Die Rolle der Serpentin-Rezeptoren Fzd8 und Fzd9 im Knochenremodelling

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften vorgelegt im Department Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

> vorgelegt von Herrn Dipl.-Chem. Joachim Albers aus Quakenbrück

> > Hamburg, April 2010

- 1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Michael Korth
- 2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Michael Amling

Tag der Disputation: 02. Juli 2010

Meinen Eltern und Jenny

Wissenschaft ist Irrtum auf den letzten Stand gebracht

Linus Pauling

Inhaltsverzeichnis

1	Ε	INLEI	TUNG	1
	1.1	Funk	TION UND STRUKTUR DES KNOCHENS	1
	1.2	KNOO	HENZELLEN	2
	1	.2.1	Osteoblasten	2
	1	.2.2	Osteozyten	3
	1	.2.3	Osteoklasten	5
	1.3	Entw	VICKLUNG DES SKELETTSYSTEMS	. 7
	1.3	DER	WNT-SIGNAL WEG	. ,
	1.7	EDIZZ		11
	1.5	TKIZZ	LED-NEZEF I OKEN	11
2	A	UFGA	BENSTELLUNG	13
3	N	IATEF	RIAL UND METHODEN	14
	31	Маті		14
	2.1	1 1	Chamikalian and Engume	14
	2	.1.1		14
	3	.1.2	Antikorper	16
		3.1.2.	Primarantikorper	16
	2	3.1.2.	2 Sekundarantikorper/Konjugate	10
	3	.1.3		17
3.1.4 TaqMan® Gene Expression Assays3.1.5 Geräte		TaqMan® Gene Expression Assays	Γ7	
		Geräte	18	
	3	.1.6	Puffer und Lösungen	19
	3	.1.7	Primersequenzen	23
		3.1.7.	Primer für RT-PCR-Expressionsanalysen	23
		3.1.7.2	2 Primer für die Genotypisierung	24
		3.1.7.3	Weitere verwendete Primer	24
	3	.1.8	Zellkulturmedien	25
	3.2	Meth	IODEN	25
	3	.2.1	Molekularbiologische Methoden	25
		3.2.1.	Polymerasekettenreaktion	25
		3.2.1.2	2 Quantitative RT- PCR (qRT-PCR)	26
		3.2.1.3	3 Isolierung von RNA aus Gewebe	27
		3.2.1.4	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	28
		3.2.1.	5 DNA-Sequenzierung	28
		3.2.1.0	6 Agarosegelelektrophorese	29
		3.2.1.7	7 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien	29
		3.2.1.8	Genotypisierung	29
		3.2.1.9	Affymetrix-Genchip-Analyse	29
		3.2.1.	0 Restrictionsverdau von Plasmid-DNA	30
		3.2.1.	1 Modifizierung von DNA-Enden	30
		3.2.1.	Extraction von DNA aus Agarosegelen	31
		3.2.1.	Ligation von DNA-Fragmenten	31

4

	3.2.1.14	Transformation kompetenter Bakterien durch Elektroporation	31
	3.2.1.15	Präparation von Plasmid-DNA (Miniprep, Maxiprep)	32
	3.2.1.16	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	32
	3.2.1.17	SDS-Gelelektrophorese	32
	3.2.1.18	Elekto-Proteintransfer (Western-Blotting)	33
3.	.2.2 Best	immung von Serumparametern	34
	3.2.2.1	Serumgewinnung	34
	3.2.2.2	Serumanalysen	34
3	.2.3 Zell	biologische Methoden	34
	3.2.3.1	Osteoblastenkultur	34
	3.2.3.2	Osteoklastenkultur	35
	3.2.3.3	Von Kossa-Färbung	35
	3.2.3.4	Alizarinrot-Färbung	36
	3.2.3.5	TRAP-Färbung	36
	3.2.3.6	Proteinisolation aus Zellen	36
	3.2.3.7	Gewinnung von RNA aus Zellen	37
	3.2.3.8	BrdU-Proliferationsassay	37
	3.2.3.9	Immunhistologie	37
	3.2.3.10	Herstellung retroviraler Partikel in HEK 293T Zellen	38
	3.2.3.11	Transduktion von MC3T3-Zellen und primären Osteoblasten	38
3.	.2.4 Hist	ologische und histomorphometrische Methoden	39
	3.2.4.1	Präparation und Fixierung von Mausskeletten	39
	3.2.4.2	Kontaktröntgen und µCT	40
	3.2.4.3	Biomechanische Testung mittels Dreipunktbiegetest	40
	3.2.4.4	Von Kossa/van Gieson-Färbung	40
	3.2.4.5	Toluidin-Färbung	40
	3.2.4.6	HE-Färbung (Paraffin)	41
	3.2.4.7	TRAP-Färbung an Paraffinschnitten	41
	3.2.4.8	Calcein-Markierung von Mäusen	41
	3.2.4.9	Histomorphometrie	41
3	.2.5 Stat	istik	42
Ε	RGEBNIS	SE	43
4.1	UNTERSU	CHUNGEN ZUR EXPRESSION VON FZD9 IN OSTEOBLASTEN	43
4.2	HISTOLOG	UISCHE ANALYSE DES KNOCHENPHÄNOTYPS FZD9-DEFIZIENTER MÄUSE	44
4.3	HISTOLOG	ische Analyse der Regression hyaloider Blutgefäße in Fzd9-defizienten	
	MÄUSEN.		47
4.4	ANALYSE	FZD9-DEFIZIENTER OSTEOBLASTEN	48
45	UNTERSU	THUNGEN ZUR ROLLE VON ISG15 IN OSTEORI ASTEN	54
1.6	KNOCHEN	HISTOLOGISCHE ANALYSE $Isc 15$ -defiziented Mälise	5 1
4.0 1 7	ÜDEDEVD		50 50
+./	UDEKEAP	MERCING VON 13013 IN 1203-DEFIZIENTEN OSTEUBLASTEN	58
4.8	KNOCHEN	HIS IOLOGISCHE ANALYSE VON FZD9 MAUSEN UND WILLIAMS- BEUREN-SYNDROM	
	(WBS)PA	TIENTEN	59
4.9	GENERIER	UNG EINES COL1A1-FZD9 DNA-KONSTRUKTES	61

	4.10	UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE DES WNT-SIGNALWEGS IN DER OSTEOKLASTEN-	
		DIFFERENZIERUNG	62
	4.11	UNTERSUCHUNG DER GENEXPRESSION WÄHREND DER OSTEOKLASTEN-DIFFERENZIERUNG	64
	4.12	UNTERSUCHUNG DER EXPRESSION VON WNT-PROTEINEN UND FRIZZLED-REZEPTOREN WÄHREN	٧D
		DER OSTEOKLASTENDIFFERENZIERUNG	66
	4.13	ERSTELLUNG EINES GEWEBEEXPRESSIONSPROFILS ALLER FRIZZLED-REZEPTOREN	67
	4.14	INHIBITION DES ANTI-OSTEOKLASTOGENEN WNT3A-EFFEKTS DURCH LÖSLICHE REKOMBINANTE	ł
		Fzd-Cystein-reiche-Domänen	69
	4.15	KNOCHENHISTOLOGISCHE ANALYSE Fzd8-defizienter Mäuse	70
5	D	ISKUSSION	74
	5.1	ERNIEDRIGTE KNOCHENDICHTE IN FZD9-DEFIZIENTEN MÄUSEN	74
	5.2	FZD9 REGULIERT DIE FUNKTION UND/ODER DIFFERENZIERUNG VON OSTEOBLASTEN	
		UNABHÄNGIG VOM KANONISCHEN WNT-SIGNALWEG	75
	5.3	FZD9 REGULIERT DIE EXPRESSION VON CHEMOKINEN UND INTERFERON-ABHÄNGIGEN GENEN IM	
		OSTEOBLASTEN	76
	5.4	DIE ROLLE DER PROTEIN ISGYLIERUNG IN OSTEOBLASTEN	78
	5.5	ERNIEDRIGTE KNOCHENDICHTE IN FZD9 ^{+/-} MÄUSEN UND WILLIAMS-BEUREN- SYNDROM (WBS)	
		PATIENTEN	80
	5.6	INHIBITION DER DIFFERENZIERUNG VON ÖSTEOKLASTEN DURCH AKTIVIERUNG DES KANONISCHEN	ſ
		WNT-SIGNALWEGS	81
	5.7	FZD-REZEPTOREN IN DER OSTEOKLASTENDIFFERENZIERUNG	82
	5.8	ERHÖHTE KNOCHENRESORPTION IN FZD8-DEFIZIENTEN MÄUSEN	83
	5.9	AUSBLICK	84
6	Z	USAMMENFASSUNG	86
_	CT		
7	SU	JMMARY	88
8	L	ITERATUR	90
9	A	NHANG	. 100
	9.1	LEBENSLAUF	. 100
	9.2	VERÖFFENTLICHUNGEN	. 101
	9.	2.1 Originalarbeiten	. 101
	9.2	2.2 Kongressbeiträge	. 102
	9.3	Erklärung	. 103
	9.4	DANKSAGUNG	. 104
	9.5	SICHERHEITSHINWEISE	. 105

Abkürzungen

<u>Alpl:</u>	alkaline phosphatase,	DAB:	3,3'-diaminobenzidine
	(gewebeunspezifische		tetrahydrochloride
	Alkalische Phosphatase)	<u>dest</u> :	destilliert
<u>Amp:</u>	Ampicillin	DEPC:	Diethylpyrocarbonat
APC:	adenomatous polyposis coli	<u>Dmp1:</u>	Dentin matrix protein 1
ATP:	Adenosintriphosphat	DMSO:	Dimethylsulfoxid
BFR/BS:	bone formation rate per	DNA:	deoxyribonucleic acid
	bone surface		(Desoxyribonukleinsäure)
	(Knochenformationsrate	<u>dNTP:</u>	Desoxynukleotid-
	pro Knochenoberfläche)		triphosphat
<u>Bglap:</u>	Bone gla protein	DTT:	Dithiotreitol
	(Osteocalcin)	DVL:	Dishevelled
<u>BMP:</u>	Bone Morphogenetic	DXA:	(Dual-Energy-X-Ray-
	Protein		Absorptiometrie) Dual-
<u>BMU:</u>	Basic Multicellular Unit		Röntgen-Absorptiometrie)
<u>Bp:</u>	Basenpaare	Eco:	ecotroph
<u>BrdU :</u>	5'-bromo-2'-deoxyuridin	EDTA:	Ethylendiamintetraazetat
BSA:	bovines Serumalbumin	eGFP:	enhanced Green
<u>Bsp:</u>	Bone sialoprotein		Fluorescent Protein
<u>BV/TV:</u>	bone volume per tissue	ELISA:	Enzyme-Linked
	volume (Knochenvolumen		Immunosorbent Assay
	pro Gewebevolumen)		(enzymgekoppelter
<u>CamkII</u> :	Calcium-calmodulin		Immunadsorptionstest)
	dependent kinase II	env:	envelope
<u>CDD:</u>	Cleidocraniale Dysplasie	FGF:	Fibroblast Growth Factor
<u>cDNA:</u>	copy DNA	<u>FKS:</u>	fötales Kälberserum
<u>CK:</u>	Casein Kinase	Fmax:	Maximalkraft
<u>Clc-7:</u>	Chlorid channel 7	<u>Fzd:</u>	Frizzled
	(Chloridkanal 7)	FRET:	Fluoreszenz-Resonanz-
<u>Col1a1:</u>	collagen, type I (TypI-		Energie-Transfer
	Kollagen)	<u>gag:</u>	group specific antigen
<u>cort:</u>	cortical (kortikal)	<u>GSK:</u>	Glykogen Synthase Kinase

<u>H₂O:</u>	Wasser	N.Oc/B.Pm:	number of osteoclasts per
HEK:	Human Embryonic Kidney		bone perimeter (Anzahl der
<u>HRP:</u>	horseradish peroxidase		Osteoklasten per
	(Meerrettichperoxidase)		Knochenoberfläche)
<u>Ibsp:</u>	Integrin binding	<u>Obl:</u>	Osteoblasten
	sialoprotein	Ob.S/BS:	osteoblast surface per bone
<u>Ifi203:</u>	Interferon activated gene		surface
	203		(Osteoblastenoberfläche
<u>Isg15:</u>	Isg15 ubiquitin-like		pro Knochenoberfläche)
	modifier	<u>Oasl2</u> :	2'-5' Oligoadenylate
<u>JNK</u> :	c-Jun N-terminale Kinase		synthetase-like 2
<u>kDa:</u>	kilo Dalton	Ocl:	Osteoklasten
lacZ:	β-Galaktosidase Gen	<u>Opg:</u>	Osteoprotegerin
<u>LB:</u>	Luria Broth, Kulturmedium	<u>PBS:</u>	Phosphate buffered saline
LEF:	Lymphoid Enhancer		(Phosphat-gepufferte
	binding protein Factor		Salzlösung)
<u>Lsg.:</u>	Lösung	<u>PCP</u> :	Planar Cell Polarity
<u>LRP 5/6:</u>	Low density lipoprotein 5/6	PCR:	polymerase chain reaction
LTR:	Long terminal repeats		(Polymerasekettenreaktion)
<u>M:</u>	Molar	<u>p-GSK3:</u>	phospho-Glykogen
MCSF:	macrophage colony		synthasekinase 3
	stimulating factor	<u>PKC</u> :	Protein Kinase C
MEM:	Minimum-Essential-	<u>P/S:</u>	Penicilin/Streptomycin
	Medium	PTH:	Parathormon
<u>μCT:</u>	μ-Computertomographie	<u>RA:</u>	Rheumatoide Arthritis
<u>min:</u>	Minute	Rank:	receptor activator of NF-
NLK:	Nemo-like-Kinase		κB (Rezeptor Aktivator
<u>NaOH:</u>	Natriumhydroxid		vom NF-κB)
N.Ob/B.Pm:	number of osteoblast per	RANKL:	RANK (Receptor Activator
	bone perimeter (Anzahl der		of NF-κB) Ligand
	Osteoblasten pro	<u>RNA:</u>	ribonucleic acid
	Knochenoberfläche)		(Ribonukleinsäure)

<u>rpm:</u>	rounds per minute, Upm;	<u>w/v:</u>	weight/volume
	Umdrehungen pro Minute		(Masse/Volumen)
<u>RT:</u>	Raumtemperatur		
RT-PCR:	Reverse-Transkriptase PCR		
Runx2:	Runt related transcription		
	factor 2		
<u>SDS:</u>	Sodium dodecyl sulfate		
	(Natriumdodecylsulfat)		
<u>SLR:</u>	signal log ratio		
	(Signalintensitätsparameter)		
<u>Sp7:</u>	Sp7 transcription factor		
	(Osterix)		
Stbw:	Standardabweichung		
TAE:	Tris-Azetat-EDTA		
<u>Tb.N:</u>	trabecular number (Anzahl		
	der Trabekel)		
<u>Tb.Sp:</u>	trabecular spacing		
	(Abstand der Trabekel)		
<u>Tb.Th:</u>	trabecular thickness		
	(Trabekeldicke)		
TCF:	T-Cell-Factor		
<u>TE:</u>	Tris-EDTA		
TRAP:	Tartrat resistant acid		
	phosphatase		
<u>Tris:</u>	Tris(hydroxymethyl)-		
	aminomethan		
<u>U:</u>	unit, Enzymeinheit		
<u>ü.N.:</u>	über Nacht		
<u>UV:</u>	Ultraviolett		
<u>V:</u>	Volt		
WBS:	Williams-Beuren-Syndrom		
<u>Wntx:</u>	wingless-related MMTV		
	integration site x		
WT:	Wildtyp		

1 Einleitung

Der Knochen ist ein metabolisch aktives Organ, das während des gesamten Lebens einem stetigen Umbauprozess (Remodelling) unterliegt. Jedes Jahr werden bei einem gesunden Menschen etwa zehn Prozent der gesamten Knochenmasse umgebaut, so dass das gesamte Skelett etwa alle zehn Jahre komplett erneuert wird. (Cohen, 2006). Bei diesem Prozess herrscht ein sensibles Gleichgewicht zwischen der Knochenresorption durch Osteoklasten und der Knochenformation durch Osteoblasten, welches bei einer ungünstigen Verschiebung zu Erkrankungen wie Osteoporose führen kann. Die Osteoporose ist eine chronische Skeletterkrankung, die durch eine Verminderung der Knochenmasse, eine Störung der Knochenmikroarchitektur und ein erhöhtes Frakturrisiko charakterisiert ist (Cohen, 2006). Besonders postmenopausale Frauen unterliegen einem hohen Risiko, an Osteoporose zu erkranken. Im Jahr 2003 litten in Deutschland 7,8 Millionen Menschen im Alter von mindestens 50 Jahren an Osteoporose (Häussler et al., 2007). Dabei ist die Prävalenz bei Frauen deutlich höher als bei Männern (ca. 6:1) und steigt sowohl bei Frauen als auch bei Männern mit dem Alter stark an. Die direkten Kosten der Osteoporose liegen in Deutschland jährlich bei etwa 5,4 Milliarden Euro und stellen demnach eine erhebliche Belastung für das Gesundheitssystem dar (Häussler et al., 2007). Aus diesem Grund ist die Erforschung und Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Behandlung der Osteoporose von großer Bedeutung, insbesondere auch vor dem Hintergrund, dass das Durchschnittsalter der Bevölkerung ständig zunimmt und demnach auch das Risiko, an Osteoporose zu erkranken, steigt.

1.1 Funktion und Struktur des Knochens

Das Skelett von Säugetieren besteht zum größten Teil aus mineralisiertem Knochen und Knorpel, welche zwei wichtige Funktionen ausüben. Die erste Funktion ist eine rein strukturelle, die darin besteht, die inneren Organe sowie das Knochenmark zu schützen und einen Befestigungspunkt für die Muskeln als Grundlage der Bewegung zu liefern. Die zweite Funktion liegt darin, dass der Knochen ein wichtiges Reservoir an Kalzium und Phosphat für die körpereigene Ionenhomöostase bereitstellt (Hadjidakis & Androulakis, 2006).

Knochen besitzt eine poröse Struktur, die aus Zellen, Gefäßen, Knochenmatrix und Kalziumkristallen (Hydroxylapatit) aufgebaut ist und je nach Knochentyp unterschiedliche Proportionen einnimmt. Im normalen menschlichen Skelett gibt es unter den etwas über 200

Knochen im Prinzip zwei morphologisch unterschiedliche Arten von Knochen, nämlich kortikalen Knochen und trabekulären Knochen (Abb. 1.1).



Abbildung 1.1: Schliffpräparat eines mazerierten adulten Wirbelkörpers.

Der kortikale Knochen macht wegen seiner höheren Dichte etwa 80 % der Knochenmasse aus, stellt jedoch nur 20 % der Knochenoberfläche dar. Der trabekuläre Knochen stellt die restlichen 80 % der Knochenoberfläche dar und befindet sich zum größten Teil im Inneren der langen Röhrenknochen und der Wirbelkörper. Trabekulärer Knochen ist weniger dicht, dafür aber elastischer und hat eine wesentlich höhere metabolische Aktivität als kortikaler Knochen (Hadjidakis & Androulakis, 2006).

1.2 Knochenzellen

1.2.1 Osteoblasten

Die Osteoblasten sind die Zellen, die für die Produktion der Knochenmatrix und ihrer Bestandteile verantwortlich sind. Osteoblasten treten in der Regel nicht alleine auf, sondern in sogenannten Clustern zu etwa 50 bis 200 Zellen entlang der Knochenoberfläche. Die Osteoblasten entwickeln sich aus multipotenten mesenchymalen Stammzellen, welche entweder zu Adipozyten (Fettzellen), Chondrozyten (Knorpelzellen), Myoblasten, Fibroblasten oder zu Osteoblasten differenzieren können (Krause et al., 2008). Studien an genetisch veränderten Mäusen haben gezeigt, dass insbesondere die Aktivität des Transkriptionsfaktors *Runx2 (Runt related transcription factor)* für die Differenzierung zu Osteoblasten von entscheidender Rolle ist. Welche dramatischen Auswirkungen eine Fehlfunktion dieses Transkriptionsfaktors für die Skelettbildung hat, zeigten Studien an *Runx2*-defizienten Mäusen, deren Skelett nur aus Knorpel besteht (Otto et al., 1997), was dadurch erklärt wurde, dass die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten zu einem frühen Zeitpunkt gestört ist (Abb. 1.2 A). Dass RUNX2 auch bei der Entwicklung des menschlichen Skeletts eine entscheidende Rolle spielt, zeigt sich anhand des Krankheitsbildes der cleidocranialen Dysplasie (CCD). Patienten mit dem CCD-Syndrom weisen charakteristische Merkmale wie hypo- bis aplastische Claviculae, stark verspäteten Fontanellenschluß, Schaltknochen und zumeist vermindertes Längenwachstum auf (Abb. 1.2 B). Durch molekulargenetische Untersuchung dieser Patienten konnte gezeigt werden, dass das CCD-Syndrom durch eine Haploinsuffizienz der *RUNX2* Expression bedingt ist (Mundlos et al., 1997; Mundlos, 1999).



Abbildung 1.2: Auswirkungen einer Deletion oder Fehlfunktion von Runx2 auf die Skelettbildung. (A) Alcianblau/Alizarinrot-gefärbte Wildtyp (links) und $Runx2^{-/-}$ (rechts) neugeborene Mäuse. Die Entwicklung des Knorpels (blau) ist in beiden Mäusen normal, jedoch kommt es in den $Runx2^{-/-}$ Mäusen nicht zu einer Ossifikation (rote Färbung). Aus Otto et al., 1997. (B) Patient mit cleidocranialer Dysplasie (CCD). Aus Prasad et al., 2006.

Neben *Runx2* wurden bereits viele weitere Faktoren identifiziert, die für die Differenzierung von Osteoblasten notwendig sind. Hierzu gehören insbesondere Wachstumsfaktoren wie FGFs (*Fibroblast Growth Factors*) und BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*) aber auch viele endokrine und parakrine Faktoren, die die Differenzierung und Funktion von Osteoblasten regulieren (Krause et al., 2008). Hierzu gehören insbesondere Vitamin D3, Östrogen, Parathormon (PTH), Leptin und neuesten Studien zufolge auch Serotonin (Cohen, 2006; Yadav et al., 2008).

1.2.2 Osteozyten

Osteoblasten, die im Osteoid, bzw. im später mineralisierten Knochen "eingemauert" werden, differenzieren zu sogenannten Osteozyten. Die Osteozyten repräsentieren mit 90-95 % den Großteil aller Knochenzellen (im Vergleich zu Osteoblasten mit 4-6 % und

Osteoklasten mit 1-2 %). Osteoblasten verlieren während des Differenzierungsprozesses zu Osteozyten einen großen Anteil ihrer Zellorganellen und entwickeln gleichzeitig cytoplasmatische Ausstülpungen, sogenannte *gap junctions*, durch welche sie Kontakt zu Zellen auf der Knochenoberfläche und benachbarten Osteozyten im mineralisierten Knochen halten. Connexine (insbesondere Connexin 43) sind die essentiellen Bestandteile dieser *gap junctions*, die eine direkte Kommunikation und einen direkten Stoffaustausch zwischen den verbundenen Zellen erlauben (Cherian et al., 2005). Bislang wird die Hauptfunktion der Osteozyten darin gesehen, als Mechanosensoren im Knochen zu fungieren und eine mechanische Belastung des Knochens in zelleigene Signale zu transduzieren (Turner et al., 1994; Klein-Nulend & Bonewald, 2008).

Osteozyten spielen aber auch eine wichtige Rolle in der Regulation der Knochenformation, denn sie exprimieren als einzige Zellen im menschlichen Körper *Sclerostin (SOST)*, einen potenten Inhibitor der Osteoblastendifferenzierung. Menschen mit inaktivierenden Mutationen im *SOST*-Gen leiden am Van-Buchem-Syndrom (VBD), welches sich durch ein übermäßiges Knochenwachstum des gesamten Skeletts äußert (Abb. 1.3).





Abbildung 1.3: Osteosklerose in VBD-Patienten. Röntgenaufnahmen von einem gesunden Menschen (links) und einem Patienten der am Van-Buchem-Syndrom (VBD), bedingt durch eine Mutation des *SOST*-Gens, leidet (Aus Keller, 2008).

Die hemmende Wirkung von Sclerostin auf die Osteoblastendifferenzierung beruht vermutlich darauf, dass es den kanonischen Wnt-Signalweg inhibiert, welcher in der frühen Phase der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Osteoblasten eine kritische Rolle spielt (Karsenty et al., 2009). Wenn dieser inhibitorische Effekt von Sclerostin ausfällt, kommt es zu einer vermehrten Bildung von Osteoblasten und einem unkontrollierten Knochenwachstum. Es gibt bereits erste vielversprechende Studien mit einem monoklonalen Antikörper gegen Sklerostin, von dem man sich einen osteoanabolen Effekt z.B. für eine Osteoporosetherapie erhofft (Li et al., 2009).

1.2.3 Osteoklasten

Osteoklasten sind die einzigen Zellen, die die Fähigkeit haben, mineralisierten Knochen zu resorbieren. Osteoklasten entstammen der hämatopoetischen Linie und entstehen durch die Differenzierung und Fusion von Monozyten/Makrophagen-Vorläuferzellen an der Knochenoberfläche (Boyle et al., 2003). Osteoklasten sind mit bis zu 100 µm Durchmesser sehr große, multinukleäre Zellen mit 4-20 Zellkernen, die vereinzelt in sogenannten Howship's Lakunen auf der Oberfläche des mineralisierten Knochens zu finden sind.

Zur Resorption adhärieren Osteoklasten über Integrinrezeptoren ($\alpha v\beta 3$) an den Knochen und nach einer Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts kommt es zur Ausbildung eines Aktinrings, und einer sogenannten *"sealing zone"* (Abb. 1.4), welche das unter dem Osteoklasten befindliche Knochenareal undurchlässig abschirmt (Teitelbaum S.L, 2000).



Abbildung 1.4: Schematische Darstellung eines Osteoklasten auf der Knochenoberfläche. Osteoklasten verankern sich durch Bildung eines apikalen Rings aus Aktin und durch Interaktion mit Integrinen fest auf der Oberfläche des mineralisierten Knochens. Unter dem Osteoklasten entsteht ein nach außen abgedichtetes extrazelluläres Kompartment (Resorptionslakune). Durch die Verschmelzung mit lysosomalen Vesikeln, die mit Enzymen wie Cathepsin K oder TRAP (*Tartrate Resistent Acid Phosphatase*) gefüllt sind, faltet sich die apikale Plasmamembran zur "*ruffled border"* und die lysosomalen Enzyme werden in die Resorptionslakune freigegeben. Außerdem kommt es zu einem Transport von Protonen und Chloridionen in die Resorptionslakune, was zu einer Herabsenkung des pH-Wertes auf etwa 4,5 in der Resorptionslakune führt. (modifiziert nach E. J. Barrett & P. Barrett, 2005)

Diese Resorptionslakune wird dann durch die Aktivität einer Protonenpumpe (H⁺-ATPase) und eines Chloridkanals (Clcn7) mit Salzsäure (HCl) auf einen pH-Wert von etwa 4,5

angesäuert (Abb. 1.4). Dieses saure Milieu führt zur Auflösung des mineralisierten Knochens und zur Freisetzung der organischen Matrix, die zum größten Teil aus Typl-Kollagen besteht (Cohen, 2006). Dieses wird durch das lysosomale Enzym Cathepsin K, welches vom Osteoklasten über die "*ruffled border*" in die Resorptionslakune sekretiert wird, abgebaut. Die gesamten entstehenden Abbauprodukte (Kollagenfragmente, Kalzium, Phosphat) werden schließlich durch den Osteoklasten aufgenommen und in die Zirkulation abgegeben.

Durch natürlich vorkommende Mutationen oder Studien an genetisch veränderten Mäusen sind bislang viele Gene identifiziert worden, deren Transkripte für die Osteoklastendifferenzierung oder Osteoklastenfunktion von entscheidender Rolle sind. Mutationen in diesen Genen führen zu einer abnormal hohen Knochendichte und dem Krankheitsbild einer Osteopetrose. Insbesondere die Zytokine RANKL (Receptor Activator of NF-kB-Ligand) und MCSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) sind für die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Osteoklasten von entscheidender Bedeutung. So entwickeln Mäuse mit einer spontanen Mutation im M-csf-Gen (op/op-Mäuse) eine Osteopetrose bedingt durch ein Fehlen von Osteoklasten (Boyle et al., 2003; McLean & Olsen, 2001), und das gleiche gilt für Mäuse in denen der Rezeptor für Rankl deletiert ist (Boyle et al., 2003). Mutationen im humanen CLCN7-Gen führen ebenfalls zum Krankheitsbild einer Osteopetrose, allerdings ist hier, wie auch bei Mäusen mit einer Deletion des Clcn7-Gens, die Anzahl an Osteoklasten normal, aber die Osteoklasten sind nicht in der Lage Knochen zu resorbieren. Dies liegt daran, dass diese Osteoklasten, ohne einen funktionierenden Chloridkanal, kein saures Milieu in der Resorptionslakune erzeugen können (Kornak et al., 2001). Aus dem gleichen Grund entsteht bei Menschen mit einer Mutation im TCIRG1-Gen, welches für eine Untereinheit einer Protonenpumpe im Osteoklasten kodiert, eine Osteopetrose, denn auch hier ist es dem Osteoklasten nicht möglich, eine Ansäuerung der Resorptionslakune zu erreichen und Knochen zu resorbieren (Frattini et al., 2000).

Die Zunahme an Knochenmasse bei einer Osteopetrose führt jedoch nicht, wie man vielleicht annehmen könnte, zu einer verstärkten biomechanischen Belastbarkeit der Knochen, sondern bewirkt eher das Gegenteil, denn die Qualität des Knochens bei osteopetrotischen Patienten ist, bedingt durch ein fehlendes Remodelling, deutlich verschlechtert. Außerdem kommt es zu weiteren Komplikationen, wie Kompressionen von Nerven oder aber des Knochenmarkkanals (Cohen, 2006).

