. Neben diesen Veränderungen der Knochenmasse gibt es auch Erkrankungen, bei denen die Mineralisation des Knochens betroffen ist, so spricht man bei einer Anreicherung der nicht mineralisierten Matrix von einer Osteomalazie.

Einerseits können genetische Veränderungen Ursache dieser Erkrankungen sein. So tritt eine Osteoporose bei Patienten mit Osteoporosis-Pseudoglioma-Syndrom aufgrund einer inaktivierenden Mutation des *LRP5*-Gens auf. Patienten mit einer aktivierenden Mutation (G171V) des *LRP5*-Gens zeigen klinisch eine Osteosklerose (Little *et al.*, 2002). Die entsprechenden Mausmodelle bestätigen dabei den beobachteten humanen Phänotyp (Kato *et* 

*al.*, 2002). Inaktivierende Mutationen der Gene *CLC7*, das für einen Chloridkanal kodiert und *TCIRG* (kodiert für die  $\alpha$ 3 Untereinheit der Protonenpumpe im Osteoklasten) sind im Menschen die Ursache für eine Osteopetrose. Die jeweiligen Mausmodelle weisen ebenfalls eine Osteopetrose auf (Schinke *et al.*, 2009). Von allen Erkrankungen des Skelettsystems hat jedoch die Osteoporose die größte Bedeutung.

Neben der genetischen Komponente gibt es zahlreiche Risikofaktoren für die Ausbildung einer Osteoporose. Hierzu zählen Fehl- und Mangelernährung (Rosen, 2005), eine unzureichende Versorgung mit Vitamin D (Priemel *et al.*, 2009), ein Abfallen des Östrogenspiegels in der Menopause, Glukocorticoideinnahme, Immobilisation und Grunderkrankungen wie Tumorleiden z.B. das Multiple Myelom sowie inflammatorische Erkrankungen wie z.B. die rheumatoide Arthritis. Ziel einer medikamentösen Osteoporose-Therapie ist es, durch gezielt in die Regulationsmechanismen des Knochenumbaus einzugreifen und so den Knochenmasseverlust aufzuhalten, bzw. im Idealfall sogar neue Knochenformation geschehen, ohne dabei die Resorption zu senken, sodass es zu einer Erhöhung der Knochenmasse ohne Abnahme der Knochenqualität kommt.

Im Moment stehen neben der Supplementierung von Calcium und Vitamin D verschiedene Therapien zur Verfügung. Eine wichtige Wirkstoffklasse sind die so genannten Bisphosphonate, die sich an den Knochen anlagern und nach Resorption durch Osteoklasten diese in die Apoptose treiben. Bei dieser Substanzklasse handelt es sich also um Inhibitoren der Resorption. Aktuell ist ein neutralisierender Antikörper gegen humanes RANKL mit dem Namen Denosumab als Therapie-Option hinzugekommen. Hierbei handelt es sich auch um eine antiresorptive Therapie, welche u. a. bei der postmenopausalen Osteoporose eingesetzt werden kann (Cummings *et al.*, 2009). Der Großteil der heute verfügbaren Therapien ist jedoch nur in der Lage, den fortschreitenden Knochenmasseverlust durch Hemmung der Resorption bestenfalls aufzuhalten oder zu verlangsamen.

Zum Aufbau neuer Knochenmasse ist bis heute nur eine Therapieoption vorhanden. Hierbei wird den Patienten intermittierend PTH verabreicht. Dies birgt aber auch potenzielle Gefahren. So kann bis heute nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass eine PTH-Therapie, wie im Tiermodell, das Risiko für die Entwicklung von Osteosarkomen erhöht (Tashjian und Goltzman, 2008), weshalb diese Therapie maximal zwei Jahre durchgeführt werden darf. Führt diese Therapie nicht zu dem gewünschten Erfolg, gibt es z.Z. keine weitere Möglichkeit, die Knochenmasse medikamentös zu steigern. Deshalb ist es essenziell, weitere Ansatzpunkte für eine osteoanabole Therapie zu identifizieren.

## **1.2 Der Wnt-Signalweg**

Die Beobachtung, dass aktivierende Mutationen des humanen Wnt-Korezeptors *LRP5* in einer Osteosklerose (Mutation G171V) resultieren, führte zu der Hoffnung, dass der Wnt-Signalweg als potentieller Ansatzpunkt einer osteoanabolen Therapie dienen könne (Krishnan *et al.*, 2006). Der Wnt-Signalweg wird in mindestens drei Signalwege unterteilt: Der kanonische Wnt-Signalweg, der Wnt/Planar cell polarity (PCP)-Signalweg und der Wnt/Ca (Calcium abhängigen)-Signalweg (Mosimann *et al.*, 2009). Von allen Wnt-Signalwegen ist der kanonische Wnt-Signalweg der am besten verstandende. Die Bezeichnung "Wnt" stellt ein Anagramm der Wörter "*Wingless*" und "*Int1*" dar. 1982 wurde das Gen *Int1* als bevorzugte Integrationsstelle des MMTV-Virus identifiziert (Nusse und Varmus, 1982). Das Gen *Wingless* ist ein Segmentpolaritätsgen und stellt das Homolog zu *Int1* in der Fruchtfliege dar (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980). Komponenten des Wnt-Signalwegs treten das erste Mal in der Art *Trichoplax* (Stamm: *Placozoa*) auf (Srivastava *et al.*, 2008).

Der kanonische Wnt-Signalweg wird durch eine Vielzahl von Mechanismen reguliert (Abb.1.2.1). In Abwesenheit eines aktivierenden Signals wird  $\beta$ -Catenin durch die Wirkung des so genannten "*destruction complex*", welcher sich aus *Adenomatous polyposis coli* (APC), Axin, Glykogensynthase Kinase-3 (Gsk3) und Caseinkinase (CKI) zusammensetzt, gebunden und durch GSK3 an spezifischen Serin- und Threonin-Resten phosphoryliert. Durch die E3-Ubiquitin-Ligase  $\beta$ -Trcp wird  $\beta$ -Catenin ubiquitiniert und durch das 26S Proteasom abgebaut, wodurch der Signalweg inaktiviert wird bzw. bleibt.

Eine Aktivierung dieses Signalweges geschieht, wenn ein Wnt-Protein an einen Serpentin-Rezeptor der Frizzled-Familie und den Wnt-Korezeptor Lrp5/6 bindet, wodurch die Degradation von  $\beta$ -Catenin verhindert wird. Das Säugetiergenom kodiert für 19 Wnt-Proteine und für 10 Frizzled-Rezeptoren (MacDonald *et al.*, 2009). Dies führt zwangsläufig zu einer gewissen Redundanz, und die Frage, ob ein gewisses Wnt-Protein kanonisch (d.h. über die Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin) oder nicht- kanonisch (PCP-, Calcium-abhängige-Signalwege) wirkt, kann nicht pauschal beantwortet werden, da dies immer auch rezeptor- bzw. zellkontextabhängig ist (Angers und Moon, 2009, Mikels und Nusse, 2006). Entscheidend für die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges ist die Herstellung räumlicher Nähe eines Frizzled-Rezeptors und dem Korezeptor Lrp5/6 (Cong *et al.*, 2004). Durch noch nicht genau verstandene Abläufe kommt es dann zu einer Phosphorylierung von PPPSPxS-Motiven im C-Terminus von Lrp6 durch GSK-3 und CKI (Davidson *et al.*, 2005, Zeng *et al.*, 2005). Durch Ausbildung von phosphorylierten Lrp6-Aggregaten (Bilic *et al.*, 2007), an welche Axin bindet, steht  $\beta$ -Catenin nun nicht mehr unter der Kontrolle des *"destruction complex"*, weshalb es auch nicht mehr phosphoryliert und dem Proteasom zugeführt wird (die unphosphorylierte Form stellt das aktive  $\beta$ -Catenin dar). Stattdessen transloziert es in den Nucleus, wo es zusammen mit TCF-Transkriptionsfaktoren an Konsensussequenzen 5'-AAGATCAAAGG-3' bindet und die Genexpression von Wnt-Zielgenen wie *Axin2* oder *Naked* induziert (Mosimann et al., 2009).



#### Abbildung 1.2.1 Der kanonische Wnt-Signalweg, modifiziert nach MacDonald et al., 2009

Links: In Abwesenheit eines Wnt-Liganden bindet der  $\beta$ -Catenin-Zerstörungskomplex (Axin, APC: *Adenomatous polyposis coli*, Gsk-3 $\beta$ : Glykogensynthase-Kinase-3-Beta, CKI: Casein-Kinase)  $\beta$ -Catenin und durch die Aktivität von Gsk-3 $\beta$  wird  $\beta$ -Catenin an spezifischen Serin-und Threonin-Resten phosphoryliert. Diese Phosphorylierung dient der E3-Ubiquitin-Ligase  $\beta$ -Trcp als Signal zur Ubiquitinierung von  $\beta$ -Catenin. Ubiquitiniertes  $\beta$ -Catenin wird anschließend durch das 26S-Proteasom abgebaut. Rechts: Die Bindung eines Wnt-Liganden an LRP5/6 und Frizzled führt zu einer Phosphorylierung spezifischer Serin-Reste im C-Terminus von Lrp6, wodurch Axin an die Membran gelagert wird. Dadurch wird die Bindung des Zerstörungskomplexes an  $\beta$ -Catenin unterbrochen und dieses transloziert in den Nukleus, wo es in Synergie mit Transkriptionsfaktoren der TCF-Familie die Genexpression induziert.

Neben diesen zentralen Interaktionspartnern (dargestellt in Abb.1.2.1) gibt es eine Vielzahl von Regulatoren dieses Signalweges. So binden die *secreted frizzled-related proteins* (sFRPs) an Frizzled-Rezeptoren und Wnt-Proteine und blockieren so den Wnt/ β-Catenin-Signalweg

(Bovolenta *et al.*, 2008). Ein weiteres Beispiel für lösliche Inhibitoren des Wnt/ β-Catenin-Signalwegs sind die Mitglieder der Wise/Sost-Familie und der Dickkopf-Familie (Dkk), hier insbesondere Dkk1, 2 und 4 (Semenov *et al*, 2005, Niehrs, 2006). Dkk1, 2 und 4 sind wiederum Liganden der Transmembran-Rezeptoren Kremen1 (Krm1) und Kremen2 (Krm2) (Mao und Niehrs, 2003). Krm-Proteine sind je nach Anwesenheit von Dkk-Proteinen Aktivatoren oder Inhibitoren des Wnt/ β-Catenin-Signalwegs (Hassler *et al.*, 2007) und inhibieren in Synergie mit Dkk1 die Lrp6-abhängige Signaltransduktion durch Limitierung des membranständigen Lrp6 (Mao *et al.*, 2002). Diese Sichtweise wird aber durch neuere Erkenntnisse in Frage gestellt, wonach Dkk1 auch ohne die Beteiligung der Kremen-Proteine den Wnt/ β-Catenin-Signalweg durch Inhibition der Interaktion von Wnt-Proteinen mit Lrp6 hemmt (Semenov *et al.*, 2008).

#### 1.2.1 Der Wnt-Signalweg und seine Bedeutung für den Knochen

Der Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalweg spielt bei Prozessen wie Zellproliferation, Zellpolarität und Zelldifferenzierung eine entscheidende Rolle (MacDonald *et al.*, 2009). Auch für die Regulation des Knochenumbaus ist der Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalweg von zentraler Bedeutung. So regelt der Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalweg die Differenzierung von Chondrozyten und Osteoblasten (Day *et al.*, 2005). Wird der Wnt-Signalweg im Stadium der Osteochondro-Vorläuferzellen (gemeinsame Vorläuferzelle von Chondrozyt und Osteoblast) durch konditionale Deletion von  $\beta$ -Catenin (Prx1-Cre und Dermo)-Cre gehemmt, entstehen vermehrt Chondrozyten, da die terminale Differenzierung zu Osteoblasten blockiert ist (Day *et al.*, 2005, Hartmann, 2006). Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg reguliert aber nicht nur die Linien-Entscheidung zwischen Knorpelzellen und Osteoblasten. Dies geschieht aber nicht durch seine Aktivität in vollständig ausgereiften Osteoblasten. Dies geschieht aber nicht durch Steuerung der Knochenformation sondern durch eine nicht zell-autonome Regulation der Knochenresorption. So konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs im reifen Osteoblasten die *Opg*-Expression steuert und so die Knochenresorption durch den Osteoklasten reguliert (Glass *et al.*, 2005).

Die Veränderung  $\beta$ -Catenin-abhängiger Signalwege ist auch Ursache zahlreicher Erkrankungen, die den Knochen betreffen. Dies zeigt sich dadurch, dass inaktivierende Mutationen des humanen *LRP5*-Gens Ursache des *Osteoporosis Pseudoglioma Syndromes* sind, bei dem es zu der Ausbildung einer juvenilen Osteoporose und Blindheit kommt (Gong *et al.*, 2001). Inaktivierende Mutationen des *SOST*-Gens sind Ursache des van Buchem-

Syndroms, bei dem es zu einer Osteosklerose (überschießender Aktivität der Osteoblasten) kommt (Balemans *et al.*, 2001). Die Bedeutung des Wnt-Signalweges für den Knochen zeigt sich aber nicht nur durch vererbte genetische Veränderungen. So hat Dkk1 als Antagonist des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in verschiedenen pathologischen Vorgängen eine zentrale Funktion (Pinzone *et al.*, 2009).

Maligne Erkrankungen wie das Multiple Myelom, das Prostatakarzinom und das Mammakarzinom betreffen bei vielen Patienten Skelettsystem, das da hier Knochenmetastasen auftreten, bei denen es zu einer Verringerung der Knochendichte und zu Osteolysen kommen kann. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass osteolytische Tumorzellen vermehrt DKK1 sezernieren (Kaiser et al., 2008, Hall et al., 2005, Forget et al., 2007). Da eine Blockade von Dkk1 im Tiermodell das Ausmaß der Osteolysen verringern, könnten DKK1-neutralisierende Antikörper ein gewisses Potential bezüglich der Behandlung von Patienten mit Knochenmetastasen besitzen (Heath et al., 2009, Fulciniti et al, 2009). Dkk1 spielt ebenso eine wichtige Rolle in der rheumatoiden Arthritis, bei der es zu einer Gelenkzerstörung und Knochenabbau kommt, weshalb auch hier der Einsatz DKK1neutralisierender Antikörper diskutiert wird (Diarra et al., 2007).

#### 1.3 Vorarbeiten zur potentiellen Bedeutung von Krm2 im Osteoblasten

In einer RT-PCR Expressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass *Kremen2 (Krm2)* im Gegensatz zu seinem Familienmitglied *Kremen1 (Krm1)* prädominant im Knochen exprimiert wird (Abb.1.3.1 A). Außerdem fiel auf, dass die Expression von *Krm2* nur in der frühen Phase der Differenzierung primärer Osteoblasten nachgewiesen werden konnte. Dies stellt eine gegenläufige Regulation der Expression in Bezug zur *Dkk1*-Expression dar, welches ausschließlich in terminal differenzierten Osteoblasten exprimiert wird. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen humanes KRM2 konnte dessen Expression in Osteoblasten an humanen Knochenbiopsien nachgewiesen werden (Abb.1.3.1 B). In Transfektionsexperimenten mit der Zelllinie MC3T3 zeigte sich, dass Krm2 in Abhängigkeit des jeweiligen Wnt-Liganden zu einer Aktivierung bzw. zu einer Inaktivierung eines Wnt-abhängigen Luciferase-Reportergens (Top-Flash) führen kann (Abb.1.3.1 C). Da aufgrund dieser Ergebnisse keine eindeutige Aussage zur Funktion von *Krm2* im Knochenumbau gemacht werden konnte, wurde ein Mausmodell (*Col1a1-Krm2*) generiert, bei dem *Krm2* unter der Kontrolle des 2,3 kb Typ-I Kollagen Promoter-Fragments in Osteoblasten überexprimiert werden sollte, um die Funktion bzw. Wirkungsweise von Krm2 hinsichtlich des Wnt-Signalwegs besser zu verstehen.



**Abbildung 1.3.1 Vorarbeiten zur Expression und Funktion von Kremen2:** A. RT-PCR-Expressionsanalyse primärer Osteoblasten und verschiedener Gewebe , 1=Osteoblasten, Tag 5 der Differenzierung, 2=Osteoblasten, Tag 25 der Differenzierung, 3=Gehirn, 4=Femur, 5=Schädeldach, 6=Fett, 7=Herz, 8=Niere, 9=Leber, 10=Lunge, 11=Milz. B. Immunhistologie humaner Knochen. Die Kontrolle wurde nur mit dem Sekundärantikörper durchgeführt, die Pfeile zeigen KRM2-positive Osteoblasten. C. Transfektionsexperimente mit der osteoblastischen Zelllinie MC3T3. MC3T3-Zellen wurden mit einem Wnt-responsiven Luziferase-Reporterplasmid transformiert. Die unterschiedlichen Proben wurden durch Transfektion mit einem Plasmid, welches für β-Galaktosidase kodiert, normiert. Es wurden verschiedene Ko-Transfektion mit unterschiedlichen Wnt-Liganden untersucht wurde. Dargestellt sind die relativen Unterschiede der Reporteraktivität (normiert auf die β-Galaktosidase-Aktivität) bezogen auf die Kontrolle. So wirkte Krm2 in Gegenwart von Wnt-2 als Agonist und in Anwesenheit von Wnt-1 bzw. Wnt-3 als Antagonist der Wnt-abhängigen Signaltransduktion.

#### 1.4 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte die Rolle des Wnt-Signalweges im Osteoblasten näher untersucht werden. Hierzu stand ein in unserer Arbeitsgruppe etabliertes Mausmodell, bei dem *Krm2* selektiv im Osteoblasten überexprimiert wurde zur Verfügung. Dieses Modell sollte auf histologischer Ebene charakterisiert werden, um so den potenziellen Knochenphänotyp näher zu beschreiben. Zusätzlich sollte versucht werden, den molekularen Mechanismus der Wirkungsweise von Krm2 im Osteoblasten näher zu untersuchen. Im Zuge der Untersuchungen des oben beschriebenen Mausmodells, bei dem es zu einer verstärkten Expression von *IL-33* kam, stellte sich die Frage, ob IL-33 zu dem beobachteten Phänotyp der *Collal-Krm2* transgenen Mäuse beitrug. Durch Charakterisierung der Wirkungsweise dieses Zytokins *in vitro* und eines Mausmodells ohne funktionellen IL-33-Rezeptor sollten neue Erkenntnisse zur Wirkung dieses Zytokins auf den Knochenumbau gewonnen werden.

Da die Inhibition des Wnt-Signalweges im Osteoblasten bei Tumorerkrankungen, welche Osteolysen hervorrufen wie z.B. dem Prostata-Karzinom, dem Multiplem Myelom und dem Mamma-Karzinom, eine entscheidende Rolle spielt, sollte unter anderem auch der Einfluss der Prostata-Karzinom-Zelllinie PC-3, welche den Krm2-Interaktionspartner DKK1 in hohen Mengen sezerniert, auf den Osteoblasten näher untersucht werden.

# 2. Material und Methoden

# 2.1 Material

# 2.1.1 Laborgeräte

#### ABI StepOnePlus

Analysenwaage BP 221S Analysenwaage BL 600 Autotechnikon BlotKammer Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell Brutschrank BBD 6220 Brutschrank Cabinet x-ray system Chemilumineszenzauswertung, Chemi Doc XRS Elektroporator Gene Pulser X cell ELISA- Reader, Versa<sub>MAX</sub> tunable microplate reader

FACSCalibur Durchflusszytometer

Gelkammern, WIDE MINI-SUB CELL GT Gelsystem, Mini Protean 3 System Geldokumentation Kamera, AxioCam Kamera, EOS 10D Magnetrührer Mikroskop Axiovert 25 Mikroskop Axioskop Mikrotom NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 PCR Cycler, Mastercycler ep pH Meter MP 220 Photometer, Ultrospec 2100 pro Applied Biosystems, Foster City, USA Sartorius, Göttingen Sartorius, Göttingen Bavimed, Birkenau BioRad, München Heraeus, Hanau *Memmert*, Schwabach Faxitron, Kreizhof BioRad, München BioRad, München MolecularDevices, Sunnyvale, USA **BD** Biosciences. Heidelberg BioRad, München BioRad, München BioRad, München Zeiss, Göttingen Canon, Krefeld Heidolph, Kelheim Zeiss, Göttingen Zeiss, Göttingen Enno Vieth, Hamburg Peqlab, Erlangen *Eppendorf*, Hamburg Mettler Toledo, Giessen GE Healthcare, München

Power-Supply, Power Pac 1000 UV Stratalinker 1800 Röntgenentwickler, OPTIMAX Rührmixer, Minishaker MS1 Schleifmaschine, Phoenix Alpha Schüttler Duomax 1030 Schüttelinkubator, GFL 3031 Sterile Arbeitsbank, Hera Safe Thermomixer comfort UV-Tisch Video Graphic Printer, UP-895 MD Wasserbad, GFL 1086 Zentrifuge, Megafuge 1.0R Zentrifuge, Biofuge pico Zentrifuge, Centrifuge 5415 D

# 2.1.2 Glas- und Plastikwaren

Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5ml und 2,5ml Falcon Reaktionsgefäße, 15ml und 50 ml Filter, Bottle Top Filter, 0,45µm Gewebekulturplatten Gewebekulturschalen Kanülen, Gr20, 100 Sterican Optische Folien, MicroAmp

Optische 96-Kammer-Platten mit Barcode, Micro Amp

Pipettenspitzen Pipettenspitzen mit Filter Serologische Pipetten Spritzen, 1ml Spritzen, 20ml BioRad, München Stratagene, La Jolla, USA Protec, Oberstenfeld IKA, Staufen Buehler, Stuttgart Heidolph, Kelheim GFL, Burgwedel Heraeus, Hanau Eppendorf, Hamburg Bio Rad, München Sony, Berlin GFL, Burgwedel Heraeus, Hanau Heraeus, Hanau

*Eppendorf*, Hamburg Greiner, Frickenhausen *Carl Roth*, Karlsruhe VWR, Darmstadt Greiner, Frickenhausen Greiner, Frickenhausen Braun, Melsungen Applied Biosystems, Foster City, USA Applied Biosystems, Foster City, USA *Eppendorf*, Hamburg Sarstedt, Nürnbrecht BD Falcon, Heidelberg Braun, Melsungen BD Falcon, Heidelberg

Zellsieb, 100µm

BD Falcon, Heidelberg

# 2.1.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Fluka (Neu Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Roche (Mannheim), Gibco (Karlsruhe) und Sigma (München) bezogen. Restriktionsendonukleasen, Taq- Polymerase sowie andere Enzyme wurden von Fermentas (St. Leon-Roth), New England Biolabs (Frankfurt am Main) und Roche (Mannheim) rekombinante Proteine von den Firmen PeproTech (Hamburg) und R&D Systems (Minneapolis, USA) bezogen.

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

Acrylamidlösung für SDS-Gele:

• Rotiphorese Gel 30 (37,5:1, *Roth*, #3029.1)

Blockierungspuffer für WB:

• 1xTBS, 0,1% Tween-20, 5% Milchpulver (Blocking grade)

Bradford- Reagenz :

• BioRad, München, 500-0006, eingesetzt 20%

Cohn-II-Stammlösung:

• 10mg/ml in PBS

Coomassie-Färbelösung:

 Färbelösung: 50% MeOH, 0,1% Coomassie und 10% Essigsäure, Entfärben: 15% MeOH, 10% Essigsäure

DEPC-H<sub>2</sub>O:

• 0,1% DEPC in Wasser gelöst, Inkubation ü. N, autoklavieren

10x DNA-Gel-Ladepuffer:

• 50% Glyzerin, 0,1% Xylencyanol, 0,1% Bromphenolblau in TE

ECL-Chemilumineszenzlösung:

20ml 0,1M Tris, pH 8,5, 6,12µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100µl 500mM Luminol (Fluka, #09253) in DMSO (88mg/ml), 100µl 80mM p-Coumarsäure (Sigma, #C-9008) in DMSO (13mg/ml)

20% EDTA (Entkalkung von Knochen):

 200g Titriplex III (Merck #108418) ad 1000ml H<sub>2</sub>O, mit konzentrierter NaOH lösen und auf pH 7,2 einstellen.

Eosin-Lösung (HE-Färbung):

• 0,25g Eosin G , 250ml destilliertes H<sub>2</sub>O, 5 Tropfen Eisessig

# FACS-Puffer:

• 3% FCS, 0,5% Natriumazid in PBS

Fludarabine-Lösung:

• 8,6 mM Fludarabine (*Sigma*, #F2773) in H<sub>2</sub>O

Gießlösung (Acrylat-Histologie):

 1000ml Methylmethacrylat (*Merck* #8.00590) entstabilisiert, 3,3 g Benzoylperoxid (*Merck* # 801641) getrocknet, 100ml LPG (Nonyl-Phenol, *Sigma Aldrich* #74430), Zugabe von N,N Dimethyl-p-Toluidin (Endkonzentration von 0,5%) vor dem Gießen.

