



Universität Hamburg  
DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG



Institut für Osteologie und Biomechanik

Zentrum für experimentelle Medizin

Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Universität Hamburg

# **Wnt- und Notch-Signale im Knochenstoffwechsel**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,

Fachbereich Chemie

der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Timur Alexander Yorgan**

aus Düsseldorf

Hamburg, 2014

Tag der Disputation: 13.02.2015

Datum der Freigabe: 19.02.2015

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thorsten Schinke

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Elke Oetjen

## **Inhaltsverzeichnis**

1	Zusammenfassung.....	1
1.1	Zusammenfassung auf Deutsch.....	1
1.2	Summary in English .....	3
2	Einleitung.....	5
2.1	Projektziel .....	5
2.2	Theoretischer Hintergrund.....	5
2.2.1	Das Skelettsystem.....	5
2.2.1.1	Knochenentwicklung .....	5
2.2.1.2	Knochenformen.....	6
2.2.1.3	Struktureller Aufbau .....	7
2.2.1.4	Knochengeweberemodellierung .....	9
2.2.2	Knochenzellen .....	10
2.2.2.1	Osteoblasten .....	10
2.2.2.2	Osteozyten.....	12
2.2.2.3	Osteoklasten.....	14
2.2.2.4	Belegzellen.....	16
2.2.3	Signalwege.....	16
2.2.3.1	Wnt-Signalweg.....	16
2.2.3.2	Notch-Signalweg.....	24
2.2.4	Erkrankungen mit beeinträchtigt <sup>m</sup> Knochenstoffwechsel.....	26
2.2.4.1	Osteoporose .....	26
2.2.4.2	Osteopetrose .....	28
2.2.4.3	Osteosklerose .....	28
2.2.4.4	Hajdu-Cheney Syndrom.....	29
2.2.4.5	Morbus Paget .....	30
3	Aufgabenstellung.....	31
4	Material und Methoden .....	32
4.1	Material .....	32
4.1.1	Geräte.....	32
4.1.2	Verbrauchsmaterial.....	33
4.1.3	Chemikalien .....	33
4.1.4	Fertiglösungen und Pulver.....	35
4.1.5	Reaktionssätze.....	35

4.1.6	Enzyme und Proteine .....	35
4.1.7	Antikörper.....	36
4.1.7.1	Antikörper für Durchflusszytometrie .....	36
4.1.7.2	Antikörper für Western Blots .....	36
4.1.8	Oligonukleotid-Primer .....	36
4.1.9	TaqMan-Sonden .....	37
4.1.10	Lösungen und Puffer .....	38
4.1.11	Bakterien-und Zellkulturmedien .....	42
4.1.12	Softwareliste.....	43
4.2	Methoden.....	43
4.2.1	Tierversuche .....	43
4.2.1.1	Mausmodelle.....	43
4.2.1.2	Haltung /Verpaarung.....	47
4.2.1.3	Genotypisierung .....	48
4.2.1.4	Calcein-Markierung .....	48
4.2.1.5	Präparation der Mäuse.....	49
4.2.1.6	Serumgewinnung.....	49
4.2.2	Radiologische Untersuchungen.....	49
4.2.2.1	Kontaktradiographie.....	49
4.2.2.2	Mikro-Computertomographie.....	50
4.2.3	Histologie.....	51
4.2.3.1	Unentkalkte Knochenhistologie .....	52
4.2.3.2	Färbungen.....	52
4.2.3.3	Histomorphometrie.....	53
4.2.4	Biomechanische Analysen .....	55
4.2.4.1	3-Punkt Biegesteifigkeitstest.....	55
4.2.4.2	Finite Elemente Analyse .....	55
4.2.5	Zellkultur.....	56
4.2.5.1	Schädeldach-Osteoblasten.....	56
4.2.5.2	Knochenmarkszellen.....	56
4.2.5.3	Stimulation .....	57
4.2.6	Molekularbiologische Methoden .....	57
4.2.6.1	DNA Isolation.....	57
4.2.6.2	DNA Bestimmung .....	58
4.2.6.3	Polymerase-Kettenreaktion.....	58

4.2.6.4	Long-Range PCR.....	60
4.2.6.5	DNA Sequenzierung.....	60
4.2.6.6	E.Coli Kultur .....	60
4.2.6.7	Plasmidpräparation .....	60
4.2.6.8	Enzymatischer Verdau.....	61
4.2.6.9	Southernblot.....	61
4.2.6.10	RNA-Isolation.....	62
4.2.6.11	cDNA-Synthese .....	63
4.2.6.12	Genexpressionsanalyse .....	63
4.2.7	Biochemische Methoden.....	64
4.2.7.1	Analyse von Serumparametern.....	64
4.2.7.2	Mineralisationsanalyse.....	65
4.2.7.3	Proteinisolation .....	66
4.2.7.4	Proteinbestimmung.....	66
4.2.7.5	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	67
4.2.7.6	Westernblot.....	67
4.2.7.7	Knochenmarksanalyse mittels Durchflusszytometrie .....	67
4.2.8	Statistische Analyse .....	68
5	Ergebnisse.....	69
5.1	Charakterisierung des <i>Col1a1-Sost</i> -Mausmodells.....	69
5.1.1	Funktionsbestätigung des transgenen Konstruktes .....	69
5.1.2	µCT-Analyse des <i>Col1a1-Sost</i> -Mausmodells .....	70
5.1.3	Histologische Untersuchung des <i>Col1a1-Sost</i> -Mausmodells .....	72
5.1.4	Serumanalyse und morphologische Eigenschaften.....	73
5.1.5	Biomechanische Eigenschaften .....	74
5.1.6	Analyse des Knochenmarks.....	75
5.2	Interaktion von Komponenten des Wnt-Rezeptorkomplexes .....	76
5.2.1	Analyse von <i>Col1a1-Sost</i> und <i>Col1a1-Krm2</i> in Kombination mit <i>Lrp5</i> -Varianten .....	76
5.2.2	µCT-Analyse von <i>Col1a1-Sost</i> und <i>Col1a1-Krm2</i> in Kombination mit <i>Lrp5</i> -Varianten..	78
5.2.3	Histologie von <i>Col1a1-Sost/Krm2</i> in Kombination mit <i>Lrp5</i> -HBM-Varianten .....	80
5.2.4	Serumparameter von <i>Col1a1-Sost/Krm2</i> in Kombination mit <i>Lrp5</i> -HBM-Varianten ....	83
5.2.5	<i>Ex vivo</i> Analyse der <i>Col1a1-Sost</i> -Osteoblasten in Kombination mit <i>Lrp5</i> <sup>A213V/A213V</sup> .....	84
5.2.6	Eigenschaften der <i>Fzd9</i> -defizienten Mäuse in Kombination mit <i>Lrp5</i> <sup>A213V/A213V</sup> .....	86
5.2.7	µCT-Analyse des <i>Fzd9</i> -KOs in Kombination mit <i>Lrp5</i> <sup>A213V/A213V</sup> .....	88
5.2.8	Histologie des <i>Fzd9</i> -KOs in Kombination mit <i>Lrp5</i> <sup>A213V/A213V</sup> .....	89

5.3	Die Bedeutung von Notch2 im Knochenstoffwechsel.....	90
5.3.1	Expressionsmuster von <i>Notch2</i> und Notch-Liganden .....	90
5.3.2	Zellspezifische Inaktivierung von <i>Notch2</i> .....	92
5.3.2.1	Osteoklasten-spezifische Notch2-Inaktivierung.....	93
5.3.2.2	Osteoblasten-spezifische Notch2 Inaktivierung.....	94
5.3.3	Das Hajdu-Cheney Mausmodell .....	97
5.3.3.1	Generierung des Hajdu-Cheney Mausmodells.....	98
5.3.3.2	Skelettanalyse des Hajdu-Cheney Mausmodells.....	99
6	Diskussion.....	102
6.1	Charakterisierung der <i>Col1a1-Sost</i> -Mäuse.....	103
6.2	Interaktion von Komponenten des Wnt-Rezeptorkomplexes .....	105
6.3	Die Bedeutung von Notch2 im Knochenstoffwechsel.....	110
6.4	Fazit .....	116
7	Ausblick.....	117
8	Sicherheit und Entsorgung .....	119
8.1	H- und P-Sätze der verwendeten Chemikalien.....	119
8.2	Schlüssel für H-Sätze .....	120
8.3	Schlüssel für P-Sätze .....	121
9	Quellennachweis .....	123
9.1	Literaturverzeichnis.....	123
9.2	Abbildungsverzeichnis.....	136
10	Abkürzungsverzeichnis .....	138
11	Danksagung .....	142
12	Lebenslauf .....	143
13	Eidesstattliche Erklärung.....	146

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Zusammenfassung auf Deutsch

Die Osteoporose ist eine der weltweit am weitesten verbreiteten Krankheiten mit erheblichen sozialökonomischen Auswirkungen. Die in den meisten Fällen zum Einsatz kommende Therapie ist die Behandlung mit anti-resorptiv wirkenden Bisphosphonaten, die den Knochenverlust aufhalten können aber langfristig eine Verschlechterung der Knochenqualität zur Folge haben, die wiederum zu Frakturen führen kann. Um kosteneffektive, osteoanabole Behandlungsoptionen zu generieren, die den aktiven Aufbau der Knochenmasse stimulieren, ist es erforderlich die molekularen Interaktionen aufzuklären, die die Knochenformation kontrollieren. In diesem Zusammenhang sind Osteozyten als zentrale Regulatoren des Knochenstoffwechsels von entscheidender Bedeutung. Sie sind unter anderem die Hauptquelle des sekretierten Proteins Sclerostin, das die Knochenformation äußerst potent unterdrücken kann. Dennoch ist bisher nicht bekannt, welche Mechanismen an der Differenzierung dieses Zelltyps beteiligt sind. Die Assoziation von Mutationen im NOTCH2-Gen mit dem Hajdu-Cheney Syndrom, einer Erkrankung die sich unter anderem durch einen Knochenmasse-Verlust auszeichnet, führte zur Hypothese, dass Notch-Signale möglicherweise über den Mechanismus der lateralen Inhibition an der Differenzierung von Osteozyten beteiligt sind.

Vorhergegangene Studien haben nahegelegt, dass Sclerostin ein Antagonist des Wnt-Co-Rezeptors Lrp5 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5) ist, was die Entwicklung eines anti-Sclerostin Antikörpers als osteoanabole Therapieoption zur Folge hatte. Dennoch gab es keinen klaren *in vivo* Beweis für diese Interaktion und alternative Wirkmechanismen wurden erörtert. Daher wurden in dieser Arbeit zunächst Mäuse charakterisiert, die Sclerostin transgen in Osteoblasten überexprimierten und die als Phänotyp, den Erwartungen entsprechend, eine deutlich verringerte Knochenmasse, bedingt durch eine reduzierte Knochenformationsrate, aufwiesen. Diese Tiere wurden anschließend mit zwei Mauslinien verpaart, die hohe Knochenmasse-hervorrufende Mutationen (HBM) im *Lrp5*-Gen trugen, die angeblich die Sclerostin-Bindungsstelle zerstören. Parallel hierzu wurden Mäusen, die genetische veränderte Varianten von weiteren potentiellen Komponenten des Wnt-Rezeptorkomplexes trugen (Kremen2 und Frizzled9) mit den *Lrp5*-HBM Linien verpaart. *In vivo* Analysen von weiblichen und männlichen Tieren im Alter von 12 Wochen mittels  $\mu$ CT und Knochenhistologie, sowie *in vitro* Versuche mit primären Osteoblasten zeigten, dass die *Lrp5*-HBM-Mutationen die Wirkung von Kremen2 und Frizzled9 nur geringfügig beeinflussten. Der Effekt der Sclerostin-Überexpression hingegen wurde durch die *Lrp5*-HBM-Mutationen in den HBM-Phänotyp umgewandelt. Somit konnte in dieser Arbeit erstmalig ein schlüssiger *in vivo* Beleg für die Interaktion von Sclerostin mit der postulierten Bindungsstelle von Lrp5 erbracht werden. Dies ist von

bedeutender klinischer Relevanz, da somit eine vereinheitlichende Hypothese der Funktion der beiden Moleküle, die in Personen mit Osteosklerose mutiert sind, untermauert werden kann.

Um die Bedeutung von Notch2 für den Knochenstoffwechsel und die Osteozyten-Differenzierung näher zu erörtern, wurde in dieser Arbeit der skelettale Phänotyp von Mäusen mit Osteoklasten- und Osteoblasten-spezifischer *Notch2*-Defizienz untersucht und ein Mausmodell des Hajdu-Cheney Syndroms generiert. Radiologische und histologische Untersuchungen zeigten, dass die Osteoklasten-spezifische Defizienz keine messbaren Effekte hervorrief, wohingegen die Osteoblasten-spezifische Defizienz eine Erhöhung und Umverteilung der trabekulären Knochenmasse in Röhrenknochen zur Folge hatte, die wahrscheinlich auf die größere Osteoblastenzahl zurückzuführen war. Die Analyse des erfolgreich generierten Mausmodells mit einer Hajdu-Cheney-Mutation im *Notch2*-Gen ergab, dass diese Tiere zwar keine Acro-Osteolysen aufwiesen, aber eine Reduktion der Knochenmasse, die mit einem erhöhten Knochenumsatz einherging. Es konnten jedoch keine Hinweise gefunden werden, die die Hypothese einer Notch2-Beteiligung an der Osteozyten-Differenzierung unterstützen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig ein Mausmodell des Hajdu-Cheney Syndroms generiert, und *in vivo* der Einfluss von Notch2 auf den Knochenstoffwechsel nachgewiesen. Dass ein erhöhter Knochenumsatz und die Osteoblasten-Differenzierung als primär beteiligte Mechanismen identifiziert wurden, ist von hoher klinischer Bedeutung, da dies einerseits zum Verständnis des Hajdu-Cheney Syndroms beiträgt und andererseits zeigt, dass die Modulation der Notch-Signale ein sinnvoller Ansatzpunkt für eine osteoanabole Therapie ist.

## 1.2 Summary in English

Osteoporosis is one of the most prevalent disorders worldwide with a substantial socioeconomic impact. In most cases anti-resorptive drugs from the class of bisphosphonates are used for treatment. These are able to arrest the bone loss but may lead to a decrease in bone quality and increased fracture risk in the long term. In order to create cost-effective osteoanabolic treatment options the molecular interactions controlling bone formation need to be elucidated. Osteocytes, the central regulators of bone metabolism, are of paramount importance in this context. They are the main source for Sclerostin, a secreted protein with the ability to effectively suppress bone formation. However, it is still unknown what mechanisms are involved in the differentiation of this cell type. The association of mutations of the NOTCH2 gene with the Hajdu-Cheney syndrome, a disorder characterized by loss of bone mass, has led to the hypothesis, that Notch-signaling is possibly involved in the differentiation of osteocytes by way of the lateral inhibition mechanism.

Previous studies have suggested that Sclerostin functions as an antagonist for the Wnt co-receptor Lrp5 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5) and this has led to the development of an anti-Sclerostin antibody as an osteoanabolic treatment option. Yet clear *in vivo* evidence for this mechanism was still missing, and alternative mechanisms have been discussed. Therefore, mice over-expressing Sclerostin specifically in osteoblasts were initially characterized in this thesis. As expected, they displayed a severely reduced bone mass caused by a decreased bone formation rate. Subsequently these mice were crossed with two mouse lines with high bone mass causing mutations (HBM) in the *Lrp5* gene. These mutations supposedly act by inactivating the Sclerostin binding site. In parallel, mice carrying genetically modified versions of further potential components of the Wnt receptor complex (Kremen2 and Frizzled9) were crossed with the two *Lrp5*-HBM lines. *In vivo* analysis of 12 week old male and female mice via  $\mu$ CT and bone histology as well as *in vitro* experiments involving primary osteoblasts demonstrated that *Lrp5*-HBM mutations only marginally influenced the effects of Kremen2 and Frizzled9. In contrast, the effect of Sclerostin-overexpression was abolished by the *Lrp5*-HBM mutations, thus transforming it into a HBM-phenotype. Accordingly this work presents the first compelling *in vivo* evidence for an interaction of Sclerostin with its postulated binding site on Lrp5. These results are of considerable clinical relevance since they provide substantial support for a unifying hypothesis involving the function of the two molecules mutated in individuals with osteosclerosis.

To elucidate the role of Notch2 in bone metabolism and osteocyte differentiation, the skeletal phenotype of mice with a cell type specific deficiency of *Notch2* in osteoclasts or osteoblasts was investigated and a mouse model for the Hajdu-Cheney syndrome was generated. Radiological and histological studies showed no measurable effects in the osteoclast specific deficiency whereas the

osteoblast specific deficiency resulted in an increased and relocated trabecular bone mass in long bones. This phenotype was probably caused by an increased number of osteoblasts. No acro-osteolysis was detectable during the analysis of the successfully generated mouse model carrying one of the mutations associated with the Hajdu-Cheney syndrome in the *Notch2* gene. Nonetheless a reduction of bone mass was observed along with a high-turnover situation. However no evidence was observed that supports the hypothesis of an involvement of Notch2 in the differentiation of osteocytes. This thesis represents the first time that a mouse model of the Hajdu-Cheney syndrome was generated and the influence of Notch2 on bone metabolism was investigated *in vivo*. It is of significant clinical relevance that Notch2 primarily affects bone turnover and the differentiation of osteoblasts, since this provides further insight into the Hajdu-Cheney syndrome. In addition these results clearly show that the modulation of Notch signaling is a reasonable target for the development of osteoanabolic therapies.

## 2 Einleitung

### 2.1 Projektziel

Das Ziel dieser Arbeit war es, einerseits die Bedeutung und den Wirkmechanismus des primär von Osteozyten produzierten Wnt-Inhibitors Sclerostin im Knochenstoffwechsel *in vivo* zu erörtern und andererseits die potentielle Rolle des Notch-Signalweges im Knochenstoffwechsel im Allgemeinen und in der Osteozyten-Differenzierung im Speziellen zu untersuchen. In beiden Fällen liegt das Bestreben zu Grunde, Mechanismen und Signalwege zu finden, die die Osteoblasten-Aktivität beeinflussen, um Ansatzpunkte zu finden oder zu verifizieren, die eine dringend benötigte, osteoanabole Therapieoption der Osteoporose ermöglichen.

### 2.2 Theoretischer Hintergrund

#### 2.2.1 Das Skelettsystem

Knochen bilden das endoskelettale Stützgewebe der Wirbeltiere und erlauben, als bewegliches Gerüst, das komplexe Zusammenspiel von Muskeln und Sehnen, denen das Skelett als Ansatzpunkt dient und somit, über Hebelwirkungen, dem Organismus einerseits eine Möglichkeit zur komplexen Bewegung gibt und andererseits eine effiziente Übersetzung der Muskelkraft erlaubt. Des Weiteren dient das Skelett als Stützapparat für die inneren Organe, denen es gleichzeitig vor externen Krafteinwirkungen Schutz bietet. Der Knochen selbst dient als Reservoir für diverse Wachstumsfaktoren und Zytokine sowie essentielle Mineralien wie Calcium und Phosphat, die in Kombination mit den Nieren eine Regulation des Mineralhaushaltes sowie des Blut pH-Wertes ermöglichen<sup>[4]</sup>. Schlussendlich bildet das Innere der Knochen, das Knochenmark, ein Milieu das die Bildung von Zellen des Blut- und Immunsystems erlaubt und somit unabdingbar für die Energieversorgung und Abwehr von Krankheitserregern ist<sup>[5]</sup>. Kommt es zu Erkrankungen des Knochens beziehungsweise des Knochenstoffwechsels, hat dies negative Auswirkungen auf den gesamten Körper zur Folge. Insbesondere die Osteoporose stellt eines der größten gesundheitlichen Probleme in den Industriestaaten dar<sup>[6]</sup>. Der Großteil der betroffenen Patienten wird zurzeit mit anti-resorptiven Medikamenten behandelt, die jedoch langfristig die skelettale Stabilität negativ beeinflussen<sup>[7]</sup>. Daher ist es dringend notwendig kostengünstige, osteoanabole Therapieoptionen zu entwickeln, die nicht diese negativen Effekte hervorrufen<sup>[8]</sup>. Um dieses Ziel erreichen zu können ist ein Verständnis der an der Knochenformation beteiligten molekularen Interaktionen erforderlich, insbesondere im Bereich der Zellmembran, die für potentielle Wirkstoffe gut zugänglich ist.

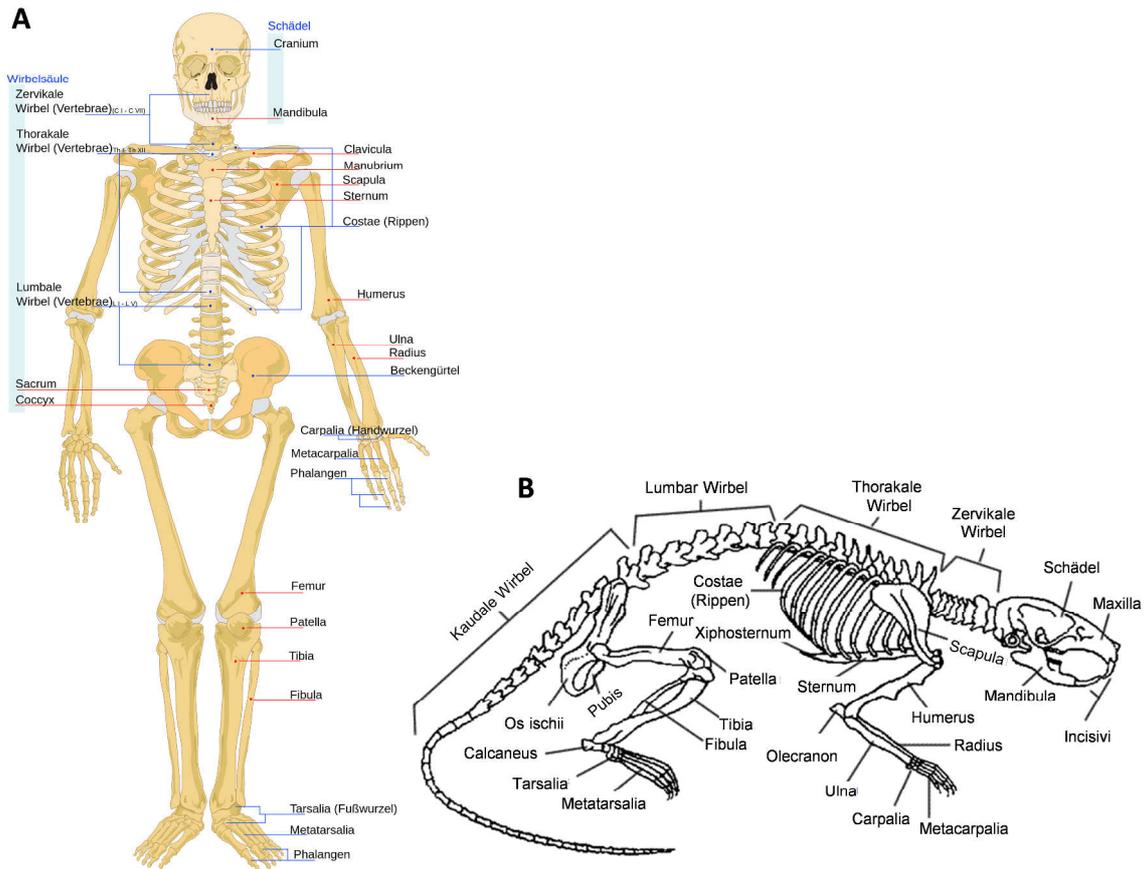
##### 2.2.1.1 Knochenentwicklung

Während der Entwicklung und des Wachstums eines Organismus gibt es mehrere Möglichkeiten, wie Knochen entstehen können. Dieser Ossifikation genannte Vorgang besteht hauptsächlich aus der chondralen Ossifikation, bei der eine Vorlage aus Knorpel, das Primordialskelett, von innen

(enchondrale Ossifikation) und von außen (perichondrale Ossifikation) durch Knochen ersetzt wird und der desmalen Ossifikation, bei der Knochen direkt aus dem Mesenchym entsteht. Des Weiteren besteht auch die Möglichkeit, dass sich neues Knochengewebe durch appositionelle Ossifikation, der Anlagerung an vorhandenen Knochen, bildet<sup>[9]</sup>. Das für die chondrale Ossifikation erforderliche Primordialskelett wird durch Chondrozyten gebildet, die aus mesenchymalen Vorläuferzellen differenzieren<sup>[10]</sup>. Diese sezernieren zunächst eine hauptsächlich aus Typ II-Kollagen bestehende Matrix. In der nächsten Phase der Knochenbildung wird Typ X-Kollagen, Fibronectin sowie VEGF von den inzwischen morphologisch hypertroph erscheinenden Chondrozyten produziert<sup>[11]</sup>. VEGF ermöglicht das Einwachsen von Blutgefäßen, die unter anderem Chondroklasten den Zugang zum Knorpel ermöglichen. In dieser Invasion des Knorpels genannten Phase bauen die Chondroklasten den Knorpel teilweise ab, um das Einwachsen weiterer Blutgefäße und das Einwandern von Osteoblasten zu ermöglichen, die die eigentliche Knochenmatrix generieren. Dieser Prozess findet während des Längenwachstums von Röhrenknochen kontinuierlich an den Enden im Bereich der Wachstumsfuge statt<sup>[11]</sup>. Der Verlauf der desmalen Ossifikation ist im Vergleich zur chondralen Ossifikation deutlich weniger komplex, da hierbei an den entsprechenden skelettalen Positionen mesenchymale Vorläuferzellen direkt zu Osteoblasten differenzieren, die eine organische Knochenmatrix sezernieren, die durch Einlagerung von Hydroxylapatit zu fertigem Knochen reift<sup>[12]</sup>.