1.3 Entwicklung des Skelettsystems

Im Prinzip werden zwei Arten der Skelettentwicklung unterschieden. Bei der desmalen Ossifikation differenzieren mesenchymale Vorläuferzellen direkt zu knochenbildenden Osteoblasten und sekretieren eine Kollagen- und Proteoglykan-haltige Matrix (Osteoid), welche dann nach Einlagerung von Hydroxylapatit unter anderem das Schädeldach, das Gesicht und Teile des Schlüsselbeins und Schulterblatts bildet. In den Mechanismus der desmalen Ossifikation sind insbesondere BMPs und der Transkriptionsfaktor Runx2 involviert (Yang, 2008).

Bei der enchondralen Ossifikation kommt es zuerst zu einer Bildung von Knorpelgewebe aus aggregierten mesenchymalen Zellen, welches dann im Laufe des Ossifikationsprozesses durch Knochen ersetzt wird. Die enchondrale Ossifikation findet bei allen Röhrenknochen des Skelettsystems statt und läßt sich im Prinzip in einzelne Stufen unterteilen.

Nach einer Kondensation mesenchymaler Vorläuferzellen differenzieren diese unter Einwirkung bestimmter Faktoren zu Chondrozyten und produzieren ein hyalines Knorpelskelett (Primordialskelett), das eine Vorlage für den zukünftigen Knochen darstellt. Ein essentieller Faktor für die Differenzierung zu Chondrozyten ist der Transkriptionsfaktor Sox9, der im Prinzip für die Entwicklung knorpelbildender Chondrozyten ebenso wichtig ist, wie Runx2 für die Differenzierung der Osteoblasten (Karsenty, 2008). Beim Menschen führen Mutationen im *SOX9* Gen zur Campomelen Dysplasie, was sich in einer Verbiegung der Extremitäten und einem Abknicken der Röhrenknochen sowie weiteren Fehlbildungen äußert (Cohen, 2006).

In der nächsten Phase der enchondralen Ossifikation werden die Chondrozyten hypertoph und sezernieren statt TypII-Kollagen nun TypX-Kollagen und Fibronektin, was eine folgende Mineralisierung des Knorpelskelettes begünstigt (Yang, 2008). Die hypertrophen Chondrozyten sezernieren außerdem VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), was zur Einsprossung erster Blutgefäße in die Knorpelmatrix führt. Nach der terminalen Differenzierung werden die hypertrophen Chondrozyten dann apoptotisch und es dringen von außen sogenannte Chondroklasten ein und zersetzten Teile der Knorpelmatrix. In die so entstandenen Einbruchzonen können weitere Blutgefäße aus dem Periost einwandern, was man als Invasion des Knorpels bezeichnet. Nun können auch Osteoblasten in den Freiraum gelangen und mit dem Aufbau des trabekulären Knochens beginnen. Die enchondrale Ossifikation schreitet zu beiden Enden der Diaphyse weiter, so dass schließlich zwei Zonen entstehen, in denen das Wachstum so lange abläuft, bis die endgültige Länge des Knochens erreicht wird (Yang, 2008).

1.4 Der Wnt-Signalweg

Im Jahr 2001 wurde veröffentlicht, dass inaktivierende Mutationen im Gen LRP5 (*Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5*) beim Menschen zum sogenannten Osteoporose Pseudoglioma (OPPG) Syndrom führen, welches sich durch eine stark verminderte Knochendichte sowie einen Defekt in der Regression hyaloider Blutgefäße im Auge äußert (Gong et al., 2001). Ein Jahr später wurde bekannt, dass eine aktivierende Mutation (G171V) im selben Gen zu Osteosklerose führt, also einer Erkrankung mit erhöhter Knochendichte, bedingt durch eine Überaktivierung von Osteoblasten (Boyden et al., 2002). Aufgrund dieser Beobachtungen erlangte der Wnt-Signalweg, in welchem LRP5 eine wichtige Rolle für die Signaltransduktion spielt, große Aufmerksamkeit in der Knochenforschung.

Im Jahr 1982 entdeckten Roel Nusse (Stanford Universität, USA) und Harold Varmus (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, USA) das erste *Wnt*-Gen. Sie stellten fest, dass Mäuse, bei denen dieses Gen künstlich aktiviert wurde, an Brustkrebs erkrankten (Nusse & Varmus, 1982) und nannten das somit neu entdeckte Protoonkogen *Int-1*. Nahezu zeitgleich entdeckte die spätere Nobelpreisträgerin Christiane Nüsslein-Volhard, (Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen), dass die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ohne das Gen *Wingless* keine Flügel entwickelt (Nüsslein-Volhard & Wieschaus, 1980). Später stellte sich dann heraus, dass es sich bei *Wingless* um das gleiche Gen handelt, das Nusse bei den Mäusen entdeckt hatte. Als Folge dessen wurden die Namen *Wingless* und *Int1* zu "Wnt" verschmolzen und durch Sequenzhomologie bis heute insgesamt 19 unterschiedliche *Wnt*-Gene im Menschen und in der Maus identifiziert (van Amerongen & Nusse, 2009). Der Wnt-Signalweg ist einer der am höchsten konservierten Signaltransduktionswege und eine funktionelle Aktivität konnte bereits in Schwämmen, Nesseltieren (*Cnidaria*), Meereswürmern (*Planaria*), *Drosophila, Caenorhabditis elegans* und allen Wirbeltierspezies gezeigt werden (Williams & Insogna, 2009).

Historisch gesehen werden die Wnt-Proteine in zwei Klassen eingeteilt, nämlich in die sogenannten "kanonischen" Wnt-Liganden und die "nicht-kanonischen" Wnt-Liganden. Die Einteilung in die jeweilige Gruppe beruhte dabei ursprünglich auf der Fähigkeit dieser Moleküle, die maligne Transformation von C57MG-Zellen zu induzieren (Wong et al.,

1994). Dabei wurden die Wnt-Liganden, die eine starke Transformation bewirkten zu den kanonischen Liganden gezählt (Wnt1, Wnt3, Wnt3a, Wnt7a) und die Liganden, die nicht oder nur schwach transformierend wirkten (Wnt2, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6) als nicht-kanonische Wnt-Liganden bezeichnet. Die Zuteilung zu einer Gruppe erfolgt heute allerdings hauptsächlich danach, welchen intrazellulären Signalweg das jeweilige Wnt-Protein in einer Zelle aktiviert.

Der bisher am besten untersuchte und verstandene Signalweg ist der kanonische Wnt-Signalweg. Ist dieser Signalweg nicht aktiviert, kommt es im Zytoplasma der Zelle zur Bildung eines Inaktivierungskomplexes aus den Proteinen Axin, APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), GSK3β (*Glycogen Synthase Kinase 3β*) und CK1α (*Casein Kinase 1α*) (Angers & Moon, 2009). Innerhalb dieses Komplexes kommt es zur Bindung und Phosphorylierung von β-Catenin durch GSK3β und CK1α (Abb. 1.5). Diese Phosphorylierung führt zu einer Erkennung von β-Catenin durch die SKP1-Cullin1-F-box (SCFβ-TrCP) E3 Ligase und letztlich zur Degradation im Proteasom (Abb. 1.5).



Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des kanonischen Wnt-Signalwegs: Links: Inaktiver kanonischer Wnt-Signalwes, ß-Catenin wird im "destruction-Komplex" durch Phosphorylierung für den proteasomalen Abbbau markiert. Rechts: Aktivierung des Signalwegs durch einen Wnt-Liganden führt zur Auflösung des "destruction-Komplexes" und zur Translokation von ß-Catenin in den Nukleus, was zur Aktivierung von LEF/TCF Transkriptionsfaktoren führt. (modifiziert nach Angers & Moon, 2009).

Kommt es nun zur Bindung eines kanonischen Wnt-Liganden an einen Rezeptor der Frizzled-Familie (Fzd1-10) und einen Corezeptor LRP5 oder LRP6, führt dies zur Aktivierung heterotrimerer G-Proteine und der Rekrutierung von Dvl (Dishevelled) zur Plasmamembran (Angers & Moon, 2009). Nun wird der Komplex aus Axin und GSK3β von Dvl gebunden und in räumliche Nähe zum zytoplasmatischen C-Terminus von LRP5/6 gebracht, was letztlich zu einer Phosphorylierung von LRP5/6 durch GSK3β führt. So entsteht am C-Terminus von LRP5/6 eine hochaffine Bindungsdomäne für Axin, was zu dessen Rekrutierung und Bindung führt. Dies hat zur Folge, dass der Inaktivierungskomplex für β-Catenin aufgelöst wird und eine Anreicherung von β-Catenin im Zytoplasma erfolgen kann (Abb. 1.5). Nun transloziert β-Catenin in den Zellkern, wo es den Co-Repressor Groucho verdrängt und mit dem T-Zell-Faktor (TCF) und Mitgliedern der LEF (*Lymphoid Enhancer binding protein Factor*)-Familie interagiert und so die Transkription der Zielgene anregt (Angers & Moon, 2009).

Neben dem β-Catenin-abhängigen, kanonischen Wnt-Signalweg, gibt es noch mindestens zwei weitere bekannte Wnt-abhängige Signaltransduktionswege, die man auch als nichtkanonische Wnt-Signalwege zusammenfasst. Beim Wnt/Ca²⁺ Signalweg wird durch die Bindung von sogenannten nicht-kanonischen Wnt-Liganden an Rezeptoren der Frizzled-Familie der intrazelluläre Kalziumspiegel erhöht, was zur Aktivierung der Ca²⁺-abhängigen Kinasen CamkII (*Calcium-calmodulin dependent kinase II*) und PKC (*Protein Kinase C*) führt (Kühl et al., 2000). Dieser Signalweg spielt eine wichtige Rolle während der dorsoventralen Entwicklung des Embryos, der Regulierung der Zellmigration, sowie eine Rolle in der Tumorsupression, seine Rolle im Knochenremodelling wurde bislang aber noch nicht genauer untersucht (Kühl, 2004).

Der Wnt/PCP (*Planar Cell Polarity*) Signalweg kontrolliert die zytoskelettale Organisation und damit die Zellpolarität und Zellbewegung. Dies geschieht hauptsächlich durch die Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) und Nemo-like-Kinase (NLK) abhängigen Signalkaskaden (Dale et al., 2009). Es konnte bereits gezeigt werden, dass dieser Signalweg auch für die Entwicklung des Skelettsystems eine wichtige Rolle spielt, denn er steuert die Polarität proliferierender Chondrozyten in der Wachstumsfuge und reguliert damit das Längenwachstum von Knochen (Liu et al., 2008; Li et al., 2009).

1.5 Frizzled-Rezeptoren

Im Jahr 1996 fand man heraus, dass die Serpentin-Rezeptoren der Frizzled-Familie (Fzd1-10) als Rezeptoren für Wnt-Proteine fungieren (Bhanot et al., 1996). Außerdem nahm man aufgrund struktureller Homologien zu G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) an, dass die Signalübertragung nach Bindung des Wnt-Liganden über die Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen vermittelt wird, weshalb man die Frizzled-Rezeptoren zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zählte. Im Jahr 1999 konnte erstmals ein Beweis für diese Annahme erbracht werden, denn es wurde gezeigt, dass die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in F9-Teratokarzinomzellen durch *Pertussis-Toxin*, einem Inhibitor der G-Proteine G α_i und G α_0 , verhindert werden konnte (Liu et al., 1999). Mit einem ähnlichen Ansatz konnten Katanaev et al. zeigen, dass ein durch Überexpression von Fzd1 ausgelöster Effekt auf die Ommatidien (Einzelaugen) in Drosophila, ebenfalls durch *Pertussis-Toxin* inhibiert werden konnte (Katanaev et al., 2005).

Strukturell bestehen die Fzd-Rezeptoren aus einem extrazellulären N-terminalen Ende mit einer hochkonservierten Cystein-reichen Domäne (CRD), an welche die Wnt-Liganden mit hohen Affinitäten binden können und einem 7-Transmembran-Segment (7TM-Segment), sowie einem intrazellulären C-terminalen Ende mit zwei hoch konservierten Bindungsdomänen für Dvl-Proteine (Abb. 1.6).



Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des 7TM-Modells eines Fzd-Rezeptors. Das Modell zeigt die extrazelluläre Wnt-Bindungsdomäne (CRD) sowie mögliche Glykosylierungsstellen und Phosphorylierungsstellen. In pink ist dargestellt die intrazelluläre hochkonservierte PDZ-Bindungsdomäne (KTxxxW) für die Bindung von Dvl. Blau hinterlegt ist eine weitere hoch konservierte PDZ Bindungsdomäne. (Modifiziert nach Schulte & Bryja, 2007)

Neben Wnt-Proteinen wurden in den letzten Jahren auch noch weitere Liganden für Fzd-Rezeptoren beschrieben. Hierzu gehört die Protein-Familie der *soluble Frizzled-related* *proteins* (sFRPs), die R-Spondine (Rspo1-4), sowie Norrin, welche alle direkt an Frizzled-Proteine binden können und Frizzled-abhängige Signalkaskaden aktivieren bzw. blockieren können (Schulte & Bryja, 2007). Mit der ersten Strukturaufklärung einer Cystein-reichen Domäne (CRD) eines Fzd-Rezeptors im Jahr 2001 wurde außerdem gezeigt, dass es zu einer Dimerisierung von CRDs der Frizzled-Rezeptoren kommen kann, was die Komplexität möglicher Ligand-Rezeptor-Bindungen, bei 19 Wnt-Proteinen, 10 Frizzled-Rezeptoren und vielen weiteren Liganden, zusätzlich erhöht (Dann et al., 2001).

2 Aufgabenstellung

Seit der Entdeckung inaktivierender und aktivierender Mutationen des *LRP5*-Gens bei Patienten mit erblich bedingter Osteoporose bzw. Osteosklerose, gilt die Wnt-abhänige Signaltransduktion als zentraler Mechanismus zur Regulation der Knochenbildung. Lrp5 ist ein Co-Rezeptor für Signalmoleküle der Wnt-Familie, der die Bindung dieser Liganden an ihre eigentlichen Rezeptoren der Frizzled-Familie unterstützt (Krishnan et al., 2006). Bis zum Beginn der vorliegenden Arbeit existierten keine publizierten Daten, die eine Rolle der 10 bekannten Frizzled-Proteine im Knochenremodelling beschreiben, obwohl diese Proteinklasse potenziell ein vielversprechender Ansatzpunkt für eine osteoanabole Therapie sein könnte.

In Vorarbeiten zu dieser Doktorarbeit konnte mittels Affymetrix-Genchipanalyse gezeigt werden, dass das Gen *Frizzled-9* (*Fzd9*) als einziges Gen dieser Rezeptorfamilie während der Osteoblastendifferenzierung, parallel zu bekannten Osteoblastenmarkern, induziert wird. Außerdem konnte mittels *in situ* Hybridisierung eine Expression von *Fzd9* in Osteoblasten nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass Fzd9 möglicherweise eine wichtige Rolle für die Differenzierung oder Funktion von Osteoblasten, und somit für die Knochenformation, haben könnte.

Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Ergebnisse der Vorarbeiten auf mRNA-Ebene und Protein-Ebene zu verifizieren und die Rolle von Fzd9 für die Differenzierung und Funktion von Osteoblasten *in vitro* aufzuklären. Um eine potentielle physiologische Bedeutung von Fzd9 im Knochenremodelling *in vivo* zu untersuchen, sollte zudem der Knochenphänotyp eines *Fzd9*-defizienten Mausmodells histologisch und histomorphometrisch in unterschiedlichen Altersstufen analysiert werden.

Außerdem sollte im Rahmen dieser Arbeit die Rolle des kanonischen Wnt-Signalwegs für die Differenzierung von Osteoklasten analysiert werden und durch Expressionsanalysen weitere Fzd-Rezeptoren identifiziert werden, die eine mögliche Funktion für die Differenzierung von Osteoklasten haben könnten.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Enzyme

Alizarinrot S Merck, Darmstadt 6 x DNA Loading Dye Fermentas, St. Leon-Rot Carl Roth GmbH, Karlsruhe Acrylamid 30% Invitrogen, Karlsruhe Agar Agarose PEQLAB GmbH, Erlangen Agarose Ammoniumperoxidsulfat Sigma-Chemie, München Ampicilin Sigma-Chemie, München Antarctic Phosphatase New England Biolabs, Ipswich, USA Bradford-Reagenz zur Proteinbestimmung Biorad, München beta-Mercaptoethanol Sigma-Chemie, München Sigma-Aldrich, Schnelldorf Calcein Chloroquin Sigma-Aldrich, Schnelldorf Coomassie-Brilliant-Blue R und G Serva GmbH, Heidelberg Denhardt's Lösung (1x) Sigma Aldrich, Schnelldorf Diethylpyrocarbonat (DEPC) Sigma-Chemie, München DNA-DreamTaq-Polymerase Fermentas, St. Leon-Rot aus Thermus aquaticus DNA-Ladder O'GeneRuler[™] 1 kb Fermentas, St. Leon-Rot Fermentas, St. Leon-Rot DNA-Loading Dye, 6x DNA Polymerase I, Large New England Biolabs, Ipswich, USA (Klenow) Fragment 1,4-Dithiothreitol (DTT) Sigma-Chemie, München Eosin G Merck, Darmstadt Fermentas, St. Leon-Rot 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal) Sigma-Aldrich, Schnelldorf Fast Red Violet LB Salz

Faramount Aqua Mounting Medium	DAKO, Glostrup, Dänemark
Formaldehydlösung (37%)	Merck, Darmstadt
Lithiumchlorid	Sigma-Chemie, München
Mayers Hämalaunlösung	Sigma-Chemie, München
Methylmethacrylat	Merck, Darmstadt
Molekularmassenstandard SDS	Fermentas, St. Leon-Rot
Nonylphenol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Naphtol ASMX Phosphat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Chemie, München
Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung	Roche, Grenzach
Proteaseinhibitor, complete Protease	Roche, Grenzach
Inhibitor Cocktail Tablets	
Pikrinsäure, gesättigt	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Protein Ladder, Spectra [™]	Fermentas, St. Leon-Rot
Multicolor Broad Range	
Rinderserumalbumin	Sigma-Chemie, München
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon Rot
Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
RNAse Inhibitor	Fermentas, St. Leon Rot
RNAse A (10 mg/mL)	Sigma-Chemie, München
Röntgenfilme (Agfa X-ray 90)	Linnhard, München
Säurefuchsin	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Rekombinantes sRANKL	Peprotech, Hamburg
Rekombinantes MCSF	Peprotech, Hamburg
Substrate für Enzymreaktionen	Sigma-Chemie, München
T4-DNS-Ligase	Fermentas, St. Leon Rot
Titriplex III	Merck, Darmstadt
Tween20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
One Shot [®] TOP10 Electrocomp TM	Invitrogen, Karlsruhe
E. Coli Bakterien	
TRIzol® Reagent	Invitrogen, Karlsruhe

Alle nicht gesondert aufgeführten Festsubstanzen und Lösungen wurden von den Firmen Fluka (Buchs, St. Gallen, Schweiz), Gibco (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (München) verwendet. Alle organischen Lösungsmittel stammten entweder von J.T. Baker B.V. (Deventer, Niedelande) oder Carl Roth GmbH (Karlsruhe). Alle Chemikalien wiesen, soweit nicht anders angegeben, p.A. Qualität auf.

3.1.2 Antikörper

3.1.2.1 Primärantikörper

ß-Actin	Sigma-Aldrich, #A3853
Axin 2	Abcam, #ab32197
Frizzled-9	R&D Systems, #AF112
β-Catenin (C-18)	Santa Cruz, #sc-1496
Frizzled-8	R&D Systems, #AF2440
Isg15	Erhalten von Prof. K. P. Knobeloch,
	Universitätsklinikum Freiburg
Osteoprotegerin (OPG)	R&D Systems, #AF492
Phospho-p44/42 MAPK	Cell Signaling, #4377
(Thr202/Tyr204) (197G2)	
Phospho-LRP6 (Ser1490)	Cell Signaling, #2568
Phospho-B-Catenin (Ser33/37/Thr41)	Cell Signaling, #9561
Phospho-Stat1 (Tyr701)	Cell Signaling # 9171
Phospho-Stat2 (Tyr690)	Cell Signaling #4441
Phospho-Stat3 (Tyr705) (D3A7)	Cell Signaling #9145
Phospho-Stat5 (Tyr694)	Cell Signaling # 9359
Phospho-Stat6 (Tyr641)	Cell Signaling # 9361

3.1.2.2 Sekundärantikörper/Konjugate

Ziege anti-Maus IgG, HRP-konjugiert	DAKO, #P0447
Kaninchen anti-Ziege IgG, HRP-konjugiert	DAKO, #P0449
Ziege anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert	DAKO, #P0448

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5ml und 2,5ml	Eppendorf, Hamburg
Falcon Reaktionsgefäße, 15ml und 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Filter, Bottle Top	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Filter, 0,45µm	VWR, Darmstadt
Gewebekulturplatten	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturschalen	Greiner, Frickenhausen
Kanülen, Gr20, 100 Sterican	Braun, Melsungen
Optische Folien, MicroAmp	Applied Biosystems, Foster City, USA
Optische 96-Kammer-Platten mit Barcode	Applied Biosystems,
	Foster City, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten	BD Falcon, Heidelberg
Spritzen, 1ml	Braun, Melsungen
Spritzen, 20ml	BD Falcon, Heidelberg
Whatman Papier, 3mm	GE Healthcare, München
Zellsieb, 100µm	BD Falcon, Heidelberg

3.1.4 TaqMan® Gene Expression Assays

Alle verwendeten Reagenzien wurden bei der Firma Applied Biosystems (Foster, USA) bestellt und nach Angaben des Herstellers verwendet.

TaqMan® Gene Expression Master Mix #4369016

Genspezifische Assays:

Axin2	#Mm01265783_m1
Apcdd1	#Mm01257559_m1
Alpl	#Mm00475834_m1
Calcr	#Mm00432282_m1
Ccl5	#Mm01302427_m1
Ccl2	#Mm00441242_m1
Cxcl5	#Mm00436451_g1

Fzd8	#Mm00433419_s1
Fzd9	#Mm01206511_s1
Gapdh	#4352932E
Isg15	#Mm01705338_s1
Ibsp	#Mm00492555_m1
Ifit1	#Mm00515153_m1
Oasl2	#Mm00496187_m1
Tnfrsf11b	#Mm00441908_m1

3.1.5 Geräte

Agarose-Gelelektrophorese:	BioRad, München	
BioRad Sub-Cell®		
Analysenwaage BP 221S	Sartorius, Göttingen	
Analysenwaage BL 600	Sartorius, Göttingen	
Autotechnikon	Bavimed, Birkenau	
Blotting-Kammer BioRad Trans-Blot SD®,	BioRad, München	
(Semi-Dry)		
Dampfsterilisator: Webeco Modell H	Webeco GmbH, Bad Schwartau	
Dispergiergerät Ultra Turrax T25	IKA, Staufen	
Elektroporator, Gene Pulser	BioRad, München	
XcellTm®		
Gelelektrophorese (Polyacrylamid):	BioRad, München	
SDS/PAGE Mini Protean®		
Inkubator RFI-125	Infors AG, Basel, Schweiz	
Mikroskope: Olympus BH-2 RFCA	Olympus, Hamburg	
Olympus CHT Olympus	Olympus, Hamburg	
Molecular Imager ChemiDoc®	BioRad, München	
XRS System		
NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000	PEQLAB GmbH, Erlangen	
Power-Supply, Power Pac 1000	BioRad, München	
pH Meter MP 220	Mettler Toledo, Giessen	

Real time-PCR-Cycler, Applied Biosystems	Applied Biosystems, Foster, USA
StepOnePlus®, 96well format	
Röntgenentwickler, OPTIMAX	Protec, Oberstenfeld
Röntgengerät Faxitron Xray Sterile	Faxitron Xray Corp., Wheeling, USA
Arbeitsbank, Hera Safe®Rotationsmikrotom	Heraeus, Hanau
Microtec Cut 4060E	Enno Vieth GmbH, Hamburg
Thermocycler Eppendorf Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
<i>ep</i> family	
UV-Tisch	BioRad, München
Video Graphic Printer, UP-895 MD	Sony, Berlin
Wasserbad, GFL 1086	GFL, Burgwedel
Zentrifuge, Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge, Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Zentrifuge, Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg

3.1.6 Puffer und Lösungen

Alizarinrot Färbelösung:	40 mM Alizarinrot S, pH 4,2
<u>Blockpuffer:</u>	1x TBS-Tween + 5 % Milchpulver
Calcein-Injektionslösung:	0,15 M NaCl, 2 % NaHCO ₃ , 1 % Calcein
<u>DEPC-H₂O:</u>	2 mL Diethylpyrokarbonat auf 1000 mL H ₂ O, schütteln und ü.N. bei RT inkubieren lassen und anschließend autoklavieren.
EDTA (20 %):	200 g Titriplex III auf 2000 mL H ₂ O
<u>1x Einfriermedium (Zellen):</u>	10 % FKS, 80 % Kulturmedium, 10 % DMSO
Eosin-Lösung (HE-Färbung):	0,25 g Eosin G 250 mL dest. H ₂ O 5 Tropfen Eisessig

ECL-Substratlösung:	20 mL 0,1 M Tris pH 8,5
(jeweils frisch angesetzt)	6,2 μL 30 % H ₂ O ₂
	100 µL 500 mM Luminol (in DMSO)
	100 µL 80 mM p-Coumarinsäure (in DMSO)
Gießlösung (Acrylat-Histologie):	1000 mL Methylmethacrylat (entstabilisiert),
	3,3 g Benyoylperoxid, 100 mL Nonyl-Phenol.
	Vor dem Gießen der Blöcke: 500 µL N,N
	Dimethyl-p-Toluidin auf 100 mL Gießlösung
	geben
Van Gieson-Färbelösung:	2,5 g Säurefuchsin
	900 mL gesättigte Pikrinsäure
	100 mL Glycerin
	5 mL konz. Salpetersäure
Infiltrationslösung I (Acrylat):	1000 mL Methylmetacrylat, entstabilisiert
	3,3 g Benzoylperoxid, getrocknet
Infiltrationslösung II (Acrylat):	1000 mL Methylmetacrylat, entstabilisiert
	3,3 g Benzoylperoxid, getrocknet
	100 mL LPG (Nonyl-Phenol)
Von Kossa-Färbelösung:	3 g Silbernitrat auf 100 mL H ₂ O
LB/Amp-Medium:	LB-Medium, 100 µg/mL Ampicilin
Mausschwanz-Lysis-Puffer:	100 mM EDTA, pH 8,0
	50 mM Tris, pH 8,0
	100 mM NaCl
	1 % SDS
Natriumthiosulfatlösung, 5%:	5 g Natriumthiosulfat auf 100 mL H_2O

<u>1 x PBS Puffer:</u>	10 mM Di-Natriumhydrogenphosphat
	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	2 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7,4
D-PBS 1x für Zellkultur (steril):	fertige Lösung, Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)
Proteinase K-Lösung:	25 mg Proteinase K in 25 mL H ₂ O lösen und bei -20 °C lagern
<u>SDS-Lösung (20 %):</u>	200 g SDS in 900 mL H_2O auf 68 °C erhitzen, pH auf 7,2 mit HCl einstellen und auf 1 L auffüllen
50 x TAE-Puffer:	2 M Trizma-Hydrochlorid 50 mM EDTA, pH 7,8
<u>RIPA-Puffer:</u>	1 % NP40, 1 % Natriumdeoxycholat
	0,1 % SDS, 150 mM NaCl
	2 mM EDTA, 0,01 M Natriumphosphat
	jeweils direkt vor Nutzung Zusatz von Protease- Inhibitor
<u>Roti®-P/C/I:</u>	Redestilliertes, in TE-Puffer äquilibriertes Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 25: 24:1. (gebrauchsfertige Lösung, Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
TRAP-Färbelösung:	5 mg Naphtol ASMX Phosphat in 500 µL DMF
	lösen und zu 50 mL TRAP-Puffer geben;
	30 mg Fast Red Violet LB Salz dazugeben, gut
	mischen und direkt verwenden.