Van Gieson-Lösung:

 900ml gesättigte Pikrinsäure (Sigma, #80456), 100ml Glyzerin, 5ml konzentrierte Salpetersäure, 2,5g Säurefuchsin (Merck, #105231)

Hybridisierungspuffer (Northern- und Southern-Blot):

 330mM Natriumphosphat pH 7 (Titration mit Natriumdihydrogenphosphat und Natriumhydrogenphosphat), 6,6% SDS, 100µg/ml Heringssperma-DNA (nur bei Southern-Blot, Roche, #1467140)

Infiltrationslösung I (Acrylat-Histologie):

• 1000ml Methylmethacrylat entstabilisiert, 3,3g Benzoylperoxid, getrocknet

Infiltrationslösung II (Acrylat-Histologie):

 1000ml Methylmethacrylat entstabilisiert, 3,3g Benzoylperoxid, getrocknet, 100ml LPG

von Kossa-Lösung:

• 3% Silbernitrat (Merck, #1.01512.0100) in H<sub>2</sub>O dest.

LB-Agar:

• Invitrogen (Karlsruhe, #22700-025), Ampicillin (100µg/ml), Kanamycin (100µg/ml)

LB-Medium:

• Invitrogen (Kalrsruhe), #12780-052, Ampicillin (100µg/ml), Kanamycin (100µg/ml)

Mausschwanz-Lysis-Puffer:

• 50mM Tris, pH 8,0, 100mM EDTA, pH 8,0, 100mM NaCl, 1% SDS

MOPS (10x):

 0,4M MOPS, pH7, 0,5M NaAc, 10mM EDTA in DEPC- H<sub>2</sub>O, (Nicht autoklavieren, da MOPS beim Erhitzen zerfällt, die Lösung wird bei Gelbfärbung verworfen)

Natriumthiosulfatlösung:

• 5% Natriumthiosulfat in H<sub>2</sub>O dest.

NET-Puffer zum Blockieren:

 50mM Tris/HCl, pH 7,4, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0,05% TRITON X-100, 0,25% Gelatine (zum Lösen 40°C), statt BSA kann auch 0,5% Ovalbumin verwendet werden

PD98059-Lösung:

• PD98059 (Cell Signaling, #9900), 50mM in DMSO

Piceatannol-Lösung:

• Piceatannol (*Sigma*,#P0453) 10mg/ml in DMSO

Proteinase K-Lösung:

• 10mg/ml in H<sub>2</sub>O dest., Lagerung bei -20°C

# **RIPA-Lysepuffer:**

1% NP40, 1% Nadeoxycholat, 0,1% SDS, 150mM NaCl, 2mM EDTAm, 0,01M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Lagerung bei 4°C, Zugabe von Proteaseinhibitoren (Roche, #04693132001) und Phosphataseinhibitoren (Roche, #04906837001) kurz vor Gebrauch des Puffers

Salzsäure-Ethanol (HE-Färbung):

• 5ml 25% HCl, 95ml 96% EtOH

SDS-Ladepuffer (6x):

7ml 4x Tris\*Cl/SDS, pH 6.8, 3,0ml Glyzerin, 1g SDS, 0,93g DTT, 1,2mg
Bromphenol Blau, add H<sub>2</sub>O 10ml (falls nötig), Aliquots bei -80°C aufbewahren

SDS-Laufpuffer (5x):

\* 15.1g Tris Base, 72.0g Glycin, 5.0g SDS, add  $H_2O$  1000ml

SDS-Sammelgelpuffer, pH 6,8 (4x):

 6,05g Tris Base in 40mL H<sub>2</sub>O lösen, pH6.8 mit 1M HCl einstellen, add H<sub>2</sub>O 100 ml, die Lösung durch einen 0,45μm Filter sterilfiltrieren und 0,4g SDS dazugeben, Lagerung bei 4°C

SDS-Trenngelpuffer, pH 8,8 (4x):

 91g Tris Base in 300ml H<sub>2</sub>O lösen, pH8.8 mit 1M HCl einstellen, add H<sub>2</sub>O 500ml, die Lösung durch einen 0,45µm Filter sterilfiltrieren und 2g SDS dazugeben, Lagerung bei 4°C

Soda-Formollösung:

• 12,5g Natriumcarbonat, 187ml H<sub>2</sub>O, 62,5ml 37% Formalinlösung

STE-Puffer:

• 10mM Tris, pH7,4, 10mM NaCl, 1mM EDTA

Stripping-Puffer für Westernblot:

• 62,5mM TrisHCl, pH6,7, 2%SDS, 100mM beta-Mercaptoethanol

# SSC-Puffer (20x):

• 3M NaCl, 0,3M Natriumcitrat, pH7 mit HCl

# 50x TAE-Puffer:

• 2M Tris-Azetat, 50mM EDTA, pH7,8 mit Essigsäureeinstellen

# TBS (10x):

• 24,2g Tris Base, 80g NaCl, mit HCl auf pH7,6 einstellen, add 1000ml H<sub>2</sub>O

# Temed für SDS-Gele:

• *Sigma* (#T-9281)

# Toluidinlösung:

• 1% Toluidinblau O in H<sub>2</sub>O dest., pH4,5

Transferpuffer für Nitrocellulose und PVDF Membranen (20x):

 200mM Tris, 2M Glycin, pH nicht einstellen, Zum Gebrauch: 1:20 mit H<sub>2</sub>O und 10% MeOH verdünnen

**TRAP-Puffer:** 

• 40mM Azetat, 10mM Natriumtartrat, pH5,0, bei 4°C aufbewahren

TRAP-Substratlösung:

 5mg Naphtol ASMX Phosphat in 500µl N,N- Dimethylformamid lösen und mit 50ml TRAP-Puffer mischen, 30mg Fast Red Violet LB Salz darin lösen und sofort für die Färbung verwenden

# Trypsin-ETDA-Lösung:

• *Cascade Biologics (Invitrogen*, Karlsruhe, #R-001-100)

# Van Gieson-Lösung:

 2,5 g Säurefuchsin (Merck, #105231), 900ml gesättige Pikrinsäure (Sigma, #80456), 100ml Glyzerin, 5ml konz. Salpetersäure

Waschpuffer für Westernblot:

• 1x TBS, 0,1% Tween- 20

# 2.1.5 Bakterien

Zur Amplifikation von DNA in Bakterien wurden chemi- und elektrokompetente TOP10 Zellen der Firma *Invitrogen* (Karlsruhe) verwendet (#C404006, #C66455)

# 2.1.6 Sonstige Reagenzien

Amersham Cell Proliferation Elisa Biotrack System Antarctic Phosphatase **BRFF-HPC1** Medium Collagenase from Clostridium hystoliticum Type 1A Chemilumineszenz Film, Amersham Hyperfilm ECL Desoxyribonukleosidtriphosphate Dispase DreamTaq DNA Polymerase **DNA-Gelextraktionskit**, **QIAEXII** DNA-Marker, 1kbPlus DNA-Ladepuffer Fötales Rinder Serum Fötales Rinder Serum Klenow Fragment Minimum Essential Medium Eagle, Alpha mod. Miniprep Kit, QIAprep Spin Plasmid Maxi Kit. EndoFree Primer

Quantikine Mouse Opg/Tnfrsf11b Immunoassay

GE Healthcare, München *NEB*, Bad Schwalbach *Biomol*, Hamburg Sigma, München GE Healthcare, München Fermentas, St. Leon-Roth Roche, Mannheim Fermentas, St. Leon-Roth *Qiagen*, Hilden Fermentas, St. Leon-Roth Fermentas, St. Leon-Roth *HyClone*, Waltham, USA *Bio Whittaker*, Basel *Neb*, Bad Schwalbach Sigma, München Qiagen, Hilden Qiagen, Hilden MWG Biotech AG, Ebersberg *R&D Systems*, Minneapolis, USA

RNA-Ladepuffer (2x) RNase-Free DNase Set RNeasy Mini Kit RNase Zap Röntgenfilme, Kodak X-OMAT AR Film RPMI 1640 Medium SuperScript III First-Strand Synthesis System TaqMan assays

TaqMan Gene Expression Mastermix

Trizol Reagenz Quick Ligase Kit X-Gal

# 2.1.7 Antikörper

β-Actin (#A5441) β-Catenin (#9582)

CCR3/CD193 (#FAB729P)

CD11b (#RM28043)

CD23 (#553138)

CD206 (#123010)

Phospho-beta-Catenin (#9561)

Phospho-Erk (#9101)

Phospho-LRP6 (#2568)

Fermentas, St. Leon-Roth Qiagen, Hilden Qiagen, Hilden Ambion, Austin, USA Kodak, Rochester, USA Invitrogen, Karlsruhe Invitrogen, Karlsruhe Applied Biosystems, Foster City, USA Applied Biosystems, Foster City, USA Invitrogen, Karlsruhe Neb, Bad Schwalbach Fermentas, St. Leon Roth

Sigma, Karslruhe Cell Signaling, Bad Schwalbach *R&DSystems* (Minneapolis, USA) CaltagLaboratories, (Burlingame, USA) BD Pharmingen, Heidelberg BioLegend, San Diego, USA Cell Signaling, Bad Schwalbach Cell Signaling, Bad Schwalbach Cell Signaling, Bad Schwalbach

Phospho-p65 (#3034)	Cell Signaling, Bad
	Schwalbach
Phospho-Stat1 (#9171)	Cell Signaling, Bad
	Schwalbach
Phospho-Stat3 (#9134)	Cell Signaling, Bad
	Schwalbach
Phospho-Stat3 (#9415)	Cell Signaling, Bad
	Schwalbach
Phospho-Stat5 (#9351)	Cell Signaling, Bad
	Schwalbach
Stat1 (#9172)	Cell Signaling, Bad
	Schwalbach
Stat3 (#9132)	Cell Signaling, Bad
	Schwalbach
Stat5 (#9363)	Cell Signaling, Bad
	Schwalbach
ST2 (#101001F)	MD Biosciences, Egg b.
	Zürich
Isotypkontrollen:	
Rat IgG2b PE	BD Pharmingen,
	Heidelberg
Rat IgG2a Fitc	BD Pharmingen,
	Heidelberg
Rat IgG2b PerCP	BD Pharmingen,
	Heidelberg
Rat IgG2a Alexa647	BD Pharmingen,
	Heidelberg
Ly-6G (#551461)	BD Biosciences,
	Heidelberg

# 2.1.8 Primer

Arg1RTfor:	5'-aaaggccgattcacctgagct-3'	Arg1RTrev:	5'-gttgagttccgaagcaagcca-3'
Beta2for1:	5'-tgctatccagaaaacccctcaa-3'	Beta2rev1:	5'-tgcttaactctgcaggcgtatg-3'
BglapRTfor:	5'-tcatgtccaagcaggagggcaata	-3'BglaRTrev:	5'-tgatagctcgtcacaagcagggtt-3'
Col1a1RTfor:	5'- ccggtgaacgtggtgctccc-3'	Col1a1RTrev:	5'-caggaccaacagcgccaggg-3'
Ccl24RTfor:	5'-cgagtggttagctaccagttgg-3'	Ccl24RTrev:	5'-gcgtctctggacagcaaactt-3'
Chi3l4RTfor:	5'-agatetttgatgccacccagg-3'	Chi3l4RTrev:	5'-gccttgcaacttgcactgtgta-3'
Ear11RTfor:	5'-tccggccagtcattattcca-3'	Ear11RTrev:	5'-agaggactcggttcttcccaac-3'
Globin-Int:	5'-actacatcctggtcatcatcctgc-3	,	
humGH, rev:	5'-ggacaaggctggtgggcac-3'		
IbspRTfor:	5'-tctgaaacggtttccagtcca-3'	IbspRTrev:	5'-tctgcatctccagccttcttg-3'
Il1rl1RTfor:	5'-tgttatcagaagccccaacttg-3'	Il1rl1RTrev:	5'-cttggctcttggagagctttg-3'
Krm-2-6, rev:	5'-tgaatcctctggagatgctctgc-3'		
Nfatc1RTfor:	5'-tgcagctacacggttacttgga-3'	Nfatc1RTrev:	5'-cgatgatggctcgcatgtta-3'
OscarRTfor:	5'-gaactgctggtaacggatcagc-3	OscarRTrev:	5'-tgtgtgccgatcaaaaggaag-3'
ST2Geno1:	5'-ttggcttcttttaataggccc-3'	ST2Geno2:	5'-ctatcaggacatagcgttggctacc-3
ST2Geno3:	5'-tgttgaagccaagagcttacc-3'		

# 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

# 2.2.1.1 Restriktionsverdau von DNA

Die gewünschte DNA-Menge (2µg-10µg) wurde bei der vom Hersteller angegeben Temperatur verdaut. Hierzu wurden jeweils 10U des entsprechenden Enzyms verwendet. Ansätze mit *FastDigest* Enzymen der Firma *Fermentas* mussten aufgrund des einheitlichen Puffers bei Mehrfachverdaus nicht umgepuffert werden. Die Hitzeinaktivierung geschah bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur. Der Verdau wurde anschließend durch eine gelelektrophoretische Auftrennung mit anschließender Gelextraktion aufgereinigt.

## 2.2.1.2 Modifikation von DNA-Enden

Nach der Hitzeinaktivierung des jeweiligen Enzyms, wurden DNA-Überhänge mit Hilfe des Klenow-Fragmentes (große Untereinheit der Polymerase I aus *E.coli*) zu glatten Enden

aufgefüllt. Hierzu wurden der Reaktion 0,25 mM dNTPs und das entsprechende Volumen Puffer 2 (*Neb*, Bad Schwalbach) sowie 5U Klenow hinzu gegeben und mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Reaktion wurde auf Eis für 20 Minuten inkubiert und anschließend bei 85°C hitzeinaktiviert. Zur Dephosphorylierung von DNA-Enden wurden pro Reaktion 5U *Anarctic Phosphatase* von *NEB* verwendet. Hierzu wurde zum Restriktionsverdau nach Hitzeinaktivierung das entsprechende Volumen Puffer hinzugegeben und mit Wasser aufgefüllt. Die Reaktion wurde bei 37°C 20 Minuten inkubiert und anschließend bei 65°C für 5 Minuten hitzeinaktiviert. Die Reaktionen konnten dann über eine gelelektrophoretische Auftrennung oder eine Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt werden.

#### 2.2.1.3 Ligation von DNA-Enden

Für die Ligation von DNA-Fragmenten in pTOPO II wurden DNA-Fragmente mit 3'- A-Überhangen (enstanden durch Amplifikation mit *Taq*-Polymerase bzw. einem 1:1 Gemisch aus *Taq*-Polymerase und *Pwo*-DNA-Polymerase) in den Vektor pTOPO II nach Angaben des Herstellers ligiert.

Bei Ligationen von DNA-Fragmenten in Vektoren wurde das *Quick Ligation Kit* von *Neb* laut Herstellerangaben verwendet. Hierzu wurde der durch gelelektrophoretische Auftrennung aufgereinigte, dephosphorylierte Vektor mit dem Insert in einem molaren Vektor-Insert-Verhältnis von 1:2-1:4 in einem Volumen von 20µl für 5-30 Minuten inkubiert.

#### 2.2.1.4 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Auftrennung von DNA wurden die Proben mit Probenpuffer (6x konzentriert) versetzt und in Abhängigkeit der aufzutrennenden DNA-Fragmente auf ein 0,8-2% Gel mit einer Ethidiumbromidkonzentration von 0,05µg/ml aufgetragen. Die Auftrennung geschah in einem submarinen System der Firma *Bio-Rad* bei 60-120V in TAE-Puffer. Als Größenstandard diente der DNA-Marker 1kb Plus der Firma *Fermentas*.

Die Auftrennung der RNA geschah unter denaturierenden Bedingungen um eine größenabhängige Auftrennung der RNA (ohne Ausbildung von Sekundärstrukturen) zu garantieren. Hierzu wurden 1% Agarosegele mit DEPC behandeltem Wasser und 1x MOPS-Anteil sowie einem Formaldehydgehalt von ca. 4,5% verwendet. Der RNA-Ladepuffer wurde von der Firma *Fermentas* bezogen. Als Laufpuffer diente einfach konzentrieter MOPS-Puffer. Die Auftrennung lief bei 60V über 2 Stunden.

#### 2.2.1.5 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolation von DNA aus Agarosegelen wurde das Gelextraktionskit *QIAEXII* der Firma *Qiagen*, nach Herstellerangaben verwendet. Hierbei wird die Agarose bei 50°C in einem Puffer geschmolzen und die DNA an Silica-Partikel gebunden, wodurch eine anschließende Aufreinigung durch mehrere alkoholische Waschschritte möglich wird. Nach dem Trocknen der Silica-Partikel mit Hilfe einer Vakuumpumpe konnte die DNA eluiert werden.

#### 2.2.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA wurden die wässrigen Lösungen photometrisch an einem *NanoDrop Spectrophotometer ND-1000* vermessen. Hier entspricht 1 OD bei einer Wellenlänge von 260nm 50µg/ml ds DNA und 40µg/ml RNA. Der Koeffizient aus den Wellenlängen 260nm/280nm sollte dabei für DNA einen Wert von 1,8 und für RNA einen Wert von 2,0-2,2 annehmen. Dieser Wert stellt einen guten Indikator für eine Kontamination mit Proteinen dar, welche durch ihre aromatischen Reste ihr Absorptionsmaximum bei 280nm aufweisen.

#### 2.2.1.7 Transformation von kompetenten Bakterien

Zum Einbringen von DNA in Bakterien wurde chemisch kompetente *TOP10* Zellen der Firma *Invitrogen* verwendet und nach der Hitzeschock- Methode behandelt. Dazu wurden die bei - 80°C gelagerten Zellen vorsichtig aufgetaut und ca. 50ng zirkuläre DNA (in einem Volumen von nicht mehr als 1/25 des Gesamtvolumens) hinzugegeben. Gefolgt von einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurde ein Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden durchgeführt. Nach einer dreiminütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen in SOC-Medium resuspendiert, bei 220rpm für eine Stunde inkubiert und anschließend auf Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum (Ampicillin: 100µg/ml oder Kanamycin: 100µg/ml) ausplattiert. Wurde ein Ligationsansatz mit dem Vektor pTOPOII transformiert, wurden die Platten kurz vor dem Ausplattieren der Zellen mit 50µl X-Gal-Lösung (40mg/ml in DMF) versetzt. Diese Blau-Weiss-Selektion erlaubte die Identifizierung von Klonen, die das Insert aufwiesen.

Wurde eine höhere Transformationseffizienz gewünscht, wurden elektrokompetente *TOP10* Zellen der Firma *Invitrogen* verwendet. Hier wurden die Zellen nach Herstellerangaben mit einem *Gene Pulser Xcell* der Firma *Bio-Rad* elektroporiert.

# 2.2.1.8 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien im Miniprep- und Maxiprepformat

Für die Präparation von Plasmid-DNA im Miniprep Format wurde das *Qiaprep Spin Miniprep Kit* der Firma Qiagen verwendet. Dazu wurde ein Bakterienklon mit einer Pipettenspitze "gepickt" und in 4ml LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum gegeben. Nach mindestens acht Stunden Inkubation wurden die Zellen bei 10000g zentrifugiert und nach Herstellerangaben aufgearbeitet.

Für eine DNA-Präparation im Maxiprepformat wurde das *EndoFree Maxiprep Kit* der Firma *Qiagen* verwendet. Hierfür wurde eine Vorkultur angelegt, die zum Animpfen von 100ml LB-Medium verwendet wurde. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 3000g und 4°C wurde das resultierende Pellet nach Herstellerangaben aufgearbeitet.

## 2.2.1.9 Isolierung von genomischer DNA aus Mäuseschwänzen

Bis zu 0,5 cm lange Schwanzstücke wurden ü. N. in 700µl Lysepuffer supplementiert mit 0,7mg/ml Proteinase K (Stammlösung 10mg/ml) bei 55°C inkubiert. Anschließend folgte eine Phenol-Chloroform Extraktion, bei der 750µl *Rotiphenol (Roth*, Karlsruhe) hinzugegeben wurden. Der Ansatz wurde nach kräftigem Schütteln drei Minuten bei 10000g zentrifugiert und 600µl der oberen Phase wurden in ein neues Eppendorfhütchen überführt. Nach erneutem Ausschütteln mit 600µl *Rotiphenol* mit anschließender Zentrifugation (s.o) wurden 500µl der wässrigen Phase in ein Eppendorfhütchen überführt und die DNA mit Isopropanol gefällt. Hierzu wurden 0,7-0,8 Volumenanteil Isopropanol hinzugegeben und bei 10000g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend vorsichtig abgenommen und das DNA-Pellet mit 70% EtOH gewaschen. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das getrocknete Pellet nun in 50µl H<sub>2</sub>O gelöst.

#### 2.2.1.10 RNA-Isolation aus Geweben und Zellen

Für die Isolation von RNA aus Geweben, wurden diese frisch entnommen und entweder sofort verarbeitet oder in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Gewebe wurden unter Zugabe von 2ml *Trizol* Reagenz (*Invitrogen*) in einem *Ultra-Turaxx* (*IKA*) zerkleinert. Knochen (Schädeldach und Femur) wurden zuvor mit einem Mörser in flüssigem N<sub>2</sub> zerkleinert, bevor sie im *Ultra-Turaxx* mit *Trizol* aufgeschlossen wurden. Das weitere Vorgehen geschah nach Angaben des Herstellers. Hierzu wurden 200µl Chloroform/ml Trizol hinzugegeben und geschüttelt. Nach Inkubation bei RT für 3 Minuten wurden die Proben bei 10000g bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde ohne Störung der Interphase abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend wurden 0,7 Volumenanteil Isopropanol hinzugegeben, die Ansätze für 5 Minuten inkubiert und anschließend bei 10000g bei 4°C 10 Minuten zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde dann mit 70% EtOH (angesetzt mit DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O) gewaschen und anschließend in DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Falls eine weitere Aufreinigung der RNA notwendig war, wurde diese mit dem *RNeasy* Kit der Firma *Qiagen* durchgeführt. Optional wurde mit diesem Kit auch ein DNase Verdau durchgeführt, um Rückstände genomischer DNA zu beseitigen. Dies verhinderte mögliche Fehler bei der Quantifizierung der Genexpression bei Genen ohne Introns bzw. bei Assays und Primern, welche nicht zwischen genomischer DNA und cDNA

Zur Isolation von RNA aus Zellen wurde nur das *RNeasy* Kit der Firma *Qiagen* verwendet. Dies geschah nach Angaben des Herstellers.

#### 2.2.1.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation von DNA in vitro. Dabei wird eine Matrize (DNA) durch eine thermostabile DNA-Polymerase (z.B. *Taq*-Polymerase) vervielfältigt. Dies geschieht durch Anlagerung von sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primer) welche durch ihr freies 3'-OH-Ende den Startpunkt für die Synthese des komplementären Stranges liefern. Dabei besteht jeder Vervielfältigungsschritt (Zyklus) aus drei Phasen, der Denaturierung bei 94°C (hier werden die DNA-Stränge voneinander getrennt), der Anlagerung der Primer (Annealing) bei einer spezifischen Temperatur (vorgegeben durch den T<sub>M</sub> der Primer) und der Strangverlängerung bei 72°C (Elongation). In der Regel wurden die PCR-Reaktionen nach 35 Zyklen beendet. Für Standard-Anwendungen wurde die *DreamTaq*-Polymerase von *Fermentas* verwendet. Zur Reduktion der Anzahl von falsch eingebauten Basen wurde ein Gemisch aus gleichen Teilen *Pwo*-Polymerase (*Roche*) und *Taq*-Polymerase benutzt. Die Reaktionen wurden dabei auf einem *Mastercycler ep*. (Firma: Eppendorf) durchgeführt. Ein Standardansatz (20µl) setze sich wie folgt zusammen:

- xµl DNA
- $2\mu l$  Puffer (10x)
- 3µl Primer A (Stammlösung 2µM)
- 3µl Primer B (Stammlösung 2µM)
- 0,5µl dNTPs (10mM)
- 0,5µl Taq
- add  $20\mu l H_2O$

Bei der Verwendung des *Pwo/Taq*-Gemisches wurde das Reaktion entsprechend auf 50µl erhöht. Im Falle des Auftretens von unspezifischen Amplifikaten wurden dem Reaktionsansatz 10% DMSO hizugefügt, was die Ausbildung von unspezifischen Produkten verringerte.

Das Standardprogramm lief wie folgt ab:

- Initiale Denaturierung bei 94°C für 2 Minuten
- 35 Zyklen: Denaturierung bei 94°C für 30 Sekunden, Anlagerung bei 58°C für 45 Sekunden, Elongation bei 72°C für 1min/kb
- Endlos-Schleife bei 4°C zur Aufbewahrung

Dieses Programm wurde hinsichtlich der optimalen Anlagerungstemperatur, Dauer der Elongation und Zyklenzahl variiert.