### **2.2.1.2 Knochenformen**

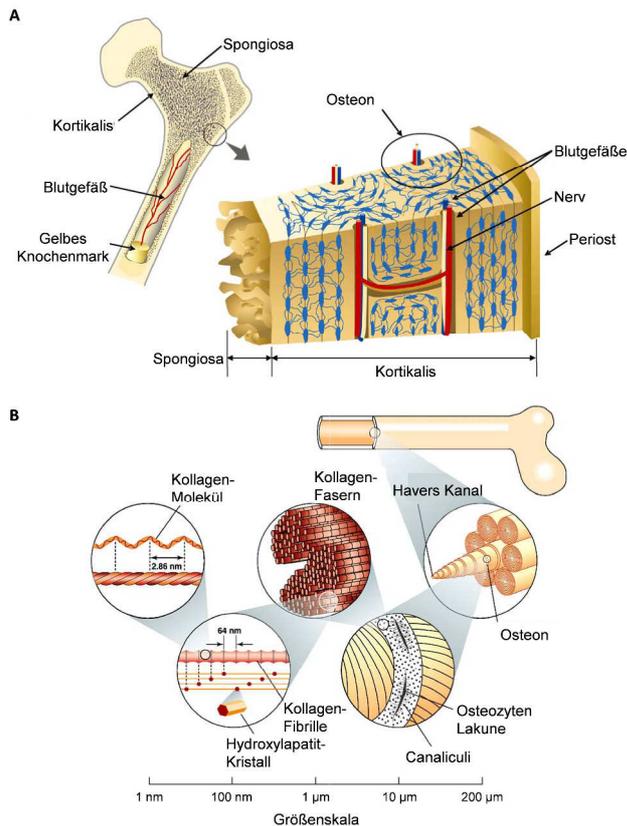
Im menschlichen Körper befinden sich um die 200 verschiedene Knochen, die anatomisch an Hand verschiedener Formen, Funktionen und Entstehungsverläufe in diverse Knochenarten unterteilt werden. *Ossa longa* (Röhrenknochen), wie beispielsweise Femur (Oberschenkelknochen) oder Ulna (Elle), befinden sich primär in den Gliedmaßen, wo sie durch chondrale Ossifikation entstanden sind und sich strukturell durch einen langen Schaft (Diaphyse), der an der sich an den Enden aufweitet (Metaphyse) und durch die Wachstumsfugen von den eigentlich Endstücken, den Epiphysen getrennt ist. *Ossa plana* (platte Knochen) wie beispielsweise das Calvaria (Schädeldach) zeichnen sich durch ihre flache Plattenform aus und werden durch desmale Ossifikation gebildet. Weitere Knochentypen sind *Ossa brevia* (kurze Knochen), *Ossa pneumatica* (luftgefüllte Knochen), *Ossa sesamoidae* (Sesambeine) und *Ossa irregularia* (unregelmäßige Knochen), zu denen die Wirbelkörper zählen<sup>[9]</sup>.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der humanen und murinen Skelettanatomie.** A: Männliches humanes Skelett in der anterioren Ansicht. B: Murines Skelett in der lateralen Ansicht. Abbildung nicht maßstabsgetreu. Modifiziert nach Villarreal & Furfur, 2007 und Muskopf, 2014.

### 2.2.1.3 Struktureller Aufbau

Die Struktur einzelner Knochen wird morphologisch in einen äußeren, kompakten Bereich, der Kortikalis und einen inneren, Spongiosa genannten, Bereich unterteilt. Die Kortikalis ist in größeren Wirbeltieren von röhrenförmigen Strukturen durchzogen, den Osteonen, die der Richtung der hauptsächlich auf den Knochen einwirkenden Kraft folgen und das Haversche System bilden, das einerseits die Versorgung mit Nährstoffen und den Umbau des Knochens ermöglicht und andererseits die mechanische Stabilität erhöht. Die Spongiosa erscheint auf Röntgenbildern weniger dicht als die Kortikalis und erhält ihren Namen durch die makroskopisch schwammartig, trajektorieell erscheinende Zusammensetzung<sup>[13]</sup>. Diese besteht aus Trabekeln, kleinen Knochenstrukturen die ein leichtes aber dennoch stabil vernetztes Geflecht bilden und in ihrer Gesamtheit auch als trabekulärer Knochen bezeichnet werden<sup>[9]</sup>. Der Zwischenraum bildet einen gut geschützten Bereich, in dem sich das Knochenmark befindet. Im Durchschnitt besteht das Skelett, bezogen auf das Volumen, zum Großteil aus trabekulärem Knochen, jedoch ist der Aufbau spezifischer Knochen stark abhängig von deren Lage, Funktion und der Belastung, der sie ausgesetzt sind. Ein Wirbelkörper besteht beispielsweise aus 25 % kortikalem Knochen, wohingegen die Diaphyse des Radius zu 95 % aus kortikalem Knochen aufgebaut ist<sup>[14]</sup>.

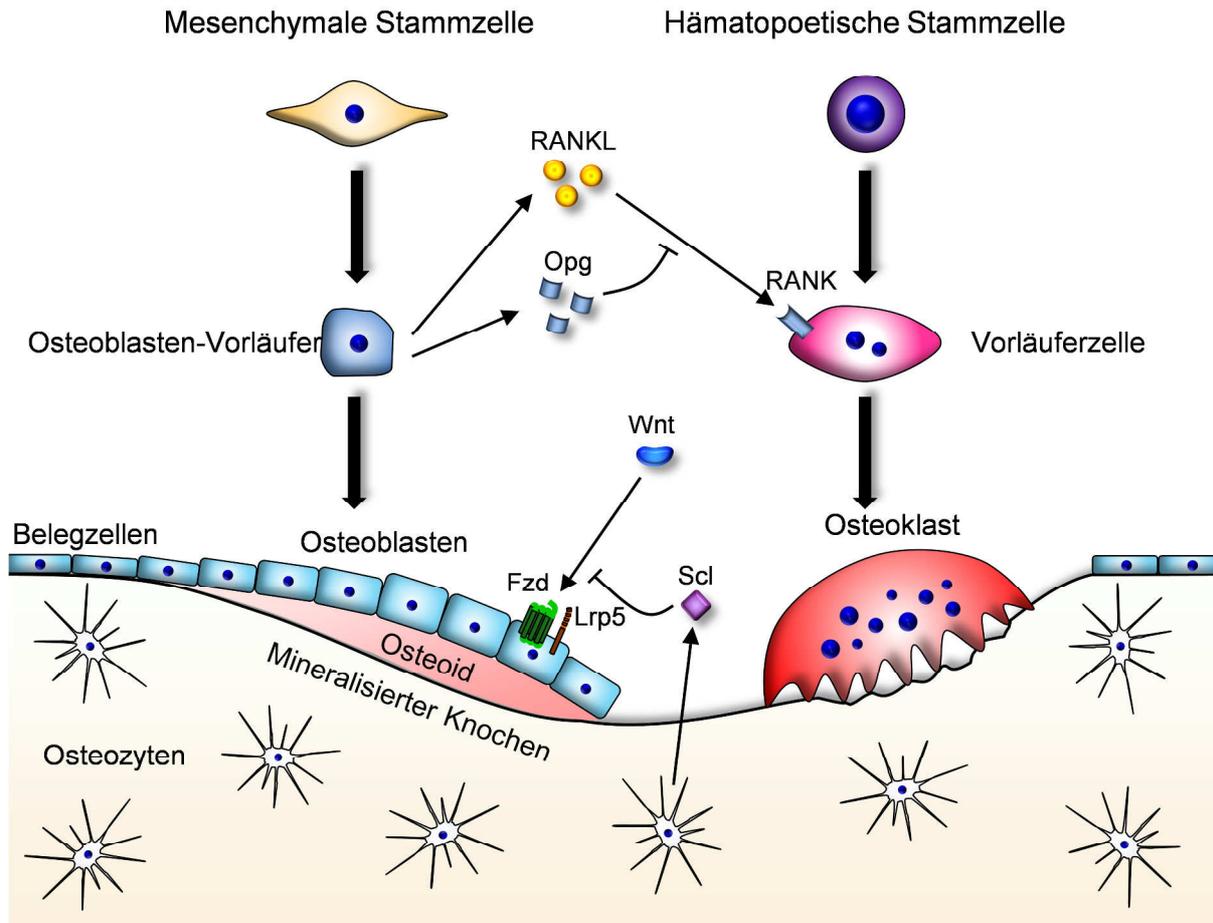


**Abbildung 2: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus eines Knochens. A:** Makroskopische Morphologie und vergrößerte Ansicht der Kortikalis. Die Spongiosa im Inneren des Knochens ist von einer dichten Knochenschicht, der Kortikalis umgeben. In größeren Wirbeltieren ist diese von Osteonen durchzogen, die über Havers-Kanäle, in denen sich Blutgefäße und Nerven befinden, die Versorgung des Gewebes gewährleisten. **B:** Mikroskopische Morphologie und Darstellung der molekularen Zusammensetzung der strukturgebenden Elemente. In einem Osteon befinden sich Osteozyten in Lakunen, die über Canaliculi mit anderen Zellen verbunden sind. Dieses Netzwerk durchzieht den mineralisierten Knochen, der hauptsächlich aus Kollagenfasern mit eingelagerten Hydroxylapatit-Kristallen besteht. Die Kollagenfasern bestehen aus über Crosslinks quervernetzten Kollagen-Fibrillen, die wiederum aus einzelnen Kollagen-Molekülen zusammengesetzt sind. Angepasst nach Nalla, 2006<sup>[2]</sup>.

Das Knochengewebe muss hohen mechanischen Ansprüchen genügen und einerseits eine adäquate Steifigkeit aufweisen aber andererseits auch die Fähigkeit besitzen Energie aus elastischen und plastischen Verformungen zu absorbieren ohne sofort Schaden zu nehmen<sup>[15]</sup>. Neben der makroskopischen Struktur und der Mikroarchitektur wird dieser Kompromiss durch die molekulare Zusammensetzung der Knochenmatrix gewährleistet. Diese besteht aus einer organischen Matrix und einer, je nach erforderlichem Härtegrad variablen, mineralischen Komponente<sup>[16]</sup>. Die organische Knochenmatrix, die im nicht mineralisierten Zustand Osteoid genannt wird, besteht zum Großteil aus Typ I-Kollagen<sup>[17]</sup>. Die einzelnen Kollagen-Fasern werden zur weiteren Steigerung der mechanischen Eigenschaften durch Crosslinks vernetzt, bei denen es sich um enzymatisch und nicht-enzymatisch generierte, molekulare Querverbindungen handelt<sup>[18]</sup>. Weiter Bestandteile des Osteoids sind Typ V-Kollagen, Proteoglykane sowie Proteine die teilweise auch als Signalmoleküle fungieren wie Osteocalcin, Osteopontin, Osteonectin, Bone Sialoprotein und weitere<sup>[19]</sup>. Diese organische Matrix reift zu mineralisiertem Knochen, indem sich Hydroxylapatit-Kristalle ( $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) einlagern die ca. 65 % der Knochenmasse ausmachen können<sup>[17]</sup>. Der so entstandene Knochen weist die erforderlichen mechanische Eigenschaften auf und zeichnet sich durch eine Zugfestigkeit (1700 kg/cm<sup>2</sup>) und Biegesteifigkeit (1800 kg/cm<sup>2</sup>) aus, die respektive Kupfer und Flusstahl entsprechen<sup>[20]</sup>. Auch die Druckfestigkeit ist mit über 1500 kg/cm<sup>2</sup> sehr hoch und dennoch ist der Knochen mit einer Elastizität von ca. 130000 kg/cm<sup>2</sup> ausreichend flexibel<sup>[20]</sup>.

#### **2.2.1.4 Knochengeweberemodellierung**

Da das Skelettsystem ein zum Teil aus anorganischem Material bestehendes Stützgewebe ist, das mitunter erheblichen mechanischen Belastungen ausgesetzt wird, würde es trotz der herausragenden mechanischen Eigenschaften mit der Zeit zur Materialermüdung durch beispielsweise Mikrofrakturen kommen, wenn der Organismus diesem Effekt nicht mit einem kontinuierlichen Umbau des Knochens, der Knochengeweberemodellierung entgegenwirken würde. Bei diesem Prozess wird in erwachsenen Menschen ca. 10 % der Gesamtknochenmasse pro Jahr ausgetauscht<sup>[21]</sup>. Die Knochengeweberemodellierung wird durch BMUs (Bone Multicellular Units) vermittelt<sup>[22]</sup>. BMUs sind Verbände aus Zellen die primär aus zwei Zelltypen bestehen, den Knochen bildenden Osteoblasten und die Knochen resorbierenden Osteoklasten<sup>[23]</sup>. Letztere bauen alte Knochenmatrix ab, bevor diese von Osteoblasten durch neue ersetzt werden kann. Die Kinetik dieser beiden Vorgänge unterscheidet sich deutlich, da der Abbau viel schneller vorstättengehen kann als die Bildung von neuem Osteoid und der anschließenden Mineralisation<sup>[24,25]</sup>. Aus diesem Grund erfordert dieser Mechanismus ein komplexes Kontroll-und Regulationssystem. Dies besteht zum einen aus dem numerischen Verhältnis der beiden Zelltypen zueinander, so kommt auf jeden Osteoklasten ein ganzes Feld an aktiven Osteoblasten, zum anderen muss auch eine strikte Koordination der räumlichen und zeitlichen Aktivität der Zellen erfolgen. Hierbei spielen einige Signalwege eine wichtige Rolle, bei denen insbesondere das Receptor Activator of NF-κB Ligand (RANKL)-Osteoprotegerin (Opg)-System zur Kontrolle der Osteoklasten sowie die Modulation der Osteoblastenaktivität über den Wnt-Signalweg hervorzuheben ist, auf den später näher eingegangen wird<sup>[26]</sup>. Bei der Osteoporose ist eben dieses Gleichgewicht aus Knochen Ab-und Aufbau zu Gunsten des Abbaus verschoben, wodurch es in der Summe zu einem Knochenmasse Verlust kommt<sup>[27]</sup>.



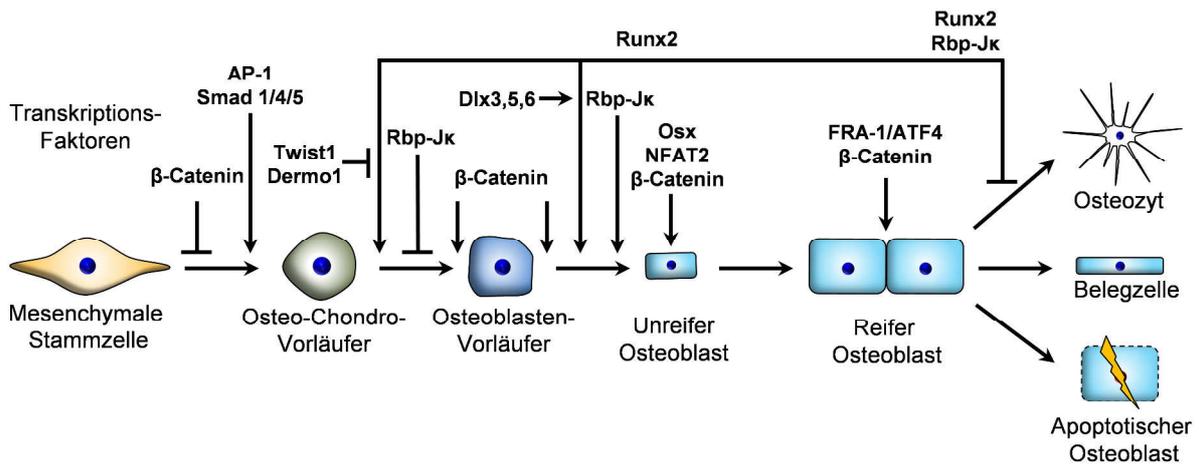
**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Knochengeweberemodellierung mit beteiligten Zellen und Signalmolekülen.** Osteoblasten differenzieren aus mesenchymalen Vorläuferzellen und produzieren Osteoid, das später mineralisiert und den mineralisierten Knochen darstellt. Die Aktivität der Osteoblasten kann unter anderem durch das von Osteozyten sezernierte Sclerostin und durch Wnt Liganden beeinflusst werden. Osteoklasten sind in der Lage Knochenmatrix zu resorbieren. Sie differenzieren aus hämatopoetischen Stammzellen, ein Vorgang der vor allem durch RANKL und Opg reguliert wird. Angepasst nach Yorgan und Schinke, 2014<sup>[3]</sup>.

## 2.2.2 Knochenzellen

### 2.2.2.1 Osteoblasten

Osteoblasten (Obl) sind der Zelltyp, der sich für die Bildung von Knochenmatrix verantwortlich zeichnet. Morphologisch bilden sie in histologischen Schnitten pallisadenförmig aneinandergereihte Zellverbände aus kuboidalen Zellen, die direkt auf der Knochenoberfläche angesiedelt sind und häufig direkt unterhalb der Zellen einen Saum aus Osteoid aufweisen<sup>[14]</sup>. Dieses Bild entsteht dadurch, dass diese Zellen *in vivo* Teil eines zweidimensional ausgebreiteten Zellfeldes sind, das aus bis zu mehreren hundert Osteoblasten bestehen kann, die neue Knochenmatrix produzieren. Osteoblasten entwickeln sich aus mesenchymalen Stammzellen (MSC), aus denen zunächst Osteoprogenitorzellen, anschließend Prä-Osteoblasten und schlussendlich reifen Osteoblasten differenzieren<sup>[22]</sup>. Mesenchymale Stammzellen besitzen die Fähigkeit in ein Reihe weiterer Zelltypen zu differenzieren, wie beispielsweise Adipozyten, Chondrozyten, Fibroblasten und Myoblasten, weshalb die Signale diverser Zytokine und die Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren

erforderlich ist, um die Entwicklung zum Osteoblasten zu gewährleisten<sup>[28]</sup>. Welche Faktoren zu welchem Zeitpunkt die ausschlaggebende Rolle spielen, ist noch nicht vollständig erforscht, da immer wieder neue Signalwege und Faktoren entdeckt werden, die einen Einfluss auf dieses System haben. Dennoch wurden einige essentielle Schritte identifiziert, die für die Differenzierung von Osteoblasten erforderlich sind. Die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweges führt zur Initiierung der Differenzierung zu Osteoprogenitorzellen, die im nächsten Schritt durch die Aktivität des Transkriptionsfaktors Runx-Related Transcription Factor 2 (Runx2) zu Prä-Osteoblasten reifen<sup>[29,30]</sup>. Runx2, auch bekannt unter dem Namen Core-binding Factor Subunit Alpha-1 (Cbfa1), ist in diesem frühen Stadium der Differenzierung von entscheidender Bedeutung, da über seine Ziel-Bindestelle Osteoblast-Specific Element 2 (OSE2) viele weitere osteogene Faktoren und Zytokine transkriptionell aktiviert werden können wie beispielsweise Osteocalcin, Bone-Sialoprotein, alkalische Phosphatase und Bone Morphogenic Proteins (BMP)<sup>[31]</sup>. BMPs stellen die Gruppe der am längsten bekannten und potentesten Zytokine im Kontext der Knochenentstehung dar. Bisher wurden 15 Mitglieder identifiziert und insbesondere für BMP2 konnte gezeigt werden, dass es sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Fähigkeit besitzt, die Differenzierung von MSCs in Richtung Osteoblasten zu fördern und die Bildung von Knochenmatrix zu stimulieren<sup>[32,33]</sup>. Die Differenzierung und Aktivität von Osteoblasten kann nicht nur durch intrinsische sondern auch durch extrinsische Faktoren wie beispielsweise Östrogen<sup>[34]</sup>, Vitamin-D<sub>3</sub><sup>[35]</sup>, Parathormon (PTH)<sup>[36]</sup>, Retinsäure<sup>[37]</sup> und Calcitonin<sup>[38]</sup> moduliert werden. Der Wirkmechanismus von Calcitonin ist hierbei besonders hervorzuheben, da er, ähnlich der Wirkung von PTH auf Osteoklasten, indirekt abläuft. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Calcitonin an einen Rezeptor auf Osteoklasten bindet, die daraufhin weniger Sphingosin-1-Phosphat (S1P) sezernieren, für das wiederum die Osteoblasten die entsprechenden Rezeptoren exprimieren. Somit stellt die Calcitonin-S1P Achse einen potentiellen Kopplungsmechanismus zwischen Osteoblasten und Osteoklasten dar<sup>[38]</sup>. Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor im Verlauf der Osteoblasten-Reifung ist Osterix (auch bekannt als SP7) der zwar zeitlich nach Runx2 aber auch in einem frühen Stadium der Differenzierung aktiv ist. Er ermöglicht die Entwicklung und Proliferation von unreifen Osteoblasten, unterdrückt aber gleichermaßen den Schritt zur Entstehung von reifen Osteoblasten<sup>[39]</sup>. Reife Osteoblasten sind schlussendlich in der Lage Osteoid zu produzieren und die Mineralisation zu regulieren, indem sie vermutlich die extrazelluläre Pyrophosphat-Konzentration lokal modulieren<sup>[40,41]</sup>. Für diesen Prozess ist unter anderem Vitamin-D<sub>3</sub> von entscheidender Bedeutung, da es bei einem Mangel dieses Vitamins zu dramatischen Mineralisationsdefekten des Knochens, der Rachitis, kommt<sup>[42]</sup>.



**Abbildung 4: Stufen der Osteoblasten-Differenzierung und involvierte Transkriptions-Faktoren.** β-Catenin und Runx2 wirken an mehreren Stufen der Differenzierung und haben sowohl stimulierende als auch inhibierende Funktionen. Basierend auf Bellido, 2014<sup>[22]</sup>.

Der Osteoblast kann am Ende seiner Aktivität drei Schicksale erfahren. Die erste Möglichkeit ist, dass er zu einer Belegzelle differenziert, die eine Einzelzellschicht über die gesamte, nicht im Umbau befindliche Knochenoberfläche bilden. Die zweite Möglichkeit ist, dass die Zelle nach Bildung der Knochenmatrix in Apoptose geht. Schlussendlich kann die Zelle auch von der Knochenbildungsfront überholt, also in Osteoid und später in mineralisiertem Knochen eingebettet werden und zu einem Osteozyten differenzieren<sup>[22]</sup>.