TRAP-Puffer:	40 mM Natriumacetat	
	10 mM Natriumtartrat, pH 5,0	
SDS-Laufnuffer	0.25 M Tris	
<u>DDD Laarpunet.</u>	0.19 M Glycin	
	0.1 % SDS	
SDS-Sammelgelpuffer (nH 6 8):	0.5 M Tris mit 1M HCl auf nH 6.8 eingestellt	
<u>555 Summergerpunter (pri 0,0).</u>	0,4 % SDS	
SDS-Trenngelnuffer (nH 8 8)	1.5 M Tris mit 1M HCl auf nH 8.8 eingestellt	
<u>505 Heingelpuner (ph 6,6).</u>	0,4 % SDS	
SDS-Probennuffer	60 mM Tris/HCl nH 6 8	
	10 % Glycerin	
	1 % DTT	
	2 % SDS	
	0.1 % Bromphenolblau	
SSC-Puffer (20x)	3 M NaCl,	
	0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0	
Sodaformollösung:	12,5 g Natriumkarbonat in 187 mL H ₂ O gelöst	
	+ 62,5 mL 37 % Formaldehydlösung	
STE-Lösung (600 mL):	12 mL 1 M Tris-HCl, pH 7,5	
	300 mL 4x SSC-Puffer	
	1,2 mL EDTA (0,5 M)	
	DEPC-H ₂ O ad 600 mL	
TBS-Puffer (10x):	24,2 g Tris Base, 80 g NaCl, mit HCl auf pH 7,6	
	einstellen, auf 1000 mL H ₂ O	
TBS-Tween (1x):	1 mL Tween20 auf 1000 mL 1xTBS	

<u>Toluidin-Färbelösung:</u>	1,0 g Toluidinblau O auf 100 mL dest. H ₂ O pH mit HCl auf 4,5 eingestellt
Trypsin-EDTA-Lösung:	fertige Lösung, Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)
X-Gal (blau-weiß-screening):	40 mg/mL in DMF, bei -20 °C lagern

3.1.7 Primersequenzen

3.1.7.1 Primer für RT-PCR-Expressionsanalysen

Calcr	Forward-Primer: 5'- GTAAGTGCCATTAGAGCGCCTT-3'
	Reverse Primer: 5'- GTGAGATTGGTAGGAGCCTGAA-3'
Fzd1	Forward-Primer: 5'- CAAGGTTTACGGGCTCATGT-3'
	Reverse Primer: 5'- CAAACTTGTCGTTGCACACC-3'
Fzd2	Forward-Primer: 5'- CCGTCTCTGGATCCTCACAT -3'
	Reverse Primer: 5'- CTTTCTTAGTGCCCTGCACC -3'
Fzd3	Forward-Primer: 5'- CCTTGAGGATGTGCCAAGAT-3'
	Reverse-Primer: 5'- GCTATAGGCACGCTGACACA-3'
Fzd4	Forward-Primer: 5'- GCCAATGTGCACAGAGAAGA-3'
	Reverse Primer: 5'- AGGCTCCTCTTCACCCAGAT-3'
Fzd5	Forward-Primer: 5'- ACCTGTGTGTGTGTCACTGGGA -3'
	Reverse Primer: 5'- ACTTGACACTGGGGATGAGC-3'
Fzd6	Forward-Primer: 5'- TCTGTGCCTCTGCGTATTTG-3'
	Reverse Primer: 5'- TCTCCCAGGTGATCCTGTTC-3'
Fzd7	Forward-Primer: 5'- GCTTCCTAGGTGAGCGTGAC -3'
	Reverse Primer: 5'- AACCCGACAGGAAGATGATG -3'
Fzd8	Forward-Primer: 5'- TGCCACAACCCCTTCTTTAG -3'
	Reverse Primer: 5'- CACTTTCTCATGTCCTGCCA -3'
Fzd9	Forward-Primer: 5'- AGTTTCCTCCTGACCGGTTT -3'
	Reverse Primer: 5'- GTGGCAGCAGTACATGGTTG -3'
Fzd10	Forward-Primer: 5'- CAGGAAGGACTGGAGAGCAC -3'

	Reverse Primer: 5'- GCTGCCCACATAACACACAC -3'
Isg15	Forward-Primer: 5'- CAGGAAGGACTGGAGAGCAC -3'
	Reverse Primer: 5'- GCTGCCCACATAACACACAC -3'
Lrp5	Forward-Primer: 5'- CATCCTGGTGTTCCACTCCT -3'
	Reverse Primer: 5'- CGGGTCATAGTTGATGGCTT -3'
Lrpб	Forward-Primer: 5'- CTGAAGGCCACAAGTGTTCA -3'
	Reverse Primer: 5'- GCAGAGGCTTCTTTGACACC -3'
Gapdh	Forward-Primer: 5'-GACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG-3'
	Reverse Primer: 5'-CTCCTGTTATTATGGGGGGTCTGG-3'

3.1.7.2 Primer für die Genotypisierung

<i>Fzd9</i> WT :	(5'-CAA TAC GGA GAA GCT GGA GA-3') und (5'-CCC ACC ACC AAG		
	GAC ATG AA-3'); Erwartete Bande: ~250 bp.		
Fzd9 KO:	(5'-ATA GCC TGA AGA ACG AGA TCA-3') und (5'-GCT TCC AGA		
	GAA ATG CCA CA-3´); Erwartete Bande: ~500 bp.		
Fzd8 WT:	(5'-GTA GTC CTC CAG GCA GAT GGG CGT G-3') und (5'-AGT GAC		
	CTC GCT CCT AGC CGC CTT G-3´); Erwartete Bande: ~280 bp.		
Fzd8 KO:	(5'-GAC GTT GTT TGT CTT CAA GAA GCT TC-3') und (5'-AGT GAC		
	CTC GCT CCT AGC CGC CTT G-3´); Erwartete Bande: ~410 bp.		
<i>Isg15</i> WT:	(5'-GCC CCC ATC CAG AGC CAG TGT T-3') und (5'-AGC CCC GAT		
	GAG GAT GAG GTG T-3'); Erwartete Bande: ~300 bp.		
Isg15 KO:	(5'-CGC GAA GGG GCC AAC CAA AGA A-3') und (5'- AGC CCC GAT		
	GAG GAT GAG GTG T -3'); Erwartete Bande: ~700 bp.		

3.1.7.3 Weitere verwendete Primer

Fzd9_clone_for:	5'-GTT GTT CCT CCG AAG GCG CCA C-3'
Fzd9_clone_rev:	5'-GGG TTT ATT CCA GTC ACA GCT TCC-3'
Fzd9_Seq1:	5'-CCA TGT GCG AGC AGG CTC GC-3'
Fzd9_Seq2:	5´-GCT ACA ATG TCT ACT CCT TGG-3´
Fzd9_Seq3:	5'-GGT ACC AGT TTC CTC CTG ACC-3'
Fzd9_Seq4:	5'-ACT TTT CAG ACT TGG CAG AGC-3'

3.1.8 Zellkulturmedien

Für die Kultur primärr muriner Osteoblasten, Osteoklasten und von MC3T3-E1 Zellen wurde Minimum Essential Medium (MEM, alpha Modifikation, Sigma # M0894) verwendet. Dem Medium wurden 10 % Hitze-inaktiviertes fötales Kälberserum (Hyclone # CH30160.03) sowie 1 % einer Penicilin/Streptomycin Antibiotikalösung (Gibco # 15140) zugesetzt. Zur Kultur von Osteoblasten und MC3T3-E1 Zellen wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Für die Kultur von Osteoklasten wurde ein pH-Wert von 6,9 eingestellt.

Für die Kultur von HEK-293T Zellen wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM, High Glucose, Invitrogen # 31966-021) verwendet. Dem Medium wurden 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (Hyclone # CH30160.03) sowie 1 % einer Penicilin/Streptomycin Antibiotikalösung (Gibco # 15140) zugesetzt.

Die Kultur der RAW264.7 Zellen erfolgte in Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM, High Glucose, Invitrogen # 31966-021). Dem Medium wurden 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (Hyclone # CH30160.03) sowie 1 % einer Penicilin/Streptomycin Antibiotikalösung (Gibco # 15140) zugesetzt.

Die Differenzierung zu Osteoklasten erfolgte in Minimum Essential Medium (MEM, alpha Modifikation, Sigma # M0894) mit 10 % Hitze-inaktiviertem fötalem Kälberserum (Hyclone # CH30160.03) sowie 1 % einer Penicilin/Streptomycin Antibiotikalösung (Gibco # 15140) unter Zugabe von 50 ng/mL rekombuinantem sRANKL.

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis et al., 1986) ist es möglich, Nukleotidsequenzen *in vitro* enzymatisch und exponentiell zu amplifizieren. Mit dieser sehr sensitiven Methode ist es möglich einzelne DNA-Moleküle als Vorlage für eine Reaktion zu benutzen. Für die PCR wird doppelsträngige DNA benötigt sowie zwei Oligonukleotide (Primer), deren Sequenzen zu dem 5'- bzw. dem 3'-Ende der Vorlage identisch bzw. revers komplementär sind. Diese Oligonukleotide dienen einer thermostabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) als Primer für die DNA-Synthese. Die PCR ist in drei Schritte gegliedert:

- 1. Denaturierung einer DNA-Vorlage bei 94°C
- 2. Zusammenlagerung (Annealing) von Template-DNA und den Primern bei einer von der Länge und Basenzusammensetzung der Primer-abhängigen Temperatur.
- 3. DNA-Polymerisation bei 72°C, dem Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase

PCR-Amplifikationen zur Genotypisierung von Mauslinien (3.2.1.8) wurden mit ca. 100 ng Template-DNA, 20 pmol von jedem Primer, 250 μ M dNTPs, einem vorgefertigten Puffer (10x) und 1 U *Dream-Taq*®-*DNA* Polymerase (Fermentas, St. Leon Rot) in einem Reaktionsvolumen von 20 μ l durchgeführt.

Ein typisches PCR-Cycling-Programm verlief wie folgt, wobei die Dauer des Elongationszyklusses und die Annealing-Temperatur je nach Größe des zu amplifizierenden Templates und der Primersequenzen variiert wurden.

Reaktion	Zeit	Temperatur	
Primärdenaturierung	2 min	94 °C	
Denaturierung	30 s	94 °C	
Annealing	45 s	58 °C	→ X 35
Polymerisation	1 min/1kb	72 °C	
Endsynthese	5 min	72 °C	

3.2.1.2 Quantitative RT- PCR (qRT-PCR)

Mittels qRT-PCR ist es möglich, die bei einer PCR vervielfältigte DNA-Menge zu quantifizieren. Bei einer "*real-time*" PCR wird während einer PCR ein Fluoreszenzsignal erzeugt, welches der Zunahme des PCR-Produktes proportional ist und direkt bzw. "*real-time*" gemessen werden kann. So ist es möglich die Reaktion in der logarithmischen Phase der PCR zu verfolgen und über den sogenannten CT-Wert letztlich die relative Ausgangskonzentration des verwendeten DNA Templates zu bestimmen.

Eine gängige Methode ist die Verwendung von sogenannten TaqMan®-Sonden. Hierbei handelt es sich um Oligonukleotide mit einer Sequenz, die dem zu amplifizierenden
Fragment komplementär ist und an den Enden mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen, einem Reporter und einem Quencher, konjugiert ist. Dabei ist der fluoreszierende Reporterfarbstoff kovalent an das 3'-Ende der Sonde gebunden und der Quencher an das 5'-Ende. Da die Taq-Polymerase eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, wird die Sonde während der Synthese am 5'-Ende abgebaut. So werden Reporter und Quencher räumlich voneinander getrennt und aufgrund des somit abgeschwächten Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) kommt es zu einer gesteigerten Reporter-Fluoreszenz welche vom Gerät detektiert werden kann.

Zur Quantifizierung der gemessenen Fluoreszenzsignale können verschiedene Rechenmodelle herangezogen werden. Meistens wird ein Referenzgen ("Haushaltsgen") mitgemessen, z. B. Gapdh oder B2-microglobulin um eine relative Quantifizierung durchführen zu können. Um möglichst immer am Anfang der exponentiellen Phase der PCR messen zu können wurde der Ct-Wert (Cycle Threshold) eingeführt, welcher den Zyklus der PCR beschreibt, bei welchem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Bei einer relativen Quantifizierung wird die n-fache Expression mit Hilfe des $\Delta\Delta$ Ct-Wertes angegeben. Hierbei werden die Ct-Werte der beteiligten Reaktionen auf die Ct-Werte des Haushaltsgens bezogen (Δ Ct) und letztlich voneinander abgezogen $(\Delta\Delta Ct)$. Aus $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ergibt sich dann die n-fache Expression.

Für die durchgeführten Expressionsanalysen wurden vorgefertigte TaqMan® Gene Expression Assays von der Firma Applied Biosystems nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.1.3 Isolierung von RNA aus Gewebe

Zur Isolierung von RNA aus Geweben wurden frisch isolierte Gewebestücke bis zu einem Gewicht von 2 mg in 1 mL TRIzol® mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Dazu wurden anschließend 200 μ L Chloroform gegeben und geschüttelt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm bei 4 °C wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 μ L Isopropanol gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 13.000 rpm bei 4 °C wurde das erhaltene Pellet mit 70 % Ethanol (in DEPC-H₂O) gewaschen und anschließend getrocknet und in 50 μ L DEPC-H₂O gelöst.

3.2.1.4 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die Synthese von cDNA erfolgte mit dem SuperScript® III Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen #18080-400) nach Angaben des Herstellers. Es wurden jeweils 1 μ g RNA unter Verwendung von Oligo(dT)₂₀ Primern in cDNA umgeschrieben.

3.2.1.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen der DNA wurden in der zentralen Sequenziereinrichtung des UKE nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger durchgeführt. Für die PCR wurde folgender Ansatz pipettiert.

500 ng DNA in H₂O gelöst
15 pM Primer
2 μL Big Dye
8 μL 2,5x Puffer
ad 20 μL Aqua dest.

PCR-Programm:

Reaktion	Zeit	Temperatur	
Primärdenaturierung	2 min	96 °C	
Denaturierung	10 s	96 °C	
Annealing	5 s	50 °C	│
Polymerisation	4 min	60 °C	
Endsynthese	5 min	60 °C	

Im Anschluss wurde die DNA zu einer Lösung aus 250 μ L absolutem Ethanol, 80 μ L H₂O und 10 μ L 3 M Natriumazetat pH 6,0 gegeben und geschüttelt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 13.000 rpm wurde der Überstand abgenommen, das Pellet getrocknet und zur Sequenzierung abgegeben. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit dem Programm *Sequence Scanner* V1.0 von Applied Biosystems.

3.2.1.6 Agarosegelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von PCR-Produkten wurde für ein 1 %-iges Agarosegel 1 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer in einem Mikrowellenofen aufgekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Zu dieser Lösung wurden 5 µL einer 10mg/mL Ethidiumbromidlösung gegeben und das Gel in horizontalen Gelkammern gegossen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80-120 V für 15-30 min. Nach ausreichender Auftrennung wurden die Gele auf einem UV-Transilluminator (BioRad, München) fotografiert.

3.2.1.7 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien

Zu der Mausschwanzbiopsie wurden 700 μ L Maussschwanz-Lysis-Puffer und 50 μ L Proteinase K Lösung (10 mg/mL) gegeben und über Nacht bei 55 °C inkubiert. Dazu werden 750 μ L Roti®-P/C/I gegeben, geschüttelt und für 4 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nochmals mit gleichem Volumen Roti®-P/C/I ausgeschüttelt. Die obere Phase wurde erneut abgenommen und mit gleichem Volumen Isopropanol versetzt und geschüttelt. Das Gemisch wurde 5 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet nach 5 min Trocknung bei RT in 50 μ L TE Puffer aufgenommen.

3.2.1.8 Genotypisierung

Die DNA zur Genotypisierung der Mäuse wurde aus Schwanzbiopsien nach 3.2.1.7 isoliert. Für die Genotypisierung mittels PCR wurde die DNA 1:10 mit H₂O verdünnt und 2 μ L als Ausgangsmaterial verwendet.

3.2.1.9 Affymetrix-Genchip-Analyse

Die Affymetrix-Genchip-Analyse ermöglicht eine vergleichende genomweite Expressionsanalyse. Die in dieser Arbeit durchgeführten Genchip-Analysen wurden mit Hilfe der Abteilung für klinische Chemie des UKE in der Arbeitsgruppe von Dr. T. Streichert durchgeführt. Hierzu wurde 5 μ g RNA in cDNA umgeschrieben. Die Synthese der biotinylierten cRNA wurde mit dem IVT Labeling Kit der Firma Affymetrix nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Hybridisierung auf dem Genchip (Affymetrix MG 430 2.0) wurde die cRNA in einer Hybridisierungslösung bei 45 °C für 16 Stunden inkubiert und anschließend mit der *Affymetrix Fluidics Station* 450 gewaschen. Der Scan der Genchips erfolgte dann mit dem *Affymetrix Gene Chip Scanner 7G* und die Signale wurden mit der GCOS Software von Affymetrix prozessiert. Die Vergleichsanalysen wurden mit dem Affymetrix MAS Algorithmus durchgeführt.

3.2.1.10 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Für den enzymatischen Verdau von Plasmid-DNA mittels Restriktionsendonukleasen wurden hauptsächlich *FastDigest*® Enzyme der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Die gewünschte Menge an DNA wurde mit der erforderlichen Menge an Enzym dabei je nach eingesetzter DNA-Menge für 15-60 min bei 37 °C in folgendem Reaktionsansatz verdaut:

DNA	1µg
10X FastDigest® Puffer	2 µL
FastDigest® Enzym	1 µL
H ₂ O	ad 20µL

Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Restriktionsansatz dann in der Regel für 5 min bei 80 °C inkubiert oder eine gelelektrophoretische Auftrennung durchgeführt.

3.2.1.11 Modifizierung von DNA-Enden

Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten: Die zu dephosphorylierende DNA wurde mit einer Antarctic Phosphatase (NEB #M0289L) bei 37 °C in 1x AP Puffer für 30 min behandelt. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung durch erhitzen der Reaktionslösung auf 65 °C für 5 min.

Auffüllreaktion überhängender 5'-Enden für eine *blunt end ligation* mit DNA Polymerase I, Klenow-Fragment: Nach einem Restriktionsverdau wurden die DNA-Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Isolierung aus dem Gel (3.2.1.12) in 41,5 μ L H₂O aufgenommen. Hierzu wurden 5 μ L 10x Klenow Puffer (NEB), 2 μ L 1mM dNTPs und 1,5 μ L Klenow (5U/ μ L, NEB) pipettiert und für 15 min bei 25 °C inkubiert. Eine Hitzeinaktivierung erfolgte durch erhitzen auf 75 °C für 20 min.

3.2.1.12 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Für die Extraktion von PCR-Fragmenten oder verdauter Plasmid-DNA aus Agarosegelen wurde das *QIAEX II Gel Extraction Kit* (Qiagen #20021) nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.1.13 Ligation von DNA-Fragmenten

PCR-Produkte, die mittels Taq-Polymerase, ausgehend von cDNA oder genomischer DNA amplifiziert wurden, wurden zuerst mittels *TOPO®-Cloning* in den pCR-TOPO 2.1 Vektor ligiert (Invitrogen #K456001). Beim *TOPO®-Cloning* handelt es sich um ein Verfahren, das von der Firma Invitrogen entwickelt wurde und die biochemischen Eigenschaften der Typ-I-DNA-Topoisomerase ausnutzt. Die Durchführung erfolgte gemäß den Vorgaben des Händlers.

Bei Ligationen von Vektor und Insert, welche zuvor mit Restriktionsenzymen behandelt wurden und gegebenenfalls weiter modifiziert wurden (3.2.1.11), wurde die T4-Ligase verwendet. Hierzu wurden in der Regel Insert und Vektorfragment im molaren Verhältnis von 3:1 in einem 20 μ L Reaktiosansatz mit 2 μ L des 10x Ligasepuffers und 1 μ L T4-Ligase (NEB #M0202) eingesetzt und über Nacht bei 16 °C ligiert.

3.2.1.14 Transformation kompetenter Bakterien durch Elektroporation

Für das Einschleusen von Plasmid-DNA in transformationskompetente *One Shot*^(®) *TOP10 Electrocomp*TM E.coli-Bakterien wurde das Elektroporationsverfahren verwendet. Dazu wurden 50 µL der elektrokompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und 2 µL DNA (100 pg-100 ng) gegeben, gemischt, in eine gekühlte Küvette überführt und im Gene Pulser XcellTm (BioRad) elektroporiert. Anschließend wurden 250 µL vorgewärmtes S.O.C Medium (Invitrogen #15544-034) dazugegeben und für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden 50 µL des Ansatzes auf eine vorgewärmte LB-Agarplatte, die je nach Resistenzgen das entsprechende Antibiotikum enthielt, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

3.2.1.15 Präparation von Plasmid-DNA (Miniprep, Maxiprep)

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus 4 mL E.coli-Bakterien Kulturen wurde mit dem QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen #27106) durchgeführt. Dazu wurden die Bakterien zuerst für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und aus dem entstandenen Bakterienpellet nach Angaben des Herstellers die Plasmid-DNA isoliert. Die Isolierung größerer Plasmid-DNA Mengen aus 100 mL Kulturen erfolgte mit dem QIAfilter[®] Plasmid Maxi Kit (Qiagen #12263) oder mit dem EndoFree[®] Plasmid Maxi Kit (Qiagen #12362) ebenfalls nach Angaben des Herstellers.

3.2.1.16 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte mit dem BioRad Protein Assay Reagenz (BioRad #500-0006) nach einem modifizierten Bradford Prinzip. Hierzu wurden 1-2 μ L des Protein Lysats zu 200 μ l H₂O gegeben und dazu 50 μ L des Protein Assay-Reagenzes gegeben. Nach Vortexen wurden 200 μ l der Lösung in eine Mikrotiterplatte überführt und nach 5 min Inkubation im ELISA-Reader bei 595 nm vermessen. Als Standard wurde eine BSA-Verdünnungsreihe nach gleichem Prinzip vermessen.

3.2.1.17 SDS-Gelelektrophorese

Die Proteinauftrennung mittels diskontinuierlicher Gelelektrophorese (Glycin-SDS PAGE) wurde nach Laemmli (Laemmli, 1970) in Mini-ProteanII[®]-Kammern (BioRad) durchgeführt. Dazu wurde zunächst ein Trenngel (Endkonzentration: 10-12 % Polyacrylamid; 0,375 M Tris/HCl, pH 8,8; 0,1 % SDS; 0,03 Vol % APS; 0,005 Vol % TEMED) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde darauf das Sammelgel (Endkonzentration: 4 % Polyacrylamid; 0,125 M Tris/HCl, pH 6,8; 0,1 % SDS; 0,03 Vol % APS; 0,005 Vol % TEMED) gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Vor dem Probenauftrag wurden die Proteine mit SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min. auf 95°C erhitzt. Die SDS-PAGE wurde 1 h bei 140 V durchgeführt. Als Proteinstandard wurde der *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (10 kDa - 260 kDa) verwendet.

3.2.1.18 Elekto-Proteintransfer (*Western-Blotting*)

Der Proteintransfer aus der Gelmatrix auf eine feste Trägermembranl erfolgte mittels Elektroblotting nach dem von Eckerskorn et al. (1988) beschriebenen *Semidry*-Verfahren in einer Trans-Blot-SD[®] Kammer (BioRad). Als Trägermaterial wurde eine hydrophobe Membran (*Amersham HybondTM-LFP*, GE Healthcare # RPN303LFP) verwendet, die sich durch eine sehr hohe Proteinbindungskapazität auszeichnet.

Für den Proteintransfer wurde folgender Blotaufbau durchgeführt. Vor Benutzung wurde die Membran in Methanol für eine Minute äquilibriert. Es wurden 6 zugeschnittene Filterpapiere (Whatman 3 mm-Papier) in Transferpuffer äquilibriert wovon drei auf die Anode der Blotting-Kammer gelegt wurden. Auf diese wurde die Membran gelegt und darauf das Proteingel luftblasenfrei positioniert. Dieses wurde mit den drei übrigen äquilibrierten Filterpapieren bedeckt, die Blotting-Kammer geschlossen und der Transfer bei 15-20 Volt für 90 Minuten durchgeführt.

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran für eine Stunde im Blockpuffer "geblockt" und anschließend über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper (1: 400-1:2000 in Blockpuffer) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1xTBS-Tween Puffer wurde die Membran für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper (1:5000 in Blockpuffer) inkubiert, wieder dreimal mit 1xTBS-Tween gewaschen und 30 Sekunden in ECL-Substratlösung geschwenkt. Durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte HRP (*horseradish peroxidase*) wird das in der Substratlösung enthaltene Luminol oxidiert und kann über die entstehende Chemielumineszenz mit einem entsprechenden Film (Amersham Hyperfilm[™] ECL, GE Healthcare # RPN324570) oder mit dem ebenfalls verwendeten BioRad ChemiDoc[®] XRS Imaging System nachgewiesen werden.

3.2.2 Bestimmung von Serumparametern

3.2.2.1 Serumgewinnung

Zur Serumgewinnung wurden die Mäuse getötet und das Blut direkt aus dem Herzen mit einer Kanüle entnommen. Nachdem das Blut nach 1 Stunde bei Raumtemperatur geronnen war, wurde es zwei Mal für fünf Minuten bei 4.000 rpm zentrifugiert und das Serum in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bis zur Verwendung wurde das Serum bei -80°C gelagert.

3.2.2.2 Serumanalysen

Zur Analyse von Serumparametern wurden spezielle Kits verwendet. Für die Bestimmung der Konzentrationen an KollagenI-Abbauprodukten im Serum wurde das *RatLapTM ELISA Kit* verwendet (Nordic Biosciences #1RTL4000) und unter Einsatz von 20 µL des Serums nach Angaben des Herstellers verwendet. Für die Bestimmung von Opg und Rankl wurden die ELISA-Kits *Quantikine*® *TRANCE/RANK-Ligand Immunoassay* bzw. *Quantikine*® *Mouse OPG* verwendet (R&D Systems #MTR00 bzw. #MOP00) und nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Bestimmung der Serumkonzentrationen an Osteocalcin und Alkalischer Phosphatase erfolgte mit dem *BTI Mouse Osteocalcin EIA Kit* (BTI #BT-470) bzw. dem *Liquid Alk Phos reagent set* (Pointe Scientific #A7516-150). Die Bestimmung von Serotonin erfolgte mit dem *Serotonin-ELISA-Kit* (LDN #BA 10-0900).

3.2.3 Zellbiologische Methoden

3.2.3.1 Osteoblastenkultur

Primäre Osteoblasten wurden aus Schädeldächern 3-5 Tage alter Mäuse gewonnen. Hierzu wurden die Schädeldächer isoliert und in sterilem 1x PBS gewaschen. Danach wurden die Schädeldächer 5x für je 10 min bei 37 °C in einer 0.1 % Collagenase/0.2 % Dispase Lösung verdaut. Die ersten beiden Überstände wurden verworfen und die letzten drei Überstände über einen 100 µM Zellsieb filtriert und gesammelt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1000 rpm wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in Osteoblasten-Komplettmedium aufgenommen. Nach Auszählen der Zellen wurden diese mit 25.000 Zellen pro mL auf Kulturschalen ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und

frisches Komplettmedium zugegeben. Zur Differenzierung der Zellen bei etwa 80 %iger Konfluenz wurde das Komplettmedium gegen Differenzierungsmedium (Komplettmedium + 50 μ g/mL Ascorbat + 10 mM beta-Glycerolphosphat) ausgetauscht und bis zum Zeitpunkt der Analyse alle drei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt.

3.2.3.2 Osteoklastenkultur

Osteoklasten wurden aus Knochenmark von erwachsenen Mäusen gewonnen. Hierzu wurden die Mäuse getötet, mit Ethanol desinfiziert und die Femora extrahiert. Aus diesen wurde dann mit alpha-MEM Komplettmedium das Knochenmark herausgespült und über ein Zellsieb (100 μ m) filtriert. Es wurde 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und das Pellet in alpha-MEM Komplettmedium resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt und mit einer Dichte von 5x 10⁶ Zellen pro mL auf Kulturschalen in alpha-MEM Komplettmedium + 10 nM Vitamin D ausplattiert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt wobei ab Tag fünf nach dem Ausplattieren 40 ng/mL sRANKL und 20 ng/mL MCSF dazugegeben wurden.

3.2.3.3 Von Kossa-Färbung

Um eine *in vitro*-Mineralisation von Osteoblasten nachzuweisen, wurde eine Silbernitratfärbung durchgeführt. Hierbei wird das Kalzium in der extrazellulären Matrix durch einwertige Silberionen ersetzt und anschließend zu braunschwarzem elementaren Silber reduziert.

Hierzu wurden die Zellen zweimal mit kaltem 1x PBS gewaschen und anschließend für 10 min mit kaltem Methanol fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit Leitungswasser wurden die Zellen mit einer 5 % Silbernitratlösung bedeckt und für 30 min inkubiert. Nun wurde zweimal mit Leitungswasser gewaschen und die Zellen für 5 min mit einer 10 % igen Natrium-thiosulfatlösung inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Leitungswasser wurden die gefärbten Kulturen fotografiert und ausgewertet.

3.2.3.4 Alizarinrot-Färbung

Die Alizarinrot Färbung wurde für den Nachweis eines Mineralisationsprozesses in der Osteoblastenkultur verwendet. Das Kalzium in der extrazellulären Matrix bildet dabei einen Chelatkomplex mit dem verwendeten Farbstoff und die Mineralisationskerne erscheinen rot. Dazu wurden die Zellen mit eiskaltem 90 % Ethanol für 45 min bei RT fixiert und anschließend zweimal mit destilliertem H₂O gewaschen. Die Zellen wurden dann mit der Alizarinrot Färbelösung für 10 min bei RT unter leichtem schütteln inkubiert. Danach wurde fünfmal mit H₂O gewaschen und mit PBS überschichtet.

3.2.3.5 TRAP-Färbung

Für die Anfärbung multinukleärer Osteoklasten wurden TRAP-Färbungen angefertigt. TRAP (*Tartrate Resistent Acid Phosphatase*) ist ein Enzym, das von ausgereiften Osteoklasten gebildet wird. In der TRAP-Färbung stellt sich das Produkt der enzymatischen Reaktion rot dar und erlaubt so die Identifikation von Osteoklasten.

Zur Färbung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und fünf Minuten mit kaltem Methanol fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit H₂O wurden die Zellen für 2 min an der Luft getrocknet und für 30 min in der TRAP-Färbelösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit H₂O wurden die Osteoklasten mittels Raster ausgezählt und gegebenenfalls fotografiert.

3.2.3.6 Proteinisolation aus Zellen

Zur Isolation des Gesamtproteingehalts aus kultivierten Zellen wurden diese mit kaltem 1x PBS zweimal gewaschen und anschließend mit eiskaltem RIPA-Lysepuffer aus den Kulturschalen abgekratzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis wurde das Lysat für 5 min bei 13.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert und anschließend der Überstand in ein neues Gefäß überführt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

3.2.3.7 Gewinnung von RNA aus Zellen

Zur Lyse der Zellen wurden diese im RLT-Lysepuffer (Qiagen # 79216) aufgenommen und über einen *QIAshredder*[®] (Qiagen #79656) zentrifugiert. Die Isolierung von RNA erfolgte mit dem RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen #74104) nach dem Protokoll des Herstellers.