# 2.2.1.12 RT-PCR und qRT-PCR

Zur Quantifizierung der Genexpression wurde unter anderem semiquantitative RT-PCR (RT-PCR) verwendet. Hierzu wurden 50ng-1µg RNA, welche aus Zellen oder Geweben isoliert wurde, mit Hilfe des *Superscript III*-Kits (*Invitrogen*) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Für RT-PCR Reaktionen wurden dann Standard-PCR-Ansätze mit den jeweiligen genspezifischen Primern zusammengestellt. Zusätzlich wurden als Kontrolle Reaktionen mit Primern für das Haushaltsgen  $\beta$ -2-Mikroglobulin bzw. Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase durchgeführt. Durch Variation der Zyklenzahl wurden die Reaktionen in der logarithmischen Phase der Amplifikation beendet, was dann eine Abschätzung der Expression des jeweiligen Gens in verschiedenen Proben möglich machte. Zur Quantifizierung der Genexpression wurde zudem eine quantitative RT-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Durch diese Methode wird im Gegensatz zur RT-PCR eine genaue
Quantifizierung möglich, da hier die Reaktion (Amplifikation der jeweiligen Sequenz) in Echtzeit anhand des Anstieges der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zyklenzahl sichtbar wird, weshalb diese Methode auch als *Realtime*-PCR bezeichnet wird. Hierzu wurde der ABI StepOnePlus der Firma Appliedbiosystem verwendet. Zudem wurden voretablierte Assays (*Taqman*-Assays) der Firma *Applied-Biosystems* verwendet. Bei diesen Assays wird von dem Hersteller eine über 90% Effizienz der Reaktion garantiert, was entscheidend ist, um den Fehler bei der relativen Quantifizierung, die eine Verdopplung des Produkts bei jedem Zyklus in der logarithmischen Phase annimmt, zu minimieren.

Für die Auswertung wurde die sogenannte  $\Delta\Delta C_T$ -Methode verwendet, welche eine relative quantitative Aussage über den mRNA Gehalt in verschiedenen Proben bezüglich des Zielgens möglich macht. Hierbei werden die Differenzen der C<sub>T</sub>-Werte des jeweiligen Haushaltsgens verschiedener Proben mit den Differenzen der C<sub>T</sub>-Werte des jeweiligen Zielgens dieser Proben miteinander verrechnet. Dabei wird die Formel: 2<sup>- $\Delta\Delta C$ </sup>T=U verwendet. Wobei U den relativen Unterschied der verglichenen Proben darstellt.

Die Reaktionsansätze setzen sich wie folgt zusammen:

- 2µl cDNA (1:10 Verdünnung)
- 1µl Taqman-Mix (20x konzentriert)
- 10µl TaqMan Gene Expression Mastermix (2x konzentriert)
- 7µl H<sub>2</sub>O

Aufgrund der voretablierten Assays war eine Variierung der Primer-Konzentrationen, der Sonden-Konzentration, des Salzgehaltes und des Temperatur-Profils nicht notwendig. Die Reaktionen liefen bei einem standartisierten Temperatur-Profil:

- Aktivierung der Hot-Start Polymerase, 95°C, 10 Minuten
- 40 Zyklen: Denaturierung bei 95°C für 15 Sekunden und Anlagerung/Elongation bei 60°C für 60 Sekunden

#### 2.2.1.13 Northernblot- und Southernblot-Analyse

Die sogenannte Northern Blot Analyse dient der Quantifizierung der Genexpression. Hierzu wurden 10µg RNA der jeweiligen Probe mit RNA-Probenpuffer (*Fermentas*) 10 Minuten bei 65°C erhitzt und anschließend auf ein denaturierendes Agarose-Gel aufgetragen (siehe 2.2.1.4). Alle Apparaturen wurden zuvor mit *RNaseZap* (*Ambion*) behandelt und mit DEPC-

behandeltem H<sub>2</sub>O gespült, um RNasen zu entfernen. Nach der Auftrennung der RNA und dem Fotografieren des Gels, wurde dieses mehrere Stunden mit DEPC- H<sub>2</sub>O gewaschen um das Formaldehyd herauszulösen, welches den Transfer der RNA auf die Membran (Hybond-XL Membran, Amersham-Biosciences) verhindern würde. Das Gel wurde anschließend in 10xSSC äquilibriert. In ein Gefäß mit 10xSSC wurde nun ein Gelträger gestellt. Auf diesen wurde ein Streifen Whatman Papier gelegt, der in das SSC-Reservoir eintauchte. Darauf wurden zwei mit 10xSSC getränkte Whatman-Papierlagen in Größe des Agarosegeles gelegt. Darauf wurde das Gel platziert, auf welches eine gleich große in 10xSSC äquilibriete Membran aufgebracht wurde. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen Gel und Membran befanden. Auf die Membran wurden nun mehrere Lagen trockene Whatman-Papiere und Handtuch-Papiere aufgebracht. Durch den Kapillarsog wurde die RNA so ü. N. auf die Membran transferiert (Kapillarblot). Anschließend wurde die RNA durch Crosslinken in einem UV-Stratalinker (Stratagene) im Modus AutoCrosslink mit der Membran kovalent verbunden. Die Membran konnte nun in 15ml Hybridisierungspuffer bei 60°C in einem Hybridisierungsofen inkubiert werden.

Zur Generierung der jeweiligen Sonde wurden Gen-spezifische Primer zur Amplifikation benutzt und das jeweilige Amplikon in pTOPOII ligiert. Der Sequenzabschnitt wurde durch Sequenzierung mit M13-Primern verifiziert und konnte anschließend mit einem *EcoRI* Verdau mit anschließender Gelextraktion isoliert werden. Zur radioaktiven Markierung der Sonde wurde das Random Primed DNA Labeling Kit (Roche, #1004760) verwendet. Ein Ansatz setze sich wie folgt zusammen:

- 25-100ng DNA, Gesamtvolumen 9µl mit H<sub>2</sub>O wurden 5 Minuten bei 95°C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt.
- 2µl Random Primed Puffer (10x)
- 3µl ATG-Nukleotid-Mix
- $5\mu l^{32}P-\alpha-dCTP$  (50 $\mu$ Ci, 3000Ci/Mmol)
- 1µl Klenow

Dieser Ansatz wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Aufreinigung (Entfernung nicht eingebauter dNTPs) wurden *Quick Spin Columns Sephadex G50* (Roche, #3117928001) verwendet. Diese wurden initial für zwei Minuten bei 3000g zentrifugiert und anschließend mit 150µl STE-Puffer äquilibriert und erneut zentrifugiert (s.o.). Der Reaktionsansatz wurde dann mit 80µl STE Puffer versetzt und auf die äquilibrierte Säule gegeben und zwei Minuten bei 3000g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde anschließend 5 Minuten bei 95°C erhitzt und auf Eis gestellt. Danach wurde dieser in den Hybridisierungspuffer gegeben. Die

Hybridisierung geschah ü.N bei 60°C. Alle nachfolgenden Waschschritte liefen bei 60°C. Die Membran wurde kurz mit 2x SSC, 0,1% SDS gewaschen, darauf folgten zwei Waschritte mit 0,5x SSC, 0,1% SDS bei 60°C. Anschließend wurde die Membran mit einem Geigerzähler vermessen (Dieser sollte nun nicht mehr als 100 Ionisationen pro Sekunde (cps) anzeigen, da sonst der Hintergrund zu groß werden würde). Die Membran wurde dann zwischen zwei Frischhaltefolien platziert und ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Exposition geschah bei -80°C für 1-14 Tage.

Die sogenannte Southernblot-Analyse wurde zur Bestimmung des Genotyps für Tiere der Maus-Linie *Col1a1-Krm2* verwendet (siehe Genotypisierung). Hierzu wurden bis zu 10µg genomische DNA über Nacht verdaut. Dem Restriktionsansatz wurde zusätzlich 1µl RNase (10mg/ml) hinzugefügt. Nach der Auftrennung über mehrere Stunden bei 60V in einem 0,8% Agarose-Gel wurde dieses für 15 Minuten in 0,25M HCl inkubiert. Nach mehrfachem Waschen mit Wasser wurde das Gel in 0,4M NaOH für weitere 15 Minuten äquilibriert. 0,4M NaOH wurde auch für den Transfer benutzt (Kapillarblot-Aufbau siehe oben). Nach dem Transfer wurde die DNA mit der Membran durch UV-Behandlung kovalent verknüpft (s.o.) und anschließend mit 2x SSC äquilibriert. Zum weitern Ablauf s.o. (Hybridisierung geschah in Hybridisierungspuffer bei 65°C mit Heringssperma (1x)). Alle Waschschritte geschahen bei 65°C und der Waschpuffer bestand aus 0,2xSSC, 0,1% SDS (höhere Stringenz als bei Northern-Blot).

# 2.2.1.14 Affymetrix-Genchip-Analyse

Für die Affymetrix-Genchip-Analysen wurden alle Proben mit dem *RNeasy* Kit (*Qiagen*) aufgereinigt. 5µg RNA wurden für jede Analyse benutzt. Die Generierung der cRNA, sowie die Hybridisierung und das Scannen der Genchips und die Auswertung wurden in der Klinischen Chemie, von Dr. Thomas Streichert und Kristin Klätschke durchgeführt.

# 2.2.1.15 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Molekülen erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger. Hierzu wurden 500ng Plasmid-DNA und eine Primerkonzentration von 10pM eingesetzt. Das Standardprogramm lief wie folgt: 35 Zyklen:

- 96 °C 10 sek
- 50 °C 5 sek
- 60 °C 4 min

Die Reaktion wurde anschließend mit 2,5 Volumenanteile 100% EtOH gefällt und 30 Minuten bei 10000g zentrifugiert. Die Analyse fand in der Sequenzierservice-Abteilung des UKE statt.

## 2.2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Generierung primärer Osteoblasten

Für die Generierung von primären Osteoblasten wurden Schädeldächer neugeborener Mäuse im Alter von 3-5 Tagen verwendet. Hierzu wurde das Schädeldach auf Höhe des Hinterhauptloches seitlich mit einer Schere vom Rest des Körpers getrennt. Das Chondrocranium und andere Bestandteile wurden mit Hilfe eines Skalpells abgetrennt bzw. abgekratzt. Die Schädeldächer wurden bis zum Ende der Präparation in sterilem PBS bei RT aufbewahrt. Anschließend wurden sie in vorgewärmte Verdaulösung (Serum-freies α-MEM mit 0,1% Collagenase und 0,2% Dispase, pro Schädeldach wurden 2ml Verdaulösung eingesetzt) überführt und 20 Minuten bei 220rpm bei 37°C geschüttelt. Der Überstand wurde verworfen und die Schädeldächer weitere 30 Minuten mit frischer Verdaulösung inkubiert. Dieser Überstand wurde durch ein Zellsieb filtriert, bei 300g für drei Minuten bei RT zentrifugiert und das Pellet in serumhaltigen  $\alpha$ -Mem aufgenommen. Die Zellen wurden dann in einer Dichte von 25\*10<sup>4</sup>/ml ausplattiert und in serumhaltigem (10% Serum hitzeinaktiviert, Hyclone) α-Mem mit 1% Penicillin/Streptomycin bis zu 25 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Beim Erreichen der Konfluenz wurden dem Medium am Tag 0 der Differenzierung 200mM β-Glycerophosphat und 8mM Ascorbat hinzugefügt, um die primären Osteoblasten zu differenzieren.

## 2.2.2.2 Generierung von Osteoklasten aus Knochenmarkzellen

Zur Generierung von Osteoklasten wurde das Knochenmark von mindestens 6 Wochen alten Mäusen aus dem Oberschenkelknochen verwendet. Hierzu wurde der freipräparierte

Unterschenkelknochen kurz in 80% EtOH getaucht in sterilem PBS gewaschen und anschließend wurden die beiden Enden mit einer Schere abgeschnitten. Dann wurde mit einer Kanüle der Größe 20 das Knochenmark, durch Eindringen in den Markraum, durch ein Zellsieb in ein 50ml Falcon gespült. Nach Zentrifugation bei 300g für drei Minuten bei RT wurden die Zellen in 10% serumhaltigem (nicht hitzeinaktiviert, BioWhittaker) α-Mem, pH 6.9 (mit 1% Penicillin/Streptomycin) in einer Dichte von  $5*10^6$ /ml ausplattiert. Zudem wurde das Medium mit 10nM 1,25-Dihydroxy-VitD (Stammlösung 10µM, in EtOH, bei -20°C, in Glas, lichtgeschützt gelagert). Nach einem Tag in Kultur wurden die nicht-adhärenten Zellen abgesaugt und die adhärenten Zellen als Osteoklasten-Vorläufer benutzt. Am Tag 3 nach dem Ausplattieren wurde das Medium mit 20ng/ml M-CSF und 40ng/ml RANKL supplimentiert. Für die Resorptions-Assays wurden 1mm dicke Elfenbeinplättchen 30 Minuten in 80% EtOH gelegt und getrocknet. Anschließend wurden die Zellen auf diese ausplattiert. Die Kulturen wurden dann bis Tag 10 und Tag 20 fortgeführt. Die Zellen wurden mit Zellschabern und Natriumhypochloridlösung entfernt und die Resorption auf den Plättchen mit Toluidinblau-Färbung sichtbar gemacht (mehrfaches Tauchen der Plättchen in 0,2% Toluidinblau-Lösung, danach mehrfaches Waschen mit H<sub>2</sub>O). Die Plättchen wurden dann fotografiert und mit ImageJ ausgewertet.

Zum Nachweis der TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase)-Aktivität wurden die Kulturen bis Tag 6 kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit kaltem MeOH für 5 Minuten fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurde TRAP-Substratlösung auf die Zellen gegeben und 30 Minuten bei RT inkubiert. Die Kulturen wurden dann wieder mit destilliertem Wasser gewaschen und im Kühlschrank gelagert. Die Auswertung geschah durch Auszählen der multinukleären TRAP-positiven Zellen.

# 2.2.2.3 Kultivierung von Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden unter Standard-Bedingungen (37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 95% H<sub>2</sub>O Sättigung) kultiviert.

MDA-PCa-2b und PC-3 Zellen wurden von der American Type Culture Collection bezogen (ATCC). MDA-PCa-2b Zellen wurden in *BRFF-HPC1* Medium mit 20% Serum und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. PC-3 Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% Serum und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Zellen wurden alle 3-5 Tage im Verhältnis 1:2-1:5 passagiert.

293 T Zellen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Boris Fehse bezogen, sie wurden in *DMEM with glutamine and high glucose-* Medium mit 10% Serum und 1% Penicillin%Streptomycin kultiviert und alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:10 passagiert.

### 2.2.2.4 SDS-Gelelektrophorese und Westernblot

Nach der Stimulation wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und mit RIPA-Puffer und einem Zellschaber abgekratzt. Nach einer Inkubation von 20 Minuten auf Eis wurden die Proben 10 Minuten bei 10000g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde Bradford-Reagenz der Firma Biorad verwendet. Gleiche Mengen Protein wurden mit SDS-Probenpuffer bei 99°C für 10 Minuten erhitzt und nach kurzer Zentrifugation auf ein denaturierendes SDS-Gel aufgetragen. Für die Zusammensetzung der Gele siehe Tabelle:

	7,5%	10%	12,5%	15%	18%	Sammelgel
Endvol	10ml	10ml	10ml	10ml	10ml	5ml
MilliQ	5ml	4,1ml	3,3ml	2,5ml	1,2ml	3ml
Trenngelpuffer/	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml	1,25ml
Sammelgelpuffer						
30% Acrylamid	2,5ml	3,4	4,2ml	5ml	6,3ml	0,75ml
TEMED	8ul	8ul	8ul	8ul	8ul	10ul
APS	50ul	50ul	50ul	40u1	30ul	50ul

Die Proben wurden in einem Mini Protean 3-System (*BioRad*) aufgetrennt. Als Marker diente der *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas*).

Durch sogenanntes *Semi-Dry-Blotten* wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Amersham Hybond-LFP, GE Healthcare) übertragen. Dafür wurde Whatman Papier in Transferpuffer eingelegt (diente sowohl als Anoden- als auch Kathodenpuffer), Die PVDF-Membran wurde vor dem Einlegen in Transferpuffer kurz mit MeOH benetzt. Bei einer Spannung von 15V-25V lief der Blotvorgang eine Stunde. Danach wurde die Membran eine Stunde blockiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Der Primärantikörper wurde dann in der vom Hersteller angegebenen Konzentration (meistens 1:1000) in Blockierungspuffer auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte auf einem Schüttler bei 4°C ü.N.. Nach drei Waschvorgängen von jeweils 5 Minuten wurde der entsprechende HRP-konjugierte Sekundär-Antikörper (*Dako*) in einer Verdünnung von 1:2000 in Blockierungspuffer auf die Membran gegeben. Die Inkubation lief bei RT auf einem Schüttler für eine Stunde. Nach drei Waschgängen (s.o.) wurde ECL-

Chemilumineszenzlösung auf den Blot gegeben und dieser zwischen zwei Frischehaltefolien mit einem Röntgenfilm und/oder Chemilumineszenzauswertung Chemi Doc XRS (*BioRad*) entwickelt. Sollten mehrere Antikörper nacheinander auf den Blot gegeben werden, konnte dieser "gestrippt" werden. Dies geschah durch Inkubation in Stripping-Puffer bei 50°C für 30 Minuten. Der Blot wurde anschließend zweimal mit Waschpuffer je 20 Minuten gewaschen und danach erneut blockiert.

#### 2.2.2.5 Proliferationsassay mit BrdU

Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurde das Amersham Cell Proliferation *Elisa Biotrack System* der Firma *GE Healthcare* verwendet. Dazu wurden 2500 Zellen pro 96 Napf ausplattiert, primäre Osteoblasten wurden an Tag 2 der Differenzierung für 8 Stunden ohne Serum kultiviert, bevor serum-freies, konditioniertes Medium mit BrdU für 12 Stunden auf die Zellen gegeben wurde. Ansonsten wurden die Angaben des Herstellers befolgt. Die Werte wurden zudem auf den Proteingehalt (bestimmt nach Bradford bei 595nm) bezogen.

#### 2.2.2.6 Osteoprotegerin-ELISA

Um die Osteoprotegerin-Konzentration in Mediumüberständen und im Serum zu bestimmen wurde das Quantikine Mouse Opg Immunoassay Kit der Firma *R&D Systems* verwendet (#MOP00). Dabei wurde nach Herstellerempfehlungen verfahren (Medium wurde 1:20 verdünnt).

## 2.2.2.7 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse von Zellen in Suspension auf Einzelzellebene. Hierbei werden diese hintereinander durch eine Kapillare angesaugt und passieren dann den Lichtstrahl eines Argon-Ionen-Lasers. Die durch die Zellen hervorgerufene Lichtstreuung kann durch Photomultiplikatoren detektiert werden. Das vorwärtsgestreute Licht (englisch: *Forward scatter*) ist ein Maß für die Zellgröße, das seitlich (im rechten Winkel) gestreute Licht hingegen, ist ein Maß für die Zellgranularität (englisch: *Side scatter*). Mit Hilfe spezifischer Antikörper, welche mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt sind, können Proteine auf der Zelloberfläche und intrazellulär nachgewiesen werden. Die Fluoreszenz ist dabei direkt proportional zur Menge des vorhandenen Proteins. In dieser Arbeit wurden Knochenmarkskulturen, welche mit oder ohne IL-33 (Kontrolle: PBS) für sieben Tage kultiviert wurden, auf die Marker CCR3 (AK gekoppelt mit PE, 1:25 Verdünnung), CD11b (AK gekoppelt mit PerCP, 1:1000 Verdünnung), CD23, (AK gekoppelt mit FITC) CD206 (AK gekoppelt mit Alexa647, 1:100 Verdünnung), Ly6G (AK gekoppelt mit PE, 1:100) und ST2 (AK gekoppelt mit FITC, 1:100 Verdünnung) untersucht.

Die Kulturen wurden dazu trypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Für jeden Ansatz wurden 10<sup>5</sup> Zellen pro FACS-Röhrchen verwendet. 100µl Cohn-II-Stammlösung wurden verwendet, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an Fc-Rezeptoren zu verhindern (Das Blocken geschah in 100µl für 20 Minuten bei 4°C). Die Waschschritte erfolgten in 4ml FACS-Puffer gefolgt von einer Zentrifugation bei 300g, bei 4°C. Die Inkubationsschritte mit den Antikörpern erfolgten lichtgeschützt für 30 Minuten bei 4°C in FACS-Puffer. Generell erfolgen die Färbungen nach folgendem Schema:

- Inkubation mit unkonjugiertem Antikörper
- Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper, der den Isotyp des ersten erkennt
- Blockade unspezifischer Bindungsstellen mit Hilfe von Serum aus demselben Organismus, aus dem der unkonjugierte Primärantikörper stammt
- Inkubation mit biotinyliertem Antikörper
- Inkubation mit Streptavidin, welches mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist
- Inkubation mit direkt markierten Antikörpern

Anschließend wurden die Zellen in 200µl FACS-Puffer resuspendiert und an einem *FACSCalibur Flow Cytometer* analysiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *CellQuestPro*. Zusätzlich zu den Färbungen wurden Isotypkontrollen durchgeführt um unspezifische Antikörperbindungen auszuschließen.

Die Arbeiten wurden in Kooperation mit der Klinischen Chemie, mit Dr. Andrea Horst und Dr. Thomas Bickert durchgeführt.

# 2.2.3 Histologie und Morphologie

#### 2.2.3.1 Kontaktröntgen und µCT-Analyse

Die fixierten Skelette (24 Stunden in 4% Formafix, 24 Stunden in 80% EtOH) der Mäuse wurden bei 35 kV für 2 Sekunden in einem Kontakt-Röntgengerät (*Faxitron*) unter Verwendung von Mamoray HDR PQ-Filmen (*Agfa*, Mechelen, Belgien) geröntgt.

Für die dreidimensionale Darstellung wurden die Lendenwirbelkörper L5 und L6 sowie die Tibia in einem  $\mu$ CT 40 (*Scanco Medical*, Basserdorf, Schweiz) gescannt. Die Auflösung betrug 12 $\mu$ m.

## 2.2.3.2 Acrylat- und Paraffin-Histologie

Um Veränderungen in der Knochenmasse zu untersuchen, wurden die rechte und linke Tibia sowie die Lendenwirbelkörper L1-L4 histologisch analysiert. Dazu wurden die Mäuse getötet und das Fell, sowie alle Weichteile im Thorax und Abdomen entfernt. Nach Fixierung in 4% Formafix für 24 Stunden wurden die Mäuse in 80% EtOH aufbewahrt. Die Wirbelkörper und Tibiae wurden anschließend präpariert und in einem Autotechnikon entwässert, (im Fall unentkalkter Knochen für die Acrylathistologie: 2x 60 Minuten 70% EtOH, 3x 60 Minuten 80% EtOH, 3x 60 Minuten 96% EtOH, 4x 60 Minuten EtOH absolut). Die Knochen wurden anschließend zur Entwässerung je 24 Stunden bei 4°C in den Infiltrationslösungen-I und -II gelagert bevor sie in Gießlösung in Glasgefäßen eingebettet wurden. Diese härteten dann ü.N. bei 4°C aus. Die Plastikblöcke wurden anschließend aus den Glasbehältern geschlagen und angeschliffen. Für die Analyse der Knochenformation durch Calcein-Markierung wurden anschließend 12µm dicke Schnitte hergestellt. Zur Analyse der Mineralisation und der zellulären Parameter wurden 4µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf gelantinebeschichtete Objektträger aufgebracht und mithilfe von 80% Isopropanollösung gestreckt. Nach dem Trocknen ü.N. konnten die 12µm Schnitte eingedeckt und die 4µm Schnitte gefärbt werden.

Knochen für die Paraffineinbettung wurden nach der Fixierung (s.o.) 2-3 Tage in 20% EtOH bei 37°C entkalkt. Anschließend folgte die Entwässerung in einem Autotechnikon (2x 60 Minuten 70% EtOH, 60 Minuten 80%, 2x 60 Minuten 96% EtOH, 2x 60 Minuten EtOH absolut, 2x 60 Minuten Xylol, 3x 60 Minuten Paraffin 60°C). Anschließend wurden die Knochen in Paraffin eingebettet und bei 4°C gehärtet.

#### 2.2.3.3 von Kossa/van Gieson-Färbung

Der Kunststoff wurde mit 2-(Methoxyethyl)-acetat (*Merck*, #806061) aus den Schnitten gelöst (3x 10 Minuten). Anschließend wurden die Präparate in einer absteigenden EtOH-Reihe bewässert. Die Färbung setzte sich aus folgenden Schritten zusammen: 5 Minuten 3% AgNO<sub>3</sub>, 10 Minuten ddH<sub>2</sub>O, 5 Minuten Sodaformollösung, 10 Minuten Spülen mit fließendem Leitungswasser, 5 Minuten 5% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Lösung, 10 Minuten Spülen mit fließendem Leitungswasser, 20 Minuten van Gieson-Lösung. Danach wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Nach 3 Inkubationen für 5 Minuten in Xylol wurden die Präparate mit DPX (*Sigma*, #44581) eingedeckt.

#### 2.2.3.4 Toluidinblau-Färbung

Für die Färbung wurden die Präparate 30 Minuten in 1% Toluidin-Blau.O Lösung pH 4,5 inkubiert (Für die Vor- und Nachbehandlung der Präparate siehe 2.2.3.3.).

# 2.2.3.5 Calceinmarkierung

Bei Calcein handelt es sich um einen fluorochromen Farbstoff, welcher sich in die mineralisierende Matrix einlagert. Um die Rate der Knochenneubildung analysieren zu können, wurden die Mäuse in einem Abstand von 7 Tagen mit Calcein markiert. Dazu wurden den Tieren jeweils 100µl Injektionslösung (0,15M NaCl, 2% NaHCO<sub>3</sub>, 1% Calcein) intraperitoneal gespritzt. An der Anzahl und den Abständen der Doppelmarkierungen konnte die Knochenneubildung quantifiziert werden.