### 2.2.2.2 Osteozyten

Osteozyten (Ot) stellen mit 95 % aller Knochenzellen die am häufigsten vertretene Zellart in diesem Gewebe dar<sup>[43]</sup>. Dieser hohe Anteil wird dadurch ermöglicht, dass sich die Osteozyten, im Gegensatz zu Osteoblasten, Belegzellen und Osteoklasten nicht auf der Knochenoberfläche sondern im Inneren der Knochenmatrix befinden. Die Differenzierung zu Osteozyten ist eines von drei möglichen Schicksalen von reifen Osteoblasten<sup>[22]</sup>. Etwa ein Fünftel der Osteoblasten wird von der Mineralisationsfront überholt und in Osteoid eingebettet<sup>[22]</sup>. Erstaunlicherweise ist bisher noch nicht bekannt, welche Vorgänge und Signalwege die Auswahl der Zellen und den Zeitpunkt der Differenzierung festlegen. Das spezielle Erscheinungsbild dieses Differenzierungsmusters, bei dem einzelne Zellen in einem Zellverband sich abweichend von ihren direkten Nachbarn verhalten, zeigt eine große Ähnlichkeit zu dem Mechanismus der lateralen Inhibition, der in der Regel durch Notch-Signale vermittelt wird<sup>[44]</sup>. In Kombination mit der Entdeckung, dass Mutationen im NOTCH2-Gen zu starken Veränderungen des Knochenstoffwechsels in Form von Osteoporose und Acro-Osteolysen führen<sup>[45-47]</sup>, liegt es nahe zu spekulieren, dass Notch-Signale eine wichtige Rolle bei diesem initialen Schritt spielen und somit nachhaltig, auf Grund der regulatorischen Eigenschaften der Osteozyten, den gesamten Knochenstoffwechsel beeinflussen können.

Der Prozess der Osteozyten-Differenzierung an sich zeichnet sich dadurch aus, dass die Zellen ihre Polarität verlieren und ihre Morphologie grundlegend verändern. Diese Umwandlung läuft über mehrere Phasen ab, wobei man den Osteoid-Osteozyten, den mineralisierenden Osteozyten und schließlich den reifen Osteozyten unterscheidet, der sich neben seiner Lage in der Knochenmatrix und seiner Morphologie, vor allem durch die Expression bestimmter Marker-Gene auszeichnet<sup>[43,48]</sup>. So wird zunächst eine gesteigerte Expression von Phosphate Regulating Endopeptidase Homolog, X-linked (PHEX) und Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein (MEPE) beobachtet gefolgt von Dentin Matrix Protein 1 (DMP1) und schlussendlich SOST und Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) in reifen Osteozyten<sup>[43]</sup>. Während dieses Vorganges degeneriert ein Großteil der Zellorganellen während sich Dendriten genannte Zellausläufer bilden. Die Dendriten befinden sich in Canaliculi genannten Kanälen innerhalb der Knochenmatrix und stehen über *Gap Junctions*, an denen insbesondere Connexin 43 beteiligt ist<sup>[49]</sup>, in Kontakt mit den Dendriten anderer Osteozyten, deren Zellkörper sich in etwas größeren Aussparungen in der Knochenmatrix, den Lakunen, befinden<sup>[43]</sup>. Die Dendriten stellen außerdem auch eine direkte Verbindung zu anderen Knochenzellen wie Osteoblasten, Belegzellen und Osteoklasten sowie Zellen des Knochenmarks und Blutgefäßen her<sup>[22]</sup>. Das so entstandene Osteozyten Netzwerk gleicht morphologisch und in der Interkonnektivität einem neuronalen Netzwerk und stellt auf Grund der dreidimensionalen Struktur und der Anzahl und Verzweigungen der Dendriten die größte, direkt für Zellen zugängliche Knochenoberfläche dar<sup>[43]</sup>. Welche Bedeutung dieses Netzwerk für den Organismus hat ist noch nicht endgültig untersucht, inzwischen wurde jedoch festgestellt, dass Osteozyten unentbehrlich für den Knochenstoffwechsel sind, da sie eine Reihe wichtiger Aufgaben erfüllen, auch wenn diese Liste weder vollständig noch endgültig ist. Das Osteozyten-Netzwerk dient zum Beispiel als Mechanosensor, der vermutlich über Strömungen und Scherkräfte an der Zellmembran innerhalb der Canaliculi funktioniert<sup>[50-52]</sup>. Somit können Knochenbereiche, die besonders hohen mechanischen Belastungen ausgesetzt sind, dynamisch an diesen Bedarf angepasst und verstärkt werden. Ähnlich ist auch die Möglichkeit des Netzwerkes Ermüdungserscheinungen im Knochenmaterial zu detektieren. Diese gehen in der Regel mit feinen Rissen im Material einher, den Mikrofrakturen. Da das Osteozyten-Netzwerk den gesamten Knochen durchzieht, wird bei einer solchen Mikrofraktur zwangsläufig auch ein Teil der Zellen beschädigt. Diese Zellen werden je nach Grad der Beschädigung nekrotisch oder apoptotisch und senden damit ein Signal für die umliegenden Osteozyten aus, die Rekrutierung von BMUs in den beschädigten Bereich voranzutreiben, um die alte Knochenmatrix gegen neue auszutauschen<sup>[53,54]</sup>.

Außerdem wird den Osteozyten eine wichtige Rolle bei der Regulation der Knochengeweberemodellierung zugeschrieben, da sie einerseits in der Lage sind Osteoprotegerin (Opg) und Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL) zu produzieren<sup>[55,56]</sup>, die über die RANKL-Opg Achse die Osteoklasten-Aktivität modulieren können. Andererseits haben immunhistochemische

Untersuchungen gezeigt, dass sie die Hauptquelle für Sclerostin darstellen<sup>[57]</sup>, einem potentiellen Wnt-Signal Inhibitor, der die Osteoblasten negativ reguliert<sup>[58]</sup>. Auch die Mineralisation der Knochenmatrix kann durch Osteozyten beeinflusst werden, da diese das Hormon FGF23 produzieren<sup>[59]</sup>. FGF23 wirkt hauptsächlich in der Niere, wo es den Phosphathaushalt reguliert. Der Phosphatspiegel wiederum ist ein entscheidender Faktor in der Entstehung von Hydroxylapatit-Kristallen<sup>[59,60]</sup>.

Weitere Funktionen die für das Osteozyten-Netzwerk postuliert worden sind, beinhalten die Osteozytenosteolyse, bei der bei erhöhtem Mineralbedarf (z.B. während der Laktation) größere Mengen Calcium und Phosphat innerhalb kürzester Zeit über die große Oberfläche des Netzwerkes freigesetzt werden können<sup>[61]</sup>. Möglicherweise ist das Netzwerk auch in der Osteoidreifung involviert<sup>[62]</sup>.

### **2.2.2.3 Osteoklasten**

Osteoklasten (Ocl) sind mit Ausnahme von Osteozyten im Kontext der Osteozytenosteolyse die einzigen Zellen im Körper, die in der Lage sind mineralisierten Knochen zu resorbieren. Osteoklasten differenzieren aus hämatopoetischen Progenitorzellen, die sich zunächst zu Monozyten/Makrophagen-Vorläuferzellen entwickeln. Erhalten diese Zellen die entsprechenden Signale, fusionieren sie zu Osteoklasten, die somit ihre ungewöhnliche Morphologie erhalten<sup>[63]</sup>. Diese zeichnet sich zum einen durch die, für eine Zelle, enorme Größe von bis zu 100µm und zum anderen durch die multiplen Zellkerne aus<sup>[64]</sup>. Die Entstehung von Osteoklasten wird im Wesentlichen von zwei Faktoren dominant beeinflusst. Ein essentielles Zytokin ist M-CSF (macrophage colony stimulating factor), welches die Proliferation und das Überleben der Vorläuferzellen ermöglicht<sup>[65]</sup>. Bei dem zweiten Zytokin handelt es sich um RANKL (Receptor activator of NF-κB Ligand), das die Zellfusion stimuliert und die weitere Differenzierung vorantreibt<sup>[66]</sup>. In der Tat ist eine Kombination dieser beiden Faktoren ausreichend um auch *in vitro* Osteoklasten aus Knochenmarkszellen zu differenzieren<sup>[64]</sup>. Auch die Regulation der Osteoklasten-Differenzierung erfolgt somit hauptsächlich über die RANKL-Opg Achse<sup>[67]</sup>. RANKL wird primär von Osteoblasten und Osteoblasten-Vorläufern gebildet, die in der Lage sind es sowohl zu sezernieren, als auch auf der Zelloberfläche zu präsentieren, wodurch ein parakriner und juxtakriner Wirkmechanismus zur Verfügung stehen<sup>[67]</sup>. Die Produktion beziehungsweise Sekretion von RANKL durch Osteoblasten wird beispielsweise durch Wnt-Signale<sup>[26,68]</sup> und das Parathormon<sup>[69]</sup> reguliert. Dieses Hormon dient dazu, die Bereitstellung von Calcium aus dem Knochen anzuregen, wofür die Aktivität von Osteoklasten notwendig ist<sup>[70]</sup>. Jedoch exprimieren diese selbst keinen Rezeptor für PTH, und sind somit auf die Signalweiterleitung über Osteoblasten angewiesen<sup>[71]</sup>. Hierdurch können Osteoblasten als Integrationspunkt von diversen Signalen wie beispielsweise auch Wnt-Signalen dienen, die eine

präzise Regulation der Osteoklasten ermöglichen<sup>[70]</sup>. Zu diesem Zweck produzieren Osteoblasten und auch Osteozyten das Protein Osteoprotegerin das als Gegenspieler von RANKL fungiert. Im Detail handelt es sich bei Opg um ein Protein, das nahe mit RANK, dem Rezeptor für RANKL, verwandt ist, der auf Osteoklasten exprimiert wird<sup>[67]</sup>. Opg ist eine lösliche Form dieses Rezeptors, der in der Lage ist an RANKL zu binden und dieses somit abzufangen, bevor es seine Wirkung auf die Osteoklasten ausüben kann<sup>[64]</sup>. Die Menge des zur Verfügung stehenden, aktiven RANKLs wird somit nicht nur durch die Expression von RANKL selbst, sondern vor allem durch das Verhältnis von Opg zu RANKL beeinflusst.

Die Resorption der Knochenmatrix durch Osteoklasten erfolgt dadurch, dass der Osteoklast zunächst auf der dem Knochen zugewandten Seite intrazellulär einen Aktinring bildet<sup>[72]</sup>. Im Bereich dieses Ringes erfolgt anschließend eine dichte Bindung der Zelle an die Knochenmatrix, die über Integrin-Rezeptoren ( $\alpha_v\beta_3$ ) erfolgt, die mit Osteopontin und Bone Sialoprotein interagieren, bei denen es sich um Bestandteile des organischen Anteils der Knochenmatrix handelt<sup>[73]</sup>. Durch das Ausbilden dieser sogenannten *sealing zone* wird die direkt unterhalb des Osteoklasten liegende Knochenoberfläche völlig vom restlichen extrazellulären Raum abgeschirmt und bildet ein eigenes Kompartiment, die Resorptionslakune<sup>[72]</sup>. Im Bereich des durch die *sealing zone* begrenzten Areal kommt es zu Ausstülpungen der Osteoklasten-Zellmembran, die auf Grund des morphologischen Erscheinungsbildes in histologischen Schnitten als *ruffled border* bezeichnet wird. Diese Veränderung hat eine Oberflächenvergrößerung zur Folge, die der effizienteren Sezernierung der für die Resorption benötigten Substanzen dient<sup>[64]</sup>.

Die Resorption selbst erfolgt über zwei Prinzipien. Zunächst wird die Resorptionslakune angesäuert, indem Protonenpumpen und Chloridkanäle wie Chloride Channel, Voltage-Sensitive 7 (Clcn7)  $H^+$ - und  $Cl^-$ -Ionen über die Zellmembran transportieren<sup>[74]</sup>. Die so sezernierte Salzsäure senkt den pH Wert in der Lakune auf ca. 4,5<sup>[64]</sup>. In diesem sauren Milieu löst sich das als Hydroxylapatit vorliegende Calciumphosphat, das den Hauptbestandteil der mineralischen Phase der Knochenmatrix ausmacht. Die in Lösung gegangenen  $Ca^{2+}$ - und  $PO_4^{3-}$ -Ionen können vom Osteoklasten aufgenommen und auf der der Knochenoberfläche abgewandten Seite an den Organismus abgegeben werden<sup>[75]</sup>. Der organische Anteil der Knochenmatrix wird abgebaut, indem der Osteoklast lysosomale Enzyme in die Resorptionslakune sezerniert. Diese Proteasen sind nur bei sauren pH-Werten aktiv und sind somit in ihrer Aktivität auf den zu resorbierenden und nach außen versiegelten Bereich beschränkt. Eines dieser Enzyme ist Cathepsin K, das sich für den Abbau von Typ-I Kollagen, der Hauptkomponente der organischen Matrix des Knochens, verantwortlich zeichnet<sup>[76]</sup>. Weitere an diesem Prozess beteiligte Enzyme sind diverse andere Cathepsine (B,C,D,E,G und L)<sup>[77]</sup>, Matrix-Metalloproteasen, insbesondere MMP-9<sup>[78]</sup> und MMP-13<sup>[79]</sup> sowie das Enzym Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). Bei TRAP

handelt es sich um eines der wichtigsten Erkennungsmerkmale der Osteoklasten, da sie relativ spezifisch in ihnen exprimiert wird und auf Grund ihrer hohen Resistenz gegenüber Denaturierung auch in fixierten Proben mit einer, auf ihrer Enzymaktivität basierten, Färberaktion nachgewiesen werden kann<sup>[80]</sup>. Dies dient der Identifizierung auf zellulärer Ebene aber auch zur Analyse der allgemeinen Osteoklasten-Aktivität. Die physiologische Funktion von TRAP ist noch nicht eindeutig geklärt, es wird jedoch vermutet, dass das Enzym reaktive Sauerstoffspezies generiert, die in die Resorptionslakune abgegeben werden und die die Degradation der Knochenmatrix unterstützen<sup>[81]</sup>. Bei diesem Abbau werden einige Fragmente der Knochenmatrix freigesetzt, die als Signalmoleküle zur Koordination der Knochengeweberemodellierung dienen können<sup>[82]</sup>, beziehungsweise, wie im Falle der Crosslaps, als klinischer Serum-Parameter zur Analyse der Knochenresorption geeignet sind<sup>[83]</sup>.

#### **2.2.2.4 Belegzellen**

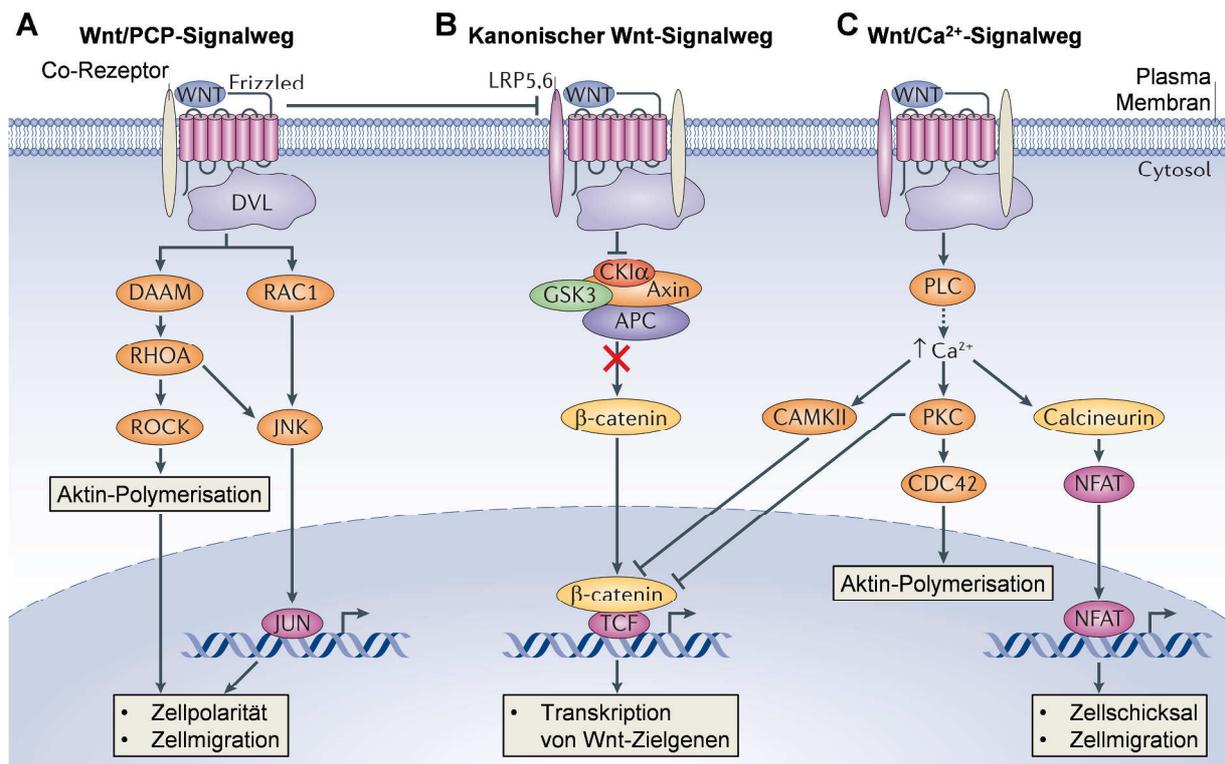
Ein Teil der Osteoblasten differenziert zu Belegzellen, die die gesamte Knochenoberfläche, die sich nicht im aktiven Umbau befindet, Epithel-artig abdecken<sup>[84]</sup>. Die Funktion dieser Zellen konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, jedoch wird vermutet, dass sie einerseits die Interaktion von Knochenmarkszellen und Osteoklasten-Vorläufern mit der Knochenmatrix verhindern und andererseits in der Lage sind, den Knochen auf die Resorption vorzubereiten, indem sie die winzige Osteoid-Schicht, die sich immer an der Knochenoberfläche befindet, anverdauen und somit den blanken, mineralisierten Knochen freilegen<sup>[85,86]</sup>. Des Weiteren bilden die Belegzellen eine Art Baldachin über Bereiche aktiver Knochengeweberemodellierung, wodurch ein Kompartiment entsteht, das möglicherweise die effektivere Anreicherung von Zytokinen und Signalstoffen erlaubt<sup>[87]</sup>. Hinzu kommt, dass gezeigt werden konnte, dass die Belegzellen, die diese Baldachin-Struktur bilden, in der Lage sind RANKL zu exprimieren und somit potentiell die Osteoklasten in der BMU über direkte Zell-Zell-Interaktionen beeinflussen<sup>[88]</sup>.

### **2.2.3 Signalwege**

#### **2.2.3.1 Wnt-Signalweg**

Der Wnt-Signalweg ist einer der evolutiv ältesten Signaltransduktionswege zur interzellulären Kommunikation. Er wurde in einem breiten Spektrum an Organismen nachgewiesen, das sich von Schwämmen über Insekten bis hin zu allen Wirbeltierspezies erstreckt. Der Wnt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, wo er unter anderem an der Festlegung der Körperachse und der Entstehung vieler Organe beteiligt ist, wie beispielsweise dem zentralen Nervensystem, dem Verdauungstrakt, der Lunge, den Nieren und den Eierstöcken. Auf zellulärer Ebene findet hierbei meist eine Beeinflussung der Differenzierung, Proliferation, Polarität, Apoptose und Migration bestimmter Zelltypen statt<sup>[89]</sup>. Diese Prozesse sind auch bei der Erhaltung der Gewebe-

Homöostase im ausgewachsenen Organismus von entscheidender Bedeutung. Zu diesen Geweben gehört auch das Skelettsystem, bei dem vor allem Osteoblasten und deren Vorläufer von Wnt-Signalen beeinflusst werden können<sup>[90]</sup>. Wnt-Signalmoleküle stellen eine Familie löslicher, lipidmodifizierter Glykoproteine mit 350-400 Aminosäuren Länge dar<sup>[91]</sup>, von denen in Mensch und Maus bisher 19 Mitglieder identifiziert worden sind<sup>[89]</sup>. Historisch wurde das erste Wnt-Gen 1982 unter dem Namen *Int-1* in Kontext einer Studie an Mäusen identifiziert, in der gezeigt werden konnte, dass eine Aktivierung des Gens zu einer erhöhten Brustkrebs-Inzidenz führt<sup>[92]</sup>. Ebenfalls 1982 und unabhängig von der Entdeckung des Gens *Int-1* wurde das Gen *Wingless* in *Drosophila melanogaster* identifiziert<sup>[93]</sup>. Da sich später herausstellte, dass es sich bei beiden um das gleiche Gen handelte, wurde dessen Name zu *Wnt* zusammengefasst. Ebenfalls historisch bedingt ist die Unterteilung in einen kanonischen und einen nicht-kanonischen Signalweg. Ursprünglich erfolgte die Einteilung anhand der Fähigkeit eines Wnt-Liganden in C57MG-Zellen eine maligne Transformation zu induzieren<sup>[94]</sup>. Hierbei wurden die Liganden Wnt1, Wnt3, Wnt3a, Wnt7a zu den kanonischen und Wnt2, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b und Wnt6 zu den nicht-kanonischen gezählt. Inzwischen bezieht sich diese Unterscheidung auf den intrazellulär aktivierten Signalweg.



**Abbildung 5: Kanonische und nicht-kanonische Wnt-Signalwege.** **A:** Wnt/PCP-Signalweg. Ein Wnt-Ligand bindet an einen Fzd-Rezeptor zusammen mit einem Co-Rezeptor. Auf die Rekrutierung von Dvl folgt eine Komplexbildung mit DAAM1 und RAC1. DAAM1 kann über das kleine G-Protein Rho die Kinase ROCK aktivieren, die wiederum die Aktin-Polymerisation beeinflusst. RAC1 aktiviert JNK die ebenfalls über Jun Proto-Oncogene (JUN) die Aktin-Polymerisation regulieren kann. **B:** Kanonischer Wnt-Signalweg. Ein Wnt-Ligand bindet an einen Fzd-Rezeptor zusammen mit einem LRP Co-Rezeptor. Die Rekrutierung von Dvl hat die Inhibition des Inaktivierungskomplexes zur Folge wodurch  $\beta$ -Catenin akkumuliert, in den Nukleus transloziert und dort als Co-Aktivatoren der Transkriptionsfaktoren TCF und Lef dient. **C:** Wnt/Ca<sup>2+</sup>-Signalweg. Ein Wnt-Ligand bindet an einen Fzd-Rezeptor und es kommt in weiterer Folge zur Aktivierung von PLC. Über

Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) wird ein Ca<sup>2+</sup>-Signal ausgelöst, das CAMKII, Protein Kinase C (PKC) und Calcineurin aktiviert. Diese regulieren unter anderem die Zellmigration. Angepasst nach Niehrs, 2012<sup>[95]</sup>.

### 2.2.3.1.1 Kanonischer Wnt-Signalweg

Der kanonische Wnt-Signalweg basiert auf der Akkumulation von  $\beta$ -Catenin. Im ruhenden Zustand wird  $\beta$ -Catenin kontinuierlich gebildet und durch einen Inaktivierungskomplex phosphoryliert, der aus den Untereinheiten Axis Inhibition Protein (Axin), Adenomatous Polyposis Coli (APC), Glycogen Synthase Kinase 3 beta (GSK3 $\beta$ ) und Casein Kinase 1, alpha (CK1 $\alpha$ ) besteht<sup>[96]</sup>. Diese Phosphorylierung ist ein Signal, das zur proteosomalen Degradation von  $\beta$ -Catenin führt<sup>[89]</sup>. Bindet ein Wnt-Signalprotein an einen in der Zellmembran befindlichen G-Protein gekoppelten Rezeptor der Frizzled (Fzd) Familie, kann sich ein Rezeptor-Komplex bilden<sup>[97]</sup>. Neben einem der 10 bisher identifizierten Frizzled- Rezeptoren<sup>[98]</sup> ist ein Co-Rezeptor aus der Familie der Lrps (Low density lipoprotein receptor-related protein) erforderlich<sup>[99-101]</sup>. Die Aktivierung des Rezeptorkomplexes hat eine Rekrutierung von Dishevelled (Dvl) zur Plasmamembran zur Folge, das wiederum in der Lage ist den Inaktivierungskomplex zu inhibieren<sup>[96]</sup>. In der weiteren Folge kann  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma akkumulieren und in den Nukleus translozieren, wo es als Co-Aktivatoren für die Transcription Factor (T-Cell Specific, HMG-Box) (TCF)/Lymphoid Enhancer-Binding Factor (Lef)-Transkriptionsfaktoren dient<sup>[102,103]</sup>.

### 2.2.3.1.2 Nicht-kanonische Wnt-Signalwege

Die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege umfassen mehrere Signaltransduktionsmöglichkeiten, die sich gravierend vom kanonischen Signalweg unterscheiden. Der Wnt/Ca<sup>2+</sup>-Signalweg wird ebenfalls durch Bindung eines Wnt-Liganden an einen Fzd-Rezeptor initialisiert. Jedoch kommt es hier in der weiteren Folge zur Aktivierung von Phospholipase C (PLC)<sup>[104]</sup>. Dies resultiert in einer Erhöhung des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegels, wodurch weitere Elemente der Signalkaskade aktiviert werden<sup>[105]</sup>. Dieser Signalweg hat nach bisherigem Stand des Wissens vor allem im Kontext der embryonalen dorsoventral-Entwicklung und der Zellmigration eine entscheidende Bedeutung<sup>[106]</sup>.