3.2.3.8 BrdU-Proliferationsassay

Zur Bestimmung der Proliferationsrate von primären Osteoblasten wurde das *Cell Proliferation Elisa Biotrack System* verwendet (GE Healthcare #RPN250). Dazu wurden 2500 Zellen pro 96-well ausplattiert. Die Proliferation der Osteoblasten wurde an Tag 0, Tag 2 und Tag 5 gemessen.

Dazu wurden die Zellen acht Stunden ohne Serum kultiviert bevor serumfreies, mit BrdU (5'-bromo-2'-deoxyuridin) versetztes Medium für 12 Stunden auf die Zellen gegeben wurde. Zum Nachweis des in die DNA eingebauten BrdUs wurde das Protokoll des Herstellers befolgt. Die gemessenen OD_{450} Werte wurden auf den Proteingehalt (bestimmt nach Bradford bei OD_{595}) bezogen.

3.2.3.9 Immunhistologie

Zur immunhistologischen Detektion einer *FZD8*-Expression in humanen Knochenbiopsien wurden die Gewebeproben entparaffiniert, rehydriert und mit 1mM EDTA pH 8,0 bei 90°C für 15 Minuten inkubiert. Nach Inkubation mit 3 % H_2O_2 für 15 Minuten um die endogene Peroxidase Aktivität zu blockieren, wurde 30 min mit 2,5 % BSA blockiert um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte in Verdünnungen von 1:50 bis 1:500 über Nacht bei 4°C. Der biotinylierte Sekundärantikörper wurde in Verdünnungen von 1:200 bis 1:500 eingesetzt und die Inkubation erfolgte für 60 min bei RT.

Die Inkubation mit Streptavidin/HRP in einer Verdünnung von 1:200 erfolgte im Anschluss für 30 min. Als chromogenes Substrat diente DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride). Die Histologien wurden anschließend mit Hämatoxylin gegengefärbt.

3.2.3.10 Herstellung retroviraler Partikel in HEK 293T Zellen

Für die retrovirale Transduktion primärer Osteoblasten wurden γ -Retroviren mit selbstinaktivierenden *long terminal repeats* (LTR) verwendet. Bei dem Vektor Mieg3-eGFP handelt es sich um einen Vektor der dritten Generation bei dem *gag, pol* und *env* in trans in die Verpackungszellinie eingebracht werden müssen. Als Verpackungszellen dienten HEK-293T-Zellen.

Das *envelope*-Plasmid Eco-env wurde von der Firma Addgene (#522K73) erhalten, das *gag,pol*-kodierende Plasmid wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Boris Fehse (Zell und Gentherapie, UKE) erhalten.

Für die Kalziumphosphat-Transfektion der HEK-293T-Zellen zur Generierung von Viruspartikeln wurde ein entsprechendes Kit der Firma Sigma (#CAPHOS) verwendet. Es wurden am Tag vor der Durchführung der Transfektion 5 x 10^6 Zellen auf eine 10 cm Kulturschale ausplattiert. Für die Transfektion wurden 5 µg des entsprechenden Vektors (Mieg3-eGFP, oder Mieg3-eGFP-Isg15) sowie 2 µg des *env*-Plasmids und 10 µg des *gag/pol*-Plasmids in einem Gesamtvolumen von 450 µL H₂O gelöst und 50 µL einer 2,5 M CaCl₂-Lösung zugegeben. In einem separatem 15 mL Gefäß wurden 500 µL der 2x HBS Lösung vorgelegt und dazu tropfenweise die Plasmid/CaCl₂-Lösung zugegeben und 15 Minuten bei RT inkubiert.

Während dieser Zeit wurde das Medium der am Tag zuvor ausplattierten HEK 293T Zellen gegen frisches Kulturmedium +25 μ M Chloroquin ausgetauscht. Dann wurde die DNA-Lösung tropfenweise auf die Zellen gegeben und für 6 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Darauf wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und von nun an über einen Zeitraum von 60 Stunden alle 12 Stunden der Überstand abgenommen, filtriert und bei -80°C gelagert.

3.2.3.11 Transduktion von MC3T3-Zellen und primären Osteoblasten

Durch eine Testtransduktion von MC3T3-Zellen wurde überprüft, welche Virusüberstände für eine Transduktion von primären Osteoblastenzellen geeignet sind. Dazu wurden 100.000 Zellen pro 6-well ausplattiert und am nächsten Tag das Medium abgenommen und gegen 1,5 mL des entsprechenden Virusüberstand mit 8 μ g/mL Polybren (Kationisches Agenz, welches die Transduktionseffizienz durch Neutralisierung negativer Ladungen an der Zelloberfläche, verbessert) ausgetauscht. Nach Inkubation über Nacht wurde am nächsten Tag das Medium abgenommen und gegen normales Kulturmedium (α -MEM + 10 % FKS + P/S) ersetzt.

Der Virustiter wurde wie folgt berechnet: T=N*P/V, T=Titer, N= ausplattierte Zellzahl, V= Volumen des zugegeben Überstandes, P= Anzahl der transfizierten Zellen.

Die Transduktion primärer Osteoblasten erfolgte einen Tag nach dem Ausplattieren der Zellen analog zu der Transduktion der MC3T3-Zellen mit zuvor getesteten Virusüberständen.

3.2.4 Histologische und histomorphometrische Methoden

3.2.4.1 Präparation und Fixierung von Mausskeletten

Nach Tötung wurden die Tiere gehäutet und der Bauchraum eröffnet. Nach Entfernung aller inneren Organe wurden die Skelette auf einer Korkplatte gestreckt und einen Tag in frischem gepuffertem 3,7 % Formaldehyd fixiert und anschließend für eine weitere Präparation in 80 % Ethanol gelagert.

Es wurde von allen Mäusen jeweils die rechte Tibia sowie die oberen vier Lendenwirbel herauspräpariert. Für eine Paraffinhistologie wurden die Präparate zwei Tage in 20 % EDTA-Lösung bei 37 °C entkalkt. Zur Entwässerung wurden die Präparate dann je nach Art der nachfolgenden Histologie im Autotechnikon nach folgendem Schema behandelt:

Paraffineinbettung	Acrylateinbettung
2 x 60 min 70 % Ethanol	2 x 60 min 70 % Ethanol
1 x 60 min 80 % Ethanol	3 x 60 min 80 % Ethanol
2 x 60 min 96 % Ethanol	3 x 60 min 96 % Ethanol
2 x 60 min Ethanol absolut	4 x 60 min Ethanol absolut
2 x 60 min Xylol	
3 x 60 min Paraffin 60 °C	

Nicht entkalkte Knochen wurden anschließend für jeweils 24 Stunden in Infiltrationslösungen (I und II) infiltriert und anschließend mit Gießlösung in Glasgefäße eingebettet. Nach Polymerisation über Nacht bei 4 °C wurden die Blöcke angeschliffen und 4 µm dicke Schnitte am Rotationsmikrotom angefertigt und auf Gelatine-beschichtete Objektträger gezogen und eingedeckt.

3.2.4.2 Kontaktröntgen und µCT

Fixierte Skelette wurden im Kontakt-Röntgenapparat (Faxitron Xray) für 2 Sekunden bei 36 kV geröntgt. µCT-Aufnahmen wurden mit einem µCT40 (Scanco Medical, Basel) bei einer Auflösung von 12 µm gescannt.

3.2.4.3 Biomechanische Testung mittels Dreipunktbiegetest

Zur Bestimmung der biomechanischen Stabilität von Mausfemora wurden diese einem Dreipunktbiegetest unterzogen. Dazu wurden die fixierten Knochen nach Entfernung des gesamten Muskelgewebes im *Rhinoceros3.0* (Mc. Neel) eingespannt und ein Stempel mit steigender Kraft auf die Mitte des Knochens gedrückt bis ein Ermüdungsbruch auftrat. Die digitale Aufnahme der Daten erfolgte mit der Software TestExpert V10.1. Die bestimmten Parameter waren Maximalkraft, Steifigkeit und Energie bis zum Versagen (Fmax).

3.2.4.4 Von Kossa/van Gieson-Färbung

Die Acrylathistologien wurden in 2-(Methoxyethyl)-acetat (3 x 10 min) entplastiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe bewässert und folgende Färbeschritte durchgeführt: 5 min 3% Silbernitrat, 10 min dest. H₂O, 5 min Sodaformollösung, 10 min Leitungswasser, 5 min 5 % Natriumthiosulfatlösung, 10 min Leitungswasser, 20 min van Gieson-Lösung. Anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und nach 3 x 5 min Xylolinfiltration mit DPX (Sigma #44581) eingedeckt.

3.2.4.5 Toluidin-Färbung

Die Vor- und Nachbehandlung der Histologien erfolgte wie bei der von Kossa/ van Gieson Färbung (3.2.3.4). Zur Färbung wurden die Schnitte für 30 min in der Toluidinlösung angefärbt.

3.2.4.6 HE-Färbung (Paraffin)

Nach 30 minütiger Fixierung im Wärmeschrank bei 60 °C wurden die Schnitte für 2 x 5 min in Xylol entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe bewässert. Anschließend wurden folgende Färbeschritte durchgeführt:

10 min Mayers Hämalaunlösung, in HCl-Ethanol eingetaucht, 10 min Leitungswasser, 2 min Eosinlösung. Danach wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, 3 x 5 min in Xylol infiltriert und in DPX eingedeckt.

3.2.4.7 TRAP-Färbung an Paraffinschnitten

Zur Färbung wurden die Paraffinschnitte in Xylol (2 x 5 min) entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe bewässert. Die Schnitte wurden dann für 60 min in TRAP-Substratlösung angefärbt und zum Abbruch der Färbung kurz in Wasser getaucht. Nach einer Gegenfärbung mit Meyer's Hämalaun (1 min) wurden die Schnitte mit Faramount Aqua Mounting Medium (DAKO # S3025) in wässrigem Medium eingedeckt.

3.2.4.8 Calcein-Markierung von Mäusen

Calcein ist ein Fluoreszenzfarbstoff mit einem Anregungsmaximum bei 495 nm und einem Abstrahlungsmaximum von 515 nm. Calcein bildet mit Kalzium einen Chelatkomplex und lagert sich entlang der Mineralisationsfront bei der Neubildung von Knochen ein. Durch eine Calcein-Doppelmarkierung in einem bestimmten Zeitabstand lässt sich somit die Neubildungsrate (BFR: *bone formation rate*) von Knochen *in vivo* bestimmen. Dazu wurde den Mäusen im Abstand von sieben Tagen jeweils 100 µL Calcein-Injektionslösung intraperitoneal injiziert. Am Abstand der zwei grün-fluoreszierenden Markierungen kann nun die Knochenneubildungsrate bestimmt werden.

3.2.4.9 Histomorphometrie

Die Quantifizierung des Knochenvolumens (BV/TV, *bone volume per tissue volume*), die Trabekelanzahl (Tb.N, *trabecular number*), die Trabekeldicke (Tb.Th, *trabecular thickness*) sowie der trabekuläre Abstand (Tb.Sp, *trabecular spacing*) wurden mit dem BioQuant System (Osteometrics Inc.) nach Vorgaben des Herstellers an 4 µm von Kossa-/van Gieson

gefärbten Acrylatschnitten bestimmt. Die Knochenformationsrate (BFR, *bone formation rate*), sowie die Anzahl von Osteoblasten und Osteoklasten (N.Ob bzw. N.Oc/B.Pm, *number of osteoblasts* bzw. *osteoclasts per bone parameter*) wurden standardmäßig mit dem OsteoMeasure Histomorphometrie-System (Osteometrics Inc.) an 12 µm ungefärbten Acrylatschnitten bzw. 4 µm Toluidin-gefärbten Acrylatschnitten bestimmt.

3.2.5 Statistik

Alle angegebenen Werte sind mit dem Computerprogramm Microsoft Excel berechnete arithmetische Mittelwerte ±Stbw. Die statistische Signifikanz wurde mit dem 2-seitigen Student-t-Test ermittelt. Ein p-Wert niedriger als 0,05 wurde als signifikant angenommen und mit (*) bezeichnet, ein p-Wert niedriger als 0,01 mit (**) bezeichnet und ein p-Wert kleiner 0,005 mit (***) bezeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Expression von *Fzd9* in Osteoblasten

In vorausgehenden Arbeiten wurde mittels Affymetrix-Genchipanalyse die Genexpression an Tag 0 der Differenzierung primärer muriner Osteoblasten mit der Expression fünf Tage nach Einleitung der Differenzierung verglichen. Hierbei stellte sich heraus, dass das Gen für den Serpentinrezeptor *Frizzled-9 (Fzd9)* als einziges Gen aus dieser Rezeptorfamilie parallel zu bekannten Osteoblastenmarkern wie *Bone Sialoprotein (Ibsp)* und *Osteocalcin (Bglap)* während dieses Zeitraums induziert wurde, was eine wichtige Funktion dieses Rezeptors für die Osteoblastendifferenzierung vermuten ließ.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen und die Expression von Fzd9 auch in der weiteren Phase der Osteoblastendifferenzierung zu untersuchen, wurde das Expressionsverhalten von Fzd9 während der Differenzierung von drei unabhängig voneinander isolierten Osteoblastenkulturen mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Als Positivkontrolle diente die Expression des bekannten Osteoblastenmarkers Bone Sialoprotein (Ibsp), welche während des Zeitraums der Differenzierung kontinuierlich ansteigt (Abb. 4.1A). Die Ergebnisse der Affymetrix-Genchipanalyse konnten so bestätigt werden, und es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Expression von Fzd9 im späteren Verlauf der Differenzierung bis zu Tag 25 nahezu konstant bleibt. Um die Expression von Fzd9 auch auf Proteinebene zu bestätigen wurde ein Westernblot durchgeführt, der die in Abb. 6.1A gefundenen Expressionsergebnisse auch auf Proteinebene bestätigte (Abb. 6.1B).



Abbildung 4.1: Expression von Fzd9 in Osteoblasten (A) Relative Expression von Bone Sialoprotein (*Ibsp*) und *Frizzled-9* (*Fzd9*) während der Differenzierung primärer Maus-Osteoblasten. (B) Westernblot zur Darstellung der Expression von Fzd9 auf Proteinebene im Verlauf der Osteoblastendifferenzierung.

4.2 Histologische Analyse des Knochenphänotyps *Fzd9*-defizienter Mäuse

Um nun zu überprüfen, ob Fzd9 für die Knochenbildung in vivo eine Rolle spielt, sollte im Folgenden der Knochenphänotyp eines Fzd9-defizienten ($Fzd9^{-/-}$) Mausmodells analysiert werden, welches von Dr. Uta Francke von der Universität Stanford zur Verfügung gestellt wurde. Dazu wurden von jeweils sechs WT und sechs $Fzd9^{-/-}$ Mäusen im Alter von 6, 24 und 52 Wochen undekalzifizierte Histologien der Wirbelkörper L2-L4 angefertigt. In Abb. sind jeweils repräsentative von Kossa-gefärbte Histologien der einzelnen 4.2A Altersgruppen abgebildet und es läßt sich bereits daraus erkennen, dass die $Fzd9^{-/-}$ Mäuse im Alter von 24 und 52 Wochen ein geringeres trabekuläres Knochenvolumen aufweisen. Die histomorphometrische Auswertung aller Histologien ergab, dass $Fzd9^{-/-}$ Mäuse im Alter von sechs Wochen ein normales Knochenvolumen (BV/TV) haben, jedoch im fortgeschrittenen Alter von 24 und 52 Wochen, im Vergleich zu den Wildtypkontrollen, ein um 30 % verringertes trabekuläres Knochenvolumen aufweisen (Abb. 4.2B). Außerdem ist in diesen Altersstufen die Trabekeldicke (Tb.Th) sowie die Anzahl der Trabekel (Tb.N) in den Fzd9^{-/-} Mäusen ebenfalls signifikant um etwa 30 % erniedrigt. Mit diesen Daten konsistent, ist der trabekuläre Abstand (Tb.Sp) in $Fzd9^{-/2}$ Mäusen um etwa 30 % erhöht (Abb. 4.2B), so dass man anhand dieser Daten insgesamt eine Osteopenie in $Fzd9^{-/-}$ Mäusen feststellen kann.



Abbildung 4.2: Osteopenie in *Fzd9*-defizienten Mäusen. (A) Von Kossa-gefärbte, undekalzifizierte Histologien von Wirbelkörpern aus WT und *Fzd9*-defizienten Mäusen in den angegebenen Altersstufen. (B) Histomorphometrische Berechnung des Knochenvolumens (BV/TV; *Bone Volume per Tissue Volume*), der Trabekeldicke (Tb.Th; *Trabecular Thickness*), der Trabekelanzahl (Tb.N; *Trabecular Number*) und des trabekulären Abstands (Tb.Sp; *Trabecular Spacing*).

Um zu überprüfen, ob in den Röhrenknochen der $Fzd9^{-/-}$ Mäuse ebenfalls ein verringertes Knochenvolumen vorliegt, wurden die Tibiaknochen 24 Wochen alter WT und $Fzd9^{-/-}$ Mäuse ebenfalls unentkalkt histologisch untersucht und auch hier konnte ein verringertes Knochenvolumen festgestellt werden (Abb. 4.3A). Außerdem wurde an µCT-Aufnahmen von WT- und $Fzd9^{-/-}$ Femora deutlich, dass die kortikale Dicke in den Knochen von $Fzd9^{-/-}$ Tieren erniedrigt ist (Abb. 4.3A). Hinzu kommt, dass der femorale Durchmesser und die biomechanische Stabilität in den $Fzd9^{-/-}$ Knochen ebenfalls signifikant erniedrigt ist (Abb. 4.3B).



Abbildung 4.3: Erniedrigte Knochendichte in Röhrenknochen *Fzd9*-defizienter Mäuse. (A) *Von Kossa* gefärbte, undekalzifizierte Histologien von Tibiaknochen aus Wildtyp- und *Fzd9*^{-/-} Mäusen im Alter von 24 Wochen, sowie μ CT-Aufnahmen von Femora aus WT und *Fzd9*^{-/-} Mäusen. (B) Mittlerer Durchmesser der Femora aus WT und *Fzd9*^{-/-} Mäusen, sowie die maximal nötige Kraft, die zum Bruch des Femurs in einem Dreipunktbiegetest führt.

Um die zellulären Mechanismen zu identifizieren, die zu der Osteopenie in den Fzd9^{-/-} Mäusen führen. wurde untersucht, ob die Knochenformation oder die nun Knochenresorption in diesen Mäusen betroffen ist. Zur Bestimmung der Knochenformationsrate (BFR; bone formation rate) wurde den Mäusen im Abstand von sieben Tagen der Fluoreszenzfarbstoff Calcein intraperitonal verabreicht. Calcein lagert sich in den neugebildeten Knochen ein und anhand des Abstandes der unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbaren Calceinbanden läßt sich die Knochenformationsrate bestimmen.

Bereits an den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Wirbelkörper läßt sich eine verminderte Calceineinlagerung und somit eine verminderte Knochenformation in den $Fzd9^{-/-}$ Mäusen vermuten (Abb. 4.4A). Die histomorphometrische Bestimmung der Osteoblastenanzahl pro Knochenfläche und der Knochenformationsrate ergeben eine

signifikant erniedrigte Osteoblastenanzahl und eine um 50 % reduzierte Knochenformationsrate in den $Fzd9^{-/-}$ Mäusen (Abb. 4.4B).



Abbildung 4.4: Erniedrigte Knochenformation in *Fzd9*-defizienten Mäusen. (A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Wirbelkörperschnitten Calcein-markierter WT und $Fzd9^{-/-}$ Mäuse im Alter von 24 Wochen. Darunter ein Ausschnitt zur Darstellung der durch die zweimalige Injektion entstandenen Doppelbanden. (B) Histomorphometrische Auswertung der Osteoblastenanzahl pro Knochenfläche (Ob.N/B.Pm; *Osteoblast Number per Bone Perimeter*), sowie die Knochenformationsrate (BFR/BS; *Bone Formation Rate per Bone Surface*).

Zur Bestimmung der Osteoklastenaktivität wurden TRAP-Färbungen an Tibiahistologien von WT und $Fzd9^{-/-}$ Mäusen angefertigt. Die Anzahl der TRAP-positiven Zellen ist hier unverändert (Abb. 4.5A), was sich in der histomorphometrischen Analyse anhand einer unveränderten Osteoklastenzahl bestätigte (Abb. 4.5B). Einen weiteren Hinweis dafür, dass die Knochenresorption in den $Fzd9^{-/-}$ Mäusen nicht verändert ist, lieferte die Tatsache, dass die Menge an TypI-Kollagen-Abbauprodukten (Crosslaps) im Serum von $Fzd9^{-/-}$ Mäusen nicht erhöht ist, was für eine verstärkte Resorption gesprochen hätte, sondern passend zur verminderten Knochendichte, ebenfalls erniedrigt ist (Abb. 4.5B).



Abbildung 4.5: Unveränderte Knochenresorption in *Fzd9*-defizienten Mäusen. (A) TRAP-gefärbte Paraffinhistologien von Tibiae aus WT und *Fzd9*^{-/-} Mäusen zur Anfärbung von Osteoklasten. (B) Histomorphometrische Bestimmung der Osteoklastenanzahl pro Knochenoberfläche, sowie mittels ELISA bestimmte Menge an TypI-Kollagen-Abbauprodukten (Crosslaps) im Serum von WT und $Fzd9^{-/-}$ Mäusen.

4.3 Histologische Analyse der Regression hyaloider Blutgefäße in *Fzd9*defizienten Mäusen

Da der in dieser Arbeit identifizierte Knochenphänotyp der $Fzd9^{-/-}$ Mäuse nahezu identisch ist zu dem von $Lrp5^{-/-}$ Mäusen (Kato et al., 2002), lag zu diesem Zeitpunkt der Analysen die Vermutung nahe, dass Fzd9 und Lrp5 möglicherweise als Rezeptor und Corezeptor gemeinsam für die Regulation der Knochenformation in Mäusen fungieren. Lrp5-defiziente Mäuse weisen neben dem Knochenformationsphänotyp einen Defekt in der Regression hyaloider Blutgefäße im Auge auf und sind von Geburt an blind. Ein identischer Defekt wurde auch bei Menschen mit inaktivierenden Mutationen im LRP5-Gen gefunden (Gong et al., 2001). Aufgrund der großen Übereinstimmungen im Knochenphänotyp wurde nun auch in $Fzd9^{-/-}$ Mäusen die Regression der hyaloiden Blutgefäße analysiert. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die Regression der vier Tage nach der Geburt (p4) noch vorhandenen Blutgefäße (Abb. 4.6A), bis p10 in den $Fzd9^{-/-}$ Mäusen wie im WT normal verläuft, während die hyaloiden Blutgefäße in den hier ebenfalls analysierten $Lrp5^{-/-}$ Mäusen, wie schon beschrieben, persistieren (Abb. 4.6B).



Abbildung 4.6: Normale Regression hyaloider Blutgefäße in Augen *Fzd9*-defizienter Mäuse. (A) HE-gefärbte Paraffinschnitte von Augen aus vier Tage alten WT, $Lrp5^{-/-}$, sowie $Fzd9^{-/-}$ Mäusen. Die Pfeile zeigen auf die hyaloiden Blutgefäße. Rechts: Anzahl der hyaloiden Blutgefäße in WT, $Lrp5^{-/-}$, sowie $Fzd9^{-/-}$ Mäusen. (B) HE-gefärbte Paraffinschnitte von Augen aus zehn Tage alten WT, $Lrp5^{-/-}$, sowie $Fzd9^{-/-}$ Mäusen. Die Pfeile zeigen auf die hyaloiden Blutgefäße. Rechts: Anzahl der hyaloiden Blutgefäße in WT, $Lrp5^{-/-}$, sowie $Fzd9^{-/-}$ Mäusen. Die Pfeile zeigen auf die hyaloiden Blutgefäße. Rechts: Anzahl der hyaloiden Blutgefäße in WT, $Lrp5^{-/-}$, sowie $Fzd9^{-/-}$ Mäusen.

4.4 Analyse *Fzd9*-defizienter Osteoblasten

Da aus den vorangegangenen Analysen hervorging, dass der Knochenphänotyp Fzd9defizienter Mäuse durch eine verminderte Knochenformation erklärt werden kann, wurden als nächstes Fzd9-defiziente Osteoblasten *ex vivo* analysiert. Dazu wurden Osteoblasten aus Schädeldächern 3-5 Tage alter WT und $Fzd9^{-/-}$ Mäuse isoliert und zunächst auf Ihre Proliferationsfähigkeit untersucht. In einem BrdU-Proliferationsassay konnte anhand eines verringerten Einbaus von BrdU in die DNA eine verringerte Proliferationsfähigkeit der Fzd9-defizienten Osteoblasten festgestellt werden (Abb. 4.7A). Wesentlich auffälliger wurde der Defekt der Fzd9-defizienten Osteoblasten jedoch nach einer von Kossa-Färbung der Kulturen, wo sich zeigte, dass die Mineralisationsfähigkeit in den Fzd9-defizienten Kulturen deutlich verzögert und herabgesetzt ist (Abb. 4.7B). Da also offenbar ein zellautonomer Defekt in der Differenzierung oder Funktion Fzd9-defizienter Osteoblasten vorliegt, wurde als nächstes eine Affymetrix-Genchipanalyse durchgeführt, mittels der die Genexpression in WT und Fzd9-defizienten Osteoblasten zehn Tage nach Einleiten der Differenzierung verglichen wurde, um mögliche Zielgene eines Fzd9-abhängigen Signalwegs zu identifizieren.



Abbildung 4.7: Zellautonomer Defekt *Fzd9*-defizienter Osteoblasten. (A) Bestimmung der Proliferation von WT und *Fzd9*-defizienten Osteoblasten zu unterschiedlichen Differenzierungszeitpunkten durch den Einbau von BrdU in die DNA proliferierender Zellen. (B) Von Kossa-gefärbte Osteoblastenkulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung.

Es konnte festgestellt werden, dass die Expression aller bekannter Osteoblastenmarker, wie *Runx2*, *Sp7*, *Col1a1*, *Bglap*, *Ibsp* und *Dmp1* in den *Fzd9*-defizienten Osteoblasten nicht wesentlich verändert ist (Abb. 4.8A). Es wurde außerdem ersichtlich, dass offenbar die Expression von bekannten Zielgenen des kanonischen Wnt-Signalwegs, wie *Tnfrsf11b*, *Axin2*, *Cyr61*, *Wisp2*, *Apcdd1* und *Ccnd1* durch ein Fehlen von *Fzd9* nicht beeinflusst ist.

Insbesondere die normale Expression von Osteoprotegerin (Tnfrsf11b; Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b) war interessant, denn Osteoprotegerin wurde in einem Mausmodell mit einer Osteoblasten-spezifischen Deletion von ß-Catenin als Zielgen des kanonischen Wnt-Signalwegs in Osteoblasten identifiziert (Glass et al., 2001). Die Ergebnisse wurden exemplarisch mittels quantitativer RT-PCR bestätigt (Abb. 4.8B) und auch auf Proteinebene konnte mittels Westernblot kein Unterschied in der Expression von Axin2 und Osteoprotegerin festgestellt werden (Abb. 4.8C). Durch eine 30 minütige Stimulation von WT und Fzd9-defizienten Osteoblasten mit 100 ng/mL rekombinantem Wnt3a an Tag zehn der Differenzierung, konnte gezeigt werden, dass die dadurch ausgelöste Phosphorylierung von Lrp6 an Ser-1490, die für die kanonische Wnt-Signaltransduktion entscheidend ist, in Fzd9-defizienten Zellen nicht negativ beeinträchtigt war (Abb. 4.8C). Außerdem konnte kein Unterschied in der Menge an phosphoryliertem ß-Catenin (Abb. 4.8C), sowohl vor als auch nach Stimulation festgestellt werden, was ebenso darauf schließen ließ, dass die Signaltransduktion des kanonischen Wnt-Signalwegs in Abwesenheit von *Fzd9* nicht beeinträchtigt ist.



Abbildung 4.8: Normale Expression von Osteoblastenmarkern und Zielgenen des Wnt-Signalwegs in Fzd9defizienten Osteoblasten. (A) Affymetrix-Signalintensitäten und SLRs (*Signal Log Ratios*) von bekannten Osteoblastenmarkergenen und Zielgenen des Wnt-Signalwegs in WT- und Fzd9-defizienten Osteoblastenkulturen an Tag 10 der Differenzierung. (B) Relative Expression von Wnt-abhängigen Genen und Osteoblastenmarkern. (C) Westernblots zeigen, dass der Proteingehalt von Axin2 und Opg in WT und Fzd9-defizienten Zellen analog zur mRNA Expression unverändert ist (links). Zudem zeigte sich, dass der kanonische Wnt-Signalweg nach 30 minütiger Stimulation mit 100 ng/mL Wnt3a in den Fzd9-defizienten Osteoblasten nicht gestört ist, was an der Phosphorylierung von Lrp6 und der unveränderten Menge an phosphoryliertem β -Catenin zu erkennen ist (rechts).

Durch die Affymetrix-Genchipanalyse konnten jedoch auch über 500 Gene identifiziert werden, deren Expression in Abwesenheit von *Fzd9* mehr als zweifach erniedrigt war. Unter diesen Genen befanden sich unter anderem einige Zykline (*Ccnb1, Ccnb2, Ccnf* und *Ccna2*), was vielleicht mit der verringerten Proliferationsrate der *Fzd9*-defizienten Osteoblasten in Verbindung gebracht werden könnte (Abb. 4.9A). Die in ihrer Expression am stärksten beeinträchtigten Gene jedoch waren Chemokine der Ccl- und Cxcl-Familie (*Ccl5, Ccl2, Cxcl5,* usw., Abb. 4.9A) und Gene die bekanntertmaßen durch Typ1-Interferone (Ifnα und Ifnβ) reguliert werden (*Oasl2, Ifi203, Ifit1, Isg15, Ifi27, Ifi44, Irf7*) (Abb. 4.9A). Die Ergebnisse wurden exemplarisch für einige dieser Gene mittels quantitativer RT-PCR in drei unabhängig voneinander isolierten Osteoblastenkulturen bestätigt (Abb. 4.9B), und es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Expression der untersuchten Gene (*Ccl2, Ccl5, Cxcl5, Oasl2, Ifi203, Isg15*) in Femora von 24 Wochen alten *Fzd9^{-/-}* Mäusen signifikant erniedrigt war (Abb. 4.9C).