## 2.2.3.6 Analyse der Osteoklastenzahl durch TRAP-Färbung

TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) ist ein spezifischer Marker für aktive Osteoklasten. Hierfür wurden Mäuse-Tibiae entkalkt siehe 2.2.3.2 und in Paraffin eingedeckt. Nach der Entparaffinierung in Xylol folgte die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe. Daraufhin wurden die Präparate eine Stunde in TRAP-Puffer inkubiert und anschließend 30 Minuten in TRAP-Färbelösung gefärbt. Die Präparate konnten dann mit destilliertem H<sub>2</sub>O gespült und für 10 bis 60 Sekunden mit Mayers Hämalaun gegengefärbt werden. Es folgte eine Bewässerung mit fließendem Wasser für 10 Minuten. Die Schnitte wurden anschließend mit wässrigem Eindeckmedium (*DAKO*, #S3025) eingedeckt.

#### 2.2.3.7 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Paraffinschnitte wurden für 30 Minuten bei 60°C inkubiert und dann 2x 5 Minuten in Xylol entparaffiniert. Danach wurden sie in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Anschließend wurden sie 10 Minuten in Mayers Hämalaunlösung (*Merck*, #109249) gefärbt, anschließend in Salzsäure-Ethanol getaucht, mit Leitungswasser gespült und zum Bläuen 10 Minuten in Leitungswasser inkubiert. Nun wurden die Schnitte für 2 Minuten in Eosin-Lösung gefärbt. Dann folgte eine aufsteigende Alkoholreihe. Nach 3 Inkubationen in Xylol je 5 Minuten wurden die Präparate mit DPX (Sigma, #44581) eingedeckt.

## 2.2.3.8 Anti-p-STAT3- Immunhistologie

Die humanen Gewebeproben wurden entparaffiniert, rehydriert und mit 1mM EDTA pH8,0 bei 90°C für 15 Minuten vorbehandelt. Nach der Inkubation mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 15 Minuten um endogene Peroxidase-Aktivität zu blockieren, wurde 30 Minuten mit 2,5% BSA blockiert um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern. Die Inkubation des Primärantikörpers (Cell Signaling, #9415) geschah in einer Verdünnung von 1:100 über Nacht bei 4°C. Der biotinylierte Sekundärantikörper (*Dako*), wurde in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt, Streptavidin/HRP (*Dako*) in einer Verdünnung von 1:200. Als chromogenes Substrat diente DAB (*Dako*). Die Schnitte wurden dann mit Hämatoxylin gegengefärbt.

# 2.2.3.9 Histomorphometrie

Die Bestimmung der Knochenformationsrate (BFR, bone formation rate) geschah an unentkalkten, 12 $\mu$ m dicken, ungefärbten Acrylatschnitten Calcein-markierter Mäuse. Die Bestimmung der Parameter des Knochenvolumens (BV/TV, bone volume per tissue volume), der Trabekeldicke (TbTh, trabecular thickness), der Anzahl der Trabekel (TbN, trabecular number) und der Abstand der Trabekel (TbSp, trabecular separation) wurden mit dem Programm Bioquant an 4 $\mu$ m Schnitten, die nach Kossa/van Gieson gefärbt waren. Die zellulären Parameter wie Osteoblasten- und Osteoklastenanzahl (NOb bzw. NOc/BPm, number of osteoblasts bzw. number of osteoclasts per bone parameter) wurden an 4 $\mu$ m dicken toluidinblau-gefärbten Schnitten nach einem standartisierten Protokoll mit dem OsteoMeasure Histomorphometrie-System (*Osteometrics Inc*, Atlanta, USA) ermittelt.

# 2.2.4 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde das Programm Excel der Firma *Microsoft* verwendet. Angegeben sind berechnete arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikanzen wurden mit Hilfe des zweiseitigen Student-T-Test berechnet. Die p-Werte wurden wie folgt angegeben: P<0,05 entspricht \*, p<0,005 entspricht \*\*, p<0,0005 entspricht \*\*\*.

# 3. Ergebnisse

# 3.1 Genotypisierung der *Col1a1-Krm2* Mäuse und Bestimmung der *Krm2*-Überexpression

In Vorarbeiten konnten in unserer Arbeitsgruppe zwei unabhängige Founderlinien etabliert werden, welche *Krm2* unter der Kontrolle eines 2,3kb-Fragmentes des TypI-Kollagen-Promoters selektiv in Osteoblasten überexprimieren sollten (Abb.3.1.1.A). Die Genotypisierung wurde mit einem Globin-Intron-spezifischen Vorwärts-Primer und einem *Krm2*-spezifischen Rückwärts-Primer durchgeführt. Hier sollte nur in transgenen Tieren ein Signal bei ca. 1100bp entstehen (Abb.3.1.1.B). In Southernblot-Analysen, welche zur Bestätigung der PCR genutzt wurden, diente das Fragment als Sonde, welches auch für die Kerninjektion verwendet wurde. Hierbei wurde die genomische DNA mit KpnI verdaut. Dabei sollten bei transgenen Tieren zwei Fragmente bei ca. 3500bp und 900bp detektiert werden können (Abb.3.1.1.C).



Abbildung 3.1.1 Genotypisierung Colla1-Krm2 transgener Mäuse: A. Schema des Konstruktes zur Überexpression von Krm2 in Osteoblasten. B. PCR zur Genotypisierung Colla1-Krm2-transgener Tiere. In Anwesenheit des Transgens entsteht ein Produkt bei ca. 1100bp. C. Southern-Blot-Analyse von genomischer DNA zur Detektion des eingebauten Transgens. Zwei Signale bei 3500bp und 900bp sind bei transgenen Tieren detektierbar.

Nach der Etablierung stabiler transgener Linien wurde die gewebe-spezifische Überexpression des Transgens bestimmt (Abb.3.1.2.A). Bei RT-PCR-Analysen konnte unter Verwendung eines Krm2-spezifischen Vorwärts-Primers und einem Rückwärts-Primer, welcher sich spezifisch im Poly-A-Schwanz der Transgen-RNA anlagerte, gezeigt werden, dass das Transgen nur im Knochen exprimiert wurde. Hierbei wurden sowohl Schädeldach (gebildet durch desmale Ossifikation) und Femur (gebildet durch enchondrale Ossifikation) untersucht. Ein wichtiger Befund war die Abwesenheit der Transgen-Expression in der Milz, wodurch eine Expression des Transgens in Osteoklasten-Vorläufern ausgeschlossen werden konnte. In nachfolgenden Analysen fiel auf, dass auch in der Haut, in welcher TypI-Kollagen exprimiert wird, keine Überexpression von Krm2 stattfand, lediglich im Auge konnte eine schwache Transgenexpression festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Der nächste Schritt war die Bestätigung der Überexpression von Krm2 in transgenen Tieren (Abb. 3.1.2.B). In Northernblot-Analysen, bei denen RNA aus Femur von Wildtyp und transgenen Mäusen verwendet wurde, fiel auf, dass es zu einer sehr starken Überexpression von Krm2 in Knochen von transgenen Tieren kam. Bei diesen Analysen wurde eine Sonde verwendet, welche sowohl das Transgen als auch die endogene Expression detektierte.



Abbildung 3.1.2 Bestimmung der gewebespezifischen Transgen-Überexpression: A. Gewebespezifische Expression des Transgens. RT-PCR Analyse von 1= Schädeldach, 2=Femur, 3=Gehirn, 4=Herz, 5=Niere, 6=Leber, 7= Fett und 8=Milz. Bei der PCR wurde nur das Transgen detektiert (Produkt bei ca. 1100bp). B. Bestimmung der Expression von *Krm2* durch Northernblot-Analysen in Femora von Wildtyp- und *Col1a1-Krm2*- transgenen Mäusen (n=3 gepoolt).

## 3.2 Analyse des Knochenphänotyps Collal-Krm2 transgener Mäusen

Bei Vorarbeiten, in denen eine verstorbene *Col1a1-Krm2* transgene Maus analysiert worden war, fiel bereits auf, dass diese eine stark verringerte Knochenmasse aufwies. In der vorliegenden Arbeit wurden zudem Tiere zweier unabhängiger transgener Linien untersucht,

die einen vergleichbaren Phänotyp zeigten (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden die nachfolgenden Analysen mit einer transgenen Linie fortgeführt. Zur Untersuchung des Knochenphänotyps dieser Mäuse wurden die Wirbelkörper und die Unterschenkelknochen durch unentkalkte Histologie aufgearbeitet (Abb.3.2.1 A). Es wurden jeweils 6 *Col1a1-Krm2* Mäuse in drei unterschiedlichen Altersstufen mit den entsprechenden Wildtypkontrollen analysiert. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass transgene Tiere schon im Alter von zwei Wochen eine signifikante Verringerung der Knochenmasse aufweisen. Auch im Alter von 6 und 24 Wochen zeigten die transgenen Tiere eine signifikante Reduktion der Knochemasse. Alle analysierten Parameter wie das Knochenvolumen/Gewebevolumen (BV/TV), die trabekuläre Dicke (Tb.Th) und die Anzahl der Trabekel (Tb.N) waren im Alter von 24 Wochen signifikant herabgesetzt (Abb.3.2.1 B).



Abbildung 3.2.1 Unentkalkte Wirbelkörper Histologie: A. Unentkalkte 4µm dicke Histologieschnitte der Wirbelkörper L3-4 (bei 2 Wochen) und L4 im Alter von 6 und 24 Wochen. Die Präparate wurden nach von Kossa gefärbt und ausgewertet. Hierbei wird die mineralisierte Knochenmasse schwarz gefärbt. B. Histomorphometrische Auswertung der Knochenparameter. BV/TV (Knochenvolumen/Gewebevolumen), Tb.N. (Anzahl der Trabekel), Tb.Th. (Dicke der Trabekel).

Zur funktionellen Analyse wurden die Wirbelkörper 24 Wochen alter Mäuse (L5 und L6) in einem  $\mu$ CT gescannt und anschließend durch Mikrokompressionstestung biomechanisch analysiert (Abb.3.2.2 A). Hier zeigten die transgenen Wirbelkörper in den  $\mu$ CT-Aufnahmen Erosionen in der Kortikalis. Bei den biomechanischen Belastungstests wiesen die transgenen Wirbelkörper eine geringere biomechanische Belastbarkeit auf. Diese war charakterisiert durch eine signifikant herabgesetzte Kraft, die bis zum Versagen aufgewendet werden musste (Fmax), und eine signifikant reduzierte Steifigkeit (N/mm) (Abb.3.2.2 B).



**Abbildung 3.2.2 Biomechanische Wirbelkörpertestung:** A. µCT-Aufnahmen eines Wildtyp (WT) und transgenen (TG) Wirbelkörpers (L5). B. Dargestellt sind die Auswertungen der biomechanischen Testung durch Mikrokompressionstestung.

Zusätzlich wurde kortikaler Knochen, in diesem Fall der Femur, von 24 Wochen alten Mäusen hinsichtlich seiner biomechanischen Belastbarkeit getestet. Auch hier wiesen *Col1a1-Krm2* Mäuse eine erniedrigte biomechanische Belastbarkeit in der Dreipunktbiegetestung auf (Abb.3.2.3 B). Diese verringerte Belastbarkeit wurde durch eine geringere kortikale Dicke (C. Th) und eine herabgesetzte Mineraldichte (vBMD) der transgenen Knochen hervorgerufen (Abb.3.2.3 A und B).



Abbildung 3.2.3 Biomechanische Testung kortikaler Knochen: A. Unentkalkte von Kossa-gefärbte Schnitte von Unterschenkelknochen (Tibia). μCT-Aufnahmen, welche den Querschnitt von Oberschenkelknochen zeigen.
B. Aufgeführt sind die Ergebnisse der μCT-Analyse und der biomechanischen Testung, C.Th. (Kortikale Dicke), vBMD (Mineraldichte), aufgewendete Kraft (Fmax) und die Steifigkeit.

Um die zelluläre Ursache dieses Phänotyps aufzuklären wurden toluidinblau-gefärbte Acrylatschnitte von 6 und 24 Wochen alten Mäusen histomorphometrisch ausgewertet. Hier fiel auf, dass die extrazelluläre Matrix in transgenen Wirbelkörpern eine andere Struktur als bei den Wildtyptieren aufwies. Zudem erschien die Morphologie der transgenen Osteoblasten atypisch (Abb. 3.2.4 A). Bei der Quantifizierung der Osteoblasten-Anzahl gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und transgenen Tieren (Abb. 3.2.4 B).



Abbildung 3.2.4 Histomorphometrische Auswertung an toluidinblau-gefärbten Schnitten: A. Gezeigt sind exemplarisch Wirbelkörperschnitte 6 Wochen alter Mäuse nach Toluidinblau-Färbung. B. Es konnte keine signifikante Abnahme der Osteoblastenzahl (ObN/BPm) in transgenen Tieren festgestellt werden.

В

Um die Knochenbildung zu quantifizieren, wurde eine dynamische histomorphometrische Analyse durchgeführt. Hierzu wurde Mäusen in einem definierten Zeitintervall der Farbstoff Calcein intraperitoneal gespritzt (Abb.3.2.5 A). Durch Quantifizierung der Anzahl der Doppelbanden und deren Abstand konnte eine signifikante Reduktion der Knochenbildungsrate (bone formation rate, BFR) im Alter von 6 und 24 Wochen alten *Collal-Krm2* Mäusen festgestellt werden (Abb.3.2.5 B).



Abbildung 3.2.5 Dynamische Histomorphometrie an Calcein-markierten Schnitten: A. Dargestellt sind 12µm dicke Schnitte von Wirbelkörpern mit Calcein-Markierung. Auffällig ist die geringere Anzahl der Doppelbanden in den Wirbelkörpern transgener Tiere und eine deutliche Abnahme des Abstandes zwischen den Doppelbanden. B. Die Auswertung ergab eine signifikante Abnahme der Knochenbildungsrate (BFR/BS).

Nachdem die Hemmung der Knochenformation durch Krm2 eindeutig festgestellt werden konnte, wurde als nächstes die Knochenresorption analysiert. Hierzu wurde an nicht entkalkten Schnitten mit Hilfe einer TRAP-Färbung die Anzahl der Osteoklasten untersucht. Hier fiel auf, dass in Tibia-Präparaten transgener Tiere eine höhere Anzahl TRAP-positiver Zellen nachweisbar war (Abb.3.2.6 A). Dieses Ergebnis wurde durch die Auswertung histomorphometrischer Untersuchungen bestätigt, bei denen eine signifikante Zunahme der Osteoklastenzahl in den transgenen Tieren festgestellt wurde (Abb. 3.2.6 B).



Abbildung 3.2.6 Analyse der Osteoklastenzahl durch TRAP-Färbung und histomorphometrische Auswertung: A. Abgebildet sind entkalkte Tibiaschnitte 6 Wochen alter Mäuse. Zu sehen ist die höhere Anzahl TRAP-positiver Zellen (rote Färbung) in dem transgenen Präparat. B. Dargestellt ist das Ergebnis der histomorphometrischen Untersuchung von Wirbelkörpern 6 und 24 Wochen alter Tiere. Hier kam es zu einer signifikanten Zunahme der Osteoklastenzahl (OcN/BPm) in *Colla1-Krm2* transgenen Tieren im Alter von 6 und 24 Wochen.

Neben der erniedrigten Knochenformation und der erhöhten Knochenresorption, welche zu einer stark erniedrigten Knochenmasse führten, kam es bei ca. 50% der transgenen Tiere im Alter von einem Jahr zur Entwicklung osteolytischer Läsionen (Abb.3.2.7 A, B). Histologische Analysen konnten zeigen, dass dies aufgrund einer erhöhten Resorption in der Kortikalis des betroffenen Knochens geschah (Abb.3.2.7 C). Dieses histologische Bild erinnerte an osteolytische Läsionen, die im Laufe von Knochenmetastasen z.B. beim humanen Prostatakarzinom im Knochen auftreten können (Abb.3.2.7 D).



Abbildung 3.2.7 Darstellung der osteolytischen Läsionen bei *Col1a1-Krm2* Mäusen: A und B. Gezeigt sind  $\mu$ CT-Aufnahmen und Röntgenbilder osteolytischer Läsionen, die sich in transgenen Tieren im Alter von einem Jahr entwickelten. C. Die histologische Auswertung zeigte eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten (Pfeilköpfe) und eine abnormale de novo-Knochenbildung, welche durch Pfeile gekennzeichnet ist. Diese betraf nicht nur die Kortikalis sondern auch den trabekulären Knochen. D. Exemplarisch ist außerdem die Histologie einer osteoblastischen und einer osteolytischen Knochenmetastase des humanen Prostatakarzinoms abgebildet. Auch hier zeigte sich eine abnormale Knochenformation, welche durch Pfeile gekennzeichnet ist.

# 3.3 Analyse der zellulären und molekularen Ursachen des Phänotyps Collal-Krm2 transgener Mäuse

Um die zellulären Ursachen des Phänotyps von *Col1a1-Krm2*-Mäusen zu untersuchen, wurden Osteoblasten-Vorläuferzellen aus Schädeldächern neugeborener Mäuse isoliert und *ex vivo* zu Osteoblasten differenziert. Zunächst wurde die Proliferationsrate von Wildtyp- und transgenen Osteoblasten am dritten Tag in Kultur untersucht. Hier fiel auf, dass transgene Osteoblasten im Vergleich zu der Wildtyp-Kontrolle eine signifikant erhöhte Proliferationsrate aufwiesen (Abb.3.3.1.A). Zudem wurden die Kulturen bis zum zehnten Tag nach der Differenzierung kultiviert und eine von Kossa-Färbung durchgeführt (Abb.3.3.1.B). Hierbei konnte eine geringere Bildung von mineralisierten Arealen in den transgenen Kulturen nachgewiesen werden, obwohl der Proteingehalt in diesen Kulturen erhöht war.



Abbildung 3.3.1 Proliferationsrate und Mineralisation von Osteoblasten *ex vivo*: A. Proliferationsassay, angegeben ist der Einbau von BrdU bezogen auf den Proteingehalt in den Kulturen. B. Von Kossa-Färbung von Osteoblastenkulturen. Abgebildet sind repräsentative von Kossa-Färbungen von Kulturen primärer Osteoblasten an Tag 10 der Differenzierung.

Da es sich bei Krm2 um einen Inhibitor des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges handelt, lag es nahe, dass Krm2 auch im Osteoblasten den kanonischen Wnt-Signalweg antagonisierte. Um dies zu überprüfen, wurden Wildtyp- und transgene Osteoblasten mit Wnt3a stimuliert, als Kontrolle dienten Wildtyp-Osteoblasten. Als Indikator der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges wurde die Phosphorylierung des Wnt-Ko-Rezeptors Lrp6 (als einer der ersten Schritte bei einer Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges wird Lrp6 im C-Terminus phosphoryliert) und die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin untersucht. Phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin wird auch als inaktives  $\beta$ -Catenin bezeichnet, welches durch Ubiquitinierung dem Proteasom zugeführt wird. Aktives  $\beta$ -Catenin hingegen ist unphosphoryliert und kerngängig. Im Kern aktiviert es in Verbindung mit TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren die Genexpression. In Westernblot-Analysen konnte nach Stimulation mit Wnt3a in Wildtyp-Osteoblasten im Vergleich zu *Krm2*-transgenen Osteoblasten höhere Mengen an phosphoryliertem Lrp6 und niedrigere Mengen an phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin detektiert werden (Abb.3.3.2). Hierdurch konnte bestätigt werden, dass Krm2 in Osteoblasten den kanonischen Wnt-Signalweg inhibiert.



Abbildung 3.3.2 Westernblot-Analyse von Wildtyp und *Colla1-Krm2*-transgenen Osteoblasten nach Stimulation mit Wnt3a: Osteoblasten wurden an Tag 10 der Differenzierung mit 100ng/ml Wnt3a in serumfreien Medium für 30 Minuten stimuliert. Deutlich zu sehen sind die größeren Mengen an phosphoryliertem Lrp6 in den Wildtypkulturen nach Wnt3a-Stimulation. Die transgenen Kulturen weisen hingegen eine höheren Gehalt an phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin auf. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin.

Nach Bestätigung des erwarteten zellautonomen Defektes der *Col1a1-Krm2*-transgenen Osteoblasten sollten Zielgene von Krm2 identifiziert werden, das sind Gene, deren Expression durch Überexpression von *Krm2* verändert wurde. Hierzu wurden drei unabhängige *Affymetrix*-Genchip-Analysen durchgeführt, bei denen das Expressionsmuster von Wildtyp- und transgenen Osteoblasten an Tag 10 der Differenzierung miteinander verglichen wurde. Es gab ca. 70 Gene, die durch Überexpression von *Krm2* in allen drei Analysen eine *mean SLR (signal log ratio)* von -1 aufwiesen, das heißt im Mittel zweifach verringert exprimiert wurden. Darunter waren zahlreiche Gene, deren verminderte Expression potenziell den beobachteten Phänotyp erklären konnte (Abb.3.3.3). So waren die terminalen Osteoblastenmarker *DmpI* und *Phex* verringert exprimiert, was für eine Störung der Differenzierung in *Col1a1-Krm2*-transgenen Osteoblasten sprach. Zudem war die Expression aller Gene der TypIX-Kollagen-Familie (*Col9a1-a3*) und der Gene *Smpd3* sowie *Pcolce2* in

den transgenen Osteoblasten vermindert. Interessanterweise war jedoch die Expression früher Osteoblastenmarker wie z.B. die der Transkriptionsfaktoren *Runx2* und *Osterix (Sp7)* nicht verändert. Auch die Expression der Gene *Col1a1* und *Ibsp* war nicht durch die Überexpression von *Krm2* betroffen. Der wichtigste Befund war die in den transgenen Osteoblasten signifikant herabgesetzte Expression von *Tnfrsf11b*. Dieses Gen kodiert für das Protein Osteoprotegerin, welches ein Antagonist des Proteins Rankl ist. Das Verhältnis von Opg und Rankl ist essenziell für die Regulation der Osteoklastogenese, da Rankl den Schlüsselfaktor für die Formation und Differenzierung von Osteoklasten darstellt.



Abbildung 3.3.3 Darstellung der Affymetrix-Genchip-Analyse: Exemplarisch dargestellt ist der relative Unterschied der Expression ausgewählter Gene von *Col1a1-Krm2*-transgenen Osteoblasten im Vergleich zu Wildtyp-Osteoblasten (Die Expression in Wildtyp-Osteoblasten wird durch die rote Linie dargestellt). Die Expression zahlreicher Osteoblasten-Markergene in transgenen Osteoblasten war im Vergleich zu Wildtyp-Osteoblasten nicht verändert. Aufgeführt ist zudem der relative Unterschied der Expression von ausgewählten Genen mit einer SLR  $\leq$ -1.

Um die Relevanz dieser Ergebnisse zu überprüfen, wurde die Opg-Konzentration im Serum von Wildtyp- und transgenen Mäusen mittels ELISA bestimmt (Abb.3.3.4 A). Hier zeigte sich, dass die Opg-Konzentration in 6 Wochen alten *Col1a1-Krm2* Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren signifikant reduziert war. Zudem wurde die Expression von *Tnfrsf11b* im Femur 6 Wochen alter Mäuse durch qRT-PCR quantifiziert (Abb.3.3.4 B). Auch hier zeigte sich eine signifikante Reduktion der *Tnfrsf11b*-Expression in transgenen Tieren. Als Kontrolle wurde zudem die Expression der Gene *Col1a1* (kodiert für TypI-Kollagen), *Bglap* (kodiert für Osteocalcin) und *Ibsp* (kodiert für *Bone sialoprotein*) durch Northernblot-Analyse quantifiziert (Abb3.3.4 C). Hier wurde kein nennenswerter Unterschied in der Expression gefunden, was die Ergebnisse der Genchip-Analysen bestätigte.



Abbildung 3.3.4 Quantifizierung von Opg im Serum und RNA-Expressionsanalysen im Femur: A. Die Opg-Konzentration im Serum 6 Wochen alter Mäuse (n=4) wurde durch ELISA quantifiziert. B. Durch qRT-PCR wurde die *Tnfrsf11b* Expression im Femur von 6 Wochen alten Mäusen (n=3) quantifiziert. C. Als Kontrolle wurden Northern Blot-Analysen zur Quantifizierung der Expression von *Colla1*, *Bglap* und *Ibsp* im Femur 6 Wochen alter Mäuse (n=3, gepoolt) durchgeführt (3.3.4 C).

In den drei Genchip-Analysen wurden auch 34 Gene mit einer mittleren SLR von  $\geq 1$  in *Krm2* transgenen Osteoblasten verstärkt exprimiert. Hier fiel auf, dass sich unter diesen Genen IL-33, welches der Interleukin-1 Familie angehört, befand (Abb.3.3.5 A). Dieser *in vitro* Befund konnte durch immunhistologische Untersuchungen *in vivo* bestätigt werden (Abb.3.3.5 B).



Abbildung 3.3.5 Verstärkte Expression von IL-33 in vitro und in vivo: A. In den drei unabhängigen Genchip-Analysen war *IL-33* von 34 Genen mit einer mittleren SLR von ≥1 auf Platz 3 der in *Col1a1*-Krm2-transgenen Osteoblasten gegenüber Wildtyp-Osteoblasten verstärkt exprimierten Gene. B. In immunhistologischen Untersuchungen konnte die verstärkte Bildung von IL-33 in *Col1a1-Krm2* transgenen Mäusen detektiert werden.