Die Aktivierung des Wnt/PCP (*Planar Cell Polarity*)-Signalweges erfolgt über einen Fzd-Rezeptor und statt eines Lrps, einer Rezeptortyrosinkinase, wie beispielsweise Receptor Tyrosine Kinase-Like Orphan Receptor 2 (ROR2)<sup>[107]</sup>, Protein Tyrosine Kinase 7 (PTK7)<sup>[108]</sup> und (Neurotrophin Receptor Homolog) NRH1<sup>[109]</sup> als Co-Rezeptor. Auf die Rekrutierung von Dvl folgt in diesem Fall eine Komplexbildung mit Dishevelled Associated Activator of Morphogenesis 1 (DAAM1) und Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1 (RAC1). Dies führt in der weiteren Folge zur Aktivierung der Kinasen Rho Kinase (ROCK) und c-Jun N-Terminal Kinase (JNK), die das Zytoskelett und die Aktinpolymerisierung regulieren können<sup>[104,105,110]</sup>. Daher spielt der Wnt/PCP Signalweg eine wichtige Rolle in der Zellpolarität und Zellmigration. Im Kontext des Skelettsystems ist dieser

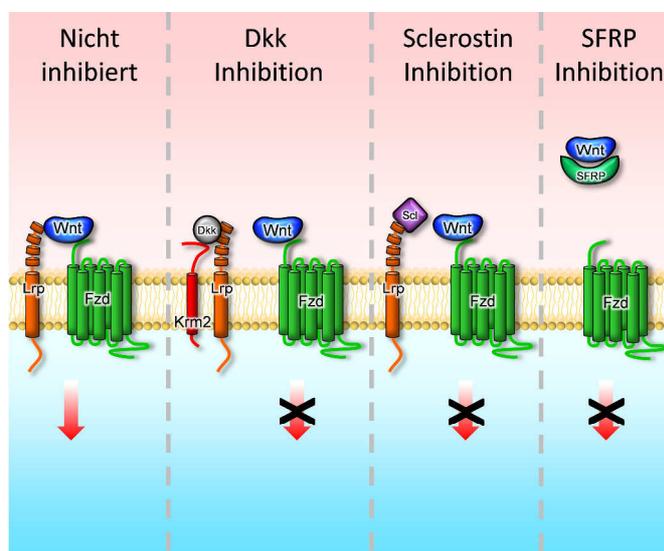
Signalweg von Bedeutung, da er die Ausrichtung der Zellpolarität der Chondrozyten in der Wachstumsfuge reguliert und somit für das Längenwachstum des Knochens essentiell ist<sup>[111,112]</sup>.

### 2.2.3.1.3 Modulation der Wnt-Signale

Diese Signalwege stellen jedoch keine in sich abgeschlossenen Systeme dar und so kann es zu Überschneidungen der Wnt-Signalwege untereinander aber auch mit gänzlich anderen zellulären Signalkaskaden, wie BMP- und Retinsäure-Signalen kommen, die eine Modulation der Zellantwort zur Folge haben<sup>[113,114]</sup>. Wnt-Signale können auch bereits außerhalb der Zelle moduliert werden. Dies ist, insbesondere mit Hinblick auf die Wirkstoffentwicklung, ein besonders interessantes Feld, da jede Membran ein erhebliches Hindernis für solche Moleküle darstellt und der Extrazellulärraum pharmakologisch somit viel besser erreichbar ist, als das Zytoplasma.

Eine Möglichkeit die Aktivierung des Wnt-Signalweges zu verhindern, ist die Bildung des Rezeptorkomplexes zu blockieren. Dickkopf (Dkk)-Moleküle können mit dem Rezeptor Kremen2 (Krm2) interagieren und einen trinären Komplex mit Lrp-Co-Rezeptoren bilden, wodurch diese nicht länger zur Bildung des Wnt-Rezeptorkomplexes zur Verfügung stehen<sup>[115-118]</sup>. Ein ähnlicher Wirkmechanismus wird auch dem hauptsächlich von Osteozyten produzierten Sclerostin zugeschrieben, das mutmaßlich an die erste extrazellulären  $\beta$ -Propeller-Domäne der Lrps bindet, wobei in diesem Fall eine Interaktion mit Krm2 nicht erforderlich ist<sup>[119-121]</sup>. Jedoch gibt es hierfür, vor allem im Kontext des Knochenstoffwechsels, keine eindeutigen *in vivo* Belege, weshalb ein Schwerpunkt dieser Arbeit auch auf diese Interaktion gerichtet wurde.

Eine weitere Methode die Wnt-Signale zu antagonisieren wird durch SFRPs (secreted Fzd-related proteins) ermöglicht. Diese sind strukturell den membrangebundenen Fzd-Rezeptoren ähnlich, sind im Gegensatz zu diesen aber löslich und können somit die Wnt-Moleküle im Extrazellulärraum binden und abfangen, bevor diese die Zelle erreichen<sup>[122]</sup>.



**Abbildung 6: Modulation der Wnt-Signale.** Das nicht inhibierte Signal basiert auf der Interaktion eines Wnt-Liganden mit einem Rezeptor aus der Frizzled-Familie und einem Co-Rezeptor aus der Lrp-Familie. Dkk-Moleküle können das Signal inhibieren, indem sie einen trinären Komplex mit Krm2 und dem Lrp Co-Rezeptor bilden, wodurch dieser nicht mehr für die Interaktion mit dem Wnt-Liganden zur Verfügung steht. Ähnlich funktioniert auch der für Sclerostin postulierte Wirkmechanismus, nur das Krm2 nicht erforderlich ist. Wnt-Liganden können auch durch SFRPs abgefangen werden, bevor dieser überhaupt den Frizzled-Rezeptor erreichen. Angepasst nach Yorgan und Schinke, 2014<sup>[3]</sup>.

#### 2.2.3.1.4 Bedeutung des Wnt-Signalwegs im Knochenstoffwechsel

Heutzutage werden Wnt-Signale als zentrale Komponente der Regulation des Knochenstoffwechsels angesehen<sup>[90]</sup>. Sie fördern die Differenzierung von Osteoblastenvorläufern in Richtung Osteoblasten<sup>[123]</sup> und unterdrücken die Differenzierung in Richtung Adipozyten durch Inhibierung des Transkriptionsfaktors Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma (PPAR $\gamma$ )<sup>[124]</sup>. Auch in reifen Osteoblasten und Osteozyten spielen Wnt-Signale eine wichtige Rolle, da sie einerseits die Aktivität der Osteoblasten selbst regulieren können, aber auch die Opg-Produktion und somit indirekt die Osteoklasten-Reifung beeinflussen können<sup>[68,125]</sup>. Hinzukommt, dass Osteoklasten auch direkt durch Wnt-Signale reguliert werden können<sup>[126-128]</sup>. Dass Wnt-Signale nicht nur in der Embryonalentwicklung des Knochens, sondern auch im Kontext des Knochenstoffwechsels eine wichtige Rolle spielen, zeigte sich erstmals in den 90er Jahren des vergangenen Jahrhunderts. Durch das Aufkommen der entsprechenden molekularbiologischen Techniken wurde es erstmals möglich, menschliche Krankheiten in Verbindung mit bestimmten chromosomalen Regionen oder sogar einzelnen Genen zu bringen. So kam es, dass der chromosomale Bereich 11q13 mit zwei scheinbar unabhängigen Störungen der Knochengeweberemodellierung assoziiert wurde<sup>[129,130]</sup>. Eine dieser Störungen war das autosomal rezessiv vererbte Osteoporose Pseudoglioma Syndrom (OPPG), das sich durch eine geringe Knochenmasse sowie einem erhöhten Frakturrisiko auszeichnet<sup>[131]</sup>. Die andere Störung folgte einem autosomal dominanten Vererbungsverlauf und wurde auf Grund der typischen Verdickung der Knochen als *High Bone Mass*(HBM), also hohes Knochenmasse Syndrom bezeichnet<sup>[130]</sup>. Da HBM sich nicht nur durch eine erhöhte Knochenformationsrate auszeichnete, sondern diese auch zu einem verringerten Frakturrisiko führte, kam die Hypothese auf, dass beide Störungen, die ein völlig gegensätzliches Erscheinungsbild zeigten, möglicherweise auf Mutationen im selben Gen zurück zu führen seien. In der Tat konnte diese Hypothese bestätigt werden, als 2001 gezeigt wurde, dass inaktivierende Mutation im Gen LRP5 OPPG verursachen<sup>[132]</sup> und aktivierende Mutation im selben Gen HBM zur Folge haben<sup>[133,134]</sup>. Des Weiteren lieferten diese Untersuchungen auch eine elegante Erklärung für den Mechanismus der aktivierenden Mutationen. Diese waren im extrazellulären Bereich des Lrp5 Co-Rezeptors lokalisiert, von dem bekannt war, dass er für die Bindung der Wnt-Antagonisten der Dkk-Familie verantwortlich war<sup>[135]</sup>. Somit verhinderten diese Mutationen die negative Regulation des Wnt-Signals. Da dieser Rezeptorkomplex einen solch starken Einfluss auf die Knochenbildung hatte und zusätzlich für potentielle Wirkstoffe gut erreichbar war, wurde er in der Folge dieser Entdeckung zu einem Schwerpunkt der Forschung im Knochenfeld. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden viele Aspekte des Wnt-Signalweges auf ihren Einfluss auf den Knochenstoffwechsel analysiert<sup>[90]</sup>. Eine Zusammenfassung der Gene des Wnt-Signalweges, von

denen gezeigt werden konnte, dass sie im Rahmen der Knochengeweberemodellierung eine Rolle spielen, ist in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1: Komponenten des Wnt-Rezeptorkomplexes mit einer Rolle im Knochenstoffwechsel.**

Gruppe	Gen	Rolle im Knochenstoffwechsel	Organismus	Referenzen
Wnt-Liganden	<i>Wnt1</i>	Fördert Knochenbildung und Mineralisation	Mensch, Nager	[136-139]
	<i>Wnt3a</i>	Assoziiert mit Knochenmasse (SNP-Screen), unterdrückt Obl Differenzierung ( <i>in vitro</i> )	Mensch	[140,141]
	<i>Wnt5a</i>	Fördert Obl Differenzierung ( <i>in vitro</i> & <i>in vivo</i> )	Mensch, Nager	[142,143]
	<i>Wnt7b</i>	Induziert Obl Differenzierung ( <i>in vitro</i> )	Nager	[144]
	<i>Wnt10b</i>	Fördert Knochenbildung ( <i>in vitro</i> & <i>in vivo</i> )	Nager	[125,145,146]
	<i>Wnt16</i>	Assoziiert mit Knochenmasse (GWAS)	Mensch	[147,148]
Fzd-Rezeptoren	<i>Fzd8</i>	Inhibiert Ocl Differenzierung ( <i>in vitro</i> & <i>in vivo</i> )	Nager	[126]
	<i>Fzd9</i>	Fördert Knochenbildung und Heilung ( <i>in vitro</i> & <i>in vivo</i> )	Nager	[149,150]
Lrp-Co-Rezeptoren	<i>Lrp4</i>	Assoziiert mit Knochenmasse (GWAS), fördert Knochenbildung, Sost & Dkk1 Rezeptor ( <i>in vitro</i> & <i>in vivo</i> )	Mensch, Nager	[151-153]
	<i>Lrp5</i>	Fördert Knochenbildung, Wnt Co-Rezeptor ( <i>in vitro</i> & <i>in vivo</i> )	Mensch, Nager	[132,133,154-158]
	<i>Lrp6</i>	Assoziiert mit Knochenmasse (GWAS), unterdrückt Knochenresorption, fördert Knochenbildung, Wnt Co-Rezeptor ( <i>in vitro</i> & <i>in vivo</i> )	Mensch, Nager	[157,159-161]
Wnt-Anatagonisten	<i>Sfrp1</i>	Unterdrückt Knochenbildung, fördert Obl Apoptose, unterdrückt Ocl Differenzierung ( <i>in vivo</i> & <i>in vitro</i> )	Nager	[162-165]
	<i>Sfrp4</i>	Unterdrückt Knochenbildung ( <i>in vivo</i> )	Nager	[166]
Lrp-Antagonisten	<i>Dkk1</i>	Unterdrückt Knochenbildung ( <i>in vitro</i> & <i>in vivo</i> )	Nager	[167-170]
	<i>Dkk2</i>	Assoziiert mit Knochenmasse (GWAS), fördert Obl Differenzierung ( <i>in vitro</i> & <i>in vivo</i> )	Mensch, Nager	[171-173]
	<i>Krm2</i>	Unterdrückt Knochenbildung, Dkk1 Rezeptor ( <i>in vitro</i> & <i>in vivo</i> )	Nager	[118,174]
	<i>Sost</i>	Unterdrückt Knochenbildung ( <i>in vitro</i> & <i>in vivo</i> )	Mensch, Nager	[55,57,175-177]
	<i>Sost-dc1</i>	Assoziiert mit Knochenmasse (GWAS)	Mensch	[178]
	<i>Wise</i>	Unterdrückt Obl Proliferation ( <i>in vivo</i> )	Nager	[179]

Einige besonders hervorzuhebende Arbeiten sind die Untersuchung der *Lrp5*-defizienten Mäuse, die einen osteoporotischen Phänotyp basierend auf einer verringerten Osteoblasten-Aktivität aufwiesen<sup>[154]</sup> und die Mausmodelle, die äquivalent zu den im Menschen identifizierten, aktivierende *Lrp5*-Mutationen trugen<sup>[156]</sup>. Diese Mäuse zeigten wie erwartet eine erhöhte Knochenmasse auf Grund einer verstärkten Osteoblasten-Aktivität. Zusammen mit den Untersuchungen, die zeigen

konnten, dass Dkk1 *in vivo* einen anti-osteoblastischen Effekt hat<sup>[167,168]</sup>, schien sich klar abzuzeichnen, dass Dkk1 physiologisch wirkt, indem es an die Region mit HBM-Mutationen von Lrp5 bindet und den Co-Rezeptor inhibiert<sup>[180]</sup>.

Jedoch wurde dieser einfache Mechanismus von einigen weiteren Studien in Frage gestellt. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die spezifische Inaktivierung von  $\beta$ -Catenin, der zentralen Komponente des kanonischen Wnt-Signalweges, in reifen Osteoblasten zu keiner Veränderung von deren Aktivität führte<sup>[55,68,181]</sup>. Dies bedeutet wiederum, dass der kanonische Wnt-Signalweg, zumindest in Osteoblasten, nicht für den beobachteten Effekt verantwortlich ist, auch wenn andererseits *in vitro* gezeigt werden konnte, dass Wnt3a in der Lage ist diesen zu aktivieren<sup>[118]</sup>. Somit stellte sich die Frage, ob eventuelle nicht-kanonische Wnt-Signalwege beteiligt sind, oder ob Lrp5 die Knochenformation überhaupt Zell-autonom reguliert, da Lrp5 ubiquitär exprimiert wird. In der Tat wurde basierend auf der Beobachtung, dass *Lrp5*-defiziente Mäuse eine verringerte Osteoblasten-Proliferation *in vivo* aber nicht *in vitro* zeigten, eine Genom-weite Expressions-Analyse durchgeführt, bei der sich herausstellte, dass die *Lrp5*-defizienten Mäuse eine deutlich erhöhte *Tph1*-Expression aufweisen<sup>[182]</sup>. Das Gen *Tph1* kodiert das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der peripheren Serotonin-Synthese und die erhöhte Expression in den *Lrp5*-defizienten Mäusen war vor allem in Zellen des Duodenums zu beobachten. Im weiteren Verlauf dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der bisher beschriebene Phänotyp von aktivierenden und inaktivierenden *Lrp5*-Mutation auftrat, wenn diese genetischen Veränderungen spezifisch in Zellen des Duodenums eingefügt wurden. In Osteoblasten hatten diese jedoch keinen Effekt auf den Knochenstoffwechsel. Überraschenderweise kam eine andere Studie, die alternative Strategien zum Erreichen des gleichen Effekts nutzte, nämlich dem Zelltyp-spezifischen Einfügen von *Lrp5*-Mutationen, zu einem völlig gegensätzlichen Schluss<sup>[155]</sup>. In dieser Arbeit wurde umfassend und überzeugend gezeigt, dass die *Lrp5* Mutationen in Osteozyten, jedoch nicht im Duodenum zu den beobachteten Effekten führten. Auch konnte kein veränderter Serotonin-Spiegel auf Grund der *Lrp5*-Mutationen nachgewiesen werden. Somit ist der Mechanismus, über den Lrp5 den Knochenstoffwechsel kontrolliert, nach wie vor nicht verstanden.

Erschwert werden die Untersuchungen auf diesem Gebiet dadurch, dass viele nah verwandte Gene redundante Funktionen zu haben scheinen. So konnte gezeigt werden, dass *Lrp6*, welches eine hohe Sequenzhomologie zu *Lrp5* aufweist, und auch *Lrp4* ähnliche Effekte wie *Lrp5* auf den Knochenstoffwechsel haben<sup>[119,120,153,161]</sup>. Hinzu kommt, dass es bisher auch nicht möglich war die primär verantwortlichen Wnt-Liganden und Fzd-Rezeptoren zu identifizieren, die mit Lrp5 interagieren könnten. Ein vielversprechende Kandidat ist hierbei unter anderem der Rezeptor Fzd9, dem einzigen aus der Familie, der im Laufe der Osteoblasten-Differenzierung differenziell reguliert

wird und dessen Ablation in Mäusen zu einer verringerten Knochenformationsrate führt<sup>[149]</sup>. Als Ligand ist Wnt1 kürzlich in den Fokus der Forschung gerückt, da sowohl in Menschen als auch in Mäusen gezeigt werden konnte, dass inaktivierende Mutationen in dessen Gen zu einer verringerten Knochenformation führen<sup>[136,138,139]</sup>.

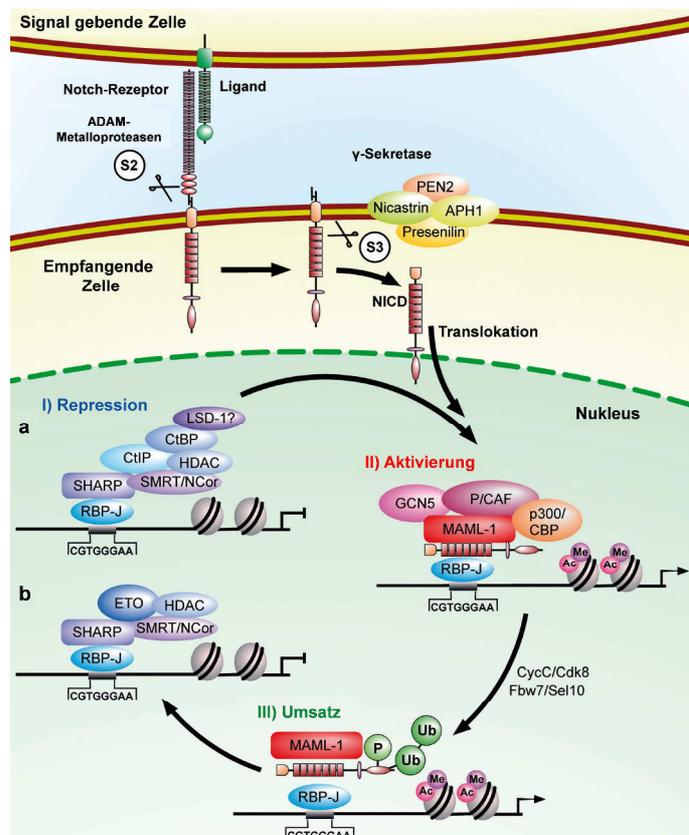
#### 2.2.3.1.5 Sclerostin

Ein weiteres Gen, das in den letzten Jahren enorm an Bedeutung für das Knochenfeld gewonnen hat ist SOST. SOST kodiert für Sclerostin, einem sezernierten Protein mit Cystein-Knoten und einiger Sequenzhomologie zu Mitgliedern der DAN-Familie der BMP-Antagonisten<sup>[175,183]</sup>. SOST gewann erstmalig im Jahr 2001 an Relevanz, als humangenetische Untersuchungen an Familien mit erhöhter Osteosklerose-Inzidenz gezeigt haben, dass inaktivierende Mutationen in diesem Gen eine autosomal rezessive Skelettdysplasie mit Sklerose (Sklerosteose) hervorrufen<sup>[175]</sup>. Auf Grund dieser Assoziation erhielt das bis dato unbenannte Gen den Namen Sclerostin. Kurz darauf konnte auch in Individuen mit der van Buchem-Krankheit, die der Sklerosteose sehr ähnlich ist, eine 52 kB große Deletion in einem nicht-kodierenden Bereich, der ca. 32 kB hinter dem SOST Gen liegt, identifiziert werden<sup>[176]</sup>. Dies führt zu einer verringerten Transkription des Gens, da die deletierte Region einen *Long-Range Enhancer* enthielt. Es konnte auch schnell mittels immunohistochemischer Studien gezeigt werden, dass Sclerostin primär von Osteozyten produziert wird<sup>[57]</sup>. Die Entdeckung dieses Gens führte zu der Generierung entsprechender Mauslinien, die den humanen Phänotyp nachempfinden konnten. So zeigten *Sost*-defiziente Mäuse eine stark erhöhte Knochenmasse<sup>[177]</sup> wohingegen *Sost* überexprimierende Mäuse eine deutlich verringerte Knochenmasse aufwiesen<sup>[57]</sup>. Obwohl ursprünglich auf Grund der Sequenzhomologie davon ausgegangen worden ist, dass es sich bei Sclerostin um einen BMP-Antagonisten handeln würde, ging man bald zu der Annahme über, dass es, ähnlich wie *Dkk1*, ein *Lrp5*-Antagonist sei. Diese Hypothese war zunächst auf der hohen Ähnlichkeit der sowohl in Menschen als auch in Mäusen beobachteten Phänotypen zu den durch *Lrp5*-Mutationen hervorgerufenen Effekten basiert, insbesondere der Tatsache, dass sowohl Sclerostin als auch *Lrp5* die Osteoblasten-Aktivität, nicht jedoch die Osteoklasten-Aktivität zu beeinflussen schienen<sup>[57,177]</sup>. Im Anschluss daran wurde in diversen Studien zumindest *in vitro* gezeigt, dass Sclerostin an *Lrp5* binden kann, und dass diese Bindung durch *Lrp5*-HBM-Mutationen gestört werden kann<sup>[119,120,184,185]</sup>. Hierbei kamen auch Hinweise auf, dass Sclerostin nicht nur an *Lrp5* sondern auch an das nah verwandte *Lrp6* und das weniger homologe *Lrp4* binden kann<sup>[153,184]</sup>. Auch wenn inzwischen in entsprechenden Kreuzungen von Mausmodellen Indizien gefunden wurden, dass der Sclerostin-*Lrp5* Mechanismus auch *in vivo* so abläuft, wie *in vitro* beschrieben<sup>[186]</sup>, so wurde der endgültige Beweis wie dieser Mechanismus funktioniert noch nicht geliefert. Auf Grund der zum Teil kontrovers diskutierten Wirkungsweise, insbesondere von *Lrp5*, ist noch weitere Forschung notwendig, um die Bedeutung dieser Wnt-Modulatoren im Kontext des Knochenstoffwechsels zu

klären. Dies wird insbesondere in Anbetracht der Tatsache ersichtlich, dass Pharmaunternehmen, trotz der noch nicht endgültig geklärten Mechanismen, Sclerostin-neutralisierende Antikörper entwickelt haben, die die Knochenformationsrate erhöhen und die als osteoanobole Therapieoption für Osteoporose eingesetzt werden sollen<sup>[187]</sup>. Die beiden am weitesten entwickelten Wirkstoffe haben die Namen Romosozumab<sup>[187]</sup> und Blosozumab<sup>[188]</sup> erhalten. Romosozumab befindet sich zurzeit in einer Phase-III klinischen Studie und die bisherigen Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass es sich um einen sehr potenten und effektiven osteoanobolen Arzneistoff handelt, wodurch die pharmazeutische Relevanz dieses Rezeptorkomplexes noch weiter unterstrichen wird<sup>[187]</sup>.