Abbildung 4.9: Erniedrigte Expression Interferon-abhängiger Gene und Chemokine in *Fzd9*-defizienten Osteoblasten. (A) Affymetrix-Signalintensitäten und SLR-Werte der am stärksten herunterregulierten Interferonabhängigen Gene und Chemokine in WT- und *Fzd9*-defizienten Osteoblasten. (B) Bestätigung der Ergebnisse der Genchipanalyse in drei unabhängig isolierten Osteoblastenkulturen aus WT und *Fzd9*^{-/-} Mäusen mittels quantitativer RT-PCR. (C) Analyse der Expression der angegebenen Gene in Femora aus 24 Wochen alten WT und *Fzd9*^{-/-} Mäusen mittels quantitativer RT-PCR.

Als nächstes wurde untersucht, ob eventuell einige dieser Gene bisher unbekannte Zielgene des kanonischen oder nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs sind. Dazu wurden primäre WT-Osteoblasten an Tag zehn der Differenzierung für sechs Stunden entweder mit rekombinantem Wnt3a (100 ng/mL) oder rekombinanten Wnt5a (100ng/mL) stimuliert und anschließend die Expression der Gene *Ccl2*, *Ccl5*, *Cxcl5*, *Oasl2*, *Ifi203*, *Isg15 und Axin2* mittels quantitativer RT- PCR untersucht.

Dabei fiel auf, dass die Interferon-abhängigen Gene Oasl2, Ifi203 und Isg15 weder durch Wnt3a noch Wnt5a induziert werden konnten, dass aber die Expression der Chemokine Ccl5, Cxcl5 und Ccl2 durch den nicht-kanonischen Wnt-Liganden Wnt5a signifikant induziert wurde. Als Positivkontrolle für die Wirkung von Wnt3a wurde die Expression von Axin2 gemessen, die wie erwartet, durch Zugabe von Wnt3a, signifikant induziert werden konnte (Abb. 4.10A). Da bekannt ist, dass die Wirkung von Wnt5a nicht über die Aktivierung des ß-Catenin abhängigen kanonischen Wnt-Signalwegs verläuft, wurde als nächstes untersucht, ob Wnt5a in Osteoblasten möglicherweise einen alternativen wichtigen Signaltransduktionsweg aktivieren kann. Da gezeigt werden konnte, dass eine Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs für die Differenzierung primärer Osteoblasten sowohl in vivo als auch in vitro von großer Bedeutung ist (Ge et al., 1997), wurde mittels Westernblot untersucht, ob Wnt5a die Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs in primären Osteoblasten induzieren kann. Anhand der Phosphorylierung von Erk1/2 an Thr202/Tyr204 wird deutlich, dass Wnt5a offenbar diesen Signalweg aktiviert (Abb. 4.10B). Außerdem wurde deutlich, dass diese Induktion der Phosphorylierung in Fzd9-defizienten Osteoblasten verringert ist (Abb. 4.10B), was möglicherweise zu dem Mineralisationsdefekt Fzd9defizienter Osteoblasten beiträgt.



Abbildung 4.10: Die Expression von Chemokinen wird durch den nicht-kanonischen Wnt-Liganden Wnt5a induziert. (A) Expressionsanalyse der angegebenen Gene nach 6h Stimulation von WT Osteoblasten an Tag zehn der Differenzierung mit rekombinantem Wnt3a und Wnt5a. (B) Westernblot zur Darstellung der Phosphorylierung von Erk1/2 (p42/44) nach 30 min Stimulation mit Wnt3a (100 ng/mL) und Wnt5a (100 ng/mL).

Um zu überprüfen, ob die Expression der sogenannten Interferon-stimulierten Gene (ISGs) tatsächlich auch in primären Osteoblasten durch Zugabe von rekombinantem Interferon induziert werden kann und ob diese Induktion in den *Fzd9*-defizienten Osteoblasten gestört ist, wurden primäre WT- und *Fzd9*-defiziente Osteoblasten für sechs Stunden mit Typ I-Interferon (Ifn α und Ifn β) und Typ II-Interferon (Ifn γ) stimuliert und anschließend die Expression von *Oasl2, Isg15* und *Ifit1* bestimmt. Es wurde gefunden, dass die Expression der untersuchten Gene durch Typ I-Interferon (Ifn α und Ifn β) stark induziert wurde, während durch Ifn γ keine Induktion der Expression erfolgte (Abb. 4.11A,B,C). Außerdem signifikant erniedrigt war (Abb. 4.11A,B,C).



Abbildung 4.11: Verminderte Expression Interferon-stimulierter Genen (ISGs) in *Fzd9*-defizienten Osteoblasten. (A, B, C) Expressionsanalyse mittel quantitativer RT-PCR von primären WT- und *Fzd9*-defizienten Osteoblasten an Tag zehn der Differenzierung, nach 6h Stimulation mit 100 ng/mL Ifn α , Ifn β und Ifn γ in Bezug auf jeweils unstimulierte Zellen.

Der am besten untersuchte Signalweg, der durch Interferone aktiviert wird, ist der JAK/STAT-Signalweg (Schindler & Plumlee, 2008). Es wurde nun analysiert, ob dieser Signalweg auch in Osteoblasten durch Ifn β aktiviert werden kann und ob möglicherweise eine gestörte Aktivierung in den *Fzd9*-defizienten Osteoblasten vorliegt, was den in Abb. 4.11A und 4.11B dargestellten Befund erklären könnte. Die Aktivierung des STAT-Signalwegs verläuft über die Phosphorylierung unterschiedlicher STAT-Proteine, welche nun mittels Westernblot nach 30-minütiger Stimulation mit Ifn β untersucht wurden. Die phosphorylierte Form von Stat1(Tyr701), Stat2(Tyr690) und Stat6(Tyr641) konnte auch nach Stimulation mit Ifn β weder in WT- noch in *Fzd9*-defizienten Osteoblastenlysaten nachgewiesen werden (Abb. 4.12). Die Phosphorylierung von Stat3 an Tyr705 ist offenbar durch die Stimulation mit Ifn β unbeeinflusst. Die Phosphorylierung von Stat5 an Tyr694 wird in Osteoblasten als einzige durch Ifn β induziert (Abb. 4.12), jedoch liegt hier kein

Unterschied in zwischen WT und *Fzd9*-defizienten Osteoblasten vor, der die Unterschiede in der Genexpression erklären könnte.



Abbildung 4.12: Keine Unterschiede in der Induktion des Stat-Signalwegs in *Fzd9*-defizienten Osteoblasten Westernblots zur Darstellung der Induktion des Stat-Signalwegs in primären WT- und *Fzd9*-defizienten Osteoblasten nach 30-minütiger Stimulation mit 100 ng/mL Ifn β . HeLa-Zellysate dienten als Kontrolle für die Funktion der verwendeten Antikörper für p-Stat1 und p-Stat2.

In einer bereits vor Beginn dieser Arbeit durchgeführten Genchipanalyse in unserer Arbeitsgruppe wurde die Genexpression von undifferenzierten (d0) Osteoblasten mit der Expression fünf Tage später, nach Zugabe von Ascorbat und beta-Glycerophosphat (d5), verglichen. Hier stellte sich heraus, dass die Expression von *Fzd9* von d0 auf d5, parallel zu Osteoblastenmarkern wie *Ibsp, Bglap und Runx2*, induziert wird. Dabei ist zu erwähnen, dass sich die Expression alle anderen Mitglieder dieser Rezeptorfamilie in diesem Zeitraum nicht verändert. In Abb. 4.13A sind außerdem die Gene aufgelistet, die während dieser Phase der Differenzierung am stärksten induziert werden (*Clec4d; C-type lectin domain family 4, member d, Hpgd; Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15, Matn4; Matrilin 4*), allerdings ist für diese Gene bislang keine Funktion im Knochenremodelling bekannt.

Anhand einer weiteren Analyse dieser Genchip-Daten sollte nun untersucht werden, wie sich die in dieser Arbeit identifizierten Interferon-abhängigen Zielgene eines potenziellen Fzd9-abhängigen Signalwegs (Oasl2, Isg15, Ifit1, Ifi203, Ifi27, Ifi44 usw.) während der frühen Osteoblastendifferenzierung verhalten. Es wurde festgestellt, dass fast alle Gene, deren Expression in Fzd9-defizienten Osteoblasten beeinträchtigt war, während der frühen Differenzierung von WT-Osteoblasten induziert werden (Abb. 4.13B). Dies geschieht also scheinbar parallel zur Induktion der Expression von Fzd9 und bekannten Osteoblastenmarkern (Abb. 4.13A), so dass auch diese Gene möglicherweise eine bisher unbekannte Funktion für die Differenzierung oder Funktion von Osteoblasten haben.

Rang	g Gen	d0	d5	SLR	B Gen	d0	d5	
	~		-0.4		16:+1	10.2	120.0	
1	Clec4d	2.2	58.6	5.1	1ju1	10.5	120.0	
2	Hpgd	2.3	74.2	5.0	<i>Ifi204</i>	3.0	23.8	
3	Matn4	110.8	1023.5	3.7	Ifit3	10.2	89.5	
•••	•••		•••	•••	Ifi27	6.3	36.2	
36	Ibsp	35.7	152.4	2.1	Isg15	87.2	204.6	
37	Bglap	93.5	351.5	2.1	Irf7	217.5	380.2	
•••		•••	•••	•••	Oasl2	38.9	128.8	
84	Fzd9	59.7	135.0	1.6	Ligp2	52.5	149.6	
•••			•••	•••	Ifi205	13.6	27.7	
215	Runx2	53.1	123.8	1.2	Ifi44	13.2	64.4	

Abbildung 4.13: Regulation Interferon-stimulierter Gene während der frühen Osteoblastendifferenzierung. (A) Ergebnisse einer Affymetrix-Genchipanalyse, in der die Expression von Genen in primären WT Osteoblasten von Tag 0 (d0) mit der Expression fünf Tage nach Zugabe von Ascorbat und beta-Glycerophosphat verglichen wurde (d5). Angegeben sind die am stärksten induzierten Gene sowie Osteoblastenmarker (*Ibsp, Bglap und Runx2*) und *Fzd9*. Angegeben sind die Affymetrix Signalintensitäten, sowie der Anstieg der Signalstärke von d0 \rightarrow d5 als SLR. (B) Affymetrix-Signalintensitäten an d0 und d5 sowie SLRs bekannter Interferon-stimulierter Gene, deren Expression in *Fzd9*defizienten Osteoblasten um mindestens 50% erniedrigt ist.

4.5 Untersuchungen zur Rolle von Isg15 in Osteoblasten

Das Gen *Isg15 (Interferon stimulated gene 15kD)* kodiert für ein Ubiquitin-ähnliches Protein das posttranslational an Proteine geknüpft wird, um diese z.B. zu stabilisieren oder für eine Translokation zu markieren (Pitha-Rowe & Pitha, 2007; Herrmann et al., 2007). Da *Isg15* als eines der am stärksten reprimierten Gene in $Fzd9^{-/-}$ Mäusen identifiziert wurde (Abb. 4.9A) und bereits ein verfügbares *Isg15*-defizientes Mausmodell generiert worden war (Osiak et al., 2005), sollte nun die Funktion von Isg15 in Knochenzellen näher untersucht werden.

Zuerst wurde eine RT-PCR-Expressionsanalyse mit 16 unterschiedlichen Mausgeweben durchgeführt, wobei sich herausstellte, dass *Isg15* in allen untersuchten Geweben exprimiert wird, wobei eine besonders starke Expression im Magen, in der Speiseröhre und im Knochen (Femur und Schädeldach) gefunden wurde (Abb. 4.14A). Außerdem wurde eine Expression in differenzierten Osteoblasten und Osteoklasten festgestellt (Abb. 4.14A), sowie eine starke Induktion der Expression während der frühen Osteoblastendifferenzierung (Abb. 4.14B). Durch einen Westernblot mit einem Isg15-spezifischen Antikörper wurde dann der Prozess der sogenannten "Protein-ISGylierung" während der Differenzierung von primären Osteoblasten analysiert. Hier zeigte sich, dass in undifferenzierten Osteoblasten (Tag 0), passend zu den Ergebnissen der mRNA-Expressionsanalysen, noch kein "freies" Isg15 vorhanden ist und dass auch noch keine höhermolekularen Proteine mit Isg15

posttranslational modifiziert wurden (Abb. 4.15A). Ab Tag fünf der Differenzierung wird jedoch bereits "freies" Isg15-Protein in Osteoblasten gebildet und auch einige höhermolekulare Proteine offenbar mit Isg15 verknüpft. An Tag sieben erreicht der Prozess der Protein-ISGylierung dann seinen Höchststand und bleibt bis zum Tag 25 relativ konstant.



Abbildung 4.14: Expressionsanalyse von *Isg15*: (A) RT-PCR-Expressionsanalyse der *Isg15*-Expression in 16 Mausgeweben, sowie Osteoblasten und Osteoklastenkulturen. (B) Bestimmung der Expression von *Isg15* während der Osteoblastendifferenzierung mittels quantitativer RT- PCR.

Als Negativkontrolle wurde Proteinlysat aufgetragen, das aus Isg15-defizienten Osteoblasten gewonnen wurde. Hier liegt kein freies Isg15 vor, jedoch wird anhand einiger vorhandener Banden deutlich, dass der verwendete Antikörper offenbar mindestens an zwei Proteine unspezifisch bindet (Abb. 4.15A). Als nächstes wurde mit derselben Methode überprüft, ob die ISGylierung in Fzd9-defizienten Osteoblasten, wie es die verminderte mRNA-Expression von Isg15 in diesen Zellen vermuten ließ, gestört ist.



Abbildung 4.15: Protein-ISGylierung in Osteoblasten: (A) Westernblot mit einem ISG15-spezifischen Antikörper zur Darstellung der Protein-ISGylierung während der Differenzierung von WT-Osteoblasten. (B) Westernblot mit einem ISG15-spezifischen Antikörper zur Darstellung der Protein-ISGylierung in WT- und *Fzd9*-defizienten Osteoblasten an Tag 0 und Tag 5 der Differenzierung. Die Pfeile deuten auf Unterschiede im Bandenmuster hin.

Dazu wurden mit dem Isg15-spezifischen Antikörper die ISGylierten Proteine in WT und Fzd9-defizienten Osteoblasten in einem Westernblot detektiert und es zeigte sich, dass das erhaltene Bandenmuster in den Fzd9-defizienten Osteoblasten an Tag 5 anders war als in den WT Osteoblasten (Pfeile in Abb. 4.15B). Dies lässt vermuten, dass die Protein-ISGylierung in den Fzd9-defizienten Osteoblasten gestört ist, was möglicherweise Auswirkungen auf die Differenzierung oder Funktion dieser Zellen hat.

4.6 Knochenhistologische Analyse Isg15-defizienter Mäuse

Um die physiologische Bedeutung von Isg15 für die Differenzierung oder Funktion von Osteoblasten auch *in vivo* weiter zu analysieren, wurde ein *Isg15*-defizientes Mausmodell analysiert, welches freundlicherweise von Dr. Klaus-Peter Knobeloch (Uniklinik Freiburg) zur Verfügung gestellt wurde. Die Analyse von Wirbelkörperhistologien aus sechs Wochen alten Tieren ergab hier, wie auch bei den $Fzd9^{-/-}$ Mäusen, keine Veränderung im Knochenvolumen (Abb. 4.16A,B). Im Alter von 24 Wochen tritt jedoch in den $Isg15^{-/-}$ Mäusen eine Osteopenie auf, was sich an einer signifikant erniedrigten Knochendichte, sowie einer erniedrigten Trabekeldicke, einer erniedrigten Trabekelanzahl und einem erhöhten trabekulären Abstand zeigte (Abb. 4.16B).



Abbildung 4.16: Erniedrigtes trabekuläres Knochenvolumen in *Isg15^{-/-}* Mäusen. (A) Von Kossa-gefärbte, undekalzifizierte Histologien von Wirbelkörpern aus Wildtyp und *Isg15*-defizienten Mäusen in den angegebenen Altersstufen. (B) Histomorphometrische Berechnung des Knochenvolumens (BV/TV), der Trabekeldicke (Tb.Th.), der Trabekelanzahl (Tb.N) und des trabekulären Abstands (Tb.Sp).

Um zu analysieren, ob die Röhrenknochen ebenfalls von einem Knochenmasseverlust betroffen sind, wurden Femora aus WT und *Isg15^{-/-}* Mäusen mittels µCT analysiert und es

stellte sich heraus, dass eine signifikant erniedrigte kortikale Dicke (C.Th) in den Knochen *Isg15*-defizienter Mäuse vorliegt (Abb. 4.17A,B).

Außerdem wurden Untersuchungen zur biomechanischen Stabilität durchgeführt. In Dreipunktbiegetests der Femora wurde eine erniedrigte biomechanische Stabilität der Femora von *Isg15^{-/-}* Mäusen festgestellt und Mikrokompressionstestungen zeigten ebenfalls eine verminderte Stabilität der Wirbelkörper von *Isg15^{-/-}* Mäusen (Abb. 4.17B), was insgesamt zu dem Schluss führt, dass eine Deletion von *Isg15* zu einem Knochenmasseverlust und verminderter Knochenstabilität in der Maus führt.



Abbildung 4.17: Verminderte biomechanische Stabilität in Röhrenknochen Isg15-defizienter Mäuse. (A) μ CT-Aufnahmen von Femora aus 24 Wochen alten WT und *Isg15^{-/-}* Mäusen. (B) Berechnung der mittleren kortikalen Dicke (C.Th) der Femora sowie die maximal nötige Kraft (Fmax), die zum Bruch des Femurs in einem Dreipunktbiegetest führt bzw. zum Versagen eines Wirbelkörpers in einem Kompressionstest.

Um auch hier den zellulären Mechanismus der vorliegenden Osteopenie aufzuklären, wurde WT- und Isg15-defizienten Mäusen im Abstand von sieben Tagen Calcein injiziert und anhand des Abstandes der Calceindoppelbanden die Knochenformationsrate bestimmt. Hier Isg15^{-/-} Mäuse dass eine stellte sich heraus, um etwa 30 % erniedrigte Knochenformationsrate aufweisen. Weiterhin zeigten histomorphometrische Analysen, dass die mit Osteoblasten bedeckte Knochenfläche ebenfalls signifikant erniedrigt ist (Abb. 4.18A,B). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die mit Osteoklasten bedeckte Fläche in Isg15^{-/-} Mäusen unverändert ist (Abb. 4.18B) und dass auch die Menge an TypI-Kollagen-Abbauprodukten im Serum der Isg15^{-/-} Mäuse nicht erhöht ist (Abb. 4.18B), was dafür spricht, dass die Knochenresorption in den Isg15^{-/-} Mäusen nicht verändert ist und dass somit die Osteopenie in diesen Tieren primär durch einen Defekt in der Knochenformation ausgelöst wird.



Abbildung 4.18: Erniedrigte Knochenformationsrate in $Isg15^{-/-}$ Mäusen. (A) Repräsentativer Ausschnitt von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen einer Calcein-Doppelbande, die durch die zweimalige Injektion von WT oder $Isg15^{-/-}$ Mäusen entstanden ist. Die histomorphometrische Bestimmung der Knochenformationsrate (BFR/BS) ist darunter angegeben. (B) Histomorphometrische Bestimmung der mit Osteoblasten bzw. Osteoklasten bedeckten Knochenoberfläche (Ob.S/BS) bzw. (Oc.S/BS) und Bestimmung der TypI-Kollagen-Abbauprodukte (Crosslaps) im Serum von WT und $Isg15^{-/-}$ Mäusen.

4.7 Überexpression von *Isg15* in *Fzd9*-defizienten Osteoblasten

Da aufgrund der bisherigen Ergebnisse die Vermutung nahelag, dass der Defekt in der Protein-ISGylierung oder aber die verringerte Expression von Chemokinen in Fzd9defizienten Osteoblasten zum Mineralisationsdefekt dieser Zellen beiträgt, wurde als nächstes überprüft, ob durch eine Überexpression von Isg15 in Fzd9-defizienten Osteoblasten oder durch eine Zugabe von rekombinantem Ccl2 oder Ccl5 eine Korrektur dieses Defektes erzielt werden kann. Da es bisher nicht gelungen war, primäre Osteoblasten Transfektionsreagenzien transient zu transfizieren, wurde eine mit retrovirale Transfektionsmethode etabliert. Dazu wurden die primären Fzd9-defizienten Zellen einen Tag nach dem Ausplattieren entweder mit einem Mieg3-eGFP Kontrollvirus (mock) oder einem Mieg3-eGFP-Isg15 Virus transduziert. Anhand der eGFP-Expression der Zellen (Abb. 4.19A) konnte der Erfolg der Transfektion bereits ein bis zwei Tage nach der Transduktion sichtbar gemacht werden.

Mittels Westernblot wurde dann die Überexpression von Isg15 in den *Fzd9*-defizienten Osteoblasten überprüft (Abb. 4.19B, freies Isg15). Anhand dieses Blots wurde außerdem deutlich, dass die Überexpression von Isg15 nicht nur zu einer vermehrten Bildung des freien Proteins führt, sondern dass sich außerdem das Bandenmuster der höhermolekularen ISGylierten Proteine ändert (Pfeile Abb. 4.19B). Um zu überprüfen ob die Überexpression von ISg15, oder die kontinuierliche Zugabe von 100 ng/mL Ccl2 oder 100 ng/mL Ccl5 eine Korrektur des Mineralisationsdefekt bewirken können, wurden die *Fzd9*-defizienten Osteoblastenkulturen an Tag 15 der Differenzierung mittels von Kossa-Färbung analysiert

und die mineralisierten Areale mittels *Bioquant* ausgemessen. Es stellte sich heraus, dass die Zugabe von rekombinantem Ccl2 oder Ccl5 keinen Einfluss auf die Mineralisation *Fzd9*-defizienter Osteoblasten hat, dass aber die Überexpression von *Isg15* zu einer partiellen und signifikanten Korrektur des Mineralisationsdefektes dieser Zellen führt (Abb.4.19 C, D).



Abbildung 4.19: Partielle Korrektur des Mineralisationsdefektes *Fzd9*-defizienter Osteoblasten. (A) Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme Mieg3-eGFP bzw Mieg3-eGFP-Isg15 transduzierter *Fzd9*-defizienter Osteoblasten an Tag 5 der Differenzierung. (B) Westernblot zur Darstellung der Protein-ISGylierung nach Überexpression von *Isg15*. Die Pfeile deuten auf Veränderungen im Bandenmuster isgylierter Proteine (C) Von Kossa-gefärbte Osteoblastenkulturen an Tag 15 der Differenzierung nach kontinuierlicher Zugabe von rekombinantem Ccl2/5 (100 ng/ml) bzw. Überexpression von *Isg15*.
(D) Bestimmung der mineralisierten Fläche von drei unabhängigen Osteoblastenkulturen unter angegebenen Bedingungen.

4.8 Knochenhistologische Analyse von *Fzd9*^{+/-} Mäusen und Williams-Beuren-Syndrom (WBS) Patienten

Das Williams-Beuren-Syndrom ist eine seltene Erbkrankheit, die neuesten Schätzungen zufolge mit einer Prävalenz von etwa 1:10000 bei Neugeborenen auftritt. Der Erkrankung liegt eine hemizygote Deletion von ca. 25 Genen auf dem langen Arm des Chromosoms 7 (7q11.23) zugrunde (Pober, 2010; Schubert, 2009). Da *FZD9* eines dieser Gene ist und durch eine Kooperation mit Dr. Barbara Pober (Harvard Medical School) und Prof. Dr. Franz Jakob (Uniklinik Würzburg) die Möglichkeit bestand, Knochendichtemessungen an

WBS-Patienten durchzuführen, wurde zuerst untersucht, ob auch eine heterozygote Deletion von *Fzd9* bei Mäusen zu einem Knochenmasseverlust führt. Die Analyse 70 Wochen alter WT, *Fzd9*^{+/-} und *Fzd9*^{-/-} Tiere ergab, dass *Fzd9*^{+/-} Mäuse ebenfalls eine signifikant erniedrigte Knochendichte und Knochenstabilität aufweisen (Abb. 4.20A,B), und dass auch in *Fzd9*^{+/-} Mäusen dieser Knochenmasseverlust durch eine erniedrigte Osteoblastenanzahl und eine erniedrigte Knochenformationsrate erklärt werden kann, während die Anzahl an Osteoklasten unverändert ist (Abb. 4.20C).



Abbildung 4.20: Osteopenie in $Fzd9^{+/-}$ Mäusen. (A) Von Kossa-gefärbte, undekalzifizierte Histologien von Wirbelkörpern aus WT, $Fzd9^{+/-}$ und $Fzd9^{-/-}$ Mäusen im Alter von 70 Wochen. Darunter: μ CT Aufnahmen von Wirbelkörpern aus WT, $Fzd9^{+/-}$ und $Fzd9^{-/-}$ Mäusen (B) Histomorphometrische Berechnung des Knochenvolumens (BV/TV), und biomechanische Berechnung der Maximalkraft bis zu Versagen des Wirbelkörpers in einem Kompressionstest. (C) Histomorphometrische Bestimmung der Osteoblastenzahl pro Knochenfläche (Ob.N./B.Pm) und der Knochenformationsrate (BFR/BS), sowie der Anzahl an Osteoklasten pro Knochenfläche (Oc.N./B.Pm)

Da also auch das Fehlen von nur einem Allel des *Fzd9*-Gens zu einer Osteopenie bei Mäusen führt, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Barbara Pober und Prof. Dr. Franz Jakob bei 15 WBS-Patienten per DXA (*Dual Xray Energy Absorptiometry*) die Knochendichte gemessen. Dazu wurden in Boston bzw. Würzburg neun männliche und sechs weibliche Patienten mit einem Durchschnittsalter von 36 Jahren untersucht (Abb. 4.21A). Es zeigte sich, dass die *T-Scores* in allen untersuchten Knochenarealen unter dem Durchschnitt lagen (Abb. 4.21B). So konnte nach WHO-Definition in sieben Fällen eine Osteopenie diagnostiziert werden und in vier Fällen sogar eine Osteoporose. Eine Patientin wies aufgrund ihrer erniedrigten Knochendichte bereits Wirbelkörperfrakturen auf, die operativ stabilisiert werden mussten (Abb. 4.21C).



Abbildung 4.21: Knochendichtemessung in WBS-Patienten: (A) Geschlechterverteilung und Altersdurchschnitt des untersuchten Patientenkollektivs. (B) Mittels DXA-Untersuchungen bestimmte durchschnittliche *T-Scores* der untersuchten WBS-Patienten. (C) Postoperative Röntgenaufnahme einer stabilisierten Wirbelkörperfraktur in einer osteoporotischen WBS-Patientin. # Frakturen der Wirbelkörper TH11 und TH12 und L2 (TH=thorakal, L=lumbal).

4.9 Generierung eines *Col1a1-Fzd9* DNA-Konstruktes

Um in weiteren Studien anhand eines Mausmodells zu überprüfen, ob eine spezifische Überexpression von Fzd9 in Osteoblasten einen osteoanabolen Effekt hervorruft, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein DNA-Konstrukt generiert, dass unter Verwendung eines 2.3kb-Fragments des *Col1a1*-Promoters eine spezifische Überexpression von Fzd9 in Osteoblasten ermöglicht (Dacquin et al., 2002) (Abb. 4.22A).

Da das *Fzd9*-Gen aus nur einem Exon besteht, wurde aus genomischer DNA der gesamte Leserahmen (~2.3 kb) von *Fzd9* amplifiziert (Abb. 4.22B) und mittels *TOPO-Cloning* in den Vektor PCR2.1-TOPO kloniert. Nach einer vollständigen Sequenzierung wurde das *Fzd9*-cDNA-Fragment in die ClaI Schnittstelle des PA3-*Col1a1*Vektors ligiert (Abb 4.22C). Nach Verdau des Vektors PA3-*Col1a-Fzd9* mit NotI und XhoI wurde das 6.3 kb große Fragment (Abb. 4.22A) extrahiert und kann nun zur Generierung *Fzd9*-transgener Mäuse durch Mikroinjektion in den Vorkern einzelliger Mausembryonen verwendet werden.



Abbildung 4.22: Generierung eines *Colla1-Fzd9* DNA-Konstruktes: (A) Schematische darstellung des *Colla1-Fzd9* DNA-Konstruktes zur spezifischen Überexpression von *Fzd9* in Osteoblasten. (B) Mittels spezifischer Primer amplifizierter Leserahmen (ca. 2.3 kb) von *Fzd9* aus genomischer DNA. (C) Schematische Darstellung des PA3-*Colla1*-Vektors (D) Restriktionsverdau des generierten PA3-*Colla1-Fzd9* Vektors mit XhoI und NotI vor der Gelextraktion des 6.3 kb linearisierten *Colla1-Fzd9* Konstrukts und Restriktionsverdau des PA3-*Colla1* Vektors mit XhoI und NotI als Kontrolle.