Die IL-1 Familie besteht neben IL-33 aus den Zytokinen IL-1a, IL-1b und IL-18. Abgesehen von IL-33 war schon ein direkter Einfluss von IL-1 und IL-18 auf Osteoblasten und Osteoklasten beschrieben (Lorenzo *et al.*, 2008). Dies war der Grund, in den folgenden Analysen den Einfluss von IL-33 auf Osteoblasten und Osteoklasten zu untersuchen und so eventuell einen besseren Erklärungsansatz für den schwerwiegenden Phänotyp der *Col1a1-Krm2* Mäuse liefern zu können.

# 3.4 Der Einfluss von IL-33 auf den Knochenumbau

Zunächst wurde durch RT-PCR überprüft, in welchen Geweben *IL-33* und sein Rezeptor *Il1rl1* (wird auch häufig als *ST2* bezeichnet) exprimiert wurden. Hier fiel die starke Expression von *Il1rl1* im Wirbelkörper, Femur und Schädeldach auf (Abb.3.4.1), während *IL-33* ubiquitär exprimiert wurde.



Abbildung 3.4.1 RT-Expressionsanalyse von *IL-33* und *Il1rl1* in verschiedenen Geweben: Die Expression von *IL-33* und *Il1rl1* wurde in 1=Muskel, 2=Magen, 3=Hypothalamus, 4=Ösophagus, 5=Fett, 6=Zunge, 7=Lunge, 8=Niere, 9=Herz, 10=Auge, 11=Schilddrüse, 12=Milz, 13=Leber, 14= Wirbelkörper, 15=Femur, 16= Schädeldach überprüft.

Durch qRT-PCR wurde anschließend die Regulation der Expression dieser beiden Gene in der Differenzierung von Osteoblasten untersucht (Abb.3.4.2). Hier zeigte sich, dass die Expression von *IL-33* im Laufe der Differenzierung anstieg, während die Expression seines Rezeptors herunterreguliert wurde.



Abbildung 3.4.2 qRT-PCR Analyse der relativen Expression von *IL-33* und *Il1rl1* während der Differenzierung primärer Osteoblasten: Primäre Osteoblasten wurden bis zu dem angegebenen Zeitpunkt kultiviert und die Expression von *IL-33* und *Il1rl1* analysiert. Angegeben ist der relative Unterschied der Expression im Vergleich zum Tag 0 der Differenzierung.

Um zu überprüfen, ob primäre Osteoblasten einen funktionellen Rezeptor für IL-33 aufweisen, wurden sie an Tag 10 der Differenzierung mit rekombinantem IL-33 behandelt, und anschließend wurde in Westernblot-Analysen überprüft, ob IL-33 p42/44 und Stat-Signalwege aktivierte, was schon für andere Zelltypen beschrieben war (Pecaric-Petkovic *et al.*, 2009). Primäre Osteoblasten reagierten dabei dosis-abhängig mit einer Aktivierung des p42/44-Signalweges. Es konnte zudem auch eine Aktivierung des Stat3-Signalweges nachgewiesen werden (Abb.3.4.3).



Abbildung 3.4.3 Westernblot-Analyse primärer Osteoblasten nach Stimulierung mit rekombinantem IL-33: Primäre Osteoblasten wurden in serum-freien Medium 30 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen IL-33 behandelt. Anschließend wurde die Phosphorylierung von p42/44 und Stat3 analysiert. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Actin.

Um erste Anhaltspunkte für die Wirkung von IL-33 auf Osteoblasten zu erhalten, wurden diese mit rekombinantem IL-33 kultiviert. An Tag 10 der Differenzierung wurde eine von Kossa Färbung durchgeführt (Abb.3.4.4 A). Hier zeigte sich, dass die Zahl der mineralisierten "Nodules" abnahm, aber die flächige Mineralisation zunahm. Um genauere Aussagen über den Einfluss von IL-33 auf Osteoblasten treffen zu können, wurde deshalb eine Genchipdurchgeführt (Abb.3.4.4 В und C). Die Expression Analyse wichtiger Osteoblastenmarkergene wie z.B. Runx2 oder Bglap war jedoch nicht deutlich verändert (Abb.3.4.4 B). Es fiel aber auf, dass die Expression zahlreicher Zytokine wie z.B. Illa, Illb und Il6 induziert wurde (Abb.3.4.4 C). Der wichtigste Befund war jedoch, dass die Expression von Tnfsf11, welches für Rankl kodiert, induziert und die Expression von *Tnfrsf11b*, welches für Opg kodiert, reprimiert wurde (Abb.3.4.4). Diese Expressionsanalyse wurde durch qRT-PCR exemplarisch für die Gene Tnfsf11, Tnfrsf11b und Csf2 bestätigt (Abb.3.4.5).



Abbildung 3.4.4 Einfluss von IL-33 auf primäre Osteoblasten: A. Primäre Osteoblasten wurden in Anwesenheit verschiedener IL-33 Konzentrationen (5-100ng/ml) kultiviert. Nach 10 Tagen wurde die mineralisierte Matrix durch von Kossa-Färbung visualisiert. B. Osteoblasten wurden in serumfreien Medium 6 Stunden mit 100ng/ml IL-33 behandelt bevor eine *Affymetrix*-Genchip-Analyse durchgeführt wurde. Angegeben sind die Expressionsunterschiede wichtiger Osteoblastenmarkergene. C. Aufgeführt sind außerdem Gene, welche durch IL-33 in ihrer Expression erhöht waren.



Abbildung 3.4.5 qRT-PCR Analyse der relativen Expression von *Csf2*, *Tnfsf11* und *Tnfrsf11b* in primären Osteoblasten nach IL-33 Stimulation: Abgebildet sind die relativen Unterschiede der Genexpression nach Stimulation mit IL-33 bezogen auf die Kontrolle.

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass IL-33 über den Osteoblasten die Bildung von Osteoklasten verstärken könnte, da die Expression von *Tnfsf11* nach IL-33-Behandlung induziert und die *Tnfrsf11b*-Expression verringert wurde. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Osteoklastenvorläuferzellen aus dem Knochenmark von Mäusen isoliert und in Gegenwart von Rankl und M-Csf zu Osteoklasten differenziert. Die Kulturen wurden zusätzlich mit unterschiedlichen Konzentrationen IL-33 behandelt und nach 7 Tagen wurde die Anzahl der TRAP-positiven multinukleären Zellen bestimmt. Bei der Kontrolle (ohne IL-33) war die Bildung von Osteoklasten zu beobachteten. Dagegen kam es bei den IL-33 behandelten Kulturen zu einer kompletten Inhibition der Osteoklastenformation (Abb.3.4.6 A). Zudem war auch die Resorptionsleistung der Osteoklasten in den Kulturen durch IL-33 signifikant herabgesetzt (Abb.3.4.6 B).

А



Abbildung 3.4.6 Hemmung der Osteoklastenformation und Resorption durch IL-33 *in vitro*: A. Osteoklasten wurden aus Knochenmark generiert und unterschiedlichen Konzentrationen von IL-33 von Tag 0 der Differenzierung ausgesetzt. An Tag 7 der Differenzierung waren in der Kontrolle multinukleäre, TRAPpositive Zellen sichtbar, während in Gegenwart von mindestens 5ng/ml IL-33 keine TRAP-positiven Zellen zu beobachten waren. B. Zusätzlich wurden Zellen auf Elfenbeinplättchen (Dentin) ausplattiert und für die angegebene Zeitdauer in Anwesenheit von 100ng/ml IL-33 kultiviert. Anschließend wurde die Resorption auf Dentinchips in % nach Toluidinblau-Färbung analysiert.

Dieses unerwartete Ergebnis wurde nun weiter überprüft. Hierzu wurde der Effekt von IL-33 auf die Osteoklastogenese in unterschiedlichen Phasen der Differenzierung *in vitro* untersucht (Abb.3.4.7). So hatte nur die Zugabe von IL-33 an einem frühen Zeitpunkt (Tag 0 bis Tag 3) eine inhibitorische Wirkung auf die Osteoklastogenese. Wurde IL-33 erst am dritten Tag nach dem Ausplattieren mit M-Csf und Rankl in die Kultur gegeben, hatte dies keine Auswirkungen auf die Osteoklastogenese, d.h. hier bildeten sich multinukleäre, TRAPpositive Zellen.



Abbildung 3.4.7 Einfluss von IL-33 auf die Osteoklastogenese zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung *in vitro*: Knochenmarkkulturen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung mit 50ng/ml IL-33 stimuliert und an Tag 6 der Differenzierung wurde die Anzahl der multinukleären, TRAP-positiven Zellen bestimmt.

Um die Wirkung von IL-33 auf Osteoklasten-Vorläuferzellen näher zu charakterisieren, wurden Knochenmarkzellen in Gegenwart von IL-33 ausplattiert und 6 Tage kultiviert. Anschließend wurde eine *Affymetrix*-Genchip-Analyse durchgeführt (Abb.3.4.8 A). Hier fiel auf, dass Gene wie *Csf2*, *IL-6*, *IL-1a* und *IL-1b* durch IL-33 verstärkt exprimiert wurden. Dies war eine Übereinstimmung zu den bereits an Osteoblasten durchgeführten Analysen, jedoch wurde *Tnfsf11* in den Knochenmarkkulturen durch IL-33 in seiner Expression verringert. Zudem fiel auf, dass zahlreiche Gene, welche als Markergene für Osteoklasten gelten, wie z.B. *Oscar*, *Nfatc1* und *Calcr* massiv verringert exprimiert wurden (Negishi-Koga und Takayanagi, 2009). Dieser Befund bestätigte die Ergebnisse der Quantifizierung der multinukleären TRAP-positiven Zellen nach IL-33 Stimulation. Die Verringerung der Expression von Genen, welche mit der Osteoklastogenese assoziiert werden, war begleitet von einer gesteigerten Expression von Genen, deren Expression mit eosinophilen Granulozyten (*Ear11*, *Ccl24*) und alternativ aktivierten Makrophagen (*Arg1*, *Chi3l4*) in Verbindung gebracht wird (Cormier *et al.*, 2002, Martinez *et al.*, 2009). Diese Ergebnisse wurden durch RT-PCR verifiziert (Abb.3.4.8 B).



Abbildung 3.4.8 Affymetrix-Genchip- und RT-PCR-Analyse von Knochenmarkkulturen nach Kultivierung mit IL-33: A. Knochenmarkkulturen wurden 6 Tage kultiviert. IL-33 (100ng/ml) wurde ab dem Tag des Ausplattierens zu den Kulturen gegeben. Die Zugabe M-Csf und Rankl erfolgte 3 Tage nach dem Ausplattieren. Links sind Gene aufgeführt, welche auch im Osteoblasten durch IL-33 in ihrer Expression verändert wurden. B. Die bei der Genchip-Analyse beobachteten Regulationen wurden durch RT-PCR in unabhängigen Kulturen bestätigt.

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass IL-33 die Generierung eosinophiler Granulozyten und alternativ aktivierter Makrophagen auf Kosten der Formation von Osteoklasten propagierte. Um diese These zu bestätigen, wurden FACS-Analysen durchgeführt (Abb.3.4.9). Hierbei diente CCR3 als Marker für eosinophile Granulozyten, Ly-6G als Marker für neutrophile Granulozyten, CD23 als Marker für eosinophile und basophile Granulozyten und CD206 als Marker für alternativ aktivierte Makrophagen (Voehringer *et al.*, 2007, Abbitt *et al.*, 2009). Die Analysen zeigten, dass die Zugabe von IL-33 in der Tat die Bildung eosinophiler Granulozyten und basophiler Granulozyten zur Folge hatte, die Zahl der neutrophilen Granuolzyten wurde dagegen durch IL-33 Zugabe nicht signifikant verändert. Die Zahl der CD206-positiven Zellen war in den mit IL-33 behandelten Kulturen signifikant erhöht, dies bestätigte die Generierung alternativ aktivierter Makrophagen. Zudem kam es in den mit IL-33 behandelten Kulturen bedingt durch ein höhere Proliferation im Vergleich zur Kontrolle zu einer signifikanten Erhöhung der Zellzahl, dabei stieg die Zahl der Il1r11 (ST2)- positiven Zellen ebenfalls signifikant an (Abb.3.4.9 D).



Abbildung 3.4.9 FACS-Analyse von Knochenmarkzellen nach Kultivierung mit IL-33: A. Die Knochenmarkkulturen wurden in Anwesenheit von 50ng/ml IL-33 6 Tage kultiviert (M-Csf und Rankl Zugabe erfolgte nach drei Tagen). Anhand der angegebenen Marker wurden die einzelnen Zellpopulationen identifiziert. Abgebildet sind repräsentative Rohdaten. B. Die Auswertung wurde anschließend als prozentualer Anteil der Gesamtzellzahl angegeben. C und D. Zudem wurden die Zellzahlen vor den FACS-Analysen und der Anteil ST2- positiver Zellen in den Kulturen bestimmt.

So konnte die Wirkung von IL-33 auf Knochenmarkzellen *in vitro* näher charakterisiert werden. Es stellte sich aber nun die Frage, ob diese Wirkung von IL-33 auch *in vivo* eine Rolle spielte. Hierzu wurden *ll1rl1*-defiziente Mäuse auf eine mögliche Veränderung der Knochenmasse untersucht. Die ersten untersuchten Tiere stammten aus der Arbeitsgruppe von Prof. Georg Schett, aber im Laufe des Projektes wurde eine eigene Mauslinie aufgebaut, mit der die Versuche fortgesetzt wurden. Im Alter von 6 Wochen zeigten die analysierten *ll1rl1*-defizienten Tiere sowohl im Wirbelkörper (Abb.3.4.10 A) als auch in Röhrenknochen (Abb.3.4.10 B) eine signifikante Erniedrigung der Knochenmasse.



Abbildung 3.4.10 Unentkalkte Wirbelkörper- und Tibia-Histologie von Wildtyp- und *Il1rl1*-defizienten Mäusen: A. Im Alter von 6 Wochen wurden *Il1rl1*-defiziente Mäuse und die adäquaten Kontrollen (n=4) unentkalkt histologisch aufgearbeitet (4µm dicke Schnitte der Wirbelkörper L1-L4) und nach von Kossa gefärbt. Aufgeführt ist die Quantifizierung des Knochenvolumens (BV) bezogen auf das Gewebevolumen (TV). B. Zudem wurden Röhrenknochen dieser Tiere (Tibia) hinsichtlich ihrer Knochenmasse analysiert.

Nun war die Frage, ob der beobachtete Phänotyp der *Il1rl1*-defizienten Tiere durch eine veränderte Knochenformation und/oder durch eine veränderte Knochenresorption bedingt war. Hierfür wurde eine dynamische histomorphometrische Analyse durchgeführt (Abb.3.4.11 A), welche aber keine signifikanten Unterschiede in der Knochenformation bei den untersuchten Tieren zeigte (Abb. 3.4.11 B). Auch die Zahl der Osteoblasten war nicht signifikant verändert (Abb.3.4.11 B).



Abbildung 3.4.11 Quantifizierung der Knochenformation in Wildtyp- und *Il1rl1*-defizienten Mäusen: A. Die Mäuse (n=4) wurden in einem Abstand von sieben Tagen mit Calcein markiert und anschließend wurde die Knochenbildung durch dynamische Histomorphometrie quantifiziert. B. Die Quantifizierung der Osteoblastenzahl (ObN/BPm) durch histomorphometrische Analyse von Wirbelkörperschnitten sowie die Knochenbildungsrate (BFR) sind hier aufgeführt.

Da diese Analyse keine signifikanten Unterschiede zeigte, wurden nun die Parameter der Knochenresorption quantifiziert. Hier konnte nicht nur eine signifikant höhere Osteoklastenzahl, sondern auch eine signifikante Erhöhung der Osteoklastenoberfläche gefunden werden (Abb. 3.4.12).



Abbildung 3.4.12 Quantifizierung der Osteoklastenanzahl und der Osteoklastenoberfläche von Wildtypund *Il1rl1*-defizienten Mäusen: Dargestellt ist die Auswertung der histomorphometrischen Analyse von Wirbelkörperschnitten (n=4), Quantifiziert wurden die Anzahl der Osteoklasten (OcN/BPm) und die Osteoklasten-Oberfläche (OcS/BS).

Diese Ergebnisse zeigten, dass IL-33 eine physiologische Rolle bei der Regulation des Knochenumbaus besitzt. So konnten die Zellkultur-Ergebnisse, bei denen IL-33 eine inhibitorische Wirkung auf die Osteoklastogenese vermittelte, bestätigt werden. Zur Kontrolle wurden nun Knochenmarkszellen aus *Il1rl1*-defizienten Mäusen (Abb.3.4.13 A) isoliert und in Anwesenheit von IL-33, M-Csf und Rankl *ex vivo* zu Osteoklasten differenziert. In *Il1rl1*-defizienten Kulturen wurden die Osteoklastenmarker wie z.B. *Nfatc1* oder *Oscar* durch IL-33 nicht in ihrer Expression inhibiert (Abb.3.4.13 B). Ein Anstieg der Expression von Markern wie *Arg1*, welche für die Anwesenheit von alternativ aktivierten Makrophagen spricht, konnte ebenfalls nicht mehr nachgewiesen werden. Zudem kam es im Gegensatz zu Wildtyp-Kulturen nach Zugabe von IL-33 in *Il1rl1*-defizienten Kulturen zu keiner Inhibition der Osteoklastogenese (Abb.3.4.13 C).



Abbildung 3.4.13 Stimulierung von WT- und *Il1rl1*-defizienten Knochenmarkzellen mit IL-33: A. Genotypisierung der *Il1rl1-/-* Mäuse. B. WT- und *Il1rl1*-defiziente Knochenmarkzellen wurden in Anwesenheit von 50ng/ml IL-33 6 Tage in Anwesenheit von M-Csf und Rankl kultiviert. Die Abwesenheit des funktionellen *Il1rl1* Allels wurde durch RT-PCR bestätigt. Als Marker der alternativen Makrophagen Aktivierung wurde die Expression von *Arg1* verwendet. *Nfatc1* und *Oscar* dienten als Osteoklastenmarker. C. Die Kulturen wurden auf die Bildung von multinukleären, TRAP-positiven Zellen untersucht. Angegeben ist außerdem die Quantifizierung (n=3 Versuche).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die erhöhte Expression von *Il-33* in den *Col1a1-Krm2*transgenen Osteoblasten keinen Erklärungsansatz für die in diesen Tieren beobachtete erhöhte Knochen-Resorption liefern konnte. Vielmehr handelte es sich bei IL-33 um einen hochpotenten Inhibitor der Osteoklasten-Formation, wodurch es möglich sein könnte, dass die Überproduktion von IL-33 den Knochen-Resorptions-Phänotyp der *Col1a1-Krm2* Mäuse sogar abschwächt.

# 3.5 Die Rolle des Wnt-Signalweges bei der Pathogenese des humanen Prostata-Karzinoms

Der Krm2-Ligand DKK1 trägt in Tumorerkrankungen wie dem Prostatakarziniom, dem Mammakarzinom oder dem multiplem Myelom entscheidend zur Ausbildung osteolytischer Läsionen bei (Fulciniti *et al.*, 2009, Heath *et al.*, 2009). Im Falle des Prostatakarzinoms sind zahlreiche Zelllinien erhältlich, die im Tiermodell osteoblastische Knochenmetastasen auslösen. Ein Beispiel hierfür ist die Prostatakarzinom-Zelllinie MDA-Pca-2b (MDA), die osteoblastische Metastasen unter anderem durch die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges im Osteoblasten bewirkt (Li *et al.*, 2008). Eine Prostatakarzinom-Zelllinie, welche osteolytische Metastasen im Tiermodell verursacht, ist die Zelllinie PC-3. Die Ausbildung von Osteolysen durch die PC-3-Zelllinie konnte u.a. auf eine erhöhte Sezernierung von DKK1 zurückgeführt werden (Hall *et al.*, 2005).

Diese beiden Zelllinien sollten nun als Modellsystem für die Aktivierung und die Inhibition des kanonischen Wnt-Signalweges im Osteoblasten genutzt werden, um so eventuelle Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede hinsichtlich der Wirkung von Krm2 auf die Genexpression im Osteoblasten zu finden. Hierzu wurden konditionierte Medien beider Zelllinien benutzt, welche auf primäre Osteoblasten gegeben wurden. Zuerst wurde die Anwesenheit von DKK1 im konditionierten Medium der osteolytischen Zelllinie PC-3 und die Abwesenheit in dem der osteoblastischen Zelllinie MDA bestätigt (Abb. 3.5.1).



Abbildung 3.5.1 Nachweis von DKK1 in konditioniertem Medium der PC-3 Zelllinie: In einer Westernblot-Analyse wurde PC-3 (PC-3 kond.)- und MDA (MDA kond.)-konditioniertes Medium auf den Gehalt an DKK1 untersucht. Als Kontrolle dienten die normalen Wachstumsmedien. Bei den konditionierten Medien handelte es sich um serum-freies alpha-MEM, was 3 Tage auf den Zelllinien verblieb, bevor es für die Stimulation primärer Osteoblasten verwendet wurde.

Zunächst wurde überprüft, ob PC-3 konditioniertes Medium einen inhibitorischen Einfluss auf Lrp6- und  $\beta$ -Catenin-abhängige Signalwege hatte, wie es auch schon bei der Krm2
Uberexpression in primären Osteoblasten beobachtet worden war. Es zeigte sich, dass PC-3konditioniertes Medium die Wnt3a-vermittelte Lrp6- und  $\beta$ -Catenin-Aktivierung inhibieren konnte (Abb.3.5.2). Dies äußerte sich in einer verringerten Lrp6-Phosphorylierung und höheren Mengen an phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin in Osteoblasten nach Wnt3a Exposition. Im Vergleich hierzu trat bei MDA-konditioniertem Medium keine Inhibition dieses Signalweges auf. Es konnte jedoch bei diesen Versuchen auch keine eindeutige Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges im Osteoblasten durch MDA- konditioniertes Medium gefunden werden.



Abbildung 3.5.2 Westernblot-Analyse primärer Osteoblasten nach Inkubation mit PC-3 und MDAkonditionierten Medien: Primäre Osteoblasten wurden 10 Tage nach der Differenzierung mit dem jeweiligen konditionierten Medium inkubiert und zusätzlich für 30 Minuten mit 100ng/ml Wnt3a stimuliert. Anschließend wurden die Mengen an inaktivem, phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin und aktiviertem, phosphoryliertem Lrp6 bestimmt.

Nun stellte sich die Frage, ob die konditionierten Medien dieser Zelllinien auch den entsprechenden Einfluss auf die Genexpression in Osteoblasten haben würden. So wurde die Expression von *Axin2* und *Apcdd1*, welche prominente Wnt-Zielgene darstellen, durch qRT-PCR quantifiziert (Abb.3.5.3). PC-3-konditioniertes Medium führte zu einer Erniedrigung der *Axin2* und *Apcdd1* Expression, während MDA-konditioniertes Medien in der Lage war, die Expression dieser Gene zu erhöhen, was für eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges durch MDA-Zellen sprach. Als Kontrolle wurde der Effekt von Dkk1, Wnt3a und Wnt5a (einem nicht kanonischen Wnt-Liganden, durch welchen es nicht zu einer Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges kommen sollte) auf die Expression von *Axin2* und *Apcdd1* untersucht. Hier wurde auch eine erniedrigte Expression dieser Gene durch

Dkk1-Einwirkung gefunden, während Wnt3a die Expression von *Axin2* und *Apcdd1* induzierte. Wnt5a hatte hingegen keinen Effekt auf die Expression dieser Wnt-Zielgene.



Abbildung 3.5.3 Einfluss von PC-3- und MDA-konditioniertem Medium auf die Expression der Wnt-Zielgene Axin2 und Apcdd1: 10 Tage nach Differenzierung wurden primäre Osteoblasten 6 Stunden mit konditionierten Medien der Zelllinien PC-3 und MDA stimuliert. Als Kontrolle dienten 100ng/ml Wnt3a, 250ng/ml Wnt5a und 250ng/ml Dkk1. Die Expression der Gene wurde mit qRT-PCR bestimmt, angegeben sind die relativen Unterschiede der Expression zur Kontrolle (Medium mit PBS) (n=3 unabhängige Kulturen).