### 2.2.3.2 Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg ist, ähnlich wie der Wnt-Signalweg, evolutiv sehr alt und kommt in hochkonservierter Form in den meisten mehrzelligen Organismen vor<sup>[189]</sup>. Notch-Signale sind rein juxtakrin und erfordern die direkte Interaktion der beteiligten Zellen. In Säugetieren gibt es vier Notch-Rezeptoren (Notch1, Notch2, Notch3, Notch4) und zwölf Liganden (Contactin1/6, Delta-Like Homolog (Dlk)1, Distal-Less (Dll)1/3/4, Delta/Notch-Like EGF-Related Receptor (DNER), Jagged (JAG)1/2, Microfibril-Associated Glycoprotein (MAGP)1/2, Nephroblastoma Overexpressed (NOV))<sup>[1,190]</sup>. Die Rezeptoren zeichnen sich strukturell durch eine, auf die Proteidlänge bezogen, große, N-terminale extrazelluläre Region aus, die hauptsächlich aus Epidermal Growth Factor (EGF)-ähnlichen Domänen besteht und eine intrazelluläre Region, die auch Notch Intrazelluläre Domäne (NICD) genannte wird. Diese hat eine hohe Homologie zwischen allen vier Notch-



**Abbildung 7: Der Notch-Signalweg.** Bindet ein Ligand juxtakrin an einen Notch-Rezeptor, so kommt es zu einer Abspaltung der NICD durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex. Die NICD kann in den Nucleus translozieren wo sie den Repressor-Komplex, der entweder CtBP-Interacting Protein (CtIP) (a) oder Runt-Related Transcription Factor 1; Translocated to, 1 (ETO) (b) enthält, verdrängen kann und einen Transkriptionskomplex rekrutiert, der den Transkriptionsfaktor RBP-J $\kappa$  aktiviert. Das Signal wird gegenreguliert durch die Ubiquitinierung der NICD an der PEST-Domäne, wodurch sie proteasomal degradiert wird und sich der Repressor-Komplex neu bilden kann. Angepasst nach Borggreve und Oswald, 2009<sup>[1]</sup>.

Molekülen. Am C-terminalen Ende der NICD befindet sich eine PEST-Domäne (Proline (P)-, Glutamin (E)-, Serin (S)-, und Threonin (T)-reich)<sup>[191]</sup>. Kommt es zur Bindung eines Notch- Rezeptors mit einem Liganden, wird die NICD von dem extrazellulären Bereich des Rezeptors durch Presenilin 1 und 2

abgespalten, die Bestandteile des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes sind<sup>[190]</sup>. Die freigesetzte NICD kann in den Nucleus translozieren, wo eine Interaktion mit RBP-J $\kappa$  stattfindet<sup>[192,193]</sup>. Zusammen mit Mastermind-like (Maml) bildet sich schlussendlich ein Transkriptionskomplex der typischerweise zur Expression der Zielgene Hairy Ears, Y-Linked (HEY) und Hairy and Enhancer of Split (HES) führt<sup>[194]</sup>. Die Gegenregulation erfolgt über die PEST-Domäne, die als Ubiquitinierungs-Ziel dient und somit für eine zügige, proteosomale Degradation der NICD und eine Deaktivierung des Signals verantwortlich ist<sup>[191,195]</sup>.

Notch-Signale spielen häufig eine Rolle, wenn die Differenzierung einzelner Zellen aus einem Verband ähnlicher Zellen über den Prozess der lateralen Inhibition erfolgt. Dies ist beispielsweise während der Embryonalentwicklung der Fall, bei der Notch-Signale an einer Vielzahl essentieller Schritte beteiligt sind<sup>[1]</sup>. Zu diesen gehören unter anderem die Festlegung der embryonalen Polarität<sup>[196]</sup>, die Segmentierung des axialen Skeletts während der Somitogenese<sup>[197]</sup> sowie die Entwicklung des zentralen Nervensystems<sup>[198]</sup>, des Kreislaufsystems<sup>[199]</sup> und des endokrinen Systems, zu dem auch das Skelett gezählt wird<sup>[200,201]</sup>. Welche Rolle Notch-Signale für die Homöostase des ausgewachsenen Knochens spielen ist weniger eindeutig. So konnte einerseits gezeigt werden, dass Notch1 bei der Differenzierung von Chondrozyten exprimiert wird<sup>[202]</sup> und dass Notch-Signale eine wichtige Rolle bei der Festlegung von MSCs auf die Osteoblasten-Zelllinie spielen<sup>[203]</sup>. Gleichmaßen konnte auch gezeigt werden, dass Notch-Signale negativ auf sowohl die Osteoblastogenese als auch die Osteoklastogenese wirken können<sup>[204]</sup>. Der letztere Effekt ist dadurch erklärbar, dass Notch-Signale in reifen Osteoblasten zu einer gesteigerten Opg-Expression führen, die wiederum negativ auf die Osteoklasten-Differenzierung und Aktivität wirken<sup>[205]</sup>. Dies resultiert schlussendlich in einer, auf verminderten Resorption basierten, erhöhten trabekulären Knochenmasse und einer Trabekularisierung des kortikalen Knochens<sup>[206]</sup>. Weitere Studien haben gezeigt, dass Notch-Signale in frühen Stadien der Osteoblasten-Differenzierung eine weitere Reifung der Zellen unterdrücken<sup>[207-209]</sup>. Die meisten Studien in diesem Feld wurden jedoch mit Notch1 oder sogar nur der NICD von Notch1 durchgeführt, weshalb der Einfluss der anderen Notch Rezeptoren noch unzureichend untersucht ist. Hinweise darauf, dass beispielsweise auch Notch2 für den Knochenstoffwechsel von Bedeutung ist, bieten kürzlich erschienene Studien, in denen Mutationen im NOTCH2-Gen mit dem Hajdu-Cheney Syndrom assoziiert wurden, einer Krankheit die sich durch eine dramatisch veränderte skelettale Morphologie auszeichnet<sup>[45-47]</sup>.

## **2.2.4 Erkrankungen mit beeinträchtigtem Knochenstoffwechsel**

Es gibt diverse Erkrankungen des Skelettsystems, von denen einige speziell den Knochenstoffwechsel betreffen. Diese haben häufig eine Veränderung der Knochenmasse und der mechanischen Eigenschaften zur Folge. Dies bedeutet wiederum für die betroffenen Patienten häufig ein erhöhtes Frakturrisiko mit äußerst ernstesten Begleitsymptomen und Folgeerkrankungen.

### **2.2.4.1 Osteoporose**

Die Osteoporose zeichnet sich durch eine systemisch verringerte Knochenmasse aus, die mit einem deutlich erhöhten Frakturrisiko assoziiert ist<sup>[210]</sup>. Zusammen mit malignen Tumoren und Diabetes mellitus Typ II wird die Osteoporose als eine der häufigsten Erkrankungen in der industrialisierten Welt angesehen<sup>[211]</sup>. Die hohe Prävalenz von über 200 Millionen betroffenen Menschen weltweit, davon alleine ca. 8 Millionen in Deutschland, und die hohe Sterblichkeitsrate von ca. 20 % bei Auftreten von Frakturen haben dazu geführt, dass die Osteoporose als ein schwerwiegendes, gesundheitliches Problem wahrgenommen wird<sup>[6,212,213]</sup>. Die durch Osteoporose verursachten direkten und indirekten Kosten werden in der Europäischen Union zur Zeit auf 38,7 Milliarden Euro pro Jahr geschätzt, wobei von einer Verdopplung dieses Betrags innerhalb der nächsten 50 Jahre ausgegangen wird, wodurch erhebliche Mehrbelastungen für die Gesundheitssysteme entstehen<sup>[214,215]</sup>.

Statistisch steigt die Wahrscheinlichkeit an Osteoporose zu erkranken mit dem Alter, und Frauen haben ein sechsmal höheres Risiko als Männer<sup>[213]</sup>. Diese geschlechtsspezifische Diskrepanz erklärt sich durch den mit der Menopause einhergehenden Gonadenausfall<sup>[216]</sup>. Die Veränderung des Geschlechtshormonspiegels, der ein wichtiger Faktor für die Regulation der Knochengeweberemodellierung ist, führt zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen der Aktivität der Knochen-bildenden Osteoblasten und der Knochen-resorbierenden Osteoklasten, wodurch es zu einer negativen Knochenbilanz kommt<sup>[217]</sup>. Auch andere Formen der Osteoporose basieren auf der Verschiebung dieses Gleichgewichts, jedoch können die Auslöser unterschiedlichsten Ursprungs sein. So kommt es beispielsweise bei der altersbedingten (senilen) Osteoporose zu einer Veränderung des Calcium- und Phosphathaushaltes, die durch Freisetzung der Ionen aus dem Skelett kompensiert wird<sup>[218]</sup>. Beeinflusst wird diese Pathogenese durch eine Reihe an Risikofaktoren, zu denen Ernährung<sup>[219]</sup>, Genetik<sup>[220]</sup> und Lebenswandel<sup>[221]</sup> gehören. Osteoporose kann auch als sekundärer Effekt von endokrinen, metabolischen, onkologischen oder immunologischen Grunderkrankungen auftreten und wird auch als Nebenwirkung mancher Medikamente, wie zum Beispiel Glukokortikoide, hervorgerufen<sup>[222]</sup>.

Auf Grund der verringerten Knochenmasse wird auch die Mikroarchitektur und somit die mechanische Belastbarkeit des Knochens negativ beeinflusst<sup>[223]</sup>. Dadurch kommt es zu den typischen

klinischen Symptomen, zu denen chronische Schmerzen auf Grund von komprimierten Nerven und Frakturen des Bewegungsapparates zählen<sup>[224]</sup>. Diese Frakturen treten vor allem in Wirbelkörpern, der Tibia und im Femurhals auf<sup>[214]</sup>. Die für die Genesung des Knochens erforderliche, längere Bettruhe ist, in Kombination mit dem meist fortgeschrittenen Alter der Patienten, auch der Grund für die hohe Sterblichkeitsrate, da Folgeerkrankungen wie beispielsweise Lungenentzündungen häufig auftreten<sup>[225]</sup>.

Zur Therapie der Osteoporose gibt es bisher einige Optionen, die jedoch nur eine stark eingeschränkte Wirksamkeit zeigen. Zur Prävention können zurzeit Calcium- und Vitamin-D-Präparate sowie Hormonersatztherapien eingesetzt werden<sup>[226]</sup>. Hat sich die Osteoporose jedoch bereits manifestiert, ist die derzeitige Therapieoption der Wahl die Verabreichung von Bisphosphonaten<sup>[227]</sup>. Bei Bisphosphonaten handelt es sich um eine Gruppe anti-resorptiver Medikamente. Das bedeutet, dass die Aktivität oder Anzahl an Osteoklasten verringert wird und somit ein weiterer Knochenabbau verhindert werden kann. Die Bisphosphonate, die ursprünglich als Nebenprodukt der Waschmittelindustrie entstanden, wirken, indem sie an mineralisierten Knochen binden und somit die gesamte Knochenoberfläche mit einem artifiziellen Substrat belegen. Dieses wird von Osteoklasten aufgenommen, wenn diese beginnen den Knochen zu resorbieren und führt, je nach Wirkstoff, zur Apoptose oder Verminderung der Aktivität<sup>[228]</sup>. Diese Therapieoption hat jedoch zur Folge, dass auch die erwünschte Knochengeweberemodellierung unterbrochen wird, und es bei längerer Behandlung zur Materialermüdung der Knochensubstanz und schlussendlich zu sogenannten atypischen Frakturen kommt<sup>[7]</sup>.

Ein weiteres, kürzlich zugelassenes, anti-resorptives Medikament ist Denosumab, ein Antikörper gegen RANKL, der durch das Abfangen dieses Signalmoleküls die Differenzierung von Osteoklasten verhindern kann<sup>[229]</sup>. Der Vorteil hierbei ist der, im Vergleich zur Bisphosphonaten, spezifische Wirkmechanismus. Dennoch ist anzunehmen, dass es auch hierbei mit der Zeit zu einer Versprödung des Knochens kommt. Den anti-resorptiven Therapieoptionen stehen die osteo-anabolen Therapien gegenüber. Bei diesen ist es das Ziel, die Osteoblasten-Aktivität zu steigern und somit die Synthese neuer Knochenmasse zu fördern. Hierzu wurden in der Vergangenheit Strontium- und Flouridsalze eingesetzt, die nur einen geringen Effekt aufwiesen oder gar nur zu einer radiologischen jedoch nicht architektonischen Verbesserung der Knochenmasse führten<sup>[230-232]</sup>. Das bisher einzige Zugelassene osteoanabole Medikament ist das Parathormon (als vollständiges PTH1-84 oder als Teilfragment PTH1-34 = Teriparatid)<sup>[233,234]</sup>. Wird dieses intermittierend und in hohen Dosen verabreicht, kommt es, im Gegensatz zum physiologischen Effekt, zu einer Aktivierung der Osteoblasten. Jedoch stehen dem relativ geringen Gewinn an Knochenmasse von ca. 5 % pro Jahr sehr hohe Kosten gegenüber, weshalb es selten zum Einsatz kommt<sup>[233,234]</sup>. Diese Übersicht über die bisherigen Therapieoptionen

verdeutlicht, dass zur Behandlung der Osteoporose noch keine angemessenen Medikamente verfügbar sind und unterstreicht den Bedarf neue Ansatzpunkte, insbesondere für osteo-anabole Präparate, zu finden.

#### **2.2.4.2 Osteopetrose**

Die Osteopetrose, auch Marmorknochenkrankheit genannt, zeichnet sich durch eine deutlich erhöhte Knochenmasse aus, die auf einer Osteoklasten-Unterfunktion basiert<sup>[235]</sup>. Die Patienten haben trotz der größeren Knochendichte ein erhöhtes Frakturrisiko auf Grund der schlechten Materialeigenschaften des Knochens und leiden auch an einer Reihe weiterer Symptome wie Hör- und Sehverlust durch Verknöcherung der Nervenaustrittspunkte und starken immunologischen Defiziten ausgelöst durch das Verdrängen und Zuwachsen des Knochenmarks<sup>[236]</sup>. Zur Therapie wird in der Regel eine Knochenmarkstransplantation im frühen Kindesalter eingesetzt, wodurch die Patienten funktionierende Osteoklasten aus den hämatopoetischen Stammzellen des Spenders erhalten<sup>[237]</sup>. Diese Störung des Knochenstoffwechsels ist im Vergleich zu Osteoporose relativ selten, aber dennoch von großer Bedeutung im Feld der Knochenforschung. So führte die genetische Analyse von Patienten zur Entdeckung des RANKL/RANK/Opg Mechanismus, der einen großen Einblick in die molekulare Kontrolle des Knochenstoffwechsels ermöglicht hat und der wiederum die Entwicklung von Denosumab zur Folge hatte<sup>[238]</sup>. Hinzukommt, dass die Osteopetrose den Zustand darstellt, der auch durch anti-resorptive Therapien hervorgerufen wird und somit die Nachteile dieser Behandlungsmethode weiter verdeutlicht.

#### **2.2.4.3 Osteosklerose**

Osteosklerose bezeichnet eine Reihe an Störungen des Knochenstoffwechsels, die sich durch eine erhöhte Knochenmasse in Folge einer verstärkten Osteoblasten-Aktivität auszeichnen. Zu den wichtigsten gehören die Sklerosteose und die van Buchem Krankheit. Ähnlich wie bei Individuen mit Osteopetrose, können die Symptome in homozygoten Trägern eine Verknöcherung der Nervenaustrittspunkte und erhöhten interkranialen Druck beinhalten. Im Gegensatz zur der van Buchem Krankheit wird bei der Sklerosteose häufig eine Fehlbildung der Hände beobachtet<sup>[175]</sup>. Beide Störungen werden durch genetische Veränderungen hervorgerufen, die das Gen SOST betreffen<sup>[175,239]</sup>. Bei der Sklerosteose liegen inaktivierende Mutationen im kodierenden Bereich des Gens vor, wohingegen bei der van Buchem Krankheit ein Enhancer des Gens verändert ist, wodurch es zu einer verringerten Expression kommt. Dies resultiert in einer verminderten Produktion des putativen Wnt-Signal-Inhibitors Sclerostin. Beide Störungen sind mit nur einigen Dutzend beschriebenen Fällen äußerst selten<sup>[175]</sup>, haben aber dennoch einen großen Beitrag zur Erforschung der molekularen Mechanismen geliefert, die die Osteoblasten-Aktivität regulieren. Neben der scheinbar spezifischen Wirkung von Sclerostin auf Osteoblasten und dem damit verbundenen Potential als Wirkstoff-Zielmolekül, wie durch die Entwicklung der anti-Sclerostin Antikörpers

Romosozumab und Blosozumab ersichtlich<sup>[187,188]</sup>, konnte die Entdeckung dieses Moleküls auch einen der größten Vorteile einer potentiellen osteoanabolen-Therapie aufzeigen. Heterozygote Träger des Sklerosteose oder van Buchem-Allels haben Zeit ihres Lebens einen konstanten Knochenmasse-Zuwachs, der mit einer stark verringerten Frakturneigung einhergeht. Im Gegensatz zu Osteopetrose Patienten haben van Buchem Patienten jedoch keine der negativen Symptome wie immunologische Probleme oder Nervenkompressionen<sup>[240]</sup>. Dies zeigt, dass mit osteoanaboler Therapie bei richtiger Dosierung ein Aufbau und eine Verstärkung der Knochen ohne negative Begleiterscheinungen möglich sind.

Osteosklerosen können auch durch aktivierende Mutationen im Gen LRP5 hervorgerufen werden. Zu diesen Mutationen zählen G171V und A214V, die beide in der gleichen, extrazellulären Region des Transmembran-Co-Rezeptors angesiedelt sind<sup>[133,134]</sup>. Das Erscheinungsbild dieser Form der Osteosklerose entspricht weitestgehend der durch inaktivierende SOST-Mutationen hervorgerufenen, weshalb ein gemeinsamer Mechanismus für beide Moleküle postuliert wurde<sup>[130,133]</sup>.

#### **2.2.4.4 Hajdu-Cheney Syndrom**

Das Hajdu-Cheney Syndrom (HCS), benannt nach Nicholas Hajdu und William Cheney, die das Syndrom erstmalig beschrieben und näher charakterisiert haben, bezeichnet eine äußerst seltene Osteodysplasie<sup>[241,242]</sup>. Bisher sind insgesamt nur etwas über 50 Fälle bekannt<sup>[45]</sup>. Die primären Symptome von HCS sind eine Osteoporose, kraniofaziale Abnormitäten und Acro-Osteolysen<sup>[46]</sup>. Letzteres bezeichnet lytische Rückbildungen der distalen Phalangen (Knochen in den Spitzen der Finger und Zehen). Weitere häufig beschriebene Symptome sind Nierenzysten und Wirbelkörper-Einbrüche. Hinzu kommen eine Reihe weiterer Symptome, die aber häufig nur in einigen wenigen Patienten beobachtet wurden. Die Symptome tauchen meist im frühen jugendlichen Alter auf und schreiten im Laufe der Zeit voran, dabei ist bisher nicht bekannt, ob es durch HCS zu einer verringerten Lebenserwartung kommt. Auch wenn aus dem Erscheinungsbild des Syndroms klar hervorgeht, dass es sich um eine Störung des Knochenstoffwechsels handelt, so ist der Mechanismus, der sich hierfür verantwortlich zeichnen könnte, noch gänzlich unbekannt. Einer Hypothese zufolge könnten zumindest die Acro-Osteolysen durch eine fehlerhafte Frakturheilung von Mikrorissen erklärt werden, wodurch sich diese Knochen im Laufe der Zeit abnutzen und verkürzen<sup>[243,244]</sup>. Umso interessanter ist die Tatsache, dass vor kurzem gezeigt werden konnte, dass HCS durch aktivierende Mutationen im NOTCH2-Gen verursacht wird<sup>[45-47]</sup>. Im Detail führen die Mutationen zu einem vorzeitigen Translationsstopp, wodurch die C-terminale PEST-Domäne fehlt, die für den zügigen Abbau des aktiven NICD-Fragments von Notch2 verantwortlich ist<sup>[45,195]</sup>. Da auch die Bedeutung des Notch-Signalweges im Kontext des Knochenstoffwechsels bisher nur rudimentär untersucht wurde,

besteht die Hoffnung, anhand dieses Syndroms nähere Einblicke gewinnen zu können und möglicherweise, analog zu den Erfolgen die mit der Erforschung von Osteopetrosen und Sklerosteose erzielt wurden, neue Ansatzmöglichkeiten für anti-osteoporotische Therapien zu ermöglichen. Zum Erreichen dieses Ziels ist vor allem die Generierung eines entsprechenden Tiermodells unabdingbar.

### **2.2.4.5 Morbus Paget**

*Osteodystrophia deformans* oder Morbus Paget, benannt nach James Paget, der die Krankheit 1877 erstmalig beschrieb<sup>[245]</sup>, ist nach der Osteoporose die zweithäufigste knochenassoziierte Krankheit mit einer Inzidenz von ca. 5 % der Gesamtbevölkerung über 55 Jahren<sup>[246,247]</sup>, weshalb sie an dieser Stelle der Vollständigkeit halber erwähnt werden soll. Die Krankheit tritt erst mit höherem Alter und in der Regel nicht unter dem 55. Lebensjahr auf. Sie zeichnet sich durch einen stark erhöhten Knochenstoffwechsel in einem oder einigen wenigen Knochen aus, wodurch diese radiologisch dichter erscheinen, auch wenn die mechanische Stabilität verringert ist<sup>[248]</sup>. Häufig verläuft die Krankheit asymptomatisch<sup>[249]</sup>, kann aber in manchen Fällen zu einer erhöhten Frakturinzidenz der betroffenen Knochen führen, die Schmerzen und Nervenkompressionen zur Folge haben<sup>[248]</sup>. In einem geringen Teil der Patienten kann es auch zu bösartigen Entartungen des Knochens kommen<sup>[250]</sup>. In der Regel erfolgt eine Behandlung medikamentös, beispielsweise durch Bisphosphonate, aber in Extremfällen kann auch eine Operation erforderlich sein<sup>[248]</sup>. Morbus Paget scheint durch eine Fehlregulation der Osteoklasten hervorgerufen zu werden, jedoch ist der Auslöser unbekannt, auch wenn zurzeit genetische und virale Ursachen vermutet werden<sup>[248]</sup>.