4.10 Untersuchungen zur Rolle des Wnt-Signalwegs in der Osteoklastendifferenzierung

Da bisher sehr wenig über die Rolle des Wnt-Signalwegs in Osteoklasten bekannt ist, wurde der Effekt einer Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs auf die Differenzierung von Osteoklasten aus Knochenmarkszellen untersucht. Hier zeigte sich, dass eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs durch den GSK3β-Inhibitor Lithiumchlorid (LiCl) oder aber eine Aktivierung durch die kanonischen Wnt-Liganden Wnt3a und Wnt7a zu einer Dosis-abhängigen Blockierung der Differenzierung von Osteoklasten führt (Abb. 4.23A,B). So bildeten sich bei kontinuierlicher Aktivierung des β-Catenin-abhängigen Wnt-Signalwegs durch eine Konzentration von 10 mM LiCl oder durch 200 ng/mL Wnt3a, innerhalb der Kulturzeit von sieben Tagen, fast keine Osteoklasten mehr. Dagegen bildeten sich bei Anwesenheit eines nicht-kanonischen Wnt-Liganden (Wnt5a), in gleichen
Konzentrationen, sogar signifikant mehr Osteoklasten. Die Anwesenheit von Dkk1, einem Inhibitor des kanonischen Wnt-Signalwegs, hatte keinen Effekt auf die Differenzierung von Osteoklasten (Abb. 4.23A,B).



Abbildung 4.23: Inhibition der Osteoklastendifferenzierung durch Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs. (A) Exemplarische Ausschnitte aus TRAP-gefärbten Osteoklastenkulturen nach sieben Tagen Kultivierung in Anwesenheit der angegebenen Konzentrationen an LiCl, Wnt3a, Wnt5a und Dkk1 ab Tag 0 der Differenzierung. Ab Tag 4 erfolgte die zusätzliche Zugabe von MCSF (20 ng/mL) und RANKL (40 ng/mL). (B) Quantifizierung der TRAP-positiv gefärbten multinukleären Osteoklasten an Tag sieben der Differenzierung unter angegebenen Kulturbedingungen.

Um zu überprüfen, ob dieser negative Einfluss auf die Osteoklastendifferenzierung ein direkter Effekt ist oder aber durch eine negative Wirkung auf die Rankl-Expression in Stromazellen vermittelt wird, wurde als nächstes überprüft, ob die Wnt3a-vermittelte Inhibition der Osteoklastogenese durch eine kontinuierliche Zugabe von rekombinantem RANKL aufgehoben werden kann. In Abb. 4.24A ist zu sehen, dass die kontinuierliche Zugabe von RANKL zwar zu einer erhöhten Osteoklastenzahl nach sieben Tagen Kultur führt, dass aber der negative Effekt von Wnt3a nur geringfügig aufgehoben werden konnte. Um einen indirekten Effekt über eine zweite Zellart komplett auszuschließen, wurden RAW264.7 Zellen durch Zugabe von RANKL zu Osteoklasten differenziert und auch hier

der Effekt von LiCl und Wnt3a auf die Osteoklastogenese getestet. Es zeigte sich, dass eine Konzentration von 10 mM LiCl auch in dieser Makrophagen-Vorläuferzellinie einen vollständigen Block der Osteoklastendifferenzierung hervorruft, und dass auch die Kultivierung in Anwesenheit höherer Konzentrationen von rekombinantem Wnt3a zu einer signifikant verringerten Osteoklastenbildung führt (Abb. 4.24B).



Abbildung 4.24: Rankl-unabhängiger Effekt von LiCl und Wnt3a auf die Differenzierung von Osteoklasten. (A) Anzahl der aus Knochenmarkszellen gebildeten Osteoklasten bei kontinuierlicher Zugabe von RANKL (50 bzw. 100 ng/mL und Wnt3a (200 ng/mL). (B) Anzahl der aus RAW264.7 Zellen gebildeten TRAP-positiven multinukleären Zellen nach vier Tagen Kultur in Gegenwart von 50 ng/mL RANKL und den angegebenen Konzentrationen an LiCl und Wnt3a.

4.11 Untersuchung der Genexpression während der Osteoklastendifferenzierung

Um die Expression von Mitgliedern des Wnt-Signalwegs, insbesondere der Frizzled-Rezeptoren, während der Differenzierung von Osteoklasten aus Knochenmarkszellen zu untersuchen, wurde einen genomweite Expressionsanalyse mittels Affymetrix-Genchip-Hybridisierung durchgeführt. Hierzu wurde nach dem Schema in Abb. 4.25 die Genexpression an vier unterschiedlichen Tagen der Osteoklastendifferenzierung untersucht. Als Referenzexpression diente die Genexpression an Tag 1 nach dem Ausplattieren der Knochenmarkszellen. Ausgehend hiervon wurde dann die Expression an Tag 4, an Tag 5 und an Tag 7, wo sich bereits deutlich sichtbar Osteoklasten in der Kultur befanden, untersucht.



Abbildung 4.25: Schematische Darstellung der untersuchten Zeitpunkte der Genexpression während der Differenzierung von Knochenmarkszellen zu Osteoklasten. Bis Tag 4 der Differenzierung wurde der Kultur eine Konzentration von 10⁻⁸ M Vitamin D hinzugefügt und dann bis zum Kulturende MSCF (20 ng/mL) und RANKL (40 ng/mL) zugesetzt. Die Isolierung von RNA aus den Zellen erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten an Tag 1, 4, 5 und 7.

Anhand des Expressionsverlaufes der Osteoklastenmarker *Calcr* (*Calcitonin receptor*), *Clcn7* (*Chloride channel 7*), *Oscar* (*Osteoclast associated receptor*), *Mst1r* (*Macrophage stimulating 1 receptor*), *Ctsk* (*Cathepsin K*) und *Acp5* (*Acid phosphatase 5, tartrate resistant*) (Abb. 4.26A) konnte bereits der Erfolg dieses Experiments erkannt werden, denn die Expression dieser stieg wie zu erwarten während der Kulturdauer stark an. Stattdessen konnte wie erwartet kein Anstieg in der Expression von Osteoblastenmarkern wie Bglap (Bone gamma carboxyglutamate protein) und Ibsp (Bone sialoprotein) festgestellt werden (Abb. 4.26).



Abbildung 4.26: Anstieg in der Expression von Osteoklastenmarkern während der Differenzierung von Knochenmarkszellen. Affymetrix-Signalintensitäten der angegebenen Gene zum jeweiligen Zeitpunkt der Osteoklastendifferenzierung.

4.12 Untersuchung der Expression von Wnt-Proteinen und Frizzled-Rezeptoren während der Osteoklastendifferenzierung

Durch die durchgeführte Affymetrix-Genchipanalyse bestand nun die Möglichkeit, die Expression der 19 Wnt-Gene, während der Differenzierung von Osteoklasten aus Knochenmarkszellen, zu untersuchen. Hier wurde gefunden, dass offenbar die kanonischen Wnt-Liganden Wnt1, Wnt3 und Wnt3a in den Kulturen kaum gebildet werden und dass die Expression der als nicht-kanonisch geltenden Liganden Wnt4 und Wnt5a am stärksten ist (Abb. 4.27). Außerdem steigt die Expression dieser Gene im Verlauf der Differenzierung stark an, was möglicherweise eine Funktion für die Osteoklastendifferenzierung impliziert.



Abbildung 4.27: Expression von Wnt-Liganden während der Osteoklastendifferenzierung. Affymetrix Signalintensitäten der angegebenen Gene zum jeweiligen Zeitpunkt der Osteoklastendifferenzierung.

Als nächstes wurde die Expression von Frizzled-Rezeptoren und die Expression der Wnt-Corezeptoren *Lrp5* und *Lrp6* untersucht. Hier fiel besonders der starke Anstieg (30-fach) in der Expression des *Fzd8* Gens von Tag eins auf Tag vier auf. Außerdem wird *Fzd8* von allen Mitgliedern dieser Familie am stärksten exprimiert (Abb. 4.28), was eine mögliche Funktion von Fzd8 während der Differenzierung von Knochenmarkszellen zu Osteoklasten impliziert.



Abbildung 4.28: Expression von Wnt-Rezeptoren während der Osteoklastendifferenzierung. Affymetrix-Signalintensitäten der angegebenen Gene zum jeweiligen Zeitpunkt der Osteoklastendifferenzierung.

Die Wnt-Corezeptoren *Lrp5* und *Lrp6* werden ebenfalls in den Kulturen zu allen Zeitpunkten exprimiert, die Expression von *Lrp6* ist jedoch etwa viermal so hoch (Abb. 4.28). Zur Bestätigung der Ergebnisse der Affymetrix-Genchipanlyse wurde die Expression der Fzd-Rezeptoren, sowie die Expression von *Lrp5* und *Lrp6* und *Calcr* mittels semiquantitativer RT-PCR bestätigt (Abb. 4.29).



Abbildung 4.29: Bestätigung der Ergebnisse der Genchipanalyse mittels semiquantitativer RT-PCR. Mittels semiquantitativer RT-PCR und Gen-spezifischen Primern in 32 Zyklen amplifizierte DNA-Fragmente von Rezeptoren der Frizzled-Familie und *Lrp5/6* sowie *Calcr*, nach geleektrophoretischer Auftrennung und Visualisierung unter UV-Licht.

4.13 Erstellung eines Gewebeexpressionsprofils aller Frizzled-Rezeptoren

Als nächstes wurde die Expression von Fzd-Rezeptoren sowie *Lrp5* und *Lrp6* in 16 unterschiedlichen Mausgeweben sowie ausdifferenzierten Osteoblasten- und Osteoklastenkulturen untersucht, um möglicherweise eine Knochenzell-spezifische Expression einer der Rezeptoren zu finden. Dazu wurde aus den unterschiedlichen Geweben bzw. Zellen RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mit spezifischen Primern wurde dann jeweils in einer semiquantitativen RT-PCR die Expression des entsprechenden Gens untersucht (Abb. 4.30). Hier zeigte sich wie in den vorangegangenen Untersuchungen, dass insbesondere Fzd8 sehr stark in Osteoblasten und Osteoklasten exprimiert wird und ansonsten in allen untersuchten Geweben ein eher schwaches Signal liefert. Außerdem werden Fzd1 und Fzd7 relativ stark in Osteoklastenkulturen exprimiert.

Weiterhin war an dieser Analyse auffällig, dass Fzd9 offenbar nicht in Osteoklasten exprimiert wird, was außerdem für Fzd3 und Fzd10 gilt, während alle Fzd-Rezeptoren in Osteoblasten exprimiert werden. Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass $Fzd9^{-/-}$ Mäuse keine Veränderungen in der Knochenresorption aufweisen.



Abbildung 4.30. Gewebe-Expressionsprofil von *Fzd-* **und** *Lrp5/6*-Rezeptoren. Mittels semiquantitativer RT-PCR und Gen-spezifischen Primern in 38 Zyklen amplifizierte DNA-Fragmente von Rezeptoren der Frizzled-Familie und *Lrp5/6*, nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Visualisierung unter UV-Licht.

Als nächstes wurde untersucht, ob *Fzd8* auch *in vivo* in Knochenzellen exprimiert wird. Mittels Immunhistochemie an humanen Knochenbiopsien und einem FZD8-spezifischen Antikörper konnte eine spezifische Expression von FZD8 auch *in vivo* sowohl in Osteoblasten (Abb. 4.31A) als auch in Osteoklasten (Abb. 4.31B) gezeigt werden.



Abbildung 4.31: Expression von *FZD8* in humanen Knochenzellen. Immunhistochemische Färbung an einer humanen Knochenbiopsie mit einem FZD8-spezifischen Antikörper. (A) Anhand der Braunfärbung multinukleärer Osteoklasten wird eine Expression von FZD8 in diesen Zellen deutlich. (B) Anhand der Braunfärbung der auf dem Knochen lokalisierten Osteoblasten wird eine Expression von FZD8 auch in diesen Zellen erkennbar.

4.14 Inhibition des anti-osteoklastogenen Wnt3a-Effekts durch lösliche rekombinante Fzd-Cystein-reiche-Domänen

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse zur Expression von Fzd8 wurde nun als nächstes überprüft, ob lösliche Fzd-Rezeptoren, die nur die extrazelluläre hochkonservierte Cysteinreiche-Domäne (CRD) enthalten, den anti-osteoklastogenen Effekt von Wnt3a inhibieren können. Es wurden nun also Knochenmarkszellen wie in den vorangegangenen Versuchen in Gegenwart von 200 ng/mL Wnt3a kultiviert und zusätzlich 500 ng/mL der rekombinanten Fzd8-CRD zugegeben. Aufgrund ihrer hohen endogenen Expression in den Knochenmarkszellkulturen wurde außerdem der Effekt einer Fzd1-CRD und einer Fzd7-CRD untersucht. Während **CRDs** alleine alle rekombinanten keine Auswirkungen auf die Osteoklastendifferenzierung haben, wurde der inhibierende Effekt von Wnt3a durch alle Fzd-CRDs vermindert wobei die Zugabe der Fzd8-CRD zu einer vollständigen Inhibition des Wnt3a-Effekts auf die Osteoklastendifferenzierung führte (Abb. 4.32A). Mittels Westernblot wurde dann überprüft, ob durch die Zugabe der Fzd8-CRD die Induktion der Lrp6-Phosphorylierung in den Osteoklastenkulturen blockiert werden kann. In Abb. 4.32B ist zu sehen, dass eine 30-minütige Stimulation von Osteoklastenkulturen an Tag 4 der Differenzierung eine Phosphorylierung von Lrp6 bewirkt und dass dieser Effekt durch gleichzeitige Zugabe von Dkk1 oder der Fzd8-CRD blockiert wird. Außerdem wird ebenfalls der Effekt von Wnt3a auf den Gehalt an phosphoryliertem ß-Catenin durch gleichzeitige Zugabe von Dkk1 und der Fzd8-CRD aufgehoben (Abb. 4.32B).



Abbildung 4.32: Inhibition des anti-osteoklastogenen Effekts von Wnt3a durch rekombinante Fzd-CRDomänen: (A) Anzahl der nach sieben Tagen in Kultur gebildeten TRAP-positiven multinukleären Osteoklasten aus Knochenmarkszellen unter kontinuierlicher Zugabe der angegebenen rekombinanten Proteine, Wnt3a (200 ng/mL) und Fzd1/7/8-CRD (500 ng/mL). (B) Westernblot mit Proteinlysaten von Osteoklastenkulturen an Tag vier der Differenzierung nach 30-minütiger Stimulation mit den angegebenen rekombinanten Proteinen.

4.15 Knochenhistologische Analyse Fzd8-defizienter Mäuse

Da die bisherigen Ergebnisse darauf hindeuteten, dass Fzd8 möglicherweise eine wichtige Funktion in der Signaltransduktion von kanonischen Wnt-Liganden in Knochenzellen spielt, sollte durch die Knochenhistologische Analyse eines Fzd8-defizienten Mausmodells die physiologische Funktion von Fzd8 im Knochenremodelling untersucht werden. Fzd8defiziente Mäuse wurden von der Firma Deltagen ($\#Fzd8^{tm1Dgen}$) erhalten und unter Verwendung spezifischer Primerpaare und genomischer DNA genotypisiert (Abb. 4.33A). Die Analyse des trabekulären Knochenvolumens von sechs Wochen alten WT und $Fzd8^{-/-}$ Mäusen ergab keinen signifikanten Unterschied im Knochenvolumen (Abb. 4.33B), jedoch im Alter von 24 Wochen zeigen $Fzd8^{-/-}$ und sogar $Fzd8^{+/-}$ Mäuse ein bis zu 35 % erniedrigtes trabekuläres Knochenvolumen (Abb. 4.33C). Passend zu diesem Phänotyp waren auch die anderen strukturellen Parameter, wie die Trabekelanzahl (Tb.N) und die kortikale Dicke (Tb.Th) in den $Fzd8^{-/-}$ Mäusen im Alter von 24 Wochen signifikant erniedrigt, sowie der Trabekelabstand (Tb.Sp) erhöht (Abb. 4.33D).



Abbildung 4.33: Osteopenie in $Fzd8^{-/-}$ Mäusen. (A) Ergebnis der Genotypisierung von $Fzd8^{+/+}$ und $Fzd8^{-/-}$ Mäusen. (B,C) Von Kossa-gefärbte, undekalzifizierte Histologien von Wirbelkörpern aus WT, $Fzd8^{+/-}$ und $Fzd8^{-/-}$ Mäusen im Alter von sechs Wochen (B) und 24 Wochen (C) Angabe des Knochenvolumens (BV/TV) jeweils darunter. (D) Histomorphometrische Berechnung der Trabekelanzahl (Tb.N), Trabekeldicke (Tb.Th), und des trabekulären Abstands (Tb.Sp).

Ein vergleichbarer Phänotyp zeigte sich auch in den Röhrenknochen *Fzd8*-defizienter Mäuse. Hier konnte in den Tibiae ein um etwa 50 % erniedrigtes Knochenvolumen festgestellt werden (Abb. 4.34A), sowie eine signifikant erniedrigte Kortikalisdicke (Abb. 4.34B).



Abbildung 4.34: Erniedrigte Knochendichte in Röhrenknochen *Fzd8*-defizienter Mäuse. (A) Von Kossa-gefärbte, undekalzifizierte Histologien von Tibiae aus WT und $Fzd8^{-/-}$ Mäusen im Alter von 24 Wochen mit der Angabe des Knochenvolumens (BV/TV). (B) μ CT-Aufnahmen von Femora aus WT und $Fzd8^{-/-}$ Mäusen im Alter von 24 Wochen mit der Angabe der Kortikalisdicke (C.Th).

Um den zellulären Mechanismus aufzuklären, der dem gefundenen Phänotyp unterliegt, wurden als nächstes histomorphometrische Messungen durchgeführt. Durch zweimalige Injektion von Calcein, im Abstand von sieben Tagen, in 24 Wochen alten WT und $Fzd8^{-1}$ Mäusen und anschließender histologischer Aufarbeitung und histomorphometrischer Messung, wurde die Knochenformationsrate bestimmt. Hier zeigte sich kein Unterschied in den Abständen der entstandenen Doppelbanden (Abb. 4.35A), und auch die histomorphometrische Berechnung der Knochenformationsrate zeigte keinen Unterschied zwischen WT und $Fzd8^{-/-}$ Mäusen (Abb. 4.35B). Dazu passend konnte ebenfalls kein Unterschied in der Osteoblastenanzahl pro Knochenfläche (Ob.N/B.Pm) gefunden werden (Abb. 4.35B). Eine TRAP-Färbung auf Paraffinhistologien von WT und Fzd8^{-/-} Tibiae zeigte hingegen eine deutlich vermehrte Anzahl TRAP-positiver Zellen in den Knochen Fzd8defizienter Mäuse (Abb. 4.35C). Die histomorphometrische Bestimmung der Anzahl von Osteoklasten ergab dazu passend eine fast verdoppelte Anzahl an Osteoklasten in den Fzd8-defizienter Mäuse und die Konzentration von Knochen TypI-Kollagen-Abbauprodukten (Crosslaps) war im Serum dieser Mäuse signifikant erhöht, was auf eine erhöhte Resorption schließen lässt.



Abbildung 4.35: Erhöhte Knochenresorption in *Fzd8*-defizienten Mäusen. (A) Repräsentativer Ausschnitt einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme einer Calcein-Doppelbande, die durch zweimalige Injektion von WT und $Fzd8^{-/-}$ Mäusen entstanden ist. (B) Histomorphometrische Bestimmung der Knochenformationsrate und der Anzahl von Osteoblasten pro Knochenfläche (Ob.N/B.Pm) (C) Ausschnitte von TRAP-gefärbten Tibiahistologien aus WT und $Fzd8^{-/-}$ Mäusen. (D) Histomorphometrische Bestimmung der Osteoklastenanzahl pro Knochenfläche, sowie die mittels ELISA bestimmte Menge an TypI-Kollagen-Abbauprodukten (Crosslaps) im Serum von WT und $Fzd8^{-/-}$ Mäusen.

Da Mäuse mit einer osteoblastenspezifischen Deletion von β -Catenin ebenfalls eine verminderte Knochenmasse bedingt durch eine erhöhte Knochenresorption aufweisen. (Glass et al., 2005), was in diesen Mäusen durch eine verringerte Expression von Osteoprotegerin (OPG) in Osteoblasten erklärt wurde, sollte im Folgenden überprüft werden, ob dies ebenfalls in $Fzd8^{-/-}$ Mäusen der Fall ist. Hier wurde gefunden, dass passend zu den unveränderten Knochenformationsparametern, in $Fzd8^{-/-}$ Mäusen kein Unterschied in den Serumkonzentrationen von Alkalischer Phosphatase und Osteocalcin vorliegt (Abb. 4.36A). Zudem wurde kein Unterschied in den Serumkonzentrationen lässt, dass die erhöhte Resorption in den $Fzd8^{-/-}$ Mäusen nicht durch ein verändertes Opg/Rankl Verhältnis zu erklären ist.



Abbildung 4.36: Normale Konzentration Knochen-spezifischer Serumparameter in *Fzd8*-defizienten Mäusen (A) Serumkonzentrationen von Alkalischer Phosphatase und Osteocalcin in 24 Wochen alten WT und $Fzd8^{-/-}$ Mäusen. (B) Serumkonzentrationen von Osteoprotegerin (Opg) und Rankl in 24 Wochen alten WT und $Fzd8^{-/-}$ Mäusen.

5 Diskussion

5.1 Erniedrigte Knochendichte in *Fzd9*-defizienten Mäusen

Das FZD9-Gen wurde 1997 identifiziert und fand aufgrund seiner Lokation in der chromosomalen Region 7q11.23, die bei Williams-Beuren-Syndrom (WBS) partiell hemizygot deletiert ist, große Beachtung. Beim Williams-Beuren-Syndrom handelt es sich um eine neurologische Entwicklungsstörung, die neuesten Schätzungen zufolge mit einer Häufigkeit von 1:10000 bei Neugeborenen auftritt und sich durch multiple Symptome, wie kognitive Behinderungen oder kardiovaskuläre Veränderungen äußert (Wang et al., 1997; Pober, 2010; Schubert, 2009). Um herauszufinden, ob bestimmte Symptome des Syndroms durch die hemizygote Deletion von FZD9 erklärt werden können, wurde zwei Jahre später das murine Fzd9-Gen charakterisiert. Eine Expressionsanalyse hat ergeben, dass Fzd9 in der Maus in vielen Geweben, wie Herz, Gehirn und skelettalem Muskel exprimiert wird (Wang et al., 1999). Um die physiologische Relevanz von Fzd9 zu analysieren, wurden unabhängig voneinander zwei Fzd9-defiziente Mausmodelle generiert und analysiert (Ranheim et al., 2005; Zhao et al., 2005). In beiden Studien entwickelten sich die Mäuse normal, waren fertil und zeigten rein äußerlich keine Auffälligkeiten. Während in einer Studie Unterschiede im Hippocampus und Lerndefekte in $Fzd9^{-/-}$ Mäusen diagnostiziert wurden (Zhao et al., 2005), konnte in der zweiten Studie ein Defekt in der Entwicklung von B-Zellen, sowie eine etwas verminderte Lebenserwartung diagnostiziert werden (Ranheim et al., 2005), allerdings keine Symptome, die Übereinstimmungen zum humanen Williams-Beuren-Syndrom zeigten.

Aufgrund der stark ansteigenden Expression von Fzd9 während der frühen Differenzierung von Osteoblasten, parallel zu etablierten Osteoblastenmarkergenen wie *Runx2, Bone Sialoprotein* oder *Osteocalcin* (Karsenty, 2008), wurde schon vor Beginn dieser Arbeit eine mögliche physiologisch relevante Funktion von Fzd9 für die Differenzierung oder Funktion von Osteoblasten vermutet. Bis heute existieren keine publizierten Studien, die einen der 10 bekannten Frizzled-Rezeptoren mit einer physiologischen Funktion im Knochenremodelling in Verbindung bringen. Die in dieser Arbeit gefundene Osteopenie in *Fzd9*-defizienten Mäusen, bedingt durch einen zellautonomen Defekt in Osteoblasten, gibt also den ersten Hinweis darauf, dass ein Rezeptor der Frizzled-Familie eine wichtige Rolle für die Knochenformation einnimmt. Die in dieser Arbeit analysierten $Fzd9^{-/-}$ Mäuse weisen ab einem Alter von 24 Wochen ein signifikant erniedrigtes Knochenvolumen auf, was durch einen Defekt in der Knochenformation erklärt werden konnte. Der hier identifizierte Phänotyp weist große Übereinstimmungen zu dem Knochenphänotyp Lrp5-defizienter Mäuse auf, in denen ebenfalls eine um ca. 35 % reduzierte Knochenmasse vorliegt, die auch hier durch eine erniedrigte Knochenformationsrate erklärt werden konnte (Kato et al., 2002). Somit lag die Vermutung nahe, dass es sich bei Fzd9 möglicherweise um einen Interaktionspartner von Lrp5 handelt und dass beide als Rezeptor und Co-Rezeptor die Signaltransduktion von Wnt-Liganden im Osteoblasten vermitteln. Diese Möglichkeit wurde jedoch durch die Entdeckung, dass Lrp5 die Knochenformation indirekt reguliert, unwahrscheinlich. Yadav et al. veröffentlichten im Jahr 2008, dass Lrp5 die Produktion von Serotonin im Duodenum negativ reguliert, und dass eine erhöhte Konzentration von Serotonin im Serum von Lrp5-/-Mäusen zu einer Inhibition von knochenbildenden Osteoblasten führt, was den Defekt in der Knochenformation erklären konnte (Yadav et al., 2008). Passend zu diesen Daten konnten ebenfalls erhöhte Serotoninspiegel in Patienten mit inaktivierenden LRP5-Mutationen gefunden werden (Yadav et al., 2008), sowie erniedrigte Serotoninspiegel in Patienten mit aktivierenden Mutationen im LRP5-Gen, die zu erhöhter Knochenmasse führen (Frost et al., 2010). Anders als bei $Lrp5^{-/-}$ Mäusen liegt in den hier analysierten $Fzd9^{-/-}$ Mäusen aber ein zellautonomer Osteoblastendefekt vor. Zudem konnten im Vergleich zu Wildtypkontrollen keine Unterschiede in der Serotonin-Konzentration im Serum von $Fzd9^{-/-}$ Mäusen gefunden werden (WT: 3,1 \pm 0,42 µg/mL; $Fzd9^{-/-}$: 3,2 \pm 0,63 µg/mL). Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass Fzd9 und Lrp5 die Knochenformation auf unterschiedliche Weise regulieren.

5.2 Fzd9 reguliert die Funktion und/oder Differenzierung von Osteoblasten unabhängig vom kanonischen Wnt-Signalweg

In dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Deletion von Fzd9 in Osteoblasten offenbar keinen Einfluss auf die Signaltransduktion des kanonischen, ß-Catenin-abhängigen, Signalwegs hat. Dies wurde unter anderem daran deutlich, dass bekannte Zielgene des kanonischen Wnt-Signalwegs, wie *Axin2*, *Apcdd1* oder aber *Tnfrsf11b* (Zirn et al., 2006; Yan et al., 2009; Glass et al., 2005) in ihrer Expression in *Fzd9*-defizienten Osteoblasten unbeeinflusst bleiben. Insbesondere die unveränderte Expression von *Tnfrsf11b* ist interessant, denn dieses Gen kodiert für Osteoprotegerin (Opg), welches in einem Mausmodell mit einer Osteoblasten-spezifischen Deletion von ß-Catenin, als Zielgen

des kanonischen Wnt-Signalwegs in Osteoblasten identifiziert werden konnte (Glass et al., 2005). In diesem Mausmodell wurde der entstehende Knochenmasseverlust, bedingt durch die Deletion von β -Catenin im Osteoblasten, überraschenderweise nicht durch einen Defekt in der Knochenformation erklärt, sondern durch eine erhöhte Knochenresorption. Dies wurde dadurch belegt, dass die Serumkonzentrationen des Osteoklasten-Inhibitors Opg in diesen Mäusen erniedrigt waren, was zu einer vermehrten Osteoklastenzahl und erhöhter Resorption führte. Da in $Fzd9^{-/-}$ Mäusen keine Veränderung in der Knochenresorption gefunden wurde und auch keine Änderung der Expression von Opg, ist es wahrscheinlich, dass Fzd9 im Osteoblasten keine entscheidende Bedeutung in der Signaltransduktion des kanonischen Wnt-Signalwegs hat. Weiter verstärkt wurde diese These dadurch, dass eine Deletion von Fzd9 in primären Osteoblasten keinen negativen Einfluss auf die Phosphorylierung von Lrp6 und die Stabilisierung von β -Catenin, nach einer Stimulation mit Wnt3a, hat. Somit sprechen alle erhaltenen Daten dafür, dass Fzd9 die Differenzierung oder Funktion von Osteoblasten unabhängig vom kanonischen Wnt-Signalweg reguliert.

5.3 Fzd9 reguliert die Expression von Chemokinen und Interferonabhängigen Genen im Osteoblasten

Während in den Fzd9-defizienten Osteoblasten keine signifikanten Veränderungen in der Expression von bekannten Markergenen der Osteoblastendifferenzierung (*Runx2, Ibsp, Bglap, Alpl*) und Zielgenen des kanonischen Wnt-Signalwegs gefunden wurden, gab es über 400 Gene, deren Expression in *Fzd9*-defizienten Osteoblasten um mehr als 50 % reduziert war. Bei der Analyse dieser Gene konnten im Wesentlichen zwei Gruppen von Genen identifiziert werden. Zum einen Chemokine der Ccl- oder Cxcl-Familie und zum anderen Gene, deren Expression bekanntermaßen durch Interferone induziert werden kann (*Oasl2, Isg15, Ifit1* usw.). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Expression dieser Gene ebenfalls *in vivo* in Femora von *Fzd9*^{-/-} Mäusen verringert war, was in möglichem Zusammenhang mit dem identifizierten Phänotyp dieser Mäuse steht.