Die Analysen bestätigten, dass die konditionierten Medien dieser Zelllinien als Modellsystem für die Aktivierung und Inhibition des kanonischen Wnt-Signalweges im Osteoblasten verwendet werden konnten. Das System konnte also nun genutzt werden, um die Mechanismen zu verstehen, die in *Col1a1-Krm2* transgenen Mäusen zur Ausbildung von Osteolysen führten. Hierzu wurde eine *Affymetrix*-Genchip-Analyse durchgeführt, bei der die Genexpression primärer Osteoblasten, welche mit MDA-konditioniertem Medium stimuliert wurden, mit der Genexpression von Osteoblasten, welche mit PC-3-konditioniertem Medium stimuliert wurden, verglichen wurde (Abb.3.5.4). Hier fiel auf, dass unter den durch PC-3Medien reprimierten Genen viele waren, welche auch in Osteoblasten *Col1a1-Krm2*transgener Mäuse verringert exprimiert wurden. Dazu gehörten unter anderem *Smpd3* und *Dmp1*. Auffällig war zudem, dass bekannte Wnt-Zielgene wie *Dkk1* und *Apcdd1* in den mit PC-3 Medien behandelten Proben eine schwächere Expression aufwiesen, was die vorangegangenen Analysen bestätigte. Der deutlichste Unterschied hinsichtlich der Wirkung der konditionierten Medien auf die Genexpression in primären Osteoblasten war jedoch völlig unerwartet. In den mit PC-3-konditioniertem Medium stimulierten Osteoblasten wurden zahlreiche Gene stärker als in mit MDA-konditioniertem Medium stimulierten Osteoblasten exprimiert. Darunter waren vor allem Chemokine der Ccl-und Cxcl-Familie, wie z.B. *Ccl2* oder *Cxcl1*, aber auch das Gen *Tnfsf11*, das für das Zytokin Rankl kodiert (Abb.3.5.4).



Abbildung 3.5.4 Analyse der differentiellen Genexpression in primären Osteoblasten nach Stimulation mit PC-3- und MDA-konditioniertem Medium: 10 Tage nach Differenzierung wurden primäre Osteoblasten für 6 Stunden mit konditionierten Medien der PC-3- und MDA-Zelllinien behandelt. Aufgeführt sind die logarithmischen Signalverhältnisse (SLR) der Gene, welche durch PC-3-Medien im Vergleich zu MDA-Medien maximal reguliert wurden.

qRT-PCR Analysen, die der Validierung der *Affymetrix*-Genchip-Analyse dienten, zeigten, dass PC-3 konditioniertes Medium die Expression von *Dmp1*, *Dkk1* und *Smpd3* im Osteoblasten signifikant inhibierte (Abb.3.5.5). Ein zweites Ergebnis fiel aber unerwartet deutlich aus: PC-3-konditioniertes Medium löste eine erhöhte Expression zahlreicher Chemokine wie etwa *Cxcl1*, *Cxcl5* und *Cxcl12*, in Osteoblasten auslöste. Auch der Schlüsselfaktor der Osteoklastogenese *Tnfsf11*, wurde in seiner Expression durch PC-3-konditioniertes Medium verstärkt. MDA-konditioniertes Medium hatte dagegen keinen Einfluss auf die Expression der Chemokine (Abb.3.5.5), führte aber auch zu einer gesteigerten *Tnfsf11*-Expression in den Osteoblasten. Die *Tnfrsf11b*-Expression wurde durch keine der Zelllinien signifikant verändert. Dies waren wichtige Befunde, da schon bekannt war, dass PC-3-Zellen durch Sezernierung von Chemokinen wie Ccl2 in der Lage sind, Osteoklasten zu aktivieren, was zur Ausbildung von Osteolysen führt (Li *et al.*, 2009).



Abbildung 3.5.5 qRT-PCR Analyse der Genexpression primärer Osteoblasten nach Inkubation mit konditionierten Medien von MDA- und PC-3-Zellen: Primäre Osteoblasten wurden 10 Tage nach Differenzierung für 6 Stunden mit konditionierten Medien inkubiert. Dargestellt sind die relativen Unterschiede in der Genexpression bezogen auf die Kontrolle (n=3).

Im Folgenden wurde untersucht, wie dieser starke Anstieg der Chemokin-Expression in den Osteoblasten erklärt werden konnte, da diese nicht durch kanonische Wnt-Signaltransduktion beeinflusst wird, was durch eigene Stimulations-Experimente mit Dkk1 und Wnt3a bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Da schon bekannt war, dass die *Ccl2*-Expression im

Osteoblasten durch Stat- und p42/44 (Erk)-abhängige-Signalwege reguliert wird, wurde überprüft, ob PC-3 Zellen Stat-Signalwege im Osteoblasten aktivieren konnten (Lin *et al.*, 2004). Dies war in der Tat der Fall, denn es kam durch PC-3-konditioniertes Medium zu einer Aktivierung von Stat1-, Stat3-, Stat5- und p42/44-Signalwegen, was sich in einer verstärkten Phosphorylierung dieser Proteine zeigte (Abb.3.5.6).



Abbildung 3.5.6 Westernblot-Analyse primärer Osteoblasten nach Stimulation mit PC-3 und MDA konditionierten Medien: Zehn Tage nach der Differenzierung wurden primäre Osteoblasten 30 Minuten mit konditionierten Medien der beiden Zelllinien stimuliert und die Phosphorylierung von Stat1, Stat3 und Stat5 bzw. Erk überprüft.

Daher stellte sich die Frage, wie sich eine Inhibition von Stat- und p42/44-Signalwegen auf die Expression der Chemokine und *Tnfsf11* auswirken würde. Hierzu wurden spezifische Inhibitoren für Stat1- (Fludarabine), Stat3/5- (Piceatannol) und p42/44- (PD98059) Signalwege verwendet, um ihre Aktivierung durch PC-3-konditioniertes Medium zu verhindern. Als Kontrolle wurde die Effektivität der Inhibition in Westernblot-Analysen überprüft (Abb.3.5.7 A). Durch PD98059 wurde selektiv die Phosphorylierung von p42/44 verringert und durch Piceatannol die Phosphorylierung von Stat3 und Stat5. Fludarabine zeigte sich nicht als effektiver Inhibitor des Stat1-Signalweges (Daten nicht gezeigt). Nun wurde die Expression ausgewählter Chemokine und *Tnfsf11* nach Exposition mit PC-3-konditioniertem Medium mit oder ohne den jeweiligen Inhibitor durch qRT-PCR quantifiziert (Abb.3.5.7 B). Es zeigte sich, dass die Inhibition von Stat3/5 durch Piceatannol ausreichte, um den Anstieg der Expression von *Cxcl5*, *Cxcl12* und *Tnfsf11* durch PC-3-konditioniertes

Medium zu verhindern. Die Inhibition von Stat3/5 hatte jedoch keinen Einfluss auf die *Cxcl1* Expression. Dies war der Beweis, dass die PC-3 Zelllinie *in vitro* nicht durch Inhibition Lrp6-abhängiger Signalwege die Expression von *Tnfsf11* im Osteoblasten induzierte, sondern durch eine Aktivierung Stat3/5-abhängiger Signalwege.



Abbildung 3.5.7 Analyse der selektiven Inhibition von Stat- und p42/44-Signalwegen in Osteoblasten: A. Primäre Osteoblasten wurden mit den jeweiligen Inhibitoren behandelt und mit PC-3-konditioniertem Medium stimuliert. Anschließend wurde die Phosphorylierung von p42/44 und Stat3/5 in Westernblot-Analysen überprüft. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin. B. Die Expression der Chemokine *Cxcl1*, *Cxcl5* und *Cxcl12* sowie die des Zytokins *Tnfsf11* wurde durch qRT-PCR quantifiziert. Dargestellt sind die relativen Unterschiede der Expression bezogen auf die mit PC-3-konditionierten Medien stimulierten Proben. (n=3) (3.5.7 B)

Bis zu diesem Punkt wurden alle Versuche mit primären Osteoblasten durchgeführt, welche aus Schädeldächern neugeborener Mäuse isoliert wurden. Um zu überprüfen, ob dieser Mechanismus auch in primären humanen Osteoblasten eine Rolle spielen könnte, wurden diese Versuche nun auch mit primären humanen Osteoblasten durchgeführt (Abb.3.5.8). Hier zeigte sich, dass PC-3-konditioniertes, aber nicht MDA-konditioniertes Medium eine gesteigerte Expression der *CXCL1*, *CXCL5* und *TNFSF11* auslöste (Abb.3.5.8 A). Die Behandlung der humanen Osteoblasten hatte zudem auch eine STAT3- und STAT5-Phosphorylierung zur Folge (Abb.3.5.8 B). Die Inhibition mit Piceatannol verhinderte einen Anstieg der *CXCL5* und *TNFSF11* Expression (Abb.3.5.8 B), hatte aber keinen Einfluss auf die *CXCL1* Expression (Daten nicht gezeigt). Diese Versuche bestätigten zum größten Teil die Ergebnisse mit den murinen Osteoblasten.



Abbildung 3.5.8 Einfluss von PC-3- und MDA-konditioniertem Medium auf primäre humane Osteoblasten: Durch qRT-PCR wurde die Expression von *CXCL1*, *CXCL5* und *TNFSF11* in humanen primären Osteoblasten nach 6-stündiger Inkubation mit dem jeweiligen konditionierten Medium quantifiziert (3.5.8 A). Zudem wurde der Anteil von phosphoryliertem STAT3 und STAT5 nach 30-minütiger Inkubation durch Westernblot bestimmt (3.5.8 B) Durch qRT-PCR wurde die Wirkung des STAT3/5-Inhibitors Piceatannol auf die Expression von *CXCL5* und *TNFSF11* durch qRT-PCR quantifiziert, dabei ist der relative Unterschied der Expression in Bezug auf die PC-3 stimulierten Proben dargestellt (n=3) (3.5.8 C).

Um erste Anhaltspunkte für die Abläufe im wirklichen Krankheitsgeschehen zu erhalten, wurden nun humane Tumorbiopsien auf eine osteoblasten-spezifische Aktivierung von

STAT3 und STAT5 in osteoblastischen und osteolytischen Metastasen des humanen Prostata-Karzinoms untersucht (Abb.3.5.9). Hier war neben einer erhöhten Anzahl TRAP-positiver Zellen eine erhöhte Phosphorylierung von STAT3 in osteolytischen, nicht aber in osteoblastischen Metastasen von Prostata-Karzinom-Biopsien nachweisbar. Als Kontrolle dienten Biopsien des Mamma-Karzinoms, bei denen es immer zu einer Ausbildung von Osteolysen kommt. Hier war auch phosphoryliertes STAT3 nachweisbar. Phosphoryliertes STAT5 konnte in keiner der Biopsien in Osteoblasten nachgewiesen werden.



Abbildung 3.5.9 Immunhistochemische Analyse entkalkter, humaner Biopsien von Knochenmetastasen: Knochenmetastasen von Prostata-Karzinomen wurden anhand ihrer Morphologie und dem Auftreten TRAPpositiver Zellen in osteoblastische- und osteolytische Metastasen eingeteilt. Als Kontrolle dienten osteolytische Metastasen des Mamma-Karzinoms. Die Aktivierung von STAT3 in Osteoblasten wurde mit einem phospho-STAT3-spezifischen Antikörper detektiert.

## 4. Diskussion

# 4.1 Die Rolle von Krm2 für die Regulation des Wnt/β-Catenin-Signalwegs in Osteoblasten

Der Wnt/β-Catenin-Signalweg spielt für die Regulation des Knochenumbaus eine entscheidende Rolle. So steuert er nicht nur die Linienentscheidung zwischen Chondrozyten (Knorpelzellen) und Osteoblasten, sondern reguliert in differenzierten Osteoblasten die Expression von Tnfrsf11b, wodurch es zu einer nicht-zellautonomen Steuerung der Knochenresorption kommt (Day et al., 2005, Glass et al., 2005). Bei Krm2 handelt es sich um ein Transmembranprotein, das in Synergie mit Proteinen der Dickkopf-Familie den kanonischen Wnt-Signalweg inhibieren kann (Mao et al., 2002, Mao und Niehrs, 2003). In der vorliegenden Arbeit konnten zwei Mauslinien, bei denen Krm2 selektiv im Osteoblasten unter der Kontrolle eines 2,3kb-Fragmentes des Typ I-Kollagen-Promoters überexprimiert wurde, verwendet werden, um die Rolle des kanonischen Wnt-Signalwegs im Osteoblasten näher zu untersuchen. In Northernblot-Analysen konnte eine starke Überexpression von Krm2 im Knochen transgener Mäuse festgestellt werden. Eine Expression des Transgens in anderen Geweben konnte nur im Auge detektiert werden. Dies entsprach auch den Erwartungen, da das verwendete 2,3kb.-Fragment des Typ I-Kollagen-Promoters im Gegensatz zu einem 3,6kb-Fragment eine selektive Überexpression im Osteoblasten ermöglicht (Dacquin et al., 2002, Boban et al., 2006).

Bei der Analyse der *Collal-Krm2* Mäuse durch unentkalkte Histologie zeigte sich eine signifikante Reduktion der Knochenmasse (BV/TV) in allen analysierten Alterstufen (2, 6 und 24 Wochen), wobei es in den transgenen Tieren in höheren Altersstufen fast zu einem totalen Verlust des trabekulären Knochens kam. Dieser Phänotyp ging mit einer erniedrigten biomechanischen Belastbarkeit einher und wurde durch eine signifikante Verringerung der Knochenformation sowie durch eine signifikante Erhöhung der Knochenresorption ausgelöst. Dies war ein sehr interessanter Befund, da es sich bei Krm2 um einen bekannten Inhibitor von Lrp6- und  $\beta$ -Catenin-abhängigen Signalwegen handelt (Mao *et al.*, 2002). Dabei verursacht aber eine hypomorphe Mutation des *Lrp6*-Gens in der so genannten Ringelschwanz-Maus eine Verringerung der Knochenmasse, welche alleine auf einer erhöhten Knochenresorption beruht (Kubota *et al.*, 2008). Im Einklang damit steht der Phänotyp von Mäusen mit einer osteoblasten-spezifischen Inaktivierung von  $\beta$ -Catenin, welche ebenfalls in einer Verringerung der Knochenmasse, bedingt durch eine erhöhten Knochenresorption, resultiert

(Glass *et al.*, 2005). *Col1a1-Krm2* transgene Mäuse zeigten aber nicht nur eine erhöhte Knochenresorption sondern auch eine erniedrigte Knochenformation.

Dieser Befund wurde anfangs mit einer Inhibition des Wnt-Ko-Rezeptors Lrp5 durch Krm2 erklärt werden. So weisen Lrp5-defiziente Mäuse eine verringerte Knochenmasse auf, hervorgerufen durch eine erniedrigte Knochenformation (Kato et al., 2002). Dies wird aber durch neuere Studien in Frage gestellt, da eine Osteoblasten-spezifische Deletion des Lrp5-Gens zu keiner signifikanten Verringerung der Knochenmasse führt, was für einen nichtzellautonomen Defekt spricht. In der Tat steuert Lrp5 die Knochenformation über die Regulation der Serotonin-Synthese im Duodenum, und Serotonin beeinflusst dann durch Bindung an Htr1b und Regulation von CREB die Proliferation von Osteoblasten (Yadav et al., 2008, Yadav et al., 2010). Diese neuen Ergebnisse ließen eine Erklärung der verringerten Knochenformation der Collal-Krm2 transgenen Mäuse über eine Inhibition von Lrp5 durch Krm2 im Osteoblasten nicht zu. Um potenzielle Ansatzpunkte für eine Erklärung des Phänotyps der Collal-Krm2 transgenen Mäuse zu finden, wurden nach der histologischen Charakterisierung des Mausmodells zelluläre und molekulare Analysen durchgeführt. Diese ergaben eine erhöhte Proliferation der transgenen Osteoblasten, welche einherging mit einer verringerten Mineralisation der extrazellulären Matrix. In Westernblot-Analysen konnte gezeigt werden, dass Krm2 die Aktivierung von Lrp6 und β-Catenin durch Wnt3a inhibierte. In Genchip-Analysen fiel auf, dass zahlreiche Gene wie etwa Dmp1, Phex, Smpd3 und Tnfrsf11b in transgenen Osteoblasten verringert exprimiert wurden, während wichtige Osteoblastenmarker wie Collal, Bglap und Ibsp nicht in ihrer Expression verändert waren.

Diese Ergebnisse bestätigten die vermutete Inhibition Lrp6- und  $\beta$ -Catenin-abhängiger Signalwege durch Krm2, wodurch die erhöhte Resorption erklärt werden konnte, da auch *in vivo* eine verringerte *Tnfrsf11b*-Expression und Opg-Produktion in *Col1a1-Krm2* Mäusen gefunden wurde, was dem Phänotyp von Mäusen mit einer osteoblasten-spezifischen Deletion von  $\beta$ -Catenin entspricht, welche aufgrund einer geringeren Opg-Produktion im Osteoblasten eine erhöhte Knochenresorption aufweisen (Glass *et al.*, 2005). Die verringerte Expression der Gene *Dmp1* und *Phex*, welche terminale Osteoblasten. Durch andere konnte gezeigt werden, für eine verringerte Differenzierung der Osteoblasten. Durch andere konnte gezeigt werden, dass Wnt11 über gesteigerte Expression von *R-Spondin2*, welches einen Krm-Interaktionspartner und Wnt-Agonisten darstellt, die Expression von *Dmp1* und *Phex* in MC3T3 Zellen erhöht (Friedmann *et al.*, 2009). Da dies eine gegenläufige Regulation darstellt, würde dieser Befund durchaus Sinn ergeben. Die Inhibition von *Smpd3*, welches für eine Sphingomyelin-Phosphodiesterase kodiert, könnte ebenfalls zu der Schwere des Phänotyps beitragen, da eine Deletion dieses Gens in den so genannten fro/fro Mäusen zu einem Osteogenesis imperfecta ähnlichem Phänotyp führt (Aubin *et al.*, 2005). Normalerweise beruht dieses Krankheitsbild auf einem Kollagendefekt, was bei der fro/fro Maus aber nicht der Fall ist. Dies stellt eine Übereinstimmung zu den *Collal-Krm2* Mäusen dar.

Dass die Überexpression von Krm2 im Osteoblasten zu einer Reduktion der Knochenformation führte, war nicht selbstverständlich und ließ sich durch diese Ergebnisse auch nicht vollständig erklären. Es stellte sich z.B. die Frage, wie der schwerwiegende Phänotyp der Collal-Krm2 transgenen Mäuse erklärt werden konnte, schließlich zeigten diese Tiere einen schwereren Phänotyp als Collal-Dkkl transgene Mäuse (Li et al., 2006). Die unphysiologische Stärke der Überexpression gepaart mit einer unterschiedlichen Anzahl der inserierten Transgene von Krm2 könnte zu dem Schweregrad des Phänotyps der Collal-Krm2 Mäuse beitragen. So konnte die Krm2-Expression in Vorarbeiten nur in einem kurzen Abschnitt der Differenzierung primärer Osteoblasten detektiert werden. In späteren Stadien war ein Nachweis dagegen nicht mehr möglich. Durch die Expression des Transgens wurde das Abschalten der Krm2 Expression nun aber verhindert, was zu einer untypischen Aktivität der Osteoblasten führen könnte. Da diese unphysiologische Überexpression des Transgens sich wahrscheinlich im Vergleich zur Dkkl-Überexpression nur in einer stärkeren Inhibition der Knochenformation bemerkbar machen würde, könnten weitere Mechanismen eine Rolle spielen.

Nicht vergessen werden darf in diesem Zusammenhang, dass die Funktion von Dkk2 von der Anwesenheit von Krm2 abhängig ist (Mao und Niehrs, 2003). *Dkk2*-defiziente Mäuse weisen interessanterweise keine erhöhte Knochenmasse, sondern eine erniedrigte Knochenmasse auf, wobei Dkk2 die terminale Differenzierung von Osteoblasten propagiert (Li *et al.*, 2005). Die Anwesenheit des Krm2-Transgens in späten Stadien der Osteoblastendifferenzierung könnte durchaus zu einer veränderten Wirkungsweise von Dkk2 führen. Interessant wäre zu untersuchen, ob *Dkk2*-defiziente *Col1a1-Krm2* Mäuse eine erhöhte Knochenmasse gegenüber *Col1a1-Krm2* Mäusen aufweisen würden.

Die physiologische Relevanz von Krm2 bleibt zudem noch abschließend zu klären, da gefunden wurde, dass nur Mäuse, in denen beide *Krm*-Gene deletiert sind eine erhöhte Knochenmasse aufgrund einer erhöhten Knochenformation aufweisen (Ellwanger *et al.*, 2008). Da eine *Krm2*-Überexpression in unserem Modell eine signifikante Verringerung der Knochenmasse zur Folge hat, bleibt diese beschriebene Redundanz anzuzweifeln. Fraglich ist

zudem auch die unbeeinflusste Resorption in den Krm1-/-Krm2-/- Mäusen, da die Überexpression von *Krm2* eine erhöhte Resorption zur Folge hatte. Neuere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe in Kollaboration mit Dr. Roland Baron zeigten, dass auch Krm1-/-Mäuse und Krm2-/- Mäuse in höheren Alterstufen aufgrund einer gesteigerten Knochenbildungsrate eine signifikante Erhöhung der Knochenmasse aufweisen, was die Vermutung zulässt, dass Krm2 eine physiologische Funktion im Osteoblasten einnimmt. Daher erscheint es sinnvoll, die Rolle von Krm-Proteinen z.B. in humanen Osteoblasten näher zu untersuchen, da diese Transmembran-Proteine ein potentielles Ziel für eine osteoanabole Therapie darstellen könnten.

## 4.2 Die Rolle von IL-33 im Knochenumbau

In Genchip-Analysen bei denen Wildtyp- mit *Col1a1-Krm2*-transgenen Osteoblasten verglichen wurden, zeigte sich eine verstärkte Expression von *IL-33* in den transgenen Osteoblasten. Dieses Ergebnis konnte in immunhistologischen Analysen bestätigt werden. Da eine erhöhte IL-33 Produktion mit rheumatoider Arhtritis in Verbindung gebracht wird (Xu *et al.*, 2008, Palmer *et al.*, 2009), bei der es zu einer Knochenzerstörung und einer systemischen Verringerung der Knochenmasse kommen kann, lag die Vermutung nahe, dass die *IL-33*-Überexpression in *Col1a1-Krm2* Mäusen zu deren Phänotyp eine erhöhte Knochenresorption und osteolytische Läsionen gehören, beitrug. Aus diesem Grund sollte zunächst der Einfluss von IL-33 auf Knochenzellen untersucht werden.

Bei IL-33 handelt es sich um ein Mitglied der IL-1 Familie, die aus IL-1a, IL-1b, IL-18 und IL-33 besteht (Liew *et al.*, 2010, Gabay und McInnes, 2009). Bis auf IL-33 ist der Einfluss aller Mitglieder dieser Familie auf den Knochenumbau schon länger bekannt (Lorenzo *et al.*, 2008). IL-1 ist ein potenter Stimulator der Knochenresorption (Zwerina *et al.*, 2007, Polzer *et al.*, 2010), IL-18, welches von Osteoblasten sezerniert wird, wirkt dagegen mitogen auf Osteoblasten (Cornish *et al.*, 2003) und inhibiert die Osteoklastogenese über Stimulation der *GM-CSF* Expression durch T-Zellen (Udagawa *et al.*, 1997, Horwood *et al.*, 1998).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der IL-33 Rezeptor *Il1rl1 (ST2)* prädominant im Knochen exprimiert wurde und dass rekombinantes IL-33 einen direkten Einfluss auf p42/44- und Stat-abhängige Signalwege im Osteoblasten vermittelt, was bereits für basophile und eosinophile Granulozyten gefunden wurde (Pecaric-Petkovic *et al.*, 2009). Der Einfluss von IL-33 auf die Mineralisation primärer Osteoblasten konnte jedoch nicht quantifiziert werden, da die Anzahl der mineralisierten Nodule abnahm, die flächige

Mineralisation durch IL-33 jedoch zunahm. In einer Genchip-Analyse mit nachfolgender Bestätigung durch qRT-PCR konnte eine erhöhte *Tnfsf11*- und erniedrigte *Tnfrsf11b*-Expression im Osteoblasten durch IL-33 festgestellt werden, was durchaus zu den Ergebnissen anderer passte. So war in einem Maus-Arthritis-Modell die *Tnfsf11*-Expression in Gelenken nach Behandlung mit einem ST2- blockierenden Antikörper herabgesetzt (Palmer *et al.*, 2009) und die IL-33-vermittelte Induktion der *GM-Csf*-Expression stellte eine Gemeinsamkeit zu dem Wirkmechanismus von IL-18 dar (Udagawa *et al.*, 1997, Horwood *et al.*, 1998). Nun stellte sich die Frage, ob IL-33 durch die Induktion der *GM-Csf*- und *Tnfsf11*-Expression im Osteoblasten die Bildung von Osteoklasten oder deren Aktivität verstärken kann, da es sich bei Rankl um den Schlüsselfaktor der Osteoklastogenese handelt und auch GM-Csf eine stimulatorische Wirkung auf Osteoklasten haben kann (Park *et al.*, 2007)

Die nachfolgenden Analysen zeigten jedoch, dass IL-33 die Bildung und Resorptionsfähigkeit von Osteoklasten in Knochenmarkskulturen selbst in Anwesenheit von rekombinantem Rankl potent inhibierte, wodurch eine verstärkte Resorption durch indirekte Wirkung über den Osteoblasten (erhöhte Tnfsf11- und GM-Csf-Expression) ausgeschlossen werden konnte. Durch Genchip- und RT-PCR-Analysen konnte gezeigt werden, dass es trotz dieses unerwarteten Befundes Übereinstimmungen zwischen Osteoblastenund Osteoklastenkulturen in der Genexpression nach IL-33 Stimulation gab. Durch IL-33-Zugabe stiegen in beiden Kulturen z.B. die GM-Csf, IL-1a, IL-1b und IL-6 Expression an, was die Ergebnisse anderer bestätigte (Mayuzumi et al., 2009). Es zeigte sich zudem, dass IL-33 die Expression von Genen wie z.B. Earl1, Arg1 und Chi3l4 induzierte, die mit eosinophilen Granulozyten und alternativ aktivierten Makrophagen in Verbindung gebracht werden (Cormier et al., 2002, Martinez et al., 2009). Neuere Studien konnten dies ebenfalls zeigen, hier konnte IL-33 die alternative Makrophagenaktivierung durch IL-13 verstärken, was sich in einer erhöhten Expression von Arg1 und Ccl24 zeigte (Kurowska-Stolarska et al., 2009. Durch FACS-Analysen konnte dieses Erbgebnis auf zellulärer Ebene bestätigt werden. Dies ließ darauf schließen, dass IL-33 ein TH2-Milieu propagiert, das die Entstehung alternativ aktivierter Makrophagen erklären könnte. So war auch in der Genchip-Analyse die Expression des TH2-Zytokins IL-4 mit einer SLR von 3,2 nach IL-33 Stimulation stark erhöht (Daten nicht gezeigt). IL-4 ist neben IL-13 ein potenter Initiator der alternativen Makrophagenaktivierung (Gordon, 2003).