### 3 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit sollten die Rollen, die der Wnt-Signalweg und der Notch-Signalweg im Knochenstoffwechsel spielen, näher untersucht werden. Im Detail sollte die Wirkweise des vermeintlichen Wnt-Inhibitors Sclerostin *in vivo* erörtert werden und die potentielle Bedeutung von Notch2 für die Knochenentwicklung und Homöostase erforscht werden. Hierzu sollte zunächst das *Col1a1-Sost* Mausmodell insbesondere mit Hinblick auf einen eventuellen skelettalen Phänotyp charakterisiert werden. Anschließend sollte die Interaktion von Komponenten des Wnt-Rezeptorkomplexes Sclerostin, Kremen2 und Frizzled9 mit Lrp5 untersucht werden, indem *Col1a1-Sost*, *Col1a1-Krm2* und *Frizzled9*-defiziente Mäusen mit zwei unterschiedlichen Mauslinien mit *Lrp5*-Mutationen (A213V und G170V) gekreuzt wurden, die bekanntermaßen zu einer erhöhten Knochenmasse führen. Die verschiedenen Kombinationen der Genotypen sollten mittels Mikro-Computertomographie und Histologie analysiert werden. Zusätzliche Zellkulturversuche sollten genutzt werden, um die molekularen Mechanismen von eventuell beobachteten Phänotypen abzuklären. Die Wirkung von Notch2 auf den Knochenstoffwechsel sollte über drei Ansätze erforscht werden. Das Ziel war es mit Hilfe des Cre-lox Systems Mauslinien zu züchten, in denen spezifisch entweder in Osteoblasten oder in Osteoklasten das *Notch2*-Gen inaktiviert wurde. Der dritte Ansatz war die Generierung eines Mausmodells des Hajdu-Cheney Syndroms, das systemisch eine die Wirkweise modulierende Punktmutation im *Notch2*-Gen trägt. Alle drei Linien sollten mittels Mikro-Computertomographie und Histomorphometrie auf ihren generellen skelettalen Phänotyp hin untersucht werden, wobei beim Mausmodell des Hajdu-Cheney Syndroms ein besonderes Augenmerk auf die aus der humanen Krankheit bekannten Symptome gelegt werden sollte.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Geräte

Modell	Hersteller	Gerät
µCT 40	Scanco Medical AG (Brüttisellen, CH)	Röntgen-Mikrocomputertomograf
1012	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, DE)	Wasserbad
1634	Hama GmbH & Co KG (Monheim, DE)	Leuchtpult
200/2.0	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, US)	Netzteil
2050	Bavimed Laborgeräte GmbH (Birkenau, DE)	Autotechnikon
440-33	Kern & Sohn GmbH (Balingen, DE)	Waage
5050ELC	Tuttnauer Europe B.V. (Breda, NL)	Autoklav
50mm F2.8 Macro	Sigma K.K. (Kawasaki, JP)	Objektiv
5415D	Eppendorf AG (Hamburg, DE)	Tischzentrifuge
5430R	Eppendorf AG (Hamburg, DE)	Tischzentrifuge
Axiocam	Carl Zeiss AG (Oberkochen, DE)	Mikroskopkamera
Axioskop	Carl Zeiss AG (Oberkochen, DE)	Mikroskop
B 6200	Heraeus Holding GmbH (Hanau, DE)	Inkubator
BBD 6220	Heraeus Holding GmbH (Hanau, DE)	Inkubator
Biologic Duoflow	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, US)	HPLC-Apparatur
BioRad Trans-Blot SD	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, US)	Blotting Kammer
BZ2.5/TN1S	Zwick Roell AG (Ulm, DE)	Universalprüfmaschine
Certomat MV	B.Braun Biotechnologie International GmbH (Melsungen, DE)	Vortexer
CPA224S	Sartorius AG (Göttingen, DE)	Feinwaage
Cut 4060	Microtec Laborgeräte GmbH (Walldorf, DE)	Rotationsmikrotom
DP72	Olympus K.K. (Tokio, JP)	Mikroskopkamera
Drawing Board III	Calcomp Technology, Inc. (Anaheim, US)	Grafiktablett
Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG (Schwabach, DE)	Wiegeschüttler
EOS 10D	Canon K.K. (Tokio, JP)	Kamera
FACS Calibur	Becton, Dickinson and Co. (Franklin Lakes, US)	Durchflusszytometer
Faxitron Xray Sterile	Faxitron Xray Corp. (Tucson, US)	Röntgenkabinett
FM-120DE	Hoshizaki Denki K.K. (Toyoake, JP)	Eisbereiter
GS-6	Beckman Coulter, Inc. (Brea, US)	Zentrifuge
HBO 50/AC	Carl Zeiss AG (Oberkochen, DE)	Fluoreszenzlichtquelle
HS12	Heraeus Holding GmbH (Hanau, DE)	Sicherheitswerkbank
Innova 4000	New Brunswick Scientific Co., Inc. (Enfield, US)	Inkubationsschüttler
IX50	Olympus K.K. (Tokio, JP)	Mikroskop
Kap-Z Kl 0.05	AST Angewandte System Technik GmbH (Dresden, DE)	Kraftsensor
Komet Variomag Mono	H+P Labortechnik GmbH (Kleinmachnow, DE)	Magnetrührer
KS260 Basic	IKA®-Werke GmbH & CO. KG (Staufen, DE)	Kreisschüttler
LX-60	Faxitron Xray Corp. (Tucson, US)	Digitales Röntgenkabinett
Mastercycler egradient S	Eppendorf AG (Hamburg, DE)	PCR-System
Mastercycler pro S	Eppendorf AG (Hamburg, DE)	PCR-System
Nanodrop ND1000	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)	Spektralphotometer
Optimax 1170-1-0000	Protec GmbH & Co. KG (Oberstenfeld, DE)	Filmentwickler
pH Meter pH538	WTW GmbH (Weilheim, DE)	pH Meter
Pheonix Alpha	Buehler Inc. (Lake Bluff, US)	Schleifgerät
Pipetboy acu	INTEGRA Biosciences AG (Zizers, CH)	Pipettierhilfe
Powerpac HC	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, US)	Netzteil
RCT Basic	IKA®-Werke GmbH & CO. KG (Staufen, DE)	Magnetrührer
Reichert-Jung Mod.1140/Autocut	Cambridge Instruments Co. Ltd. (St. Neots, UK)	Rotationsmikrotom
Reichert-Jung Supercut 2050	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, DE)	Rotationsmikrotom
Research	Eppendorf AG (Hamburg, DE)	Mikropipette
Research Plus	Eppendorf AG (Hamburg, DE)	Mikropipette
S1200	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH (Sonnenbühl, DE)	Sicherheitswerkbank
Scanjet G4050	Hewlett-Packard Company, L.P. (Palo Alto, US)	Filmscanner
SDS/PAGE Mini Protean	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, US)	Gelelektrophoresekammer
Shel Lab 1004	Sheldon Manufacturing, Inc. (Cornelius, US)	Hybridisierungsöfen
StepOnePlus	Applied Biosystems, Inc. (Foster City, US)	Real-Time PCR System
Sub-Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, US)	Gelelektrophoresekammer
TE2101	Sartorius AG (Göttingen, DE)	Waage
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG (Hamburg, DE)	Thermoblock
Thermostat Plus	Eppendorf AG (Hamburg, DE)	Thermoblock

## Material und Methoden

Ultra-Turrax T25	IKA®-Werke GmbH & CO. KG (Staufen, DE)	Homogenisierer
Ultrospec 2100 pro	Biochrom Ltd. (Cambridge, UK)	Spektralphotometer
Universal Hood 75S	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, US)	Gel-Dokumentationsanlage
Versamax	Molecular Devices, LLC (Sunnyvale, US)	Mikrotiterplatten-Lesegerät

### 4.1.2 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller	Material
1,5 mL halbmikro Einmalküvetten	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim, DE)	Küvetten
14 mL Rundbodenröhrchen	Greiner Bio-One International AG (Kremsmünster, AT)	14 mL Rundbodenröhrchen
5mL Falcon® Round-Bottom Tubes	Becton, Dickinson and Co. (Franklin Lakes, US)	Durchflusszytometrierröhrchen
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare Ltd. (Little Chalfont, UK)	Chemolumineszenz-Filme
Assistent® Elkamed	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG (Sondheim, DE)	Objektträger
Aurelia Perform®	Supermax Healthcare Inc. (Aurora, US)	Einweg-Untersuchungshandschuhe
BD Eclipse Needle	Becton, Dickinson and Co. (Franklin Lakes, US)	Kanülen 0,8x40mm
Biomax® XAR Film	Eastman Kodak Company, Inc. (Rochester, US)	Southernblot-Filme
Biosphere® Filter Tips	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, DE)	Filterspitzen
C1000 Kontrolldiät	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG (Lage, DE)	Trockenfutter
Cell Scraper 25 cm	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, DE)	Zellschaber
Cell Star Tubes 15mL/ 50mL	Greiner Bio-One International AG (Kremsmünster, AT)	15/50 mL Reaktionsgefäße
Deckgläser 24 x 60 mm #1	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)	Deckgläser
Disposable Glass Pasteurpipettes 230mm	VWR International, LLC (Radnor, US)	Pasteurpipetten
epT.I.P.S.®	Eppendorf AG (Hamburg, DE)	Pipettenspitzen
Falcon® 12-Well Tissue Culture Plate	Becton, Dickinson and Co. (Franklin Lakes, US)	Gewebekulturschale
Falcon® Cell Strainer 70 µm Nylon	Becton, Dickinson and Co. (Franklin Lakes, US)	Zellsieb
Falcon® Serologische Pipetten	Becton, Dickinson and Co. (Franklin Lakes, US)	Serologische Pipetten
Figur 23	C. Bruno Bayha GmbH (Tuttlingen, DE)	Skalpellklingen
Hybond LFP-PVDF	GE Healthcare Ltd. (Little Chalfont, UK)	Westernblot-Membran
Hybond XL	GE Healthcare Ltd. (Little Chalfont, UK)	Southernblot-Membran
Injekt® 10/20 ml	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, DE)	Spritzen
Injekt®-F 1 mL	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, DE)	Feindosierungsspritzen
Kimtech Science	Kimberly-Clark Corp. (Irving, US)	Präzisionswischtücher
Kisol-Folie	Dental - Kettenbach GmbH & Co. KG (Eschenburg, DE)	PE-Deckfolien
Mamoray HDR PQ	Agfa-Gevaert N.V. (Mortsel, BE)	Röntgenfilme
Messer 16 cm c TC	Leica Biosystems Nussloch GmbH (Nussloch, DE)	Mikrotommesser
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)	qRT-PCR Reaktionsplatte
MicroAmp® Optical Adhesion Film	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)	qRT-PCR Dichtfolie
Mikro-Schraubröhre 2mL	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, DE)	Mikro-Schraubröhren 2mL
Mikrotestplatte 96 Well, F	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, DE)	Mikrotestplatten
Nalgene® Rapid-Flow Bottle Top Filter	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)	Flaschenaufsatzfilter
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Inc. (Chicago, US)	Verschlussfolie
PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0.2 ml	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, DE)	PCR Reaktionsgefäße
Rollrandgläser Kalk-Soda-Glass	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)	Rollrandgläser
Safe-Lock Tubes 1.5 mL/ 2mL	Eppendorf AG (Hamburg, DE)	Mikroreaktionsgefäße
Schraubverschluss	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, DE)	Schraubverschluss
Serican® Gr.16	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, DE)	Kanülen 0,60x25mm
Serican® Gr.20	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, DE)	Kanülen 0,40x20mm
Sterile Syringe Filter 0.2 µm Cellulose	VWR International, LLC (Radnor, US)	Spritzenvorsatzfilter
Swingsette	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)	Biopsie-Einbettkassetten
UPP-110HG	Sony K.K. (Tokio, JP)	Thermopapier
UVette®	Eppendorf AG (Hamburg, DE)	UV Küvette
WS Flex 18C P80	Hermes Schleifmittel GmbH & Co. KG (Hamburg, DE)	Schleifpapier

### 4.1.3 Chemikalien

Name	Abkürzung	Summenformel	Hersteller
Acrylamid		C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Agarose (SeaKem® LE)		[C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub> ] <sub>n</sub>	Lonza Group AG (Basel, CH)
7-Amino-Actinomycin D	7-AAD	C <sub>62</sub> H <sub>87</sub> N <sub>13</sub> O <sub>16</sub>	Becton, Dickinson and Co. (Franklin Lakes, US)
3-Aminophthalhydrazid	Luminol	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Ammoniumhydroxid		NH <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Ammoniumperoxodisulfat	APS	H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Ampicillin	Amp	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
L-Ascorbinsäure	Asc	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Benzoylperoxid	BPO	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	Merck KGaA (Darmstadt, DE)

## Material und Methoden

5-Bromo-4-chloro-3-inoxyl-β-D-galactopyranoside	X-Gal	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> BrClNO <sub>6</sub>	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)
Calcein		C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>13</sub>	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Chrom(III)-kaliumsulfat	Chromalaun	KCr(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
5'-[α-32P]-dCTP		C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>13</sub> P <sub>3</sub>	Hartmann Analytic
Diethylpyrocarbonat	DEPC	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
1α,25-Dihydroxyvitamin-D <sub>3</sub>	Vitamin-D <sub>3</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
1,4-Dimethylbenzol	p-Xylol	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
N,N-Dimethylformamid	DMF	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
N,N Dimethyl-p-Toluidin	DMT	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Dimethylsulfoxid	DMSO	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Di-Natriumhydrogenphosphat		Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Dithiothreitol	DTT	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Essigsäure		C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Ethanol		C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Ethylendiamintetraacetat	EDTA	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Formaldehyd		CH <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Glycerin		C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
β-Glycerolphosphat	β-Gly	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Glycin	Gly	NH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
4-Hydroxymzimtsäure	p-Coumarinsäure	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Isopropanol		C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
2-Isopropyl-5-methylphenol	Thymol	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Kaliumchlorid	KCl	KCl	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Kaliumhydrogenphosphat		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Kohlendioxid		CO <sub>2</sub>	TMG GmbH (Krefeld, DE)
β-Mercaptoethanol		C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Methanol	MeOH	CH <sub>4</sub> O	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
2-Methoxyethylacetat		CH <sub>3</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCOCH <sub>3</sub>	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Methylmethacrylat	MMA	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Monoglycol-Butylether		C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Natrium-3,4-dihydroxy-9,10-dioxo-2-anthracenesulfonat	Alizarin Rot S	C <sub>14</sub> H <sub>7</sub> NaO <sub>7</sub> S	Chroma GmbH & Co. KG (Münster, DE)
Natriumcarbonat		Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Natriumchlorid	NaCl	NaCl	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Natriumcitrat		C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Natriumdesoxycholat		C <sub>24</sub> H <sub>39</sub> NaO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Natriumdihydrogenphosphat		NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Natriumhydrogencarbonat		NaHCO <sub>3</sub>	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Natriumhydroxid		NaOH	Avantor Performance Materials (Center Valley, US)
Natriumlaurylsulfat	SDS	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Natriumphosphat		Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Natriumthiosulfat		Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Nonylphenyl-polyethyleneglykol-acetat	NPG	H <sub>19</sub> C <sub>9</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> OCOC H <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Penicillin	Pen	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)
Phenol		C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Pikrinsäure		C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Polyethylenglycol 6000	PEG6000	[C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O] <sub>n</sub>	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Polyethylenglycol(40)-nonylphenolether	NP-40	C <sub>95</sub> H <sub>184</sub> O <sub>41</sub>	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat	Polysorbat 20	C <sub>58</sub> H <sub>114</sub> O <sub>26</sub>	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Propan-1,2,3-triol	Glycerin	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Salpetersäure		HNO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Salzsäure		HCl	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Säurefuchsin		C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>3</sub>	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Silbernitrat		AgNO <sub>3</sub>	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Stickstoff		N <sub>2</sub>	TMG GmbH (Krefeld, DE)
Streptomycin	Strep	C <sub>21</sub> H <sub>39</sub> N <sub>7</sub> O <sub>12</sub>	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)
3,3',5,5'-Tetrabrom-phenolsulfonphthalein	Bromphenolblau	C <sub>19</sub> H <sub>10</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Tetramethylethylendiamin	TEMED	C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Toluidinblau O		C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>3</sub> S	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Trichlormethan	Chloroform	CHCl <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Tris Base	NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride	Tris/HCl	NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> · HCl	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Wasserstoffperoxid		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck KGaA (Darmstadt, DE)

#### 4.1.4 Fertiglösungen und Pulver

Bezeichnung	Hersteller	Material
10x DreamTaq Green Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)	PCR-Puffer
6x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)	Gel-Ladepuffer
7-AAD Färbelösung	Becton, Dickinson and Co. (Franklin Lakes, US)	Avitalfarbstoff
Adefofix	Adefo-Chemie GmbH (Dietzenbach, DE)	Fixierlösung
Albumin Standard 2 mg/mL	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)	BSA Stammlösung
Ammoniumhydroxid (30 % Lösung)	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)	
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, US)	Bradford-Reagenz
Citrolone 2000	Adefo-Chemie GmbH (Dietzenbach, DE)	Entwicklerlösung
cOmplete Protease Inhibitor	Roche Applied Science AG (Penzberg, DE)	Protease-Inhibitoren
DNA, MB Qualität aus Fischsperma	Roche Applied Science AG (Penzberg, DE)	Fischsperma DNA
dNTP Mix, 10mM Each	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)	dNTP Mischung
DPX Eindeckmittel	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)	Eindeckmittel
Ethanol (80 % Lösung)	Walter CMP GmbH (Hamburg, DE)	
FACSClean	Becton, Dickinson and Co. (Franklin Lakes, US)	Durchflusszytometer Reinigungslösung
FACSFlow	Becton, Dickinson and Co. (Franklin Lakes, US)	Durchflusszytometer Trägerlösung
FACSRinse	Becton, Dickinson and Co. (Franklin Lakes, US)	Durchflusszytometer Spüllösung
FBS (Gibco, 41G8512K)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)	Fötale Kälberserum (FCS) (Ocl)
Fetal Bovine Serum (Hyclone, RYL35914)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)	Fötale Kälberserum (Obl)
Formafix 3,5 %	Grimm med. Logistik GmbH (Torgelow, DE)	Fixiermittel
Formaldehyd (37 % Lösung)	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)	
Gel-Loading Dye F-350	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)	Gel-Ladepuffer (ohne Xylen Cyanol)
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)	DNA Größenmaßstab
GIBCO® Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)	Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)
Lysogeny Broth (LB)-Agar	Invitrogen Corp (Carlsbad, US)	Nährboden Bakterienkultur
LB-Pulver	Invitrogen Corp (Carlsbad, US)	Kulturmedium Bakterienkultur
Milchpulver blotting grade	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)	Milchpulver
Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)	α-MEM Zellkulturmedium
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)	Penicillin-Streptomycin Mischung
peqGOLD Trifast™	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, DE)	RNA Isolations-Lösung
PhosSTOP	Roche Applied Science AG (Penzberg, DE)	Phosphatase-Inhibitoren
Roti®-P/C/I	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)	Phenol/Chlororom DNA Aufreinigungslösung
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)	30 % Acrylamidlösung
Salpetersäure (65 % Lösung)	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)	
SeeBlue® Plus 2 Prestained	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)	Protein Größenmaßstab
TaqMan® Gene Expr. Master Mix	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)	TaqMan Mastermix
Wasserstoffperoxid (30% Lösung)	Merck KGaA (Darmstadt, DE)	

#### 4.1.5 Reaktionssätze

Bezeichnung	Hersteller	Material
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	Qiagen N.V. (Venlo, NL)	Plasmid Aufreinigungssatz
KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, DE)	Genotypisierungssatz
LA Long Range PCR Kit	Takara Bio Inc. (Kyoto, JP)	Long-Range PCR-Satz
Mouse Opg/TNFRSF11B Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Inc. (Minneapolis, US)	Osteoprotegerin ELISA
Mouse Osteocalcin EIA Kit	Biomedical Technologies, Inc. (Stoughton, US)	Osteocalcin ELISA
Mouse Sclerostin ELISA	ALPCO Diagnostics (Salem, US)	Sclerostin ELISA
Mouse TRANCE/RANK L/TNFSF11 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Inc. (Minneapolis, US)	RankL ELISA
Nucleospin® Gel & PCR Cleanup	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, DE)	PCR Aufreinigungssatz
Nucleospin® RNA II	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, DE)	RNA Aufreinigungssatz
Phosphorus Liqui-UV	Stanbio Laboratory Inc. (Boerne, US)	Phosphat Bestimmungssatz
QIAprep Spin® Miniprep Kit	Qiagen N.V. (Venlo, NL)	Plasmid Aufreinigungssatz
QuantiChrom™ Calcium Assay Kit	BioAssay Systems (Hayward, US)	Calcium Bestimmungssatz
Random Primed DNA Labeling Kit	Roche Diagnostics International AG (Rotkreuz, CH)	DNA-Markierungssatz
RatLaps™EIA	Immunodiagnostic Systems Ltd (Baldon, UK)	Crosslaps ELISA
SEA570Mu	Uscn Life Science Inc. (Wuhan, CN)	PICP ELISA
SEA957Mu	Cloud-Clone Corp. (Houston, US)	PINP ELISA
SEC864Mu	Uscn Life Science Inc. (Wuhan, CN)	Sclerostin ELISA
TOPO® TA Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)	Klonierungssatz
Verso cDNA Kit	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)	cDNA Synthese-Reaktionssatz

#### 4.1.6 Enzyme und Proteine

Name	Hersteller
Ascl	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)

Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Collagenase Ia from <i>C.histolyticum</i>	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA)
Dispase II	Roche Applied Science AG (Penzberg, DE)
Dreamtaq	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, US)
<i>EcoRI</i>	New England Biolabs (Ipswich, US)
<i>KpnI</i>	Roche Applied Science AG (Penzberg, DE)
LA Taq® DNA Polymerase	Takara Bio Inc. (Kyoto, JP)
M-CSF	Peprotech (Rocky Hill, US)
msRANKL	Peprotech (Rocky Hill, US)
<i>MunI</i>	Roche Applied Science AG (Penzberg, DE)
RNaseA	Roche Applied Science AG (Penzberg, DE)
<i>Scal</i>	Roche Applied Science AG (Penzberg, DE)
hWnt1	PlexBio Co., Ltd (Taipei, TW)
mWnt3a	R&D Systems, Inc. (Minneapolis, US)
h/mWnt5a	R&D Systems, Inc. (Minneapolis, US)

#### 4.1.7 Antikörper

##### 4.1.7.1 Antikörper für Durchflusszytometrie

Ziel	Farbstoff	Klon	Isotyp	Hersteller	Konzentration	Verdünnung
CD16/CD32	-	2.4G2	IgG <sub>2b</sub> , K	Becton, Dickinson and Co.	0,5 mg/mL	1:1000
CD3	FITC	145-2C11	Ar Ham IgG <sub>1</sub> , K	Becton, Dickinson and Co.	0,5 mg/mL	1:200
CD4	PE	H129.19	Rat IgG <sub>2a</sub> , K	Becton, Dickinson and Co.	0,2 mg/mL	1:200
CD8a	PE	53-6.7	Rat IgG <sub>2a</sub> , K	Becton, Dickinson and Co.	0,2 mg/mL	1:200
Gr.1	FITC	RB6-8C5	Rat IgG <sub>2b</sub> , K	Becton, Dickinson and Co.	0,5 mg/mL	1:100
CD11b	PE	M1/70	Rat IgG <sub>2b</sub> , K	Becton, Dickinson and Co.	0,2 mg/mL	1:300
B220	FITC	RA3-6B2	Rat IgG <sub>2a</sub> , K	Becton, Dickinson and Co.	0,5 mg/mL	1:200
Sca1	PE	E13-161.7	Rat IgG <sub>2a</sub> , K	Becton, Dickinson and Co.	0,2 mg/mL	1:200
Isotypenkontrolle	FITC	A19-3	Ar Ham IgG <sub>1</sub> , K	Becton, Dickinson and Co.	0,5 mg/mL	1:200
Isotypenkontrolle	PE	R35-95	Rat IgG <sub>2a</sub> , K	Becton, Dickinson and Co.	0,2 mg/mL	1:200
Isotypenkontrolle	FITC	A95-1	Rat IgG <sub>2b</sub> , K	Becton, Dickinson and Co.	0,5 mg/mL	1:100
Isotypenkontrolle	PE	A95-1	Rat IgG <sub>2b</sub> , K	Becton, Dickinson and Co.	0,2 mg/mL	1:300
Isotypenkontrolle	FITC	R35-95	Rat IgG <sub>2a</sub> , K	Becton, Dickinson and Co.	0,5 mg/mL	1:200

##### 4.1.7.2 Antikörper für Western Blots

Ziel	Quelle	Hersteller	Produktnummer	Verdünnung
Akt	Kaninchen	Cell Signaling	9272	1:1000
p-Akt	Kaninchen	Cell Signaling	4060S	1:1000
beta-Catenin	Kaninchen	Cell Signaling	9562	1:1000
p-beta-Catenin	Kaninchen	Cell Signaling	9561L	1:1000
Polyclonal Goat Anti-Rabbit HRP	Ziege	Dako	P0448	1:2000

#### 4.1.8 Oligonukleotid-Primer

Alle Oligonukleotid-Primer wurden von der Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, DE) synthetisiert und als Stammlösung in einer Konzentration von 200 µM in H<sub>2</sub>O gelöst.