Chemokine sind besonders für ihre Chemotaxis-induzierenden Eigenschaften bekannt, und es konnte bereits gezeigt werden, dass Osteoblasten funktionelle Chemokinrezeptoren exprimieren und dass insbesondere Ccl5 eine Migration von Osteoblasten *in vitro* auslöst (Yano et al., 2005). Demnach lag es nahe, dass möglicherweise die Rekrutierung mesenchymaler Osteoblasten-Vorläuferzellen in $Fzd9^{-/-}$ Mäusen durch verringerte Expression von Chemokinen gestört sein könnte, was die gefundene erniedrigte Anzahl an Osteoblasten zumindest partiell erklären würde. In einem, aus dieser Arbeit abgeleiteten Projekt, wurde der Knochenphänotyp von *Ccl5*-defizienten Mäusen analysiert (Daten nicht gezeigt), und es konnte gezeigt werden, dass diese einen ähnlichen Knochenmasseverlust wie $Fzd9^{-/-}$ Mäuse erleiden. Dies konnte durch eine verringerte Knochenformationsrate, aber auch eine gleichzeitig erhöhte Knochenresorption erklärt werden. Besonders auffällig war in diesem Mausmodell aber ein vergrößerter Anteil an trabekulärer Knochenoberfläche, der nicht mit Knochenbelegzellen oder Osteoblasten besetzt ist, was möglicherweise auf einen Defekt in der Rekrutierung dieser Zellen zurückgeht. Da diese Auffälligkeit nicht in $Fzd9^{-/-}$ Mäusen gefunden wurde, ist es jedoch unwahrscheinlich, dass dies der Grund für die verringerte Knochenformation in $Fzd9^{-/-}$ Mäusen ist.

In dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass zumindest die Chemokine Zielgene eines nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs in Osteoblasten sind, denn die Expression von Ccl2, Ccl5 und auch Cxcl5 wurde durch Stimulation mit dem nicht-kanonischen Liganden Wnt5a stark induziert, während eine Stimulation mit Wnt3a keinen Effekt hatte. Außerdem wurde durch eine Stimulation mit Wnt5a, nicht aber mit Wnt3a, eine Induktion des MAPK/ERK-Signalwegs induziert, welche in Fzd9-defizienten Osteoblasten verringert war. Da bereits gezeigt wurde, dass die Expression von Chemokinen wie Ccl2 in Osteoblasten über diesen Signalweg reguliert wird (Lin et al., 2004), liegt es nahe, dass die verringerte Expression von Chemokinen in Fzd9-defizienten Osteoblasten durch einen Defekt in diesem Signalweg vermittelt wird. Außerdem wurde bereits gezeigt, dass ein Defekt im MAPK/ERK-Signalweg zu einer gestörten Differenzierung von Osteoblasten in vitro führt, was in einer geringeren Mineralisation dieser Osteoblastenkulturen resultiert (Ge et al., 2007). Der gegenteilige Effekt konnte durch eine kontinuierliche Aktivierung dieses Signalwegs erzeugt werden (Ge et al., 2007), was insgesamt dafür spricht, dass eine gestörte Aktivierung dieses Signalwegs in Fzd9-defizienten Osteoblastenkulturen zu einer geringeren Expression von Chemokinen und möglicherweise auch zu einer geringeren Mineralisation dieser Kulturen führt.

Neben der verringerten Expression von Chemokinen war insbesondere die verringerte Expression sogenannter Interferon-stimulierter-Gene (ISGs) in *Fzd9*-defizienten Osteoblasten auffällig. Da bislang relativ wenig über die Expression und Funktion dieser Gene in Osteoblasten bekannt ist, wurde zunächst überprüft, ob deren Expression auch in Osteoblasten tatsächlich durch die Stimulation mit Interferonen induziert werden kann. Während durch eine Stimulation mit TypI-Interferonen (Ifn α und Ifn β) eine starke Induktion (100-200fach) der Genexpression von *Oasl2, Isg15 und Ifit1* festgestellt werden konnte, wurden diese Gene nicht durch Interferon γ (TypII-Interferon) induziert. Dies ist besonders

vor dem Hintergrund interessant, dass in einer Studie gezeigt werden konnte, dass eine Administration von Ifn γ einen Knochenmasseverlust in Ratten hervorruft, während Ifn α keinen negativen Einfluss hat. Es konnte außerdem bereits gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Ifn α sogar bei Patienten mit chronischer Hepatitis, die an Knochenmasseverlust leiden, zu einer Erhöhung der Knochenmasse führt (Hofman et al., 2008). Es wäre also möglich, dass einige der Gene, deren Expression in Osteoblasten durch TypI-Interferone induziert wird, einen positiven Effekt auf die Funktion oder Differenzierung von Osteoblasten haben.

Die Tatsache, dass Fzd9-defiziente Osteoblasten signifikant geringer auf eine Stimulation mit Ifn α und Ifn β reagieren, bedeutet, dass Fzd9 möglicherweise eine Rolle in einem Signalweg spielt, der für die Interferon-vermittelte Signaltransduktion eine Rolle spielt. Da der JAK/STAT-Signalweg der am besten untersuchte Signalweg ist, der durch eine Bindung von Interferonen an deren Rezeptoren aktiviert wird (Schindler & Plumlee, 2008), lag nahe, dass die Aktivierung dieses Signalwegs in $F_z d9$ -defizienten Osteoblasten gestört ist. Die Wichtigkeit dieses Signalwegs für die Knochenformation wurde bereits daran deutlich, dass eine Osteoblasten-spezifische Inaktivierung von Stat3 zu einem Knochenmasseverlust durch einen Defekt in der Knochenformation führt (Itoh et al., 2006), was in großer Übereinstimmung mit dem Phänotyp von $Fzd9^{-/-}$ Mäusen steht. Offenbar ist dieser Signalweg aber in Fzd9-defizienten Osteoblasten zumindest in vitro nicht gestört, denn nach einer Stimulation mit Ifn β konnten keine Unterschiede in der Phosphorylierung von Stat-Proteinen gefunden werden. Dies bedeutet, dass der Defekt der Genexpression der untersuchten Gene entweder nicht über diesen Signalweg vermittelt wird, oder aber die hier untersuchten spezifischen Phosphorylierungsstellen in Osteoblasten nicht für die funktionierende Signaltransduktion entscheidend sind.

5.4 Die Rolle der Protein ISGylierung in Osteoblasten

Da *Isg15* zu den Genen mit der stärksten Repression in *Fzd9*-defizienten Osteoblasten gehört und durch eine Kooperation mit Prof. Knobeloch von der Uniklinik Freiburg die Möglichkeit bestand, *Isg15*-defiziente Mäuse zu analysieren, wurde die Funktion von Isg15 in WT und *Fzd9*-defizienten Osteoblasten genauer untersucht. *Isg15* kodiert für ein 15 kD großes Protein, das über einen Ubiquitin-ähnlichen Mechanismus posttranslational an Proteine ligiert wird (Protein-ISGylierung). Isg15 wurde als eines der ersten Gene identifiziert, deren Expression durch Interferone induziert wird, weshalb man annahm, dass

Isg15 eine antivirale Funktion im Organismus einnimmt (Blomstrom et al., 1986; Reich et al., 1987). Nach der Entdeckung von Isg15 vergingen fast 20 Jahre, bis die ersten ISGylierten Proteine identifiziert werden konnten (Malakhoy et al., 2003; Giannakopoulos et al., 2005), doch wie genau die ISGylierung die Funktion oder Stabilität von Proteinen beeinflusst ist bis heute unklar (Pitha-Rowe & Pitha, 2007). Es gilt aber als wahrscheinlich, dass anders als bei der Ubiquitinierung, Proteine durch eine ISGylierung nicht primär zur Degradation markiert werden, sondern z.B. eher ihre Funktion oder Bindungseigenschaften moduliert werden (Sadler & Williams, 2008). So wurde lange Zeit diskutiert, dass die ISGylierung eine wichtige Rolle im JAK/STAT-Signalweg spielt, was möglicherweise mit der in Fzd9-defizienten Osteoblasten schwächeren Reaktion auf Interferone in Verbindung gebracht werden könnte. Die Analyse von *Isg15*-defizienten Mäusen zeigte aber, dass diese Theorie offenbar nicht richtig ist (Osiak et al., 2005).

Eine in dieser Arbeit durchgeführte Expressionsanalyse in unterschiedlichen Mausgeweben zeigte, dass Isg15 in allen untersuchten Geweben, wie auch im Schädeldach, Femur und Wirbelkörper exprimiert wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Expression von Isg15, wie auch die Expression vieler weiterer ISGs, während der frühen Phase der Osteoblastendifferenzierung stark induziert wird. Diese Induktion erfolgt dabei parallel zu der Induktion von Fzd9, was ein weiteres Zeichen für eine regulatorische Funktion von Fzd9 für die Expression dieser Gene sein könnte. Mittels Westernblot konnte in dieser Arbeit außerdem gezeigt werden, dass viele bislang unidentifizierte, höhermolekulare Proteine, im Verlauf der Osteoblastendifferenzierung ISGyliert werden und dass Fzd9-defiziente Osteoblasten ein verändertes Bandenmuster ISGylierter Proteine aufweisen. Dies spricht möglicherweise dafür, dass ein Defekt in der ISGylierung in Fzd9-defizienten Osteoblasten Phänotyp in diesen Mäusen in Verbindung steht.

Um die physiologische Funktion von Isg15 im Knochenremodelling zu analysieren, wurden *Isg15*-defiziente Mäuse knochenhistologisch analysiert. *Isg15^{-/-}* Mäuse weisen keinen spontanen Phänotyp außerhalb des Knochens auf, zeigen aber eine erhöhte Anfälligkeit für die Infektion mit unterschiedlichen Viren, wie Sindbis Virus, Herpes Simplex Virus oder Influenza (Lenschow et al., 2005; Osiak et al., 2005).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass $Isg15^{-/-}$ Mäuse einen vergleichbaren Phänotyp aufweisen wie $Fzd9^{-/-}$ Mäuse, nämlich einen etwa 30%-ige Reduktion des Knochenvolumens, bedingt durch eine erniedrigte Knochenformationsrate. Der in dieser Arbeit entdeckte Knochenmasseverlust in $Isg15^{-/-}$ Mäusen ist somit der erste spontane Phänotyp in diesen Tieren. Dass auch $Isg15^{-/-}$ Mäuse, wie $Fzd9^{-/-}$ Mäuse, im Alter von 6 Wochen noch keinen Knochenmasservelust erleiden, ist ein weiteres Zeichen dafür, dass Fzd9 möglicherweise über einen gemeinsamen und Isg15 Mechanismus die Knochenformation regulieren. Um diese These auch in vitro zu überprüfen, wurde untersucht, ob der Mineralisationsdefekt der Fzd9-defizienten Osteoblastenkulturen durch eine Überexpression von Isg15 aufgehoben werden kann. Durch eine kontinuierliche retrovirale Überexpression von Isg15 in Fzd9-defizienten Osteoblasten konnte in dieser Arbeit eine partielle Verbesserung der Mineralisationsfähigkeit dieser Zellen gezeigt werden, was dafür spricht, dass Fzd9 zumindest in vitro, über einen bislang unidentifizierten Mechanismus, die ISGylierung von Proteinen steuert und somit möglicherweise auch die Knochenformation.

5.5 Erniedrigte Knochendichte in *Fzd9*^{+/-} Mäusen und Williams-Beuren-Syndrom (WBS) Patienten

Da *FZD9* eines der Gene ist, deren hemizygote Deletion zum Williams-Beuren-Syndrom (WBS) führt, wurden in dieser Arbeit auch $Fzd9^{+/-}$ Mäuse knochenhistologisch untersucht. In den 70 Wochen alten untersuchten $Fzd9^{+/-}$ Mäusen konnte ebenfalls ein signifikant erniedrigtes Knochenvolumen festgestellt werden, dass wie bei $Fzd9^{-/-}$ Mäusen durch eine erniedrigte Knochenformationsrate erklärt werden konnte.

Um nun zu untersuchen, ob die hemizygote Deletion von FZD9 auch im Menschen zu einem Knochenmasseverlust führt, wurde in Kooperation mit Dr. Pober aus Boston und Prof. Jakob aus Würzburg bei 15 WBS Patienten, mittels DXA-Scanning, die Knochenmasse in drei Skelettelementen untersucht. Laut einer Definition der WHO (World Health Organisation) liegt bei einem T-Score von -1 bis -2.5 eine Osteopenie vor und bei einem T-Score unterhalb von -2.5 eine Osteoporose (Kanis et al., 1994). Während bei einem mittleren T-Score von kleiner -1 bei fast allen Patienten eine Osteopenie diagnostiziert werden konnte, wurde bei vier Patienten sogar eine Osteoporose diagnostiziert, und eine Patientin erlitt aufgrund ihrer geringen Knochenmasse bereits eine Reihe von Wirbelkörperfrakturen. Bislang gibt es keine Berichte über Mutationen im FZD9-Gen, die im Zusammenhang mit Knochenmasseverlustsyndromen stehen, doch die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen deuten darauf hin, dass eine hemizygote Deletion von FZD9 auch beim Menschen zu einem Knochenmasseverlust führt. Die Konsequenz daraus ist, dass bei WBS-Patienten möglicherweise standardmäßig eine Knochendichtemessung durchgeführt werden sollte und dann je nach Befund eventuell eine anti-osteoporotische Therapie in Betracht gezogen werden sollte. Möglicherweise sollte auch verstärkt nach Mutationen im FZD9-Gen bei Patienten mit chronischen Knochenmasseverlustsyndromen gesucht werden, um die Bedeutung von FZD9 für die Knochenformation im Menschen weiter zu untersuchen.

5.6 Inhibition der Differenzierung von Osteoklasten durch Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs

In unterschiedlichen Studien wurde berichtet, dass der Wnt-Signalweg die Differenzierung von Osteoklasten hauptsächlich indirekt durch die Regulation von Rankl (Receptor activator of NFkB ligand) und Opg (Osteoprotegerin) in Osteoblasten oder Stromazellen beeinflusst (Glass et al., 2005; Spencer et al., 2005). Es wurde außerdem kürzlich in unabhängigen Studien entdeckt, dass eine gesteigerte Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs durch Injektion von LiCl oder Expression von Wnt3a im Knochenmark bzw. im Knochen zu einer Verhinderung osteolytischer Läsionen in Modellen des multiplen Myeloms führen kann, was durch Inhibierung der Osteoklastogenese begründet wird (Edwards et al., 2008: Qiang et al., 2008). Außerdem wurde publiziert, dass die Antagonisierung des Wnt-Inhibitors DKK1 (Dickkopf 1) osteolytische Läsionen bei Menschen mit multiplem Myelom verhindern kann (Yaccoby et al., 2007; Pinzone et al., 2009), was ein weiteres Zeichen dafür ist, dass eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs zu einer Inhibition der Knochenresorption durch Osteoklasten führt. Allerdings wird auch in diesen Studien diskutiert, dass dieser Effekt nicht direkt vermittelt wird, sondern möglicherweise über eine Änderung des Opg/Rankl Expressionsverhältnisses in Osteoblasten oder Stromazellen. Erst im Jahr 2009 demonstrierte eine Forschergruppe zum ersten Mal einen direkten negativen Effekt des kanonischem Wnt-Signalwegs auf die Differenzierung von Osteoklasten in vitro (Modarresi et al., 2009). Diese Entdeckungen stimmen mit den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen überein, denn es wurde festgestellt, dass die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs durch Wnt3a, Wnt7a oder LiCl Dosis-abhängigen Inhibition zu einer der Osteoklastendifferenzierung aus Knochenmarkszellen führt. Dagegen führt die Stimulation mit einem nicht-kanonischen Wnt-Liganden (Wnt5a) zu einer verstärkten Differenzierung von Osteoklasten, was an der signifikant erhöhten Anzahl TRAP-positiver Osteoklasten, im Vergleich zur Kontrolle, deutlich wird.

In dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass der Effekt von Wnt3a und LiCl wahrscheinlich nicht primär durch eine veränderte Rankl-Expression in den Stromazellen der Kulturen erklärt werden kann, denn auch dauerhaft hohe Konzentrationen an RANKL in den Kulturen, führten nur zu einer geringen Abschwächung des negativen Effekts von Wnt3a auf die Generierung TRAP-positiver Osteoklasten. Außerdem konnte ebenfalls ein

negativer Effekt von LiCl und Wnt3a auf die Generierung TRAP-positiver Osteoklasten aus RAW264.7 Zellen (Monozyten/Macrophagenzellinie) demonstriert werden, wobei in diesem Fall ein indirekter Effekt über die Regulation der Rankl- oder Opg-Expression einer zweiten Zellart ausgeschlossen ist. Allerdings waren für diesen Effekt höhere Konzentrationen an Wnt3a nötig, was entweder in dem Unterschied zwischen der Zelllinie RAW264.7 und primären Knochenmarkskulturen begründet ist oder aber damit zusammenhängt, dass in den Knochenmarkszellkulturen sowohl ein indirekter Effekt als auch ein direkter Effekt zusammenwirken, weshalb in diesem Fall geringere Konzentrationen notwendig sind.

5.7 Fzd-Rezeptoren in der Osteoklastendifferenzierung

Es wurde kürzlich gezeigt, dass Fzd-Rezeptoren in Osteoklasten exprimiert werden, die aus RAW264.7 Zellen oder Knochenmarkszellen von Patienten mit multiplen Myelom generiert wurden (Qiang et al., 2009). Allerdings gibt es bis zu diesem Zeitpunkt noch keine Untersuchungen, die eine physiologische Relevanz dieser Serpentin-Rezeptoren für die Osteoklastendifferenzierung zeigen. In dieser Arbeit wurde mittels Affymetrix-Genchipanalyse die Expression aller 10 Fzd-Rezeptoren während der Differenzierung muriner Knochenmarkszellen zu Osteoklasten untersucht. Anhand der Expression bekannter Osteoklastenmarker wie *Calcr (Calcitonin receptor)* oder *Ctsk (Cathepsin K)*, deren Expression im untersuchten Zeitraum stark anstieg, konnte gezeigt werden, dass die Generierung von Osteoklasten aus Knochenmarkszellen erfolgreich verlief. Die Expressionsanalyse aller Fzd-Rezeptoren zeigte, dass insbesondere die Expression von *Fzd8* sehr stark (30-fach) während der frühen Phase der Differenzierung induziert wird, was eine mögliche funktionelle Relevanz von Fzd8 für die Differenzierung von Osteoklasten impliziert.

Im Menschen kodiert FZD8 ein 694 Aminosäuren langes Protein, und eine Expression von FZD8 mRNA konnte bereits in Niere, Gehirn, Herz, Pankreas und skelettalem Muskel gezeigt werden (Saitoh et al., 2001). Es gibt bislang keine Untersuchungen, die Mutationen im FZD8-Gen mit pathogenen Mechanismen oder Krankheitsbildern in Verbindung bringen und auch ein von der Firma Deltagen generiertes Fzd8-defizientes Mausmodell zeigt, laut Angaben der Firma, keine Auffälligkeiten. In einer Expressionsanalyse konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Fzd8 im Vergleich zu den anderen Fzd-Rezeptoren sehr stark in Knochenzellen exprimiert wird und immunhistologische Untersuchungen an humanen Knochenbiopsien zeigten ebenfalls eine Expression von FZD8 in humanen Osteoblasten und Osteoklasten.

Die hochkonservierte extrazelluläre Cystein-reiche-Domäne (CRD) der Frizzled-Rezeptoren gilt als die Bindungsdomäne für Wnt-Liganden (Dann et al., 2001). In dieser Arbeit wurde herausgefunden, dass der anti-osteoklastogene Effekt von Wnt3a durch eine gleichzeitige Stimulation mit einem rekombinanten Fzd8-Protein, dass nur die extrazelluläre Cysteinreiche-Domäne enthält (Fzd8-CRD), aufgehoben wird. Mittels Westernblot konnte außerdem gezeigt werden, dass die Stimulation von Osteoklastenvorläuferzellen mit Wnt3a zu einer erhöhten Lrp6-Phosphorylierung an Ser-1490 und außerdem zu einer verringerten Phosphorylierung von ß-Catenin an Ser33/35Thr41 führt, was insgesamt eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs begünstigt. Bei gleichzeitiger Anwesenheit der Fzd8-CRD kommt es nicht zu diesen Veränderungen in der Phosphorylierung von Lrp6 und ß-Catenin, was impliziert, dass durch die Bindung von Wnt3a an die lösliche Fzd8-CRD die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs nicht mehr möglich ist. Ein identischer Effekt konnte durch gleichzeitige Stimulation von Osteoklastenvorläuferzellen mit Wnt3a und dem bekannten Wnt-Inhibitor Dkk1 gezeigt werden, dessen gesteigerte Expression im Zusammenhang mit osteolytischen Läsionen bei Prostatakrebsmetastasierung oder multiplem Myelom diskutiert wird (Schulze et al., 2010; Pinzone et al., 2009). Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen lassen vermuten, dass möglicherweise auch in vivo der Effekt kanonischer Wnt-Liganden, wie Wnt3a, durch eine Bindung an den Membranständigen Serpentin-Rezeptor Fzd8 vermittelt wird.

5.8 Erhöhte Knochenresorption in Fzd8-defizienten Mäusen

Um die physiologische Rolle von Fzd8 im Knochenremodelling zu analysieren, wurden in dieser Arbeit Fzd8-defiziente Mäuse knochenhistologisch analysiert. Dieses Mausmodell wurde von der Firma Deltagen entwickelt und analysiert. Laut Analyse von Deltagen sollen $Fzd8^{-/-}$ Mäuse keinen spontanen Phänotyp aufweisen, allerdings wurde die Knochenqualität dieser Mäuse bislang noch nicht genauer analysiert. Passend zu den in dieser Arbeit gemachten *in vitro* Beobachtungen weisen $Fzd8^{-/-}$ Mäuse im Alter von 24 Wochen eine 30% geringere trabekuläre Knochenmasse auf und haben eine ebenfalls signifikant erniedrigte Kortikalisdicke. Anders als in den zuvor analysierten $Fzd9^{-/-}$ Mäusen ist die Knochenformation in diesen Mäusen allerdings nicht beeinträchtigt, sondern eine fast verdoppelte Anzahl an Osteoklasten führt zu einer erhöhten Knochenresorption, was sich auch durch erhöhte Konzentrationen an TypI-Kollagen-Abbauprodukten im Serum dieser Mäuse bemerkbar macht. Somit ist es denkbar, dass in diesen Mäusen tatsächlich ein Fzd8-defiziert ist, der die Differenzierung von Osteoklasten

normalerweise reguliert. Durch ein Fehlen des Membran-ständigen Fzd8-Rezeptors auf Osteoklastenvorläuferzellen können also möglicherweise Wnt-Liganden einen inhibitorischen Effekt, durch Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs, nicht mehr vermitteln.

Um auszuschließen, dass die gesteigerte Knochenresorption in diesen Mäusen durch ein verändertes Opg/Rankl Verhältnis hervorgerufen wird, wie es für Mäuse mit einer Osteoblasten-spezifischen Deletion von β -Catenin gezeigt wurde (Glass et al., 2005), wurden die Serumkonzentrationen dieser Proteine in $Fzd8^{-/-}$ Mäusen bestimmt. Die Konzentrationen an Opg und Rankl in diesen Mäusen waren jedoch im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen nicht verändert. Das bedeutet, dass die Deletion von Fzd8 offenbar keine Auswirkungen auf die kanonische Wnt-Signaltransduktion in Osteoblasten hat und somit auch keinen Einfluss auf die Expression von Opg und Rankl. Durch diese Beobachtungen konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal ein Opg/Rankl-unabhängiger Effekt einer veränderten Wnt-Signaltransduktion auf die Knochenresorption gezeigt werden.

5.9 Ausblick

Etwa 25 % aller derzeit verfügbaren Medikamente vermitteln ihre Wirkung im Organismus über die Bindung an die extrazelluläre Domäne eines Serpentin-Rezeptors, welche somit die Hauptgruppe aller Zielproteine für Medikamente darstellen (Wise et al., 2002; Overington et al., 2006). Sollte es gelingen, weitere Anzeichen dafür zu finden, dass der Serpentin-Rezeptor FZD9 ein Regulator der Knochenformation im Menschen ist, wäre es denkbar, einen FZD9-spezifischen Agonisten zu entwickeln, der einen möglichen osteoanabolen Effekt im Organismus bewirken könnte. Vor diesem Hintergrund ist es besonders wichtig, dass Fzd9 in Osteoblasten offenbar keine Rolle in der kanonischen Wnt-Signalübertragung spielt, denn es gibt Anzeichen dafür, dass eine gesteigerte Aktivierung dieses Signalwegs zu Osteosarkomen führen kann (Kansara et al., 2009). Um in einem Mausmodell zu überprüfen, ob eine erhöhte Expression von Fzd9 in Osteoblasten tatsächlich einen osteoanabolen Effekt hat, wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits ein DNA-Konstrukt generiert, dass unter Verwendung eines 2.3kb langen Fragments des Col1a1-Promoters eine spezifische Überexpression von Fzd9 in Osteoblasten ermöglicht (Dacquin et al., 2002). Sollte es damit in Zukunft gelingen, Collal-Fzd9-Mäuse zu generieren, die eine erhöhte Knochenmasse haben, wäre das ein Anzeichen dafür, dass eine Stimulation von Fzd9 tatsächlich einen osteoanabolen Effekt in vivo bewirken könnte. Möglicherweise sollte auch die Identifizierung des Wnt-Liganden angestrebt werden, der durch Aktivierung der Fzd9abhängigen Signalkaskade einen positiven Effekt auf die Knochenformation vermittelt, da hiervon ausgehend nach Leitstrukturen für einen Fzd9-spezifischen Agonisten gesucht werden könnte.

Die Identifizierung von Fzd8 als negativer Regulator der Knochenresorption in der Maus, läßt die Frage offen, ob FZD8 eine ähnliche Rolle im humanen Organismus spielt. Um diese Frage zu beantworten, könnte man Patienten mit pathologisch erhöhter Knochenresorption durch SNP-Analysen auf Polymorphismen im *FZD8*-Gen untersuchen oder die Expression von *FZD8* immunhistologisch an Knochenbiopsien analysieren. Auch in diesem Fall wäre es interessant, den physiologischen Liganden von FZD8 zu identifizieren, da auch dieser durch eine Aktivierung von FZD8 zur Erhöhung der Knochenmasse führen könnte, allerdings in diesem Fall durch eine Inhibition der Knochenresorption.

Die Tatsache, dass die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs zu einer Inhibition der Osteoklastendifferenzierung *in vitro* führt, läßt zudem die Frage offen, ob auch *in vivo* die Knochenresorption durch den kanonischen Wnt-Signalweg negativ reguliert wird. Eine Möglichkeit, diese Frage zu beantworten, wäre die Generierung von Mäusen mit einer Osteoklasten-spezifischen Deletion von β -Catenin. Die Verpaarung von Mäusen, die eine Cre-Rekombinase spezifisch in Osteoklastenvorläuferzellen exprimieren (*LysM-Cre*) (Clausen et al., 1999) mit Mäusen, in denen das β -*Catenin*-Gen von loxP-Stellen flankiert ist (Brault et al., 2001), wurde bereits gestartet und sollte zu einer Deletion von β -Catenin in Osteoklasten führen. Wenn es in diesen Mäusen zu einer erhöhten Knochenresorption und somit zu einem Knochenmasseverlust käme, wäre dies ein erster Hinweis darauf, dass der kanonische Wnt-Signalweg in Osteoklastenvorläuferzellen eine inhibitorische Funktion auf die Differenzierung dieser Zellen ausübt.

6 Zusammenfassung

LRP5 ist ein Co-Rezeptor für Wnt-Liganden, die bei zusätzlicher Bindung an Rezeptoren der Frizzled (Fzd)-Familie eine Aktivierung des intrazellulären Signalweges bewirken. Bislang wurde jedoch keines der 10 Fzd-Proteine mit Erkrankungen des Skelettsystems in Verbindung gebracht, obwohl diese als Serpentin-Rezeptoren ein vielversprechendes Target für eine osteoanabole Therapie darstellen könnten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von *Fzd9* während der frühen Phase der Osteoblastendifferenzierung, parallel zu bekannten Osteoblastenmarkern, induziert wird. Während 6 Wochen alte *Fzd9*^{-/-} Mäuse eine normale Knochenmasse aufweisen, zeigte die Analyse von 24 und 52 Wochen alten Tieren, dass diese ein um etwa 35 % erniedrigtes trabekuläres Knochenvolumen haben. Durch dynamische Histomorphometrie konnte diese Osteopenie auf eine um 50 % reduzierte Knochenformationsrate zurückgeführt werden, während die Knochenresorption nicht beeinflusst ist.

Eine verminderte Proliferationsrate und verzögerte Mineralisierung deuten auf einen zellautonomen Defekt *Fzd9*-defizienter Osteoblasten hin, der jedoch nicht durch eine verminderte Expression etablierter Osteoblastenmarker wie *Runx2, Osteocalcin* oder *Bone Sialoprotein* erklärt werden kann. Sowohl durch Westernblotanalysen als auch mittels quantitativer RT-PCR konnte auf Protein- und mRNA-Ebene gezeigt werden, dass *Fzd9*, zumindest im Osteoblasten, keine entscheidende Rolle für die kanonische Wnt-Signaltransduktion spielt und dass somit auch die nicht-kanonische Wnt-Signaltransduktion eine wichtige Rolle für die Knochenformation spielt.