IL-33 inhibierte zudem die Expression der Osteoklastenmarker *Nfatc1* und *Oscar*. Nfatc1 kodiert für einen Transkriptionsfaktor, ohne dessen Wirkung es zu keiner Bildung differenzierter Osteoklasten kommen kann (Takayanagi et al., 2002). IL-33 inhibierte

demnach die Expression von zwei Schlüsselfaktoren der Osteoklastogenese, da neben der Aktivierung durch Rankl eine Ko-Stimulation durch Moleküle wie Oscar, die mit ITAM (*intracellular tyrosine activation motif*)-Motifen enthaltenen Molekülen wie FcRγ und DAP12 interagieren, für die Differenzierung von Osteoklasten absolut notwendig ist (Koga *et al.*, 2004). Durch die IL-33-vermittelte Inhibition der Expression dieser Moleküle konnte es also nicht zu einer Entstehung von Osteoklasten kommen.

Die Frage, durch welche Zellen die Inhibition der Osteoklastogenese vermittelt wurde und ob IL-4 oder GM-Csf dabei eine Rolle spielten, konnte in dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Interessant wäre, diese Versuche in T-Zell (CD4+, CD8+)-depletierten Kulturen durchzuführen, um so einen T-Zell-vermittelten Mechanismus (in Anlehnung an die Wirkungsweise von IL-18) zu überprüfen. Denkbar wäre auch, die Versuche in Stat6 defizienten Kulturen durchzuführen, da IL-4 und IL-13 über Stat6-vermittelte Signalwege die Osteoklastogenese inhibiert (Moreno *et al.*, 2003). Zudem wäre es notwendig, die Versuche mit aufgereinigten Makrophagen zu wiederholen, da diese direkte Osteoklasten-Vorläuferzellen darstellen. Dies könnte die Frage beantworten, ob IL-33 eine direkte Wirkung auf die osteoklastäre Differenzierung hat. Unabhängig von diesen noch offenen Fragen war es wichtig zu demonstrieren, dass die antiosteoklastogene Wirkung von IL-33 auch *in vivo* relevant sein könnte.

Durch Analyse des Knochenphänotyps *Il1rl1*-defizienter Mäuse konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass diese Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine signifikant erhöhte Osteoklasten-Anzahl aufwiesen, während die Anzahl der Osteoblasten und die Knochenformation nicht signifikant verändert waren. Dies stellte den Beweis dar, dass *Il1rl1*bzw. IL-33-abhängige Signalwege eine physiologische Rolle bei der Regulation des Knochenumbaus spielen. Abzuwarten bleibt, ob *Il-33* defiziente Mäuse, die bis heute noch nicht beschrieben wurden, einen ähnlichen Phänotyp aufweisen. Auch die Analyse von *Il1rap*-defizienten Mäusen hinsichtlich ihres Knochenphänotyps könnte zu einem besseren Verständnis der Wirkungsweise von IL-33 beitragen, da Il1rap als essentieller Ko-Rezeptor von IL-33 fungiert (Ali *et al.*, 2007).

Offen blieb auch die Frage, wie es in den *Col1a1-Krm2* Mäusen zu einer erhöhten Expression von *Il-33* kam und es trotz der inhibitorischen Wirkung von IL-33 auf die Osteoklastogenese in diesen Mäusen zu der erhöhten Knochenresorption kommen konnte. Da der Einfluss von IL-33 in dieser Arbeit nur *in vitro* charakterisiert wurde, blieb deshalb offen, ob die erhöhte IL-33-Expression zu dem Phänotyp der *Col1a1-Krm2* beiträgt. Um diese Frage abschließend

zu klären, erscheint es daher sinnvoll *Il1rl1*-defizienter-*Col1a1-Krm2* Mäuse zu generieren und deren Knochenphänotyp zu analysieren.

# 4.3 Die Rolle des Wnt-Signalwegs bei der Pathogenese des Prostatakarzinoms

Prostatakarzinomzellen metastasieren bevorzugt in den Knochen, was sich hauptsächlich in der Ausbildung osteoblastischer Metastasen äußert. Dabei kommt es einer zu Knochenneubildung mit biomechanisch weniger belastbarem "verwobenen (englisch: woven)" Knochen. Prostatakrebszellen regen durch Wachstumsfaktoren, wie z.B, IGF und Endothelin die Knochenformation an (Mundy, 2002). Durch Prostatakrebszellen sezernierte Wnt-Glykoproteine sind ebenfalls in der Lage die Knochenformation anzuregen (Hall et al., 2005, Hall und Keller, 2006, Dai et al., 2008). Die Prostatakrebszelllinie MDA-PCa-2b (MDA) kann z.B. durch die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs die Knochenbildung verstärken (Li et al., 2008). Knochenmetastasen des Prostatakarzinoms können aber auch Osteolysen zur Folge haben. Die Prostatakrebszelllinie PC-3 verursacht z.B. im Tiermodell Osteolysen, wobei gezeigt werden konnte, dass diese osteolytische Aktivität auf erhöhter Sezernierung von DKK1 beruht, welches einen Inhibitor des kanonischen Wnt-Signalwegs darstellt (Hall et al., 2005, Li et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden nun die Zelllinien MDA und PC-3 als Modellsysteme für die Aktivierung und Inhibition des kanonischen Wnt-Signalwegs verwendet und ihr Einfluss auf primäre Osteoblasten charakterisiert. Dies sollte eventuelle Gemeinsamkeiten zwischen der Wirkung der Zelllinie PC-3 und der Krm2-Überexpression in Collal-Krm2 transgenen Mäusen, bei denen es zur Entstehung osteolytischer Läsionen kam, aufzeigen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PC-3-konditioniertes Medium im Gegensatz zu MDA-konditioniertem Medium Lrp-6 und β-Catenin abhängige Signalwege inhibierte. Dies ging einher mit der Inhibition der Expression von Wnt-Zielgenen wie *Axin2*. Genchip-und qRT-PCR-Analysen bestätigten die Inhibition des kanonischen Wnt-Signalweges durch PC-3 konditioniertes Medium und dessen Induktion durch MDA-konditioniertes Medium. Wichtiger noch war, dass Gene wie *Dmp1* und *Smpd3*, die auch schon durch *Krm2*-Überexpression im Osteoblasten in ihrer Expression inhibiert wurden, durch die osteolytische Zelllinie PC-3 ebenfalls reprimiert wurden. Dieser Mechanismus könnte potenziell zu den Defekten der de novo-Knochenformation, die man sowohl in den *Col1a1-Krm2* Mäusen als auch in den osteolytischen Metastasen beobachten konnte (Abb.3.2.7 C und D) beitragen.

Viel deutlicher als die Inhibition des Wnt-Signalwegs durch PC-3, war die erhöhte Expression von Chemokinen der Ccl- und Cxcl-Familie in Osteoblasten durch PC-3-konditioniertes Medium, was bei MDA-konditioniertem Medium nicht beobachtet wurde. Dies war ein wichtiger Befund, da es sich bei Chemokinen um Moleküle handelt, die die Proliferation, Migration und Aktivität von Osteoklasten fördern können (Lorenzo et al., 2008). So wurde Arbeiten ein direkter Zusammenhang schon durch viele zwischen erhöhter Chemokinexpression durch Osteoblasten und erhöhter Knochenresorption in Tiermodellen des Prostatakarzinoms hergestellt. Insbesondere das Chemokin Ccl2, das ebenfalls durch PC-3 konditioniertes Medium in primären Osteoblasten induziert wurde, spielt bei der Stimulation der Resorption in Tiermodellen des Prostatakarzinoms eine entscheidende Rolle (Mizutani et al., 2009, Li et al., 2009, Loberg et al., 2007, Lu et al., 2009).

Westernblot-Analysen zeigten, dass PC-3-konditioniertes Medium p42/44- und Stat-Signalwege aktivierte. Die Inhibition von Stat3/5-Signalwegen durch den Inhibitor Piceatannol, welcher einen selektiven Inhibitor dieser Signalwege darstellt (Su und David, 2000), verhinderte dabei nicht nur den Anstieg der Chemokin-Expression, was am Beispiel von *Cxcl5* und *Cxcl12* gezeigt werden konnte, sondern auch die gesteigerte *Tnfsf11*-Expression. Dies stand auch im Einklang mit den Ergebnissen anderer, die zeigen konnten, dass die *Ccl2*-Expression nach Oncostatin-M-Einwirkung, durch Inhibition von Stat3 verhindert werden kann (Lin *et al.*, 2004, Kok *et al.*, 2009). Anders als in diesen Studien verhinderten die Inhibitoren PD98059 (inhibiert p42/44-Signalwege) und Fludarabine (inhibiert Stat1-abhängige Signalwege) nicht den Anstieg der Expression von *Cxcl1*, *Cxcl5*, *Cxcl12* und *Tnfsf11*.

Wichtig war auch der Befund, dass es nach der Inhibition von Stat3/5 nicht mehr zu einer erhöhten *Tnfsf11*-Expression durch PC-3 konditioniertes Medium kam. *Tnfsf11* kodiert für das Protein Rankl, welches von Osteoblasten und aktivierten T-Zellen produziert wird und essenziell für die Osteoklastogenese ist. Dabei kann die *Tnfsf11*-bzw. *Tnfrsf11b*-Expression im Osteoblasten durch verschiedenste Signalwege reguliert werden, z.B. kann eine Inhibition Wnt3a-abhängiger Signalwege in mesenchymalen Vorläuferzellen und Osteoblasten durch Dkk1 zu einer erhöhten *Tnfsf11*-und erniedrigten *Tnfrsf11b*-Expression führen (Fujita und Janz, 2007, Bu *et al.*, 2008). Neben der Regulation der *Tnfsf11*-Expression durch den kanonischen Wnt-Signalweg wurde auch bereits durch andere beschrieben, dass die *Tnfsf11*-Expression durch Stat-abhängige Signalwege im Osteoblasten gesteuert wird (O'Brien *et al.*, 1999). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die durch PC-3-konditioniertes Medium

induzierte *Tnfsf11*-Expression in der Tat auf der Aktivierung Stat-abhängiger Signalwege beruht.

Diese oben beschriebenen Ergebnisse wurden mit primären Osteoblasten erzielt, die aus den Schädeldächern neugeborener Mäuse generiert wurden. Es stellte sich daher nun die Frage, ob humane Osteoblasten ebenfalls auf PC-3-konditioniertes Medium mit einer Aktivierung von STAT-Signalwegen und erhöhter Expression von Chemokinen reagieren würden. Tatsächlich hatte PC-3-konditioniertes Medium ähnliche Einflüsse auf humane Osteoblasten, obwohl es auch Unterschiede zu den Ergebnissen bei primären Mäuse-Osteoblasten gab. Es kam zwar zu einem Anstieg der CXCL1-, CXCL5- und TNFSF11-Expression durch PC-3-konditioniertes Medium, aber die CXCL12-Expression blieb unverändert. Es kam auch hier zu einer Aktivierung von STAT3/5 durch PC-3-konditioniertes Medium, was sich in einer erhöhten Phosphorylierung von STAT3 und STAT5 zeigte. Eine Inhibition dieser Signalwege verhinderte den Anstieg der CXCL5- und TNFSF11-Expression, nicht aber den der CXCL1-Expression. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich in der Herkunft der Zellen begründet, aber die Versuche zeigten doch deutlich, dass dieser Mechanismus auch in humanen Zellen von Bedeutung ist. Da in primären humanen Osteoblasten die Aktivierung STAT3/5abhängiger Signalwege durch PC-3-konditioniertes Medium gezeigt werden konnte, wurden Knochenbiopsien humaner Prostatakrebsmetastasen hinsichtlich einer Aktivierung dieser Signalwege untersucht. Hier zeigte sich eine Aktivierung STAT3-abhängiger Signalwege in osteolytischen Prostatakrebsmetastasen und zwar nicht nur in den Tumorzellen, sondern auch in den angrenzenden Osteoblasten.

Dieses Ergebnis besitzt durchaus klinische Relevanz, da dominant aktive STAT-Signalwege für viele Tumore charakteristisch sind (Buettner *et al.*, 2002). So ändert konstitutiv aktives STAT3 den Phänotyp benigner Prostataepithelzellen zu einem Phänotyp, der malignen Zellen ähnelt (Huang *et al.*, 2005) und erhöht nicht nur die Motilität von Prostataepithelzellen, sondern induziert auch die Tumorigenese, d.h. die Fähigkeit Tumoren auszubilden (Azare *et al.*, 2007). Aktives STAT3 war zudem in 77% aller Lymphknotenmetastasen und 67% aller Knochenmetastasen eines untersuchten Kollektivs nachweisbar und steht so in einem engen Zusammenhang mit dem metastatischen Geschehen dieser Krebsart (Abdulghani *et al.*, 2008). Mit einer Inhibition von STAT3, die schon lange als potentielle Krebstherapie diskutiert wird (Yue und Turkson, 2009), könnten nicht nur die Tumorzellen ein direktes Ziel dieser Therapie sein, z.B. durch Einleitung der Apoptose (Barton *et al.*, 2004), sondern es könnte außerdem zu einer Unterbrechung des "Teufelskreises (englisch: vicious cycle)" kommen, der zwischen Tumorzellen und Zellen des Knochens wie etwa den Osteoblasten besteht, (Chirgwin und Guise, 2007, Casimiro *et al.*, 2009) kommen. So regen Tumorzellen durch Moleküle, wie Pthrp, Osteoblasten dazu an, für sie nützliche Stoffe zu sezernieren, wie etwa Ccl2, welches direkt die Proliferation der Prostatakrebszellen erhöhen kann. Chemokine wie Ccl2 steigern dabei auch die Knochenresorption durch Osteoklasten, die durch ihre Aktivität Wachstumsfaktoren, wie Tgf- $\beta$ , aus der Matrix freisetzen, die wiederum positiv auf das Überleben der Krebszellen wirken, wodurch Knochen ein regelrechte Nische für das Überleben der Krebszellen darstellt (Mundy, 2002). Durch eine Inhibition von STAT3 nicht nur in Tumorzellen, sondern auch in Osteoblasten könnte diese für die Tumorzellen positive Kommunikation vermindert, oder sogar verhindert werden.

## 4.4 Ausblick

In dieser Arbeit konnten mehrere wichtige Beobachtungen gemacht werden. Zunächst konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von *Krm2* im Osteoblasten einen osteoporotischen Phänotyp zur Folge hatte, der auf einer verringerten Knochenformation und einer gesteigerten Knochenresorption beruht. Außerdem wurde gefunden, dass IL-33 in differenzierten Osteoblasten exprimiert wird und einen potenten Inhibitor der Osteoklastogenese darstellt, der eine physiologische Rolle bei der Regulation des Knochenumbaus spielt. Abschließend zeigte sich, dass osteolytische Prostatakrebszellen in primären Osteoblasten nicht nur den kanonischen Wnt-Signalweg hemmen, sondern auch über eine Aktivierung Stat3/5-abhängiger Signalwege die Expression verschiedener Chemokine und Zytokine induzieren. Durch diese Ergebnisse wurden aber auch verschiedene Fragen aufgeworfen, die in zukünftigen Arbeiten beantwortet werden müssen.

So lieferte die vorliegende Arbeit zwar erste Hinweise auf eine mögliche Relevanz von Krm2 hinsichtlich des Knochenumbaus, es wurde aber nicht näher geklärt, ob der Phänotyp der *Col1a1-Krm2* Mäuse auf einer verstärkten Wirkung von Dkk1 und/oder Dkk2 beruht, oder ob Krm-Proteine eine von Dkk-Proteinen-unabhängige Funktion besitzen. Um diese Fragen zu klären, sollten *Col1a1-Krm2* Mäuse mit *Dkk2-/-* Mäusen verpaart werden. Denkbar wäre auch eine Verpaarung mit einem Osteoblasten-spezifischen Dkk1-Mausdefizienzmodell. Durch Analyse der Knochenphänotypen könnten wichtige Ergebnisse zur Wirkungsweise dieser Inhibitoren gewonnen werden, was entscheidend für eine pharmakologische Beeinflussung zu Gunsten der Knochenformation sein könnte, schließlich könnte jedes dieser Moleküle einen möglichen Ansatzpunkt einer osteoanabolen Therapie darstellen. Interessant wäre auch zu überprüfen, ob *Krm1-/-* Mäuse und *Krm2-/-* Mäuse in einem Tumormodell (Multiples

Myelom und Prostatakarzinom) vor der Ausbildung von osteolytischen Läsionen geschützt sind. Wäre dies der Fall, könnten neutralisierende Antikörper gegen Krm-Proteine als eine mögliche Therapieoption zur Verhinderung dieser schwerwiegenden Begleiterscheinung solcher Tumorerkrankungen in Betracht gezogen werden.

Um eine mögliche Beteiligung von IL-33 hinsichtlich des Phänotyps *Col1a1-Krm2* transgener Mäuse zu untersuchen, sollte eine Verpaarung von *Il1rl1-/-* Mäusen mit *Col1a1-Krm2* Mäuse in Betracht gezogen werden. Neben der Analyse des eventuellen Knochenphänotyps von IL-33-/- Mäusen wäre auch die Generierung eines transgenen Mausmodells denkbar. So könnten durch die Überexpression von IL-33 unter der Kontrolle des ApoE-Promoters (ApoE-IL33) systemisch erhöhte IL-33-Spiegel erreicht werden. Solch ein Mausmodell könnte helfen, die Relevanz von IL-33 hinsichtlich des Knochenumbaus besser zu verstehen. Zu beantworten bleiben auch die Fragen, durch welche Zelltypen der inhibitorische Effekt von IL-33 auf die Osteoklastogenese vermittelt wird, oder ob es sich sogar um einen direkten Einfluss auf Osteoklasten-Vorläuferzellen handelt. Zudem sollte die Auswirkung von IL-33 auf humane Osteoblasten bzw. Osteoklasten charakterisiert werden.

sollte Befund, Näher betrachtet werden auch der dass die osteolytische Prostatakarzinomzelllinie PC-3 eine inflammatorische Reaktion in Osteoblasten auslöst. Denkbar wäre eine pharmakologische Inhibition Stat3/5-abhängiger Signalwege in einem Tiermodell des Prostatakarzinoms, bei dem das Ausmaß der Osteolysen charakterisiert werden könnte. Ziel muss es außerdem sein, die Faktoren zu identifizieren, welche diese Entzündungsreaktion in Osteoblasten auslösen. Erste Vorarbeiten lassen die Vermutung zu, dass konstitutiv aktive p65-abhängige Signalwege für diese Eigenschaft der PC-3-Zelllinie verantwortlich sind. Hier könnten durch die Generierung einer stabilen p65 Knockdown- und einer stabilen p65-überexprimierenden Zelllinie neue Erkenntnisse gewonnen werden. Nach der Charakterisierung dieser Zelllinien in vitro könnte überprüft werden, ob diese Zelllinien eine veränderte Neigung zur Ausbildung von Osteolysen oder eine veränderte Aggressivität hinsichtlich der Metastasierung in den Knochen aufweisen. Dies könnte neue Ergebnisse hinsichtlich einer therapeutischen Intervention liefern, durch die der Teufelskreis zwischen Tumorzelle und Osteoblast unterbunden werden könnte.

## 5. Zusammenfassung

Der kanonische Wnt-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle für die Regulation des Knochenumbaus, was sich nicht nur in Erkrankungen, wie z.B. dem Osteoporose-Pseudoglioma Syndroms (ausgelöst durch inaktivierende Mutationen des Wnt-Ko-Rezeptors LRP5), sondern auch in Tumorerkrankungen wie dem multiplen Myelom und dem Prostatakarzinom zeigt, bei denen es durch eine Inhibition des kanonischen Wnt-Signalwegs in Osteoblasten durch Dickkopf-1 (DKK1) zur Ausbildung von Osteolysen kommt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine selektive Überexpression des Dkk1-Rezeptors Kremen-2 (Krm2) unter der Kontrolle des 2,3kb-Fragments des *Col1a1*-Promoters im Osteoblasten zur Ausbildung einer Osteoporose in Verbindung mit osteolytischen Läsionen führt. Der Phänotyp *Col1a1-Krm2* transgener Mäuse beruhte dabei nicht nur auf einer verringerten Knochenformation, sondern auch auf einer gesteigerten Knochenresorption. Krm2 inhibierte den kanonischen Wnt-Signalweg im Osteoblasten, und Genchip-Analysen machten es möglich, zahlreiche Zielgene von Krm2 im Osteoblasten zu identifizieren. Hier konnte gezeigt werden, dass transgene Osteoblasten eine signifikant verringerte Expression des Wnt-Zielgens *Tnfrsf11b* aufweisen, welches für Osteoprotegerin kodiert und einen entscheidenden Regulator der Osteoklastenfunktion darstellt.

Zudem kam es in *Col1a1-Krm2* transgenen Mäusen zu einer erhöhten Expression von Interleukin-33 (IL-33). Die Charakterisierung der Wirkung von IL-33 *in vitro* in Osteoblasten- und Osteoklastenkulturen zeigte, dass IL-33 einen potenten Inhibitor der Osteoklastogenese darstellt. So wird IL-33 in differenzierten Osteoblasten exprimiert und inhibiert nicht nur die Osteoklastenformation, sondern auch die Resorption *in vitro*. Ferner konnte gezeigt werden, dass IL-33 die Generierung basophiler und eosinophiler Granulozyten sowie alternativ aktivierter Makrophagen propagierte. Die Analyse eines IL-33-Rezeptor-defizienten Mausmodells (ST2 oder II1r11) zeigte, dass IL-33-abhängige Signalwege eine physiologische Relevanz in Bezug auf den Knochenumbau besitzen. So zeigten ST2-defiziente Mäuse eine signifikant herabgesetzte Knochenmasse, bedingt durch eine gesteigerte Knochenresorption.

Abschließend wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Prostatakarzinomzelllinien auf Osteoblasten charakterisiert. Hier konnte gezeigt werden, dass die osteolytische Zelllinie PC-3, welche den Krm2-Liganden DKK1 überexprimiert, den kanonischen Wnt-Signalweg im Osteoblasten inhibierte. Daneben gelang es außerdem zu zeigen, dass diese Zelllinie eine inflammatorische Reaktion in Osteoblasten auslöst, welche charakterisiert war durch eine erhöhte Expression verschiedener Zytokine und Chemokine. Diese Reaktion wurde durch eine Aktivierung Stat3/5-abhängiger Signalwege hervorgerufen, da eine selektive Inhibition dieser Signalwege in der Lage war, die erhöhte Zytokin- bzw. Chemokin-Expression zu verhindern. Die Analyse humaner Biopsien von Prostatakarzinom-Knochenmetastasen ließ zudem darauf schließen, dass neben der Inhibition des kanonischen Wnt-Signalwegs im Osteoblasten auch eine Aktivierung STAT3/5-abhängiger Signalwege in diesen Zellen eine Rolle spielen könnte.

# 6. Literaturverzeichnis

Abbitt KB, Cotter MJ, Ridger VC, Crossman DC, Hellewell PG, Norman KE (2009). Antibody ligation of murine Ly-6G induces neutropenia, blood flow cessation, and death via complement-dependent and independent mechanisms. *J Leukoc Biol.*, 85(1):55-63.

Abdulghani J, Gu L, Dagvadorj A, Lutz J, Leiby B, Bonuccelli G, Lisanti MP, Zellweger T, Alanen K, Mirtti T, Visakorpi T, Bubendorf L, Nevalainen MT (2008). Stat3 promotes metastatic progression of prostate cancer. *Am J Pathol.*, 172(6):1717-28.

Ali S, Huber M, Kollewe C, Bischoff SC, Falk W, Martin MU (2007). IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 104(47):18660-5.

Angers S, Moon RT (2009). Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 10(7):468-77.

Aubin I, Adams CP, Opsahl S, Septier D, Bishop CE, Auge N, Salvayre R, Negre-Salvayre A, Goldberg M, Guénet JL, Poirier C (2005). A deletion in the gene encoding sphingomyelin phosphodiesterase 3 (Smpd3) results in osteogenesis and dentinogenesis imperfecta in the mouse. *Nat Genet.*, 37(8):803-5.