Name	Sequenz 5'->3'
Cbfa_24	CCAGGAAGACTGCAAGAAGG
Cbfa_25	TGGCTTGCAGGTACAGGA
Cbfa_30	GGAGCTGCCGAGTCAATAAC
Flip-Del F	GTCAGTGCAGTTAAATACAAGACG
Flip-Del R	GTTGCGCTAAAGAAGTATATGTGCC
Fzd9 KO F	ATAGCCTGAAGAACGAGATCA
Fzd9 KO R v2	CCCCCTGTGCTCACTTGTC
Fzd9 WT F v2	CTTCTCTGCTCGCTCTACG
Fzd9 WT R v2	GTGCAGCCTGTGTTTTCCAG
Globin Intron	ACTACACCTGGTCATCATCCTGC
HCS Seq F	TCAATTGACCCGGAGCAG
HCS Seq R	TGTGGCATCGGAGACATACG
Kremen2-6	TGAATCCTCTGGAGATGCTCTGC
LR Neomycin R	CCTTCTTGACGAGTCTTCTGAGCGGG
LR Notch2 F 1	ACGGACAGGACAGAGACAGTACACACA
Lrp5 HBM F	AGTACTGGCTGGCACAGA

Lrp5 HBM R	CAGGCTGCCCTTGAGAT
LysM-Cre Com	CTTGGGCTGCCAGAAATTTCTC
LysM-Cre KI	CCCAGAAATGCCAGATTACG
LysM-Cre WT	TTACAGTCGGCCAGGCTGAC
M13 For	GTAACGACGGCCAG
M13 Rev	CAGGAAACAGCTATGAC
N2 Probe 3' F	TGGGATTTGCCCTCGGTGCC
N2 Probe 3' R	CGTCCCACAGCCACCTCTCT
N2 Probe 5' F	TGGAGGGGACCATCACAGGCA
N2 Probe 5' R	CGTGAGGCTTGAACCTCAGGTGG
Notch2 HCS F	CCCTTGGCACTTCGTGTTGA
Notch2 HCS NEO R	TCGTGCTTTACGGTATCGCC
Notch2 HCS R 2	GGCCGCTTCATAACTCCCT
Notch2 I	TAGGAAGCAGCTCAGCTCACAG
Notch2 II	ATAACGCTAAACGTGCACTGGAG
Notch2Del F	GCTCAGCTAGAGTGTGTCTTG
Notch2Del R	ATAACGCTAAACGTGCACTGGAG
Notch2FI F	AGCAGGGTCAACTACAGCCAG
Notch2FI R	TAATGTATGCTATACGAAGTTATCCC
RT CCN3/NOV F	ACTGTGTGTTTCGATGGGGTC
RT CCN3/NOV R	AGGGATTTCTTGGTCCGGAG
RT DLK1/Pref1 F	CCTGGCTGTGTC AATGGAGT
RT DLK1/Pref1 R	AGGATGGTGAAGCAGATGGC
RT DII1 F	CCTTCCGCCAGTACTCCTC
RT DII1 R	CACACCCTGGCAGACAGATT
RT DII3 F	TGTCATTGCCACCTGGTTT
RT DII3 R	ACGTGGATGACCAAGAGTGC
RT DII4 F	AGCAAGCCAGATGAGTGCAT
RT DII4 R	TTCGGCTTGGACCTCTGTTT
RT DNER F	GAAGCCATCAGAGGCAACCT
RT DNER R	GGGTCCTTGTACAGTTCGCA
RT F3/Contactin 1 F	AAGGTTGGCTGAAGGATGGG
RT F3/Contactin 1 R	AAGGGGTCGAGATACCCGAA
RT GAPDH F	GACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG
RT GAPDH R	CTCCTGTTATTATGGGGTCTGG
RT Jagged1 F	GAAAGACCACTGCCGTACCA
RT Jagged1 R	CACACAGGTCCCCTATTGT
RT Jagged2 F	CCCTCTGCCCTGCTATAACG
RT Jagged2 R	ATTCCAGAGCAGATAGCGCC
RT MAGP1 F	GCAAGGTTTCATTTCCAGCCC
RT MAGP1 R	GGTGCACGGGTAAGTCTT
RT MAGP2 F	CCTCTGACTGGTACCCTA
RT MAGP2 R	TCACAGGGAGGAAGTCGGAA
RT NB3/Contactin 6 F	TATGCTCCCCAGAATGGGA
RT NB3/Contactin 6 R	ACACTTGGCAGGGTAAGACG
RT Notch2 F	GCCCCACTGTCTGTCTGTGTCCCG
RT Notch2 R	ATAACGCTAAACGTGCACTGGAG
SOST R v3	TTCTCCGCCGGTTCATGGT

#### 4.1.9 TaqMan-Sonden

Gen	TaqMan®-Sonde
<i>Sost</i>	Mm00470479_m1
<i>Col1a1</i>	Mm00801666_g1
<i>Bglap</i>	Mm03413826_mH
<i>Axin2</i>	Mm00443610_m1
<i>Apcdd1</i>	Mm01257559_m1
<i>Smpd3</i>	Mm00491359_m1
<i>Ibsp</i>	Mm00492555_m1
<i>Cxcl5</i>	Mm00436451_g1
<i>Gapdh</i>	4308313

#### 4.1.10 Lösungen und Puffer

<u>Acrylat-Gießlösung</u>	0,33 % (w/v)	Benzoylperoxid
	11 % (v/v)	Nonylphenyl-polyethyleneglykol-acetat ad Methylmethacrylat (entstabilisiert)
<u>Acrylat-Infiltrationslösung I</u>	0,33 % (w/v)	Benzoylperoxid ad Methylmethacrylat (entstabilisiert)
<u>Acrylat-Infiltrationslösung II</u>	0,33 % (w/v)	Benzoylperoxid
	11 % (v/v)	Nonylphenyl-polyethyleneglykol-acetat ad Methylmethacrylat (entstabilisiert)
<u>Alizarinrot-Färbelösung</u>	40 mM	Alizarinrot S ad H <sub>2</sub> O pH 4,2
<u>Ascorbat-Stammlösung</u>	10 mg/mL	L-Ascorbinsäure ad H <sub>2</sub> O
<u>Biopsie-Lysis-Puffer</u>	100 mM	EDTA
	50 mM	Tris Base
	100 mM	NaCl
	1 % (w/v)	SDS ad H <sub>2</sub> O pH 8,0
<u>Calcein-Injektionslösung</u>	150 mM	NaCl
	238 mM	NaHCO <sub>3</sub>
	16 mM	Calcein ad H <sub>2</sub> O pH 7,4
<u>Chromalaun-Lösung</u>	4 % (w/v)	Chromalaun ad H <sub>2</sub> O
<u>Chromalaun-Gelatine</u>	10 % (w/v)	Gelatine
	4 % (v/v)	Chromalaun Lösung
	60 Stk/L	kleine Thymol Kristalle ad H <sub>2</sub> O
<u>DEPC-H<sub>2</sub>O</u>	0,2 % (v/v)	DEPC ad H <sub>2</sub> O
<u>β-Glycerophosphat-Stammlösung</u>	2 M	β-Glycerophosphat ad H <sub>2</sub> O

## Material und Methoden

---

<u>M-CSF Stammlösung</u>	10 µg/mL	M-CSF ad H <sub>2</sub> O
<u>Natriumthiosulfatlösung</u>	5 % (w/v)	Natriumthiosulfat ad H <sub>2</sub> O
<u>PBS-Puffer</u>	10 mM 137 mM 2,7 mM 2 mM	Di-Natriumhydrogenphosphat NaCl KCl Kaliumhydrogenphosphat ad H <sub>2</sub> O pH 7,4
<u>Proteinase-K-Stammlösung</u>	1 % (w/v)	Proteinase-K ad H <sub>2</sub> O
<u>RANKL-Stammlösung</u>	10 µg/mL	msRANKL ad H <sub>2</sub> O
<u>RIPA-Puffer</u>	1 % (v/v) 1 % (w/v) 0,1 % (w/v) 150 mM 2 mM 10 mM	NP-40 Natriumdesoxycholat SDS NaCl EDTA Natriumphosphat ad H <sub>2</sub> O pH 7,4
<u>RNase A-Stammlösung</u>	5 mg/mL	RNase A ad H <sub>2</sub> O
<u>Schneidelösung</u>	0,1 % (v/v)	Polysorbat 20 ad H <sub>2</sub> O
<u>Sodaformollösung</u>	473 mM 24,8 % (v/v)	Natriumcarbonat 37 % Formaldehydlösung ad H <sub>2</sub> O
<u>Southernblot Speed Hyb II</u>	7 % (w/v) 10 % (w/v) 1,5x 200 mg/L	SDS PEG6000 SSPE Fischsperma DNA
<u>Southernblot Waschpuffer A</u>	2x 0,5 % (w/v)	SSC SDS ad H <sub>2</sub> O

<u>Southernblot Waschpuffer B</u>	0,2x SSC 0,1 % (w/v) SDS ad H <sub>2</sub> O
<u>SSC-Puffer (20x)</u>	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat ad H <sub>2</sub> O pH 7,0
<u>SSPE-Puffer (20x)</u>	3 M NaCl 200 mM Natriumdihydrogenphosphat 20 mM EDTA ad H <sub>2</sub> O pH 7,4
<u>STE-Puffer</u>	10 % (v/v) 20x SSC-Puffer 20 mM Tris/HCl 1 mM EDTA ad DEPC-H <sub>2</sub> O pH 7,5
<u>Strecklösung</u>	80 % (v/v) Isopropanol 1 Tropfen/L Monoglykol-Butylether ad H <sub>2</sub> O
<u>TAE-Puffer (50x)</u>	2 M Tris/HCl 50 mM EDTA ad H <sub>2</sub> O pH 7,8
<u>TBS-Puffer (10x)</u>	500 mM Tris/HCl 1,5 M NaCl ad H <sub>2</sub> O pH 7,4
<u>TBST-Puffer</u>	0,1 % (v/v) Polysorbat 20 ad TBS Puffer
<u>TE-Puffer</u>	10 mM Tris Base 1 mM EDTA ad H <sub>2</sub> O pH 8,0
<u>Toluidin-Färbelösung</u>	32,7 mM Toluidinblau O ad H <sub>2</sub> O pH 4,5

## Material und Methoden

---

<u>Van Gieson-Färbelösung</u>	4,27 mM	Säurefuchsin
	10 % (v/v)	Glycerin
	0,5 % (v/v)	65 % Salpetersäure ad gesättigte Pikrinsäure
<u>Vitamin-D<sub>3</sub>-Stammlösung</u>	10 µM	Vitamin-D <sub>3</sub> ad EtOH
<u>Von Kossa-Färbelösung</u>	194 mM	Silbernitrat ad H <sub>2</sub> O
<u>Westernblot Blockpuffer</u>	5% (w/v)	Milchpulver ad TBST
<u>Westernblot ECL- Chemilumineszenzlösung</u>	0,1 M	Tris Base
	0,0092 % (v/v)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	2,47 mM	Luminol
	396 µM	p-Coumarinsäure ad H <sub>2</sub> O pH 8,5
<u>Westernblot Laufpuffer (10x)</u>	250 mM	Tris Base
	1,92 M	Glycin
	1 % (w/v)	SDS ad H <sub>2</sub> O
<u>Westernblot Probenpuffer (4x)</u>	500 mM	Tris/HCl
	4 % (w/v)	SDS
	40 % (v/v)	Glycerin
	40 mM	DTT
	1 Spatelspitze	Bromphenolblau ad H <sub>2</sub> O pH 6,8
<u>Westernblot Sammelgelpuffer</u>	1,5 M	Tris/HCl
	0,4 % (w/v)	SDS ad H <sub>2</sub> O pH 6,8
<u>Westernblot Transferpuffer</u>	25 mM	Tris/HCl
	192 mM	Glycin
	20 % (v/v)	Methanol ad H <sub>2</sub> O pH 8,3
<u>Westernblot Trenngelpuffer</u>	1,5 M	Tris/HCl

0,4 % (w/v) SDS  
ad H<sub>2</sub>O  
pH 8,8

Wnt-Stammlösung 0,1 % (w/v) BSA  
100 mg/mL Wnt-Ligand  
ad PBS

X-Gal-Lösung 10 mM X-Gal  
ad DMF

#### 4.1.11 Bakterien-und Zellkulturmedien

Minimalmedium 32,5 g/L α-MEM Pulver  
2,2 g/L NaHCO<sub>3</sub>  
ad H<sub>2</sub>O  
pH 7,4

Verdaumedium 100 mg Collagenase Ia  
200 mg Dispase II  
100 mL Minimalmedium

Osteoblasten Medium 10 % (v/v) FCS (Obl)  
100 U/mL Penicillin/Streptomycin  
ad Minimalmedium

Osteoblasten  
Differenzierungsmedium 50 µg/mL Ascorbinsäure  
10 mM β-Glycerophosphat  
ad Osteoblastenmedium

Osteoklasten Medium 10 % (v/v) FCS (Ocl)  
100 U/mL Penicillin/Streptomycin  
ad Minimalmedium

Osteoklasten  
Differenzierungsmedium 10 nM Vitamin-D<sub>3</sub>  
20 ng/mL MCSF  
40 ng/mL msRANKL  
ad Osteoklastenmedium

LB-Medium 32 g/L LB-Pulver  
ad H<sub>2</sub>O

LB/Amp-Medium 286 µM Ampicilin  
ad LB-Medium

#### 4.1.12 Softwareliste

Programm	Version	Hersteller
MS Office 2010	14.0	Microsoft Corp. (Redmond, US)
Fiji (ImageJ)	1.48p	Schindelin <i>et al.</i> , 2012 <sup>[251]</sup>
BoneJ	01.03.2011	Doube <i>et al.</i> , 2010 <sup>[252]</sup>
BioEdit	7.2.5	Ibis Biosciences (Carlsbad, US)
Serial Cloner	2.5	Serial Basics
StepOne™ Software	2.2.2	Applied Biosystems, Inc. (Foster City, US)
4D	12.4	4D Deutschland GmbH (Eching, DE)
Prism	6.01	GraphPad Software, Inc. (La Jolla, US)
SPSS Statistics	20	International Business Machines Corp. (Armonk, US)
MicroCT Software Suite	4.05	Scanco Medical AG (Brüttisellen, CH)
Quantity One	4.2.1	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, US)
Softmax Pro	3.1.2	Molecular Devices, LLC (Sunnyvale, US)
EndNote	X5	Thomson Reuters Corp. (New York, US)
Osteomeasure	3.2.1.1	Osteometrics, Inc. (Decatur, US)
Bioquant Osteo	7.00.10	BIOQUANT Image Analysis Corp. (Nashville, US)
Finite Element Software	1.13	Scanco Medical AG (Brüttisellen, CH)

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Tierversuche

Alle Tierversuche wurden von der Tierschutzkommission des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen begutachtet und genehmigt.

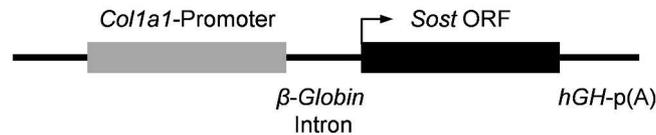
#### 4.2.1.1 Mausmodelle

In dieser Arbeit wurden Mausmodelle eingesetzt und miteinander verpaart, die aus unterschiedlichen Quellen stammten. Die genaue Herkunft sowie die Eigenschaften der Linien sind im weiteren Verlauf aufgeführt.

##### 4.2.1.1.1 Col1a1-Sost

Die *Sost*-transgenen Mäuse (Col1a1-Sost/Htg) sollten das murine *Sost*-Gen Osteoblasten-spezifisch unter der Kontrolle des Typ-I Kollagen (*Col1a1*)-Promoters exprimieren. Die eigentliche Generierung der Mäuse erfolgte nicht im Rahmen dieser Arbeit und die Methode wird aus diesem Grund an dieser Stelle nur kurz zusammengefasst. Es wurde von Franz Jakob und Peggy Benisch (Universität Ulm) ein Plasmid zusammengestellt, in dem die kodierende Sequenz des murinen *Sost*-Gens hinter ein 2,3 kB Fragment des Typ-I Kollagen-Promoters kloniert wurde. Der Vektor mit dem Promoterfragment wurde von Benoit de Crombrughe (University of Texas) zur Verfügung gestellt. Von diesem Promoter konnte bereits gezeigt werden, dass er sich für eine Osteoblasten-spezifische Genexpression eignet<sup>[253,254]</sup>. Das aus Promotor und kodierender Sequenz bestehende Konstrukt wurde mittels Restriktionsverdau aus dem Vektor geschnitten, aufgereinigt und an die Transgenic

Mouse Facility des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) weitergegeben. Dort wurden transgene Gründertiere für die Kolonie durch Mikroinjektion des DNA-Konstruktes in Pronuklei generiert. Der genetische Hintergrund dieser Mauslinie war C57Bl/6.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung des Konstruktes zur Osteoblasten-spezifischen Überexpression von *Sost*.** Das 2,3 kB Fragment des *Col1a1*-Promoters liegt, durch eine  $\beta$ -Globin Intron Sequenz getrennt, vor dem offenen Leserahmen des murinen *Sost* Gens. Dieser wird gefolgt von der Poly-A-Sequenz des humanen Somatotropins (hGH).

#### 4.2.1.1.2 *Col1a1-Krm2*

Die *Kremen2*-transgenen Mäuse (*Col1a1-Krm2/Hhtg*) wurden, ähnlich wie die *Sost*-transgenen Mäuse, am Institut generiert und bereits untersucht<sup>[118]</sup>. Auch hier diente das 2,3 kB Fragment des Typ-I Kollagen-Promoters als Promoter, der die Transkription der kodierenden Sequenz des *Krm2*-Gens reguliert und somit eine Osteoblasten-spezifische Expression von *Kremen2* ermöglicht. Der publizierte Phänotyp dieser Mäuse beschreibt eine dramatisch reduzierte Knochenmasse, die auf einer erhöhten Osteoklasten-Anzahl und einer reduzierten Knochenformationsrate bei unveränderter Osteoblasten-Anzahl zurückzuführen ist. Der genetische Hintergrund dieser Mauslinie war C57Bl/6.

#### 4.2.1.1.3 *Fzd9*-KO

Die *Fzd9*-Knockout Mäuse (B6.129X1-*Fzd9*<sup>tm1Uta</sup>) wurden freundlicherweise von Uta Francke (Stanford University School of Medicine) dem Institut zur Verfügung gestellt und im Rahmen von vorangegangenen Arbeiten bereits näher untersucht<sup>[149,255]</sup>. Die Inaktivierung des *Frizzled9*-Gens wurde durch das Ersetzen des gesamten offenen Leserahmens durch eine Neomycin-Kassette mittels homologer Rekombination erreicht. Der skelettale Phänotyp dieser Mauslinie zeichnete sich durch eine leicht reduzierte Knochenmasse auf Grund einer verringerten Osteoblasten-Anzahl und Knochenbildungsrate aus. Der genetische Hintergrund dieser Mauslinie war eine Mischung aus C57Bl/6 und Sv/129.

#### 4.2.1.1.4 *Lrp5* A213V

Die *Lrp5* A213V HBM Mauslinie (B6;129-*Lrp5*<sup>tm2.1Mawa</sup>/J) wurde vom Jackson Laboratory (Maine, US) käuflich erworben und trägt global die missense (sinnverändernde) Mutation A213V im Rezeptor *Lrp5*, die der humanen Mutation A214V entspricht. Diese Linie wurde ursprünglich in Matthew Warmans Arbeitsgruppe (Children's Hospital, Boston) generiert und zeichnet sich durch eine stark erhöhte Knochenmasse auf Grund einer erhöhten Knochenformationsrate aus<sup>[155]</sup>.

#### 4.2.1.1.5 Lrp5 G170V

Die Lrp5 G170V HBM Mauslinie (B6;129-Lrp5<sup>tm1.1Mawa</sup>/J) wurde ebenfalls vom Jackson Laboratory (Maine, US) käuflich erworben und trägt global die missense Mutation G170V im Rezeptor Lrp5, die der humanen Mutation G171V entspricht. Diese Linie wurde ursprünglich in Matthew Warmans Arbeitsgruppe (Children's Hospital, Boston) generiert und zeichnet sich durch eine stark erhöhte Knochenmasse auf Grund einer erhöhten Knochenformationsrate aus<sup>[155]</sup>. Der bisher beschriebene Phänotyp ist nahezu identisch mit der A213V Mutation, jedoch konnten kleine Unterschiede bei dem Wachstum des kortikalen Knochens unter bestimmten Belastungsbedingungen beobachtet werden<sup>[256,257]</sup>.

#### 4.2.1.1.6 Notch2-floxed

Die *Notch2*-floxed Mauslinie (B6.129S-*Notch2*<sup>tm3Grid</sup>/J) wurde von dem Jackson Laboratory (Maine, US) generiert und erworben. Diese Linie zeichnet sich dadurch aus, das Exon 3 des *Notch2*-Gens von loxP-Regionen auf beiden Seiten flankiert wird (floxed = flanked by loxP). Durch Kombination mit Mauslinien, die die Cre-Rekombinase exprimieren, kann der Bereich zwischen den loxP-Sequenzen ausgeschnitten werden. Dem verbleibenden Gen fehlt anschließend das Exon 3, wodurch es nicht länger funktionell ist und ein Knock-Out Zustand erreicht wurde.

#### 4.2.1.1.7 LysM-Cre

Die LysM-Cre Mauslinie (B6.129P2-Lyz2<sup>tm1(cre)lfo</sup>/J), die ursprünglich an der Universität zu Köln generiert wurde<sup>[258]</sup>, wurde vom Jackson Laboratory (Maine, US) erworben. Diese transgene Linie exprimiert die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des *LysM*-Promoters, wodurch eine spezifische Synthese des Enzyms in myeloischen Zellen ermöglicht wird. Die Rekombinase-Aktivität wurde insbesondere in Granulozyten und Makrophagen beobachtet, aus denen auch Osteoklasten hervorgehen. Somit ermöglicht diese Linie eine Osteoklasten-spezifische Inaktivierung von Genen, die von loxP Regionen flankiert sind.

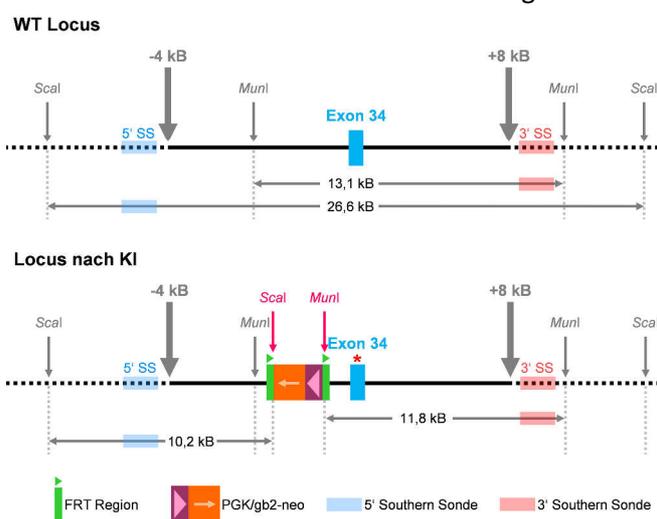
#### 4.2.1.1.8 Runx2-Cre

Die transgene Runx2-Cre Mauslinie (Tg(Runx2-icre)1Jtuc) wurde im Arbeitskreis von Jan Tuckermann (Universität Ulm) generiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Diese Linie exprimiert die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des *Runx2*-Promoters, der zu einem frühen Zeitpunkt der Osteoblasten-Differenzierung aktiv ist. Somit ist es möglich entsprechende, von loxP Sequenzen flankierte Gene Osteoblasten-spezifisch zu inaktivieren.

#### 4.2.1.1.9 Notch2-HCS

Die Notch2 HCS Mauslinie (Notch2 6272delT/Hhtg) wurde im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit der Transgenic Mouse Facility des UKE unter der Leitung von Irm Hermanns-Borgmeyer generiert. In das *Notch2*-Gen wurde mittels homologer Rekombination eine Mutation (6272delT) eingefügt, die bei Patienten beobachtet wurde, die am Hajdu-Cheney Syndrom leiden<sup>[45]</sup>. Ein entsprechendes Targeting-Konstrukt wurde von der Gene Bridges GmbH (Heidelberg, DE) produziert. Dieses beinhaltete lange flankierende Bereiche (5': 4kB; 3': 8kB) die homolog zum murinen *Notch2*-Gen waren, die Mutation an Position 6272 sowie kurz davor eine von FRT-Sequenzen flankierte Neomycin-Kassette, die Zellen, die dieses Konstrukt aufgenommen hatten, eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Neomycin vermittelte. Das Konstrukt wurde in Bakterienkultur amplifiziert, durch Plasmidpräparation aufgereinigt und durch enzymatischen Verdau mit *AscI* linearisiert. Das linearisierte Konstrukt wurde weiter über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und für die Transfektion eingesetzt. 30 µg des Konstruktes wurden per Elektroporation in murine embryonale Stammzellen transfiziert. Diese wurden in Neomycin-haltigem Selektionsmedium auf einer Schicht muriner embryonaler Fibroblasten als Versorger-Zellen kultiviert. Vielversprechend aussehende Kolonien wurden manuell in einzelne Vertiefungen von Zellkulturplatten gesetzt und weiter expandiert. Einzelne Zellkolonien wurden geteilt und ein Teil wurde eingefroren während aus dem anderen DNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert wurde. Die Klone der 384 generierten,

die das Konstrukt mittels homologer Rekombination an der korrekten Position in das Genom integriert hatten, wurden mittels Long-Range Polymerase Kettenreaktion (PCR) mit den in Abschnitt 4.1.8 aufgeführten Primern identifiziert, die spezifisch für eine Sequenz in der 5'-Region des Gens außerhalb des Targeting-Konstruktes und für die Neomycin-Kassette innerhalb des Targeting-Konstruktes waren. Die auf diese Art identifizierten Klone wurden mittels Southernblot verifiziert. Hierzu erfolgte ein Enzymatischer Verdau der genomischen DNA mit *Scal* für die Analyse des 5'-Bereiches und *MunI* für den



**Abbildung 9: Notch2 Knock-In Konstrukt und Southernblot**

**Strategie.** Gezeigt sind relevante Schnittstellen für Restriktionsenzyme und die Größe der durch die entsprechenden Southernblot-Sonden detektierten Fragmente. Durch den Knock-In wurde zusätzlich zu der Mutation in Exon 34 eine von FRT-Regionen flankierte Selektionskassette (PGK/gb2-neo) eingebracht. Dieser Bereich enthielt auch neue Restriktionsschnittstellen, wodurch es bei einem erfolgreichen Knock-In zu einer veränderten Größe der detektierten Fragmente kam.