Zudem konnten mehr als 400 Gene identifiziert werden, deren Expression in Abwesenheit von *Fzd9* um mehr als das zweifache reduziert war. Dabei waren hauptsächlich zwei Gruppen von Genen betroffen, nämlich Chemokine der Ccl- oder Cxcl-Familie sowie Gene, deren Expression bekanntermaßen durch Interferone induziert wird. Während die Chemokine als Zielgene eines durch Wnt5a induzierbaren Signalwegs identifiziert werden konnten, wurde die Expression der Interferon-abhängigen Gene in primären Osteoblasten spezifisch durch TypI-Interferone (Ifn α und Ifn β) induziert, wobei dieser Effekt in *Fzd9*defizienten Osteoblasten signifikant erniedrigt war. Es konnte in dieser Arbeit außerdem herausgefunden werden, dass in Osteoblasten während der Differenzierung viele, bislang unidentifizierte Proteine mit Isg15 modifiziert werden und dass die ISGylierung einiger dieser Proteine in *Fzd9*-defizienten Osteoblasten offensichtlich gestört ist.

Zur Untersuchung der physiologischen Bedeutung der Protein-ISGylierung für die Knochenformation, wurde ein *Isg15*-defizientes Mausmodell Knochen-histologisch

analysiert und es konnte ein vergleichbarer Phänotyp wie in $Fzd9^{-/-}$ Mäusen identifiziert werden. Ein um 30 % erniedrigtes trabekuläres Knochenvolumen im Alter von 24 Wochen, sowie die signifikant verminderte biomechanische Stabilität der Röhrenknochen und Wirbelkörper, konnte mit einer erniedrigten Knochenformationsrate erklärt werden. Durch retrovirale Überexpression von *Isg15* in *Fzd9*-defizienten Osteoblasten konnte außerdem eine partielle Korrektur des Mineralisationsdefektes erziehlt werden.

Ein Indiz dafür, dass FZD9 auch beim Menschen eine wichtige Rolle für die Knochenformation einnimmt, konnte durch die Analyse der Knochendichte von Williams-Beuren-Syndrom (WBS) Patienten erlangt werden. Bei dieser Erkrankung kommt es zur spontanen hemizygoten Deletion von etwa 20 Genen auf Chromosom 7, wobei eines dieser Gene *FZD9* ist. Die vorausgehende Analyse von $Fzd9^{+/-}$ Mäusen ergab, dass auch die hemizygote Deletion von Fzd9 zu einem signifikanten Knochenmasseverlust führt. In einer anschließenden Studie konnte mittels *DXA-Scanning* die Knochendichte von 15 WBS-Patienten in drei unterschiedlichen skelettalen Regionen bestimmt werden, und es stellte sich heraus, dass bei einem durchschnittlichen *T-Score* unterhalb -1 laut WHO-Definition fast alle Patienten an einer Osteopenie oder Osteoporose litten.

Außerdem wurde in dieser Arbeit der Effekt des kanonischen Wnt-Signalwegs auf die Differenzierung von Osteoklasten aus Knochenmarkszellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die dauerhafte Stimulation des kanonischen Wnt-Signalwegs zu einer Unterdrückung der Osteoklastendifferenzierung führt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die insbesondere Expression von Fzd8 während der Differenzierung von Knochenmarkszellen zu Osteoklasten stark induziert wird. Der negative Effekt von Wnt3a auf die Osteoklastendifferenzierung konnte durch gleichzeitige Stimulation mit einer löslichen Fzd8-Rezeptorbindungsdomäne aufgehoben werden, was eine Bindung von Wnt3a an Fzd8 vermuten läßt. Die knochenhistologische Analyse von $Fzd8^{-/-}$ Mäusen zeigte, dass diese im Alter von 24 Wochen eine um 30 % erniedrigte Knochenmasse aufweisen. Diese Osteopenie konnte durch eine gesteigerte Knochenresorption erklärt werden, die nicht durch ein verändertes Opg/Rankl Verhältnis im Serum dieser Tiere hervorgerufen wird.

7 Summary

Lrp5 serves as a co-receptor for the binding of Wnt ligands to receptors of the Frizzled (Fzd) family. However, until now it is not known whether one of the 10 known *Fzd* proteins is relevant for bone remodelling or plays a role in the pathology of bone diseases. This is a major gap because FZD-proteins are serpentine receptors, thus belonging to a major class of target proteins for currently available drugs, and therefore they are interesting targets to develop an osteoanabolic therapy.

This work demonstrates that expression of Fzd9 is induced upon primary osteoblast differentiation together with known markers of osteoblast differentiation. The analysis of the skeletal phenotype of $Fzd9^{-/-}$ mice revealed no difference in trabecular bone volume at the age of 6 weeks, but at the age of 24 and 52 weeks, $Fzd9^{-/-}$ mice displayed a 35 % reduction of the trabecular bone volume. By performing dynamic histomorphometry this phenotype could be explained by a 50 % reduction of the bone formation rate, while bone resorption was not affected.

A decreased proliferation rate and a delayed matrix mineralization demonstrated that Fzd9deficient primary osteoblasts display a cell autonomous defect that could not be explained by decreased expression of well-established osteoblast differentiation markers like *Runx2*, *Osteocalcin* or *Bone Sialoprotein*. In addition, the molecular analysis of *Fzd9*-deficient osteoblasts by Western Blotting or quantitative real time PCR did not reveal impaired canonical Wnt-signaling which demonstrated that non-canonical Wnt-signaling may also play an important role in the bone remodelling process.

Moreover, we observed reduced expression of specific chemokines of the Ccl or Cxcl family and interferon-induced genes in *Fzd9*-deficient osteoblasts. While the chemokines were identified as target genes of a non-canonical Wnt-Ligand (Wnt5a), the expression of the other genes was induced specifically by typeI-Interferons (Ifn α and Ifn β) in primary osteoblasts and most importantly this induction of gene expression was significantly less pronounced in *Fzd9*-deficient cells.

Western Blot analysis using an Isg15-specific antibody revealed an increase of free Isg15 and of yet unidentified ISGylated substrates during the differentiation process. Since this protein ISGylation was reduced in *Fzd9*-deficient osteoblasts, the physiological role of Isg15 was analyzed. Using non-decalcified histology and μ CT-imaging of the spine, a 30 % reduction of the trabecular bone volume was observed. Likewise, microcompression testing of the vertebral bodies revealed reduced biomechanical stability, and the same was observed

in three-point-bending assays of $Isg15^{-/-}$ femora. As it was observed in $Fzd9^{-/-}$ mice, this phenotype is caused by a reduced bone formation rate, while bone resorption is unaffected. Importantly, retroviral overexpression of Isg15 in Fzd9-deficient osteoblasts led to a partial rescue of the mineralization defect in these cells which means that the ubiquitin-like modifier Isg15 probably acts as one potential downstream mediator of Fzd9 in the control of bone formation.

Since *FZD9* is located within the chrosomome 7q11.23 region, whose hemizygous deletion causes Williams-Beuren-syndrome (WBS), heterozygous $Fzd9^{+/-}$ mice were analyzed and here the same low bone mass phenotype as in $Fzd9^{-/-}$ littermates was observed. Most importantly however, an analysis of 15 individuals with WBS between 30 and 50 years of age by dual Xray energy absorptiometry revealed an average T-score below -1.0, with a manifest osteoporosis being diagnosed in 4 individuals.

Since it is yet not clear, whether alterations in Wnt-signaling have osteoblast-independent effects on the function or differentiation of osteoclasts, the effect of an activation of canonical Wnt-signaling on osteoclastogenesis was studied. It is shown here that activation of canonical Wnt-signaling suppresses osteoclast differentiation from bone marrow cells and also from Raw264.7 cells *in vitro*. Using a genome-wide expression analysis during the course of osteoclast differentiation from bone marrow cells, Frizzled-8 (Fzd8) was identified as a potential candidate receptor, regulating Wnt-signaling in osteoclasts. Since the negative influence of Wnt3a on osteoclast differentiation was fully abrogated in the presence of the Fzd8-Cysteine-rich-Domain (CRD), the skeletal phenotype of Fzd8-deficient mice was analyzed. $Fzd8^{-/-}$ mice display no differences in bone volume at the age of 6 weeks, but a 30% decrease of the trabecular bone volume in $Fzd8^{-/-}$ and also in $Fzd8^{+/-}$ mice was observed at 24 weeks of age. The observed osteopenia is explained by an increase in bone resorption which occurs despite normal levels of Opg and Rankl in the serum of these mice.

8 Literatur

Angers S. & Moon R. T. (2009). Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10:468-477 doi:10.1038/nrm2717

Barrett E.J. & Barrett, P. (2005): The parathyroid glands and Vitamin D. In: Boron, W. F., Boulpaep, E. L. (Hrsg.): *Medical physiology*, 2. Auflage. Saunders-Verlag.

Bhanot P. et al. (1996). A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature*. 382:225-230.

Blomstrom D.C., Fahey D., Kutny R., Korant B.D. und Knight E. Jr. (1986). Molecular characterization of the interferon-induced 15-kDa protein. Molecular cloning nucleotide and amino acid sequence. *J. Biol. Chem.*, 261:8811–8816.

Boyden L.M., et al. (2002). High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N. Engl. J. Med.*, 346:1513-1521.

Boyle W.J., Simonet W.S., Lacey D.L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423:337-342.

Brault V., et al. (2001). Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development* 128:1253-1264.

Cherian P.P. et al. (2005). Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: A novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol. Biol. Cell*, 16:3100-3106.

Clausen B.E., Burkhardt C., Reith W., Renkawitz R., Forster I. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res.*, 8:265-277.

Cohen, M.M. Jr. (2006). The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am. J. Med. Genet. A.*, 140:2646-2706.

Dale R.M., Sisson B.E. & Topczewski J. (2009). The Emerging Role of Wnt/PCP Signaling in Organ Formation. *Zebrafish*, 6:9-14.

Dacquin R., Starbuck M., Schinke T., Karsenty G. (2002). Mouse alpha-1(I)-collagen promoter is the best known promoter to drive efficient Cre recombinase expression in osteoblast. *Dev. Dyn.*, 224:245–251.

Dann C.E., et al. (2001). Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature*, 412:86-90.

Eckerskorn C., Mewes W., Goretzki H., Lottspeich F. (1988). A new siliconized-glass fiber as support for protein-chemical analysis of electroblotted proteins. *Eur. J. Biochem.*, 176:509-519.

Edwards C.M. et al. (2008). Increasing Wnt signaling in the bone marrow microenvironment inhibits the development of myeloma bone disease and reduces tumor burden in bone in vivo. *Blood*, 111:2833-2842.

Frattini A. et al. (2000). Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nat. Genet.*, 25:343-346.

Frost M., et al. (2010). Patients with high bone mass phenotype due to Lrp5-T253I mutation have low plasma levels of serotonin. *J. Bone Miner. Res.*, 25:673-675.

Ge C., Xiao G., Jiang D., Franceschi R.T. (2007). Critical role of the extracellular signalregulated kinase-MAPK pathway in osteoblast differentiation and skeletal development. *J. Cell Biol.*, 176:709-718.

Giannakopoulos N.V., et al. (2005). Proteomic identification of proteins conjugated to ISG15 in mouse and human cells. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 336:496–506.

Glass D.A. 2nd, et al. (2005). Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev. Cell.*, 8:751-64.

Gong Y. et al. (2001). LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*, 107:513-23.

Goodman G.R., et al. (1999). Interferon-alpha, unlike interferon-gamma, does not cause bone loss in the rat. *Bone.*, 25:459-63.

Hadjidakis, D.J., Androulakis I.I. (2006). Bone Remodeling. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1092:385-396.

Häussler B., Gothe H., Göl D., Glaeske G., Pientka L., Felsenberg D. (2007). Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study. *Osteoporos. Int.*, 18:77-84.

Herrmann J., Lerman L.O., Lerman A. (2007). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation. *Circ. Res.*,100:1276-1291.

Hofmann W.P., et al. (2008). Prospective study of bone mineral density and metabolism in patients with chronic hepatitis C during pegylated interferon alpha and ribavirin therapy. *J. Viral. Hepat.*, 15:790-796.

Itoh S., et al. (2006). A critical role for interleukin-6 family-mediated Stat3 activation in osteoblast differentiation and bone formation. *Bone*, 39:505-512.

Kanis J. A., et al. (1994). Assessment of Fracture Risk and its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis: Synopsis of a WHO Report. *Osteoporosis Int.*, 4:368-381.

Kansara M., et al. (2009). Wnt inhibitory factor 1 is epigenetically silenced in human osteosarcoma, and targeted disruption accelerates osteosarcomagenesis in mice. *J. Clin. Invest.*, 119:837-851.

Karsenty G. (2008) Transcriptional control of skeletogenesis. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet*, 9:183-196.

Karsenty G., Kronenberg H.M., Settembre C. (2009). Genetic control of bone formation. *Annu. Rev. Cell Dev.Biol.*, 25:629-648.

Katanaev V.L., et al. (2005). Trimeric G protein-dependent frizzled signaling in Drosophila. *Cell*, 120:111–122.

Kato M., et al. (2002). Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J. Cell Biol.*, 157:303-314.

Keller H. (2008). Regulation des Knochenbildungs-Hemmers Sclerostin, *Biospektrum*, 14:60-62.

Klein-Nulend J. & Bonewald L.F. (2008). The Osteocyte. In: *Principles of Bone Biology*, 1. Auflage, Academic Press, San Diego, CA USA, S. 151-172.

Kornak U. et al. (2001). Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell*, 104:205–215

Krause C., de Gorter D.J.J., Karperien M., ten Dijke P. (2008). Signal Transduction Cascades Controlling Osteoblast Differentiation. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 7. Auflage, S.10-14.

Krishnan V., Bryant H.U., MacDougald O.A. (2006). Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J. Clin. Invest.*, 116:1202–1209.

Kühl M. (2004). The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. *Front. Biosci.*, 9:967-974.

Kühl M., Sheldahl L.C., Park M., Miller J.R., Moon R.T. (2000). The Wnt/Ca2+ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet.*, 16:279-83.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.

Lenschow D.J., et al. (2005). Identification of interferon-stimulated gene 15 as an antiviral molecule during Sindbis virus infection in vivo. *J. Virol.*, 79:13974–13983.

Li X., et al. (2009). Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.*, 24:578-588.

Li Y., Dudley A. T. (2009). Noncanonical frizzled signaling regulates cell polarity of growth plate chondrocytes. *Development*, 136:1083-1092.

Lin S.K., et al. (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., 50:785-793.

Liu F., Kohlmeier S., Wang C.Y. (2008). Wnt signaling and skeletal development. *Cell Signal.*, 20:999-1009.

Liu T., et al. (1999). Activation of Rat Frizzled-1 Promotes Wnt Signaling and Differentiation of Mouse F9 Teratocarcinoma Cells via Pathways That Require Ga_q and Ga₀ Function. *J. Biol. Chem.*, 274:33539-33544.

Maeda K., et al. (2009). Ror2 signaling enhances osteoclast formation in physiological and pathological conditions. *Bone*, 44;S50.

Malakhov M.P., et al. (2003). High-throughput immunoblotting. Ubiquitiin-like protein ISG15 modifies key regulators of signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 278:16608–16613.

McLean W. & Olsen B.R. (2001). Mouse models of abnormal skeletal development and homeostasis. *Trends Genet.*, 17:38-43.

Mundlos S., et al. (1997). Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell*, 89: 773–779

Mundlos S. (1999). Cleidocranial dysplasia: clinical and molecular genetics. *J. Med. Genet.*, 36:177-182.

Mullis K., et al. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology.*, 1:263–373.

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

Modarresi R., Xiang Z., Yin M., Laurence J. (2009). WNT/beta-catenin signaling is involved in regulation of osteoclast differentiation by human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir: relationship to human immunodeficiency virus-linked bone mineral loss. *Am. J. Pathol.*, 174:123-135.

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

Osiak A., Utermohlen O., Niendorf S., Horak I., Knobeloch K.P. (2005). ISG15, an interferon-stimulated ubiquitin-like protein, is not essential for STAT1 signaling and responses against vesicular stomatitis and lymphocytic choriomeningitis virus. *Mol. Cell Biol.*, 25:6338–6345.

Otto F. et al. (1997). Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, 89:765-771.

Overington J.P., Al-Lazikani B. und Hopkins A.L. (2006). How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.*, 5:993-996.

Pinzone J.J., et al. (2009). The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease. *Blood*, 113:517-525.

Pitha-Rowe I.F. & Pitha P.M. (2007). Viral defense, carcinogenesis and ISG15: novel roles for an old ISG. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 18:409-417.

Pober B.R. (2010). Williams-Beuren syndrome. N. Engl. J. Med., 362:239-252.

Prasad R., Mishra O.P., Reddy N. (2006). Cleidocranial Dysplasia with Encephalomalacia: An Unusual Association. Pediatric Oncall. http://www.pediatriconcall.com/fordoctor/casereports/cleidocranial_dysplasia.asp

Qiang Y.W., et al. (2008). Myeloma-derived Dickkopf-1 disrupts Wnt-regulated osteoprotegerin and RANKL production by osteoblasts: a potential mechanism underlying osteolytic bone lesions in multiple myeloma. *Blood* 112:196-207.

Qiang Y.W., et al. (2009). Characterization of Wnt/beta-catenin signalling in osteoclasts in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.*, [Epub ahead of print] PMID: 19961481.

Ranheim E.A., et al. 2005. Frizzled 9 knock-out mice have abnormal B-cell development. *Blood*, 105:2487-2494.

Reich N., et al. (1987). Interferon-induced transcription of a gene encoding a 15-kDa protein depends on an upstream enhancer element. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84:6394–6398.

Sadler A.J., Williams B.R. (2008). Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol.*, 8:559-568.

Saitoh T., Hirai M., Katoh M. (2001). Molecular cloning and characterization of human Frizzled-8 gene on chromosome 10p11.2. *Int. J. Oncol.*, 18:991-996.

Schindler C. & Plumlee C. (2008). Inteferons pen the JAK-STAT pathway. Semin. Cell Dev. Biol., 19:311-318.

Schubert C. (2009). The genomic basis of the Williams-Beuren syndrome. *Cell. Mol. Life Sci.*, 66:1178-1197.

Schulte G. & Bryja V. (2007). The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 28:518-525.

Schulze J., et al. (2010). Osteolytic prostate cancer cells induce the expression of specific cytokines in bone-forming osteoblasts through a Stat3/5-dependent mechanism. *Bone*, 46:524-533.

Spencer G.J., Utting J.C., Etheridge S.L., Arnett T.R., Genever P.G. (2006). Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFkappaB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. *J. Cell Sci.*, 119:1283-1296.

Teitelbaum S.L. (2000). Bone resorption by osteoclasts. Science., 289:1504-1508.

Tian E., et al. (2003). The Role of the Wnt-Signaling Antagonist DKK1 in the Development of Osteolytic Lesions in Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.*, 349:2483-2494.

Topol L., et al. (2003). Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3independent β-catenin degradation. *J. Cell. Biol.*, 162:899-908.

Turner C.H., Forwood M.R., Otter M.W. (1994). Mechanotransduction in bone. Do bone cells act as sensors of fluid flow? *FASEB J.*, 8:875-878.

van Amerongen R. & Nusse R. (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*, 136:3205-14.

Wang Y.K., et al. (1997). A novel human homologue of the Drosophila frizzled wnt receptor gene binds wingless protein and is in the Williams syndrome deletion at 7q11.23. *Hum. Mol. Genet.*, 6:465-472.

Wang Y.K., Spörle R, Paperna T, Schughart K, Francke U. (1999). Characterization and expression pattern of the frizzled gene Fzd9, the mouse homolog of FZD9 which is deleted in Williams-Beuren syndrome. *Genomics*, 57:235-248.

Williams B.O. & Insogna K.L. (2009). Where Wnts went: the exploding field of Lrp5 and Lrp6 signaling in bone. *J. Bone Miner. Res.*, 24:171-178.

Wise A., Gearing K. und Rees S. (2002). Target validation of G-protein coupled receptors. *Drug Discov. Today.* 15:235-246.

Wong G.T., Gavin B.J., McMahon A.P. (1994). Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Mol*.*Cell Biol*. 14:6278-6286.

Yaccoby S., et al. (2007). Antibody-based inhibition of DKK1 suppresses tumor-induced bone resorption and multiple myeloma growth in vivo. *Blood*, 109:2106-2111.

Yadav V.K., et al. (2010). Pharmacological inhibition of gut-derived serotonin synthesis is a potential bone anabolic treatment for osteoporosis. *Nat. Med.* 16:308-312.

Yadav V.K., et al. (2008). Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell.*, 135:825-837.

Yan Y., et al. (2009). Axin2 controls bone remodeling through the beta-catenin-BMP signaling pathway in adult mice. *J. Cell Sci.*, 122:3566-3578.

Yang Y. (2008). Skeletal Morphogenesis and Embryonic Development. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 7. Auflage, S. 2-7.

Yano S., et al. (2005). Functional expression of beta-chemokine receptors in osteoblasts: role of regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in osteoblasts and regulation of its secretion by osteoblasts and osteoclasts. *Endocrinology*, 146:2324-2335.

Zirn B., et al. (2006). Target genes of the WNT/beta-catenin pathway in Wilms tumors. *Genes Chromosomes Cancer.*, 45:565-574.
Zhao C., et al. (2005). Hippocampal and visuospatial learning defects in mice with a deletion of frizzled 9, a gene in the Williams syndrome deletion interval. *Development*, 132:2917-2927.

9 Anhang

9.1 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Joachim Albers
Geburtstag:	26.09.1980
Geburtsort:	Quakenbrück
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulische Ausbildung

06/2007 - heute	Promotion zum Dr. rer. nat. im Institut für Osteologie und
	Biomechanik (IOBM) des Universitätsklinikums Hamburg
	Eppendorf.
07/2006 - 02/2007	Diplomarbeit im Institut für Organische Chemie der Universität
	Hamburg; Titel: "Strukturbasiertes Design eines donorsubstrat-
	spezifischen Inhibitors der humanen Galaktosyltransferase B".
08/2003 - 05/2006	Hauptstudium "Diplom Chemie", Universität Hamburg.
07/2001 - 07/2003	Grundstudium "Diplom Chemie", Universität Hamburg.
07/1994 - 06/2000	Gymnasium Liebfrauenschule Cloppenburg. Abschluss: Abitur

Auszeichnungen und Stipendien

03/2009	Kongress-Stipendium des Dachverbands Osteologie für den	
	"Osteologie-Kongress 2009" (Frankfurt am Main).	
09/2008	"Young Investigator Award" der American Society for Bone and	
	Mineral Research (ASBMR) (Montreal, Kanada).	
03/2005 - 07/2005	ERASMUS-Stipendium, Instituto Universitario de Quimica	
	Organometallica Enrique Moles, (Oviedo, Spanien).	

9.2 Veröffentlichungen

9.2.1 Originalarbeiten

J. Albers, T. F. Beil, J. Schulze, M. Gebauer, R.P. Marshall, K. Wintges. F. Friedrich. M. Priemel, T. Kummer, A. F. Schilling, J. M. Rueger, B. Fehse, K. Cornils, T. Streichert, F. Jakob, B. Pober, K.P. Knobeloch, U. Francke, M. Amling, T. Schinke,. (2010). Control of bone formation by the serpentine receptor Frizzled-9. *J. Clin. Invest.*, in Revision.

J. Albers, J. Schulze, T. F. Beil, R.P. Marshall, K. Wintges, T. Streichert, M. Amling, T. Schinke. (2010). Increased Bone Resorption in Mice Lacking the Wnt Receptor Frizzled-8. In Vorbereitung.

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

Seitz S., Barvencik F., Gebauer M., **Albers J**, Schulze J., Streichert T., Amling M., Schinke T. (2010). Preproenkephalin (Penk) is expressed in differentiated osteoblasts, and its deletion in Hyp mice partially rescues their bone mineralization defect. *Calcif Tissue Int.* 86(4):282-293.

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: 524-33. * contributed equally

J. Albers, V. Cadierno, P. Crochet, S.E. García-Garrido and J. Gimeno. (2007). Octahedral ruthenium(II) complexes cis,cis-[RuX₂(CNR)(CO)(PP)] and cis,cis,cis-[RuX₂(CO)₂(PP)] (X = Cl, Br; PP = 1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene, 1,1' bis(diisopropylphosphino) ferrocene): Synthesis and catalytic applications in transfer hydrogenation of acetophenone and cycloisomerization of (Z)-3-methylpent-2-en-4-yn-1-ol. *J. Organomet. Chem.* 692, 23;5234-5244.

9.2.2 Kongressbeiträge

- 07/2009 Gordons Research Conference: Bones and Teeth, Titel: *Low bone formation in mice lacking the Wnt receptor Frizzled-9,* (Biddeford, USA).
- 03/2009 Osteologie 2009, Titel: Erniedrigte Knochendichte in Frizzled-9 defizienten Mäusen, (Frankfurt am Main, Germany).
- 09/2008 ASBMR Annual Meeting 2008, Titel: Mice lacking the Wnt receptor Frizzled9 display Osteopenia caused by decreased bone formation, (Montreal, Canada).

9.3 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die an der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Die Rolle der Serpentin-Rezeptoren Fzd8 und Fzd9 im Knochenremodelling

Im Institut für Osteologie und Biomechanik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Michael Amling und der Betreuung durch Herrn Prof. Dr. med. Michael Korth für den Fachbereich Chemie ohne fremde Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner versichere ich, dass ich bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht habe.

Hamburg, 28.4. 2010

.....

Joachim Albers

9.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Amling für die Vergabe des Promotionsthemas und die Betreuung der Dissertation. Außerdem möchte ich mich sehr für die finanzielle Unterstützung bedanken, die es mir ermöglichte meine Ergebnisse auf nationalen und internationalen Fachkongressen vorzustellen.

Herrn Prof. Dr. Michael Korth bin ich sehr dankbar für die Übernahme des zweiten Gutachtens und für die Betreuung meiner Promotionsarbeit für das Department Chemie.

Herrn PD Dr. Thorsten Schinke danke ich für die Anleitung und Unterstützung bei der Ausarbeitung der Dissertation und der großen Hilfe bei der Vorbereitung von wissenschaftlichen Beiträgen und Vorträgen.

Allen aktuellen und ehemaligen Kollegen des Instituts danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit und das hervorragende Arbeitsklima. Mein besonderer Dank gilt dabei Jochen Schulze für die Einarbeitung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken, die fachlichen Diskussionen und die stets unterhaltsame und schöne Zeit im Labor.

Außeredm danke ich Kristin Klätschke aus dem Institut für klinische Chemie für die große Hilfe bei den Genchipanalysen. Ich danke Olga Winter für die Hilfe bei der histologischen Aufarbeitung der Mausknochen, sowie Timo Beil für die Hilfe bei den histomorphometrischen Analysen und Anke Baranowsky für die Hilfe bei der Immunhistochemie. Gudrun Arndt und Susanne Conrad möchte ich herzlich für die zuverlässige Verwaltung der Mauslinien in der zentralen Tierhaltung des UKE danken.

Diese Arbeit wurde mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (FOR-793) durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich von ganzem Herzen meinen Eltern für ihre immerwährende, uneingeschränkte Unterstützung danken.

9.5 Sicherheitshinweise

Acrylamid 30%

R:45-46-20/21-23/24/25-43-48; S: 36/37/39-45-60

Alizarinrot S

S: 2

Ammoniumpersulfat (APS)

R:8-22-36/37/38-42/43; S: 22-24-26-37

Ampicillin

R:36/37/38-42/43 S: 22-26-36/37

Bradford Reagenz

R:34; S: 20-23-26-36/37/39-45-60

Bromphenolblau

S:22-24/25

Calcein

S:22-24/25

Chloroquindiphosphat

R:22; S: 22-24/25

Chloroform

R:22-38-40-48/20/22; S: (2)-36/37

Coomassie Brilliant Blau G-250 Lösung

R:20/21/22-34-68; S: 26-36/37/39-45

Diethylpyrokarbonat (DEPC)

R:22-36/37/38; S: 26-36

Dinatriumhydrogenphosphat (Na2HPO4 x 2H2O)

S:22-24/25

Dimethylformamid (DMF)

R:61-20/21-36; S: 53-45

Dimethylsulfoxid (DMSO)

R:36/37/38; S: 23-26-36

1,4-Dithiothreitol (DTT)

R: 22-36/37/38; S: 26-36

Eosin G

R:36; S: 22-26

Ethanol (100%) R:11; S: 7-16 Ethidiumbromid R:23-68; S: 36/37-45 Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) R:36-52/53; S: 26-61 **Fast Red Violet LB Salz** R:20/21/22-40; S: 22-36 Formaldehydlösung (37%) R:23/24/25-34-40-43; S: (1/2)-26-36/37/39-45-51 Glycin S:22-24/25 Hydrochloridsäure (HCl) R:34-37; S: 26-36/37/39-45 Isopropanol R:11-36-37; S: 7-16-24/25-26 Lithiumchlorid R: 22-36/37/38; S: 26-36/37/39 Kaliumchlorid (KCl) S:22-24/25 Mayers Hämalaunlösung R:22 Mercaptoethanol R:23/24/25; S: 45 Methanol R:11-23/24/25-39/23/24/25; S: 7-16-36/37-45 Methylmetacrylat R:11 36/37/38-43; S: 9-16-23-24-37-60 Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) R:11-21/22-36/37/38; S: 26-36/37 Natriumhydroxid (NaOH) R:35; S: 26-37/39-45 Nonylphenol R:22-34-50/53; S: 26-36/37/39-45-60-61

Paraformaldehyd (PFA)

R:20/22-36/37/38-40-43; S: 22-26-36/37

Phenol

R:23/24/25-34-48/20/21/22-68; S: (1/2)-24/25-26-28-36/37/39-45

Pikrinsäure

R:3-4-23/24/25; S: (1/2)-28-35-36/37-45

Silbernitrat

R: 35; S: 26-36/37/39-45

Tetramethylethylendiamin (TEMED)

R:11-20/22-34; S: 16-26-36/37/39-45-60

Triethanolamin

R:20/21/22-36/37/38; S: 26-36/37/39

Trishydroxymethylaminomethan-(Tris) Base

R:36/37/38; S: 26-36

Tris Hydrochlorid (Tris-HCl)

R:36/37/38; S: 26-36