Azare J, Leslie K, Al-Ahmadie H, Gerald W, Weinreb PH, Violette SM, Bromberg J (2007). Constitutively activated Stat3 induces tumorigenesis and enhances cell motility of prostate epithelial cells through integrin beta 6. *Mol Cell Biol.*, 27(12):4444-53.

Balemans W, Ebeling M, Patel N, Van Hul E, Olson P, Dioszegi M, Lacza C, Wuyts W, Van Den Ende J, Willems P, Paes-Alves AF, Hill S, Bueno M, Ramos FJ, Tacconi P, Dikkers FG, Stratakis C, Lindpaintner K, Vickery B, Foernzler D, Van Hul W (2001). Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet.*, 10(5):537-43.

Barton BE, Karras JG, Murphy TF, Barton A, Huang HF (2004) Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation in prostate cancer: Direct STAT3 inhibition induces apoptosis in prostate cancer lines. *Mol Cancer Ther.*, 3(1):11-20.

Bilic J, Huang YL, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat CM, Bienz M, Niehrs C (2007) Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. Science., 316(5831):1619-22.

Boban I, Jacquin C, Prior K, Barisic-Dujmovic T, Maye P, Clark SH, Aguila HL (2006) The 3.6 kb DNA fragment from the rat Col1a1 gene promoter drives the expression of genes in both osteoblast and osteoclast lineage cells. *Bone.*, 39(6):1302-12.

Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J (2008) Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci.*, 121(6):737-46.

Bu G, Lu W, Liu CC, Selander K, Yoneda T, Hall C, Keller ET, Li Y (2008) Breast cancerderived Dickkopf1 inhibits osteoblast differentiation and osteoprotegerin expression: implication for breast cancer osteolytic bone metastases. *Int J Cancer.*, 123(5):1034-42.

Buettner R, Mora LB, Jove R (2002) Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res.*, 8(4):945-54.

Casimiro S, Guise TA, Chirgwin J (2009) The critical role of the bone microenvironment in cancer metastases. *Mol Cell Endocrinol.*, 310(1-2):71-81.

Chirgwin JM, Guise TA (2007) Skeletal metastases: decreasing tumor burden by targeting the bone microenvironment. *J Cell Biochem.*, 102(6):1333-42.

Cohen MM Jr (2006) The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am J Med Genet A.*, 140(23):2646-706.

Cong F, Schweizer L, Varmus H (2004) Wnt signals across the plasma membrane to activate the beta-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. *Development.*, 131(20):5103-15.

Cormier SA, Yuan S, Crosby JR, Protheroe CA, Dimina DM, Hines EM, Lee NA, Lee JJ (2002) T(H)2-mediated pulmonary inflammation leads to the differential expression of ribonuclease genes by alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 27(6):678-87.

Cornish J, Gillespie MT, Callon KE, Horwood NJ, Moseley JM, Reid IR (2003) Interleukin-18 is a novel mitogen of osteogenic and chondrogenic cells. *Endocrinology*., 144(4):1194-201.

Cummings SR, San Martin J, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, Delmas P, Zoog HB, Austin M, Wang A, Kutilek S, Adami S, Zanchetta J, Libanati C, Siddhanti S, Christiansen C; FREEDOM Trial (2009) Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med.*, 361(8):756-65.

Dacquin R, Starbuck M, Schinke T, Karsenty G (2002) Mouse alpha1(I)-collagen promoter is the best known promoter to drive efficient Cre recombinase expression in osteoblast. *Dev Dyn.*, 224(2):245-51.

Dai J, Hall CL, Escara-Wilke J, Mizokami A, Keller JM, Keller ET (2008) Prostate cancer induces bone metastasis through Wnt-induced bone morphogenetic protein-dependent and independent mechanisms. *Cancer Res.*, 68(14):5785-94.

Davidson G, Wu W, Shen J, Bilic J, Fenger U, Stannek P, Glinka A, Niehrs C (2005) Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature.*, 438(7069):867-72.

Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y (2005) Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell.*, 8(5):739-50.

Deschaseaux F, Sensébé L, Heymann D (2009) Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends Mol Med.*, 15(9):417-29.

Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, Korb A, Smolen J, Hoffmann M, Scheinecker C, van der Heide D, Landewe R, Lacey D, Richards WG, Schett G (2007) Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med.*, 13(2):156-63.

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997) Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.*, 89(5):747-54.

Elefteriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, Kondo H, Richards WG, Bannon TW, Noda M, Clement K, Vaisse C, Karsenty G (2005) Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature.*, 434(7032):514-20.

Ellwanger K, Saito H, Clément-Lacroix P, Maltry N, Niedermeyer J, Lee WK, Baron R, Rawadi G, Westphal H, Niehrs C (2008) Targeted disruption of the Wnt regulator Kremen induces limb defects and high bone density. *Mol Cell Biol.*, 28(15):4875-82.

Feng JQ, Ward LM, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B, Yu X, Rauch F, Davis SI, Zhang S, Rios H, Drezner MK, Quarles LD, Bonewald LF, White KE (2006) Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet.*, 38(11):1310-5.

Forget MA, Turcotte S, Beauseigle D, Godin-Ethier J, Pelletier S, Martin J, Tanguay S, Lapointe R (2007) The Wnt pathway regulator DKK1 is preferentially expressed in hormone-resistant breast tumours and in some common cancer types. *Br J Cancer.*, 96(4):646-53.

Friedman MS, Oyserman SM, Hankenson KD (2009) Wnt11 promotes osteoblast maturation and mineralization through R-spondin 2. *J Biol Chem.*, 284(21):14117-25.

Fu L, Patel MS, Bradley A, Wagner EF, Karsenty G (2005) The molecular clock mediates leptin-regulated bone formation. *Cell.*, 122(5):803-15.

Fujita K, Janz S (2007) Attenuation of WNT signaling by DKK-1 and -2 regulates BMP2induced osteoblast differentiation and expression of OPG, RANKL and M-CSF. *Mol Cancer.*, 6:71.

Fulciniti M, Tassone P, Hideshima T, Vallet S, Nanjappa P, Ettenberg SA, Shen Z, Patel N, Tai YT, Chauhan D, Mitsiades C, Prabhala R, Raje N, Anderson KC, Stover DR, Munshi NC (2009) Anti-DKK1 mAb (BHQ880) as a potential therapeutic agent for multiple myeloma. *Blood.*, 114(2):371-9.

Gabay C, McInnes IB (2009) The biological and clinical importance of the 'new generation' cytokines in rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther.*, 11(3):230.

Glass DA 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo MM, Long F, McMahon AP, Lang RA, Karsenty G (2005) Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell.*, 8(5):751-64.

Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Jüppner H, Kim CA, Keppler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML; Osteoporosis-Pseudoglioma Syndrome Collaborative Group (2001) LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell.*, 107(4):513-23.

Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. Nat Rev Immunol., 3(1):23-35.

Hall CL, Bafico A, Dai J, Aaronson SA, Keller ET (2005) Prostate cancer cells promote osteoblastic bone metastases through Wnts. *Cancer Res.*, 65(17):7554-60.

Hall CL, Keller ET (2006) The role of Wnts in bone metastases. *Cancer Metastasis Rev.*, 25(4):551-8.

Harada S, Rodan GA (2003) Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.*, 423(6937):349-55.

Hartmann C (2006) A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends Cell Biol.*, 16(3):151-8.

Hartmann C (2009) Transcriptional networks controlling skeletal development. *Curr Opin Genet Dev.*, 19(5):437-43.

Hassler C, Cruciat CM, Huang YL, Kuriyama S, Mayor R, Niehrs C (2007) Kremen is required for neural crest induction in Xenopus and promotes LRP6-mediated Wnt signaling. *Development.*, 134(23):4255-63.

Heath DJ, Chantry AD, Buckle CH, Coulton L, Shaughnessy JD Jr, Evans HR, Snowden JA, Stover DR, Vanderkerken K, Croucher PI (2009) Inhibiting Dickkopf-1 (Dkk1) removes suppression of bone formation and prevents the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *J Bone Miner Res.*, 24(3):425-36.

Hill TP, Später D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C (2005) Canonical Wnt/betacatenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell.*, 8(5):727-38.

Horwood NJ, Udagawa N, Elliott J, Grail D, Okamura H, Kurimoto M, Dunn AR, Martin T, Gillespie MT (1998) Interleukin 18 inhibits osteoclast formation via T cell production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Clin Invest.*, 101(3):595-603.

Huang HF, Murphy TF, Shu P, Barton AB, Barton BE (2005) Stable expression of constitutively-activated STAT3 in benign prostatic epithelial cells changes their phenotype to that resembling malignant cells. *Mol Cancer.*, 4(1):2.

Kaiser M, Mieth M, Liebisch P, Oberländer R, Rademacher J, Jakob C, Kleeberg L, Fleissner C, Braendle E, Peters M, Stover D, Sezer O, Heider U (2008) Serum concentrations of DKK-1 correlate with the extent of bone disease in patients with multiple myeloma. *Eur J Haematol.*, 80(6):490-4.

Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C (2009) Genetic control of bone formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 25:629-48.

Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH, Glass DA 2nd, Hartmann C, Li L, Hwang TH, Brayton CF, Lang RA, Karsenty G, Chan L (2002) Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol.*, 157(2):303-14.

Koga T, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, Iwata T, Ohnishi H, Matozaki T, Kodama T, Taniguchi T, Takayanagi H, Takai T (2004) Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature.*, 428(6984):758-63.

Kok SH, Hong CY, Kuo MY, Wang CC, Hou KL, Lin YT, Galson DL, Lin SK (2009) Oncostatin M-induced CCL2 transcription in osteoblastic cells is mediated by multiple levels of STAT-1 and STAT-3 signaling: an implication for the pathogenesis of arthritis. *Arthritis Rheum.*, 60(5):1451-62.

Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA (2006) Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest.*, 116(5):1202-9.

Kubota T, Michigami T, Sakaguchi N, Kokubu C, Suzuki A, Namba N, Sakai N, Nakajima S, Imai K, Ozono K (2008) Lrp6 hypomorphic mutation affects bone mass through bone resorption in mice and impairs interaction with Mesd. *J Bone Miner Res.*, 23(10):1661-71.

Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, Pitman N, Mirchandani A, Rana B, van Rooijen N, Shepherd M, McSharry C, McInnes IB, Xu D, Liew FY (2009) IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol.*, 183(10):6469-77.

Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G (2007) Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell.*, 130(3):456-69

Li J, Sarosi I, Cattley RC, Pretorius J, Asuncion F, Grisanti M, Morony S, Adamu S, Geng Z, Qiu W, Kostenuik P, Lacey DL, Simonet WS, Bolon B, Qian X, Shalhoub V, Ominsky MS, Zhu Ke H, Li X, Richards WG (2006) Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone.*, 39(4):754-66.

Li X, Liu P, Liu W, Maye P, Zhang J, Zhang Y, Hurley M, Guo C, Boskey A, Sun L, Harris SE, Rowe DW, Ke HZ, Wu D (2005) Dkk2 has a role in terminal osteoblast differentiation and mineralized matrix formation. *Nat Genet.*, 37(9):945-52.

Li X, Loberg R, Liao J, Ying C, Snyder LA, Pienta KJ, McCauley LK (2009) A destructive cascade mediated by CCL2 facilitates prostate cancer growth in bone. *Cancer Res.*, 69(4):1685-92.

Li Y, Toraldo G, Li A, Yang X, Zhang H, Qian WP, Weitzmann MN (2007) B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood.*, 109(9):3839-48.

Li ZG, Yang J, Vazquez ES, Rose D, Vakar-Lopez F, Mathew P, Lopez A, Logothetis CJ, Lin SH, Navone NM (2008) Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) mediates the prostate cancer-induced formation of new bone. *Oncogene.*, 27(5):596-603.

Liew FY, Pitman NI, McInnes IB (2010) Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol.*, 10(2):103-10.

Lin SK, Kok SH, Yeh FT, Kuo MY, Lin CC, Wang CC, Goldring SR, Hong CY (2004) MEK/ERK and signal transducer and activator of transcription signaling pathways modulate oncostatin M-stimulated CCL2 expression in human osteoblasts through a common transcription factor. *Arthritis Rheum.*, 50(3):785-93.

Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, Dupuis J, Osborne M, Folz C, Manning SP, Swain PM, Zhao SC, Eustace B, Lappe MM, Spitzer L, Zweier S, Braunschweiger K, Benchekroun Y, Hu X, Adair R, Chee L, FitzGerald MG, Tulig C, Caruso A, Tzellas N, Bawa A, Franklin B, McGuire S, Nogues X, Gong G, Allen KM, Anisowicz A, Morales AJ, Lomedico PT, Recker SM, Van Eerdewegh P, Recker RR, Johnson ML (2002) A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet.*, 70(1):11-9.

Loberg RD, Ying C, Craig M, Day LL, Sargent E, Neeley C, Wojno K, Snyder LA, Yan L, Pienta KJ (2007) Targeting CCL2 with systemic delivery of neutralizing antibodies induces prostate cancer tumor regression in vivo. *Cancer Res.*, 67(19):9417-24.

Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y (2008) Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system., *Endocr Rev.*, 29(4):403-40.

Lu Y, Chen Q, Corey E, Xie W, Fan J, Mizokami A, Zhang J (2009) Activation of MCP-1/CCR2 axis promotes prostate cancer growth in bone. *Clin Exp Metastasis.*, 26(2):161-9.

MacDonald BT, Tamai K, He X (2009) Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell.*, 17(1):9-26.

Mao B, Niehrs C (2003) Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling. *Gene.*, 302(1-2):179-83.

Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stannek P, Walter C, Glinka A, Niehrs C (2002) Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature.*, 417(6889):664-7.

Martinez FO, Helming L, Gordon S (2009) Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.*, 27:451-83.

Mayuzumi N, Matsushima H, Takashima A (2009) IL-33 promotes DC development in BM culture by triggering GM-CSF production. *Eur J Immunol.*, 39(12):3331-42.

Mikels AJ, Nusse R (2006) Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol.*, 4(4):e115.

Mizutani K, Sud S, McGregor NA, Martinovski G, Rice BT, Craig MJ, Varsos ZS, Roca H, Pienta KJ (2009) The chemokine CCL2 increases prostate tumor growth and bone metastasis through macrophage and osteoclast recruitment. *Neoplasia*., 11(11):1235-42.

Moreno JL, Kaczmarek M, Keegan AD, Tondravi M (2003) IL-4 suppresses osteoclast development and mature osteoclast function by a STAT6-dependent mechanism: irreversible inhibition of the differentiation program activated by RANKL. *Blood.*, 102(3):1078-86.

Mosimann C, Hausmann G, Basler K (2009) Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 10(4):276-86.

Mundy GR (2002) Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer.*, 2(8):584-93.

Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, Kato S (2007) Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell.*, 130(5):811-23.

Narisawa S, Fröhlander N, Millán JL (1997) Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Dev Dyn.*, 208(3):432-46.

Negishi-Koga T, Takayanagi H (2009) Ca2+-NFATc1 signaling is an essential axis of osteoclast differentiation. *Immunol Rev.*, 231(1):241-56.

Niehrs C (2006) Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene.*, 25(57):7469-81.

Novack DV, Teitelbaum SL (2008) The osteoclast: friend or foe? *Annu Rev Pathol.*, 3:457-84.

Nusse R, Varmus HE (1982) Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell.*, 31(1):99-109.

Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. *Nature.*, 287(5785):795-801.

O'Brien CA, Gubrij I, Lin SC, Saylors RL, Manolagas SC (1999) STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF-kappaB ligand and stimulation of osteoclastogenesis by gp130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1,25-dihydroxyvitamin D3 or parathyroid hormone. *J Biol Chem.*, 274(27):19301-8.

Paic F, Igwe JC, Nori R, Kronenberg MS, Franceschetti T, Harrington P, Kuo L, Shin DG, Rowe DW, Harris SE, Kalajzic I (2009) Identification of differentially expressed genes between osteoblasts and osteocytes. *Bone.*, 45(4):682-92.

Palmer G, Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Toy D, Seemayer CA, Viatte S, Finckh A, Smith DE, Gabay C (2009) Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis Rheum.*, 60(3):738-49.

Park BK, Zhang H, Zeng Q, Dai J, Keller ET, Giordano T, Gu K, Shah V, Pei L, Zarbo RJ, McCauley L, Shi S, Chen S, Wang CY (2007) NF-kappaB in breast cancer cells promotes osteolytic bone metastasis by inducing osteoclastogenesis via GM-CSF. *Nat Med.*, 13(1):62-9.

Pecaric-Petkovic T, Didichenko SA, Kaempfer S, Spiegl N, Dahinden CA (2009) Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood.*, 113(7):1526-34.

Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ (2008) Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 105(52):20764-9.

Pinzone JJ, Hall BM, Thudi NK, Vonau M, Qiang YW, Rosol TJ, Shaughnessy JD Jr (2009) The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease. *Blood.*, 113(3):517-25.

Polzer K, Joosten L, Gasser J, Distler JH, Ruiz G, Baum W, Redlich K, Bobacz K, Smolen JS, van den Berg W, Schett G, Zwerina J (2010) Interleukin-1 is essential for systemic inflammatory bone loss. *Ann Rheum Dis.*, 69(1):284-90.

Priemel M, von Domarus C, Klatte TO, Kessler S, Schlie J, Meier S, Proksch N, Pastor F, Netter C, Streichert T, Püschel K, Amling M (2009) Bone Mineralization Defects and Vitamin D Deficiency: Histomorphometric Analysis of Iliac Crest Bone Biopsies and Circulating 25-Hydroxyvitamin D in 675 Patients. *J Bone Miner Res*. [Epub ahead of print]

Quarles LD (2008) Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. J Clin Invest., 118(12):3820-8.

Rosen CJ (2005) Clinical practice. Postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med.*, 353(6):595-603.

Schinke T, Schilling AF, Baranowsky A, Seitz S, Marshall RP, Linn T, Blaeker M, Huebner AK, Schulz A, Simon R, Gebauer M, Priemel M, Kornak U, Perkovic S, Barvencik F, Beil FT, Del Fattore A, Frattini A, Streichert T, Pueschel K, Villa A, Debatin KM, Rueger JM, Teti A, Zustin J, Sauter G, Amling M (2009) Impaired gastric acidification negatively affects calcium homeostasis and bone mass. *Nat Med.*, 15(6):674-81.

Semënov M, Tamai K, He X (2005) SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem.*, 280(29):26770-5.

Semënov MV, Zhang X, He X (2008) DKK1 antagonizes Wnt signaling without promotion of LRP6 internalization and degradation. *J Biol Chem.*, 283(31):21427-32.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P,

Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.*, 89(2):309-19.

Srivastava M, Begovic E, Chapman J, Putnam NH, Hellsten U, Kawashima T, Kuo A, Mitros T, Salamov A, Carpenter ML, Signorovitch AY, Moreno MA, Kamm K, Grimwood J, Schmutz J, Shapiro H, Grigoriev IV, Buss LW, Schierwater B, Dellaporta SL, Rokhsar DS (2008) The Trichoplax genome and the nature of placozoans. *Nature.*, 454(7207):955-60.

Su L, David M (2000) Distinct mechanisms of STAT phosphorylation via the interferonalpha/beta receptor. Selective inhibition of STAT3 and STAT5 by piceatannol. *J Biol Chem.*, 275(17):12661-6.

Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T (2002) Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell.*, 3(6):889-901.

Takayanagi H (2007) Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol.*, 7(4):292-304.

Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, Zhao L, Nagy TR, Peng X, Hu J, Feng X, Van Hul W, Wan M, Cao X (2009) TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med.*, 15(7):757-65.

Tashjian AH Jr, Goltzman D (2008) On the interpretation of rat carcinogenicity studies for human PTH(1-34) and human PTH(1-84). *J Bone Miner Res.*, 23(6):803-11.

Udagawa N, Horwood NJ, Elliott J, Mackay A, Owens J, Okamura H, Kurimoto M, Chambers TJ, Martin TJ, Gillespie MT (1997) Interleukin-18 (interferon-gamma-inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon-gamma to inhibit osteoclast formation. *J Exp Med.*, 185(6):1005-12.

Voehringer D, van Rooijen N, Locksley RM (2007) Eosinophils develop in distinct stages and are recruited to peripheral sites by alternatively activated macrophages. *J Leukoc Biol.*, 81(6):1434-44.

Wennberg C, Hessle L, Lundberg P, Mauro S, Narisawa S, Lerner UH, Millán JL (2000) Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. *J Bone Miner Res.*, 15(10):1879-88.

Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, Shpektor D, Jonas M, Kovacevich BR, Staehling-Hampton K, Appleby M, Brunkow ME, Latham JA (2003) Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J.*, 22(23):6267-76.

Wu JY, Purton LE, Rodda SJ, Chen M, Weinstein LS, McMahon AP, Scadden DT, Kronenberg HM (2008) Osteoblastic regulation of B lymphopoiesis is mediated by Gs{alpha}-dependent signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 105(44):16976-81.

Xu D, Jiang HR, Kewin P, Li Y, Mu R, Fraser AR, Pitman N, Kurowska-Stolarska M, McKenzie AN, McInnes IB, Liew FY (2008) IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 105(31):10913-8.

Yadav VK, Balaji S, Suresh PS, Liu XS, Lu X, Li Z, Guo XE, Mann JJ, Balapure AK, Gershon MD, Medhamurthy R, Vidal M, Karsenty G, Ducy P (2010) Pharmacological inhibition of gut-derived serotonin synthesis is a potential bone anabolic treatment for osteoporosis. *Nat Med.*, 16(3):308-12.

Yadav VK, Ryu JH, Suda N, Tanaka KF, Gingrich JA, Schütz G, Glorieux FH, Chiang CY, Zajac JD, Insogna KL, Mann JJ, Hen R, Ducy P, Karsenty G (2008) Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell.*, 135(5):825-37.

Yuan B, Takaiwa M, Clemens TL, Feng JQ, Kumar R, Rowe PS, Xie Y, Drezner MK (2008) Aberrant Phex function in osteoblasts and osteocytes alone underlies murine X-linked hypophosphatemia. *J Clin Invest.*, 118(2):722-34.
Yue P, Turkson J (2009) Targeting STAT3 in cancer: how successful are we? *Expert Opin Investig Drugs.*, 18(1):45-56.

Zaidi M (2007) Skeletal remodeling in health and disease. Nat Med., 13(7):791-801.

Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J, He X (2005) A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature.*, 438(7069):873-7.

Zwerina J, Redlich K, Polzer K, Joosten L, Krönke G, Distler J, Hess A, Pundt N, Pap T, Hoffmann O, Gasser J, Scheinecker C, Smolen JS, van den Berg W, Schett G (2007) TNFinduced structural joint damage is mediated by IL-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 104(28):11742-7.

## 7. Anhang

## 7.1 Danksagung

Ich möchte hiermit allen danken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben. Allen voran danke ich Herrn Professor Amling für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und des Themas, sowie für die nahezu unerschöpflichen Sachmittel. Herrn PD. Dr. Thorsten Schinke danke ich für die Betreuung dieser Arbeit sowie für seine Geduld mit mir trotz zahlreicher, sich wiederholender Fragen meinerseits, die viele andere Personen in den Wahnsinn getrieben hätten. Herrn Professor Mühlbach danke ich für die unkomplizierte externe Betreuung dieser Arbeit und die vielen aufmunternden Worte. Ein ganz besonderer Dank gilt Frau PD. Dr. Irm Hermanns-Borgmeyer, ohne deren Expertise und Engagement große Teile dieser Arbeit nicht möglich gewesen wären. Danken möchte ich auch Kristin Klätschke, die die zahlreichen Genchip-Analysen durchgeführt hat, sowie Frau Dr. Andrea Horst und Thomas Bickert für ihre Unterstützung und fachlichen Anregungen. Ein großer Dank gilt Olga Winter für die Unterstützung bei der histologischen Aufarbeitung der zahlreichen Mausmodelle.

Während dieser Arbeit habe ich Freunde hinzugewonnen und hoffe, dass wir uns nicht aus den Augen verlieren. Alex, Joachim und Johannes, ich danke euch für die guten Gespräche, für die Unterstützung jeglicher Art und die gute Zeit.

Mein größter Dank gilt meiner Freundin und zukünftigen Ehefrau Antje, meiner Mutter und meiner Tante für ihre Unterstützung (auch wenn es oft schwierig mit mir war).

Vielen Dank!

## 7.2 Publikationen

Schulze J, Albers J, Baranowsky A, Keller J, Spiro A, Streichert T, Zustin J, Amling M, Schinke T (2010) Osteolytic prostate cancer cells induce the expression of specific cytokines in bone-forming osteoblasts through a Stat3/5-dependent mechanism. *Bone.*, 46(2):524-33.

Schulze J, Seitz S, Saito H, Schneebauer M, Marshall RP, Baranowsky A, Busse B, Schilling AF, Friedrich FW, Albers J, Spiro AS, Zustin J, Streichert T, Ellwanger K, Niehrs C, Amling M, Baron R, Schinke T (2010) Negative Regulation of Bone Formation by the Transmembrane Wnt Antagonist Kremen-2. PLoS ONE 5(4): e10309. doi:10.1371/journal.pone.0010309

Schulze J, Bickert T, Beil FT, Zaiss M, Streichert T, Albers J, Keller J, Hissnauer TN, Schett G, Amling M, McKenzie AN, Horst AK, Schinke T. Interleukin-33 is Expressed in Differentiated Osteoblasts and Blocks Osteoclast Formation from Bone Marrow Precursor Cells, JBMR (Under Revision)