3'-Bereich. Das spezifische Bandenmuster des Verdaus nach Auftrennung im Agarose-Gel wurde mittels Southernblot nachgewiesen. Hierfür wurden DNA-Oligomer Sonden benutzt, die zuvor mit den in Abschnitt 4.1.8 aufgeführten Primern generiert wurden. Zwei verifizierte Klone wurden in murine Blastozysten injiziert, die wiederum in scheinchwangere Mäuse implantiert wurden. Von den aus den Blastozyten herangewachsenen, chimären Mäusen wurden anhand der Fellfarbe für die Verpaarung geeignete Tiere ausgewählt. Die Nachkommen dieser Mäuse (F1) wurden mittels PCR Genotypisiert, um die Präsenz des modifizierten Gens nachzuweisen. Da es sich bei der F1-Generation um keine Chimären Tiere mehr handelte, konnte davon ausgegangen werden, dass bei einem positiven Genotypisierungsergebnis das mutierte Gen in allen Zellen des Körpers vorhanden war. Entsprechende Tiere der F1-Generation wurden mit Mäusen aus der Flip-Deleter Kolonie verpaart, um über das Flp-FRT-System die Neomycin-Kassette aus dem Genom zu entfernen. Die Nachkommen (F2), bei denen erfolgreich die Selektionskassette entfernt wurde, wurden anschließend mit C57Bl6/J Wildtyp (WT) Mäusen verpaart, um auch die FLP-Rekombinase aus ihrem genetischen Repertoire zu entfernen. Nachkommen (F3) mit dem mutierten *Notch2*-Gen und ohne FLP-Rekombinase wurden anschließend erneut mit Wildtyp Mäusen verpaart, um Tiere mit und ohne HCS Mutation zu erhalten, die schlussendlich analysiert werden konnten.

#### 4.2.1.1.10 Flip-Deleter

Die Flip-Deleter Kolonie (B6;SJL-Tg(ACTFLPe)9205Dym/J) wurde ursprünglich von dem Jackson Laboratory (Maine, US) erworben und steht am UKE als allgemein zugängliche Linie zur Verfügung. Sie exprimiert die FLP-Rekombinase unter der Kontrolle des humanen ACTB-Promoters. Dadurch kommt es zu einer globalen Expression ab Tag E10,5 der Embryonalentwicklung. Diese Linie ist geeignet, um durch FRT-Sequenzen flankierte Bereiche des Genoms im gesamten Organismus zu entfernen.

#### **4.2.1.2 Haltung /Verpaarung**

Die Haltung aller Mauslinien erfolgte in den Räumlichkeiten der Zentralen Versuchstierhaltung (VTH) des UKE. Die Versorgung der Mäuse sowie das Ansetzen von Verpaarungen wurden von den Tierpflegern der VTH übernommen. Den Tieren stand Trockenfutter und Leitungswasser *ad libitum* zur Verfügung

Zur Charakterisierung der *Col1a1-Sost* Mauslinie wurden weibliche transgene Nachkommen im Vergleich zu Wildtyp-Wurfsgeschwistern im Alter von 6, 24 und 52 Wochen analysiert. Um einen Effekt durch die zufällige Integration des Konstruktes im Genom auszuschließen, wurden auch mehrere unabhängig generierte Gründertiere untersucht, bevor die Zucht auf die Nachkommen eines einzigen Gründertieres beschränkt wurde.

Zur Analyse der Interaktion von Komponenten des Wnt-Rezeptorkomplexes wurden die Genotypen der Mauslinien *Col1a1-Sost*, *Col1a1-Krm2* und *Fzd9-KO* mit je *Lrp5 A213V* und *Lrp5 G170V* HBM Linien gekreuzt und sowohl die weiblichen als auch die männlichen Nachkommen mit kombinierten Genotypen sowie deren Wurfsgeschwister mit nur einer oder keiner (WT) genetischen Veränderung im Alter von 12 Wochen untersucht.

Für die Untersuchung des Einflusses von *Notch2* auf den Knochenstoffwechsel wurden Mauslinien generiert, bei denen das *Notch2*-Gen Osteoblasten- oder Osteoklasten-spezifisch inaktiviert wurde. Hierzu wurden *Notch2*-floxed Mäuse mit respektive *Runx2-Cre* oder *LysM-Cre* Tieren verpaart. Weibliche Nachkommen mit Cre-Rekombinase wurden mit Wurfsgeschwistern ohne Cre-Rekombinase im Alter von 12, 24, 30 oder 52 Wochen verglichen. Des Weiteren wurden weibliche *Notch2*-HCS Tiere sowie WT-Wurfsgeschwistern im Alter von 24 Wochen analysiert.

#### **4.2.1.3 Genotypisierung**

Die Genotypisierung der in dieser Arbeit benutzten Mauslinien erfolgte mittels PCR. Hierzu wurde zunächst DNA aus Biopsien der Schwanzspitzen von neonatalen Mäusen isoliert, die von den Tierpflegern der zentralen Tierhaltung abgenommen wurden. Die DNA-Isolation erfolgte mittels des KAPA Mouse Genotyping Kits (Peqlab Biotechnologie GmbH) nach Herstellerangaben. Anschließend wurde 1 µL des Ansatzes für die eigentliche PCR eingesetzt. In Abschnitt 4.1.8 sind die für die jeweiligen Linien eingesetzten Primer und in Tabelle 2 die entsprechenden PCR Ansätze sowie Reaktionsbedingungen aufgeführt.

##### 4.2.1.3.1 Nachweis der Gewebe-spezifischen Rekombination

Die Gewebe-spezifische Deletion des *Notch2* Exon 3 durch Cre-Rekombinasen konnte mittels PCR nachgewiesen werden. Hierzu wurde DNA aus einer Gewebe-Auswahl mittels Phenol/Chloroform-Extraktion gewonnen und als Vorlage für die PCR Reaktionen 'Notch2 Rec Flox' und 'Notch2 Del' eingesetzt. Diese erlaubten den Nachweis mittels spezifischer Primerpaare von respektive der Präsenz der loxP-Sequenzen oder der Deletion der flankierten Region.

#### **4.2.1.4 Calcein-Markierung**

Zur histologischen Bestimmung der kinetischen Histomorphometrie-Parameter, insbesondere der Knochenformationsrate, wurden die Mäuse mit Calcein markiert, einem Fluoreszenzfarbstoff, der sich an neu gebildeten Knochen anlagert. Jede Maus bekam zweimal im Abstand von sieben Tagen (neun und zwei Tage vor dem Tötungszeitpunkt) eine interperitoneale Injektion von 0,1 mL steriler Calcein-Injektionslösung, die zuvor auf 37 °C vorgewärmt wurde. Für die Injektion wurden 1 mL Spritzen und Gr.20 Kanülen verwendet.

#### **4.2.1.5 Präparation der Mäuse**

Für radiologische, histologische und biomechanische Analysen wurden die Mäuse zunächst mit einem 80 % (v/v) CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> Gasgemisch betäubt bevor die eigentliche Tötung durch Einleitung von 100 % CO<sub>2</sub> erfolgte. Direkt nach der Tötung und Überprüfung des Fehlens des Zwischenzehenreflexes wurden die Tiere gewogen. Anschließend wurden sie mit einer 80 % Ethanol Lösung eingesprüht um Staubentwicklung und Haarflug zu verhindern. Die Blutabnahme für Serumanalysen erfolgte *post mortem* mittels Herzpunktion. Ein Teil der Schwanzspitze wurde zur Bestätigung des Genotyps abgenommen. Anschließend wurden die Organe des Brust und Bauchraums entfernt und bei Bedarf eine Auswahl einzeln gewogen. Diese Auswahl umfasste die gesamte Leber, die gesamte Milz, das Herz nach Ausdrücken und das Viszeralfettgewebe. Bei Männchen wurden hierfür die Gewebelappen die von den Hoden ausgehen verwendet, bei weiblichen Mäusen das Fett, das, von den Nieren ausgehend, entlang des Uterus verläuft. Die Tierkadaver wurden mit Pinnwandnadeln auf Korkplatten in gestreckter Haltung fixiert um die richtige Orientierung der Knochen zueinander für die Histologie zu gewährleisten. Die Fixierung des Gewebes erfolgte mit 3,5 % Formafix Lösung für 24-48 h. Im Anschluss wurden die Skelette in 80 % Ethanol bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

#### **4.2.1.6 Serumgewinnung**

Das mit 1 mL Spritzen mit Größe 16 Kanülen *post mortem* abgenommene Vollblut wurde für 10-30 Minuten bei Raumtemperatur in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß ruhen gelassen bis es geronnen war. Anschließend wurden die Gerinnungsfaktoren und zellulären Bestandteile durch 6 minütige Zentrifugation bei 3300 g abgetrennt und das Serum im Überstand in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Das Serum wurde anschließend für weitere Untersuchungen bei -80 °C gelagert. Um einen möglichst konstanten Stoffwechselstatus zu erreichen, wurde den Tieren 5 h vor Blutabnahme das Futter entzogen.

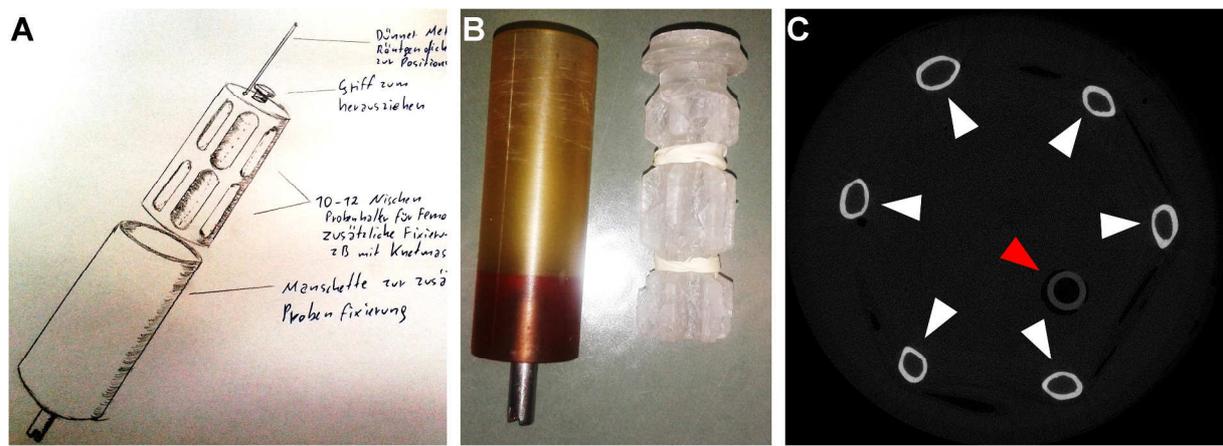
### **4.2.2 Radiologische Untersuchungen**

#### **4.2.2.1 Kontaktradiographie**

Die fixierten Mausskelette wurden auf einer Röntgenkassette platziert und in einem Röntgenkabinett (Faxitron Xray Corp.) für 2 s bei 35 kV belichtet. Anschließend wurden die Röntgenfilme in einem automatischen Entwicklersystem (Protec GmbH & Co. KG) entwickelt und mit einem Flachbettscanner mit Durchlichteinheit (Hewlett-Packard Company, L.P.) bei einer Auflösung von 150 dpi in 8-bit Graustufen digitalisiert. Alternativ wurden Kontaktradiographien mittels eines digitalen Röntgenkabinetts (Faxitron Xray Corp.) erstellt. Hierbei wurden die Skelette für 3,2 s mit 45 kV belichtet. Die digitalen oder digitalisierten Röntgenaufnahmen wurden benutzt um die Länge der Tiere (Schädelspitze bis zum 7. Kreuzbeinwirbel) und des Femurs zu bestimmen.

#### 4.2.2.2 Mikro-Computertomographie

Mittels Mikro-Computertomographie ( $\mu$ CT), auch digitale Volumentomographie, ist es möglich schichtweise Röntgenbilder von kleinen Proben in hoher Auflösung zu erstellen. Diese erlauben eine dreidimensionale Rekonstruktion der gescannten Proben und ermöglichen automatische Analysen knochenrelevanter Parameter im dreidimensionalen Raum, da mit Hilfe dieser Methode auch die Trabekel von Kleintierknochen dargestellt werden können. Zunächst wurde der rechte Femur aus den fixierten Mauskadavern präpariert. Dieser wurde in eine speziell für diesen Zweck entwickelte Halterung platziert, die gewährleistet, dass alle Proben während des gesamten Scans in der korrekten Orientierung verblieben um so vergleichbare Analysen zu ermöglichen.



**Abbildung 10:  $\mu$ CT-Probenhalter für Femora.** Dieser Probenhalter ermöglichte das gleichzeitige Scannen von bis zu zwölf Femora. **A:** Erste Konzeptzeichnung des Halters. **B:** Der fertige Probenhalter gefräst aus Polycarbonat. **C:** Beispiel einer Scanebene. Weiße Pfeile markieren Femora (transversal im Mittelschaft-Bereich). Der rote Pfeil markiert den eingebetteten Polyethylen-Schlauch, der eine eindeutige Identifizierung der Proben ermöglicht.

Der beladene Probenhalter wurde in ein  $\mu$ CT 40 (Scanco Medical AG) platziert und die Längsachse der Femora wurde orthogonal zur Röntgenquelle ausgerichtet. Der Scan der Proben erfolgte bei einer Voxelgröße von  $10\mu\text{m}$ . Hierzu wurden 100 Projektionen pro Schicht mit 2048 Abtastungen und 200 s Abtastungszeit bei einer Röhrenenergie von 55 kVp und einer Intensität von  $145\mu\text{A}$  aufgenommen. Rekonstruierte Schichten wurden mittels des  $\mu$ CT Evaluation Program V6.5-2 der Scanco MicroCT Software Suite untersucht. 3D Modelle der Knochen wurden bei einem Schwellenwert von 300 mit dem Hersteller-Skript 'UCT\_EVALUATIONV6' erstellt. Bilder der 3D Rekonstruktionen wurden mittels des Programs  $\mu$ CT Ray V3.8 aus derselben Software Suite generiert. Strukturelle Parameter der Knochen wurden automatisch für manuell bestimmte Bereiche berechnet. Trabekulärer Knochen wurde in der distalen Metaphyse in einem Volumen das sich  $2500\mu\text{m}$  bis  $500\mu\text{m}$  proximal der Wachstumsfuge befand mit dem Skript 'UCT\_EVALUATIONV6\_MULTIAUTO' in Kombination mit 'IPLV6\_AUTOCONTOUR\_DUALTH\_GAUSS\_SLIMIRR' (Parameter: Seg:

0.8|1|250|1000|6|0.8|1|250|1000|6|0.8|2| 300|1000|6; Misc: 25|30|10|2|3|1) analysiert. Dies erlaubte die Bestimmung der folgenden Messwerte:

BV/TV: Bone Volume per Tissue Volume, Knochenvolumen pro Gewebevolumen, ein Maß für die Knochendichte.

Tb.Th: Trabecular Thickness, Trabekeldicke, ein Maß für den durchschnittlichen Durchmesser der einzelnen Trabekel.

Tb.N: Trabecular Number, Trabekelanzahl, ein Maß für die Anzahl an Trabekeln, die theoretisch pro Längeneinheit berührt werden, wenn eine Linie in beliebiger Orientierung durch das untersuchte Volumen gelegt wird.

Tb.Sp: Trabecular Spacing, Trabekelabstand, ein Maß für den mittleren Abstand zwischen einzelnen Trabekeln.

Kortikaler Knochen wurde in einem 1000 µm langen Volumen in der Mitte der Diaphyse unter Anwendung desselben Skriptes mit folgenden Parametern untersucht: Seg: 0.8|1|300|1000|6|0.8|1|300|1000|6|0.8|2|350|1000|6|0.8|2|350|1000|6; Misc: 10|20|1|1|0|1. Auf diese Weise konnten die folgenden Messwerte bestimmt werden:

C.Th: Cortical Thickness, kortikale Dicke.

C.Por: Cortical Porosity, kortikale Porosität, wird aus dem Inversen des BV/TV-Wertes gebildet und ist ein Maß für den Anteil an Hohlräumen in der Kortikalis.

Ms.D: Midshaft Diameter, Durchmesser im mittleren Schaftbereich, dieser Wert wurde unter Annahme eines perfekten Kreises aus der mittleren Gewebefläche im untersuchten Volumen berechnet.

Die Femora von Mäusen, bei denen eine Osteoblasten-spezifische Inaktivierung des *Notch2*-Gens hervorgerufen werden sollte, sowie die Femora der entsprechenden Kontrolltiere, wurden mit den oben beschriebenen Methoden aber in abweichenden Abschnitten des Knochens analysiert. Es wurden fünf 1000 µm lange Regionen des Knochens untersucht, die sich 100 µm unterhalb des *Trochanter minor* (R1), um die Mitte des Femurschaftes (R3), 1500-500 µm proximal von der distalen Wachstumsfuge (R5), sowie mittig zwischen R1 und R3 (R2) und R3 und R5 (R4) befanden.

### 4.2.3 Histologie

Zur Erhebung der histomorphometrischen Daten wurden Wirbelkörper und bei Bedarf Tibiae der untersuchten Mäuse histologisch aufbereitet. Hierbei kam das spezielle Verfahren der unentkalkten

Knochenhistologie zum Einsatz. Anschließend folgten Färbungen, die die strukturellen und zellulären Eigenschaften der Knochen sichtbar machten.

#### **4.2.3.1 Unentkalkte Knochenhistologie**

Im Gegensatz zur entkalkten Knochenhistologie, die wie eine gewöhnliche Paraffinhistologie durchgeführt werden kann, erfordert die unentkalkte Knochenhistologie besondere Verfahren und Geräte. Der Vorteil liegt in der klar ersichtlichen Knochenmorphologie und der Erkennbarkeit des Mineralisationsgrades. Zur histologischen Analyse wurden zunächst die Wirbelkörper L1-L4 sowie die rechte Tibia aus den fixierten Mausekadavern präpariert. Diese wurden mit Hilfe eines Autotechnikons (Bavimed Laborgeräte GmbH) in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert: 1-5 h 70 % EtOH, 1h 70 % EtOH, 2 x 1h 80 % EtOH, 4 x 1h 96 % EtOH, 4x 100 % EtOH. Anschließend wurden die Proben in Infiltrationslösung I transferiert und nach frühestens 24h bei 4 °C in Infiltrationslösung II überführt. Nachdem diese mindestens 24h in der zweiten Infiltrationslösung bei 4 °C verblieben waren, konnte die Einbettung in Acrylat erfolgen. Zu Methylmethacrylat-haltiger Gießlösung wurde 0,5 % (V/V) DMPT als Starter für den Polymerisationsprozess zugegeben und jeweils 10-15 mL der Lösung in Rollrand-Gläser abgefüllt. Die Proben wurden in den Gläsern platziert, wobei die Wirbelkörpern mit der ventralen und die Tibiae mit der lateralen Seite nach unten ausgerichtet wurden. Nach Versiegeln der Gläser mit Schnappdeckeln wurde das Acrylat bei 4 °C aushärten gelassen. Sobald der Polymerisationsprozess abgeschlossen war, konnten die Acrylatblöcke durch Zerstören der Gläser freigelegt werden. Im Anschluss wurde das Material auf einen diamantförmigen Bereich um die Probe zurechtgeschliffen, um den späteren Schneidevorgang zu erleichtern. Histologische Schnitte von 4 und 12 µm Dicke wurden an einem Rotationsmikrotom (Cambridge Instruments Co. Ltd.) mit speziellen Klingen für Acrylathistologie angefertigt. Um eine Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten, wurden stets Schnitte aus der gleichen Ebene gewonnen. Bei Wirbelkörpern wurde diese an den vom eigentlichen Wirbelkörper abgehenden Dornfortsätzen identifiziert. Bei Tibien wurde der Block so lange angeschnitten, bis der Markraum vollständig eröffnet war. Die Schnitte wurden auf zuvor mit Chromalaun-Gelatine beschichteten Objektträger gezogen und zum Strecken mit Strecklösung benetzt. Anschließend wurden die Schnitte mit Polyethylen-Deckfolien abgedeckt und bei 60 °C über Nacht getrocknet. Die trockenen Schnitte wurden bis zur Färbung bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln gelagert.

#### **4.2.3.2 Färbungen**

##### **4.2.3.2.1 Von Kossa/van Gieson-Färbung**

Die von Kossa/van Gieson-Färbung erlaubt eine klare Identifizierung von mineralisiertem Knochen. In dieser Färbung wird mineralisierter Knochen schwarz, Osteoid und Bindegewebe rot und Muskeln

und Erythrozyte gelblich dargestellt. Die Färbung von 4 µm dicken Schnitten erfolgte nach folgendem Protokoll:

3x 5 min Entplaster (2-Methoxyethylacetat), 2x 2 min 100% EtOH, 2 min 96% EtOH, 2 min 80% EtOH, 2 min 70% EtOH, 2 min 50% EtOH, 3-5x waschen mit H<sub>2</sub>O, 5 min Von Kossa-Färbelösung, 10 min laufendes Leitungswasser, 5 min Sodaformollösung, 10 min laufendes Leitungswasser, 5 min Natriumthiosulfatlösung, 10 min laufendes Leitungswasser, 20 min van Gieson-Färbelösung, kurz laufendes Leitungswasser, kurz 80% EtOH, kurz 96% EtOH, 2x kurz 100% EtOH, 3x 5 min Xylol.

Anschließend wurden Deckgläser mit DPX-Eindeckmittel aufgebracht.

#### 4.2.3.2 Toluidin Blau-Färbung

Die Toluidin Blau-Färbung färbt Gewebe und zelluläre Bestandteile, abhängig vom Proteoglykangehalt, in unterschiedlichen Blau-Schattierungen an. Dies ermöglicht eine gute morphologische Erkennbarkeit einzelner Zellen. Die Färbung von 4 µm dicken Schnitten erfolgte nach folgendem Protokoll:

3x 5 min Entplaster, 2x 2 min 100 % EtOH, 2 min 96 % EtOH, 2 min 80 % EtOH, 2 min 70 % EtOH, 2 min 50 % EtOH, 3-5x waschen mit H<sub>2</sub>O, 30 min Toluidin-Färbelösung, waschen mit H<sub>2</sub>O, waschen mit 50 % EtOH, 2 min 70 % EtOH, 2 min 80 % EtOH, 2 min 96 % EtOH, 5 min 100 % EtOH, waschen mit 100 % EtOH, 3x 5 min Xylol.

Anschließend wurden Deckgläser mit DPX-Eindeckmittel aufgebracht.

#### 4.2.3.2.3 Visualisierung der Calcein-Markierungen

Die Calcein-Markierung ermöglicht die Bestimmung von kinetischen Knochenparametern wie der Knochenformationsrate. Da der Fluoreszenzfarbstoff den Tieren injiziert und sich an neu gebildeten Knochen angelagert hatte, war keine weitere Färbung der Schnitte notwendig. Auf 12 µm dicke histologische Schnitte wurden lediglich Deckgläser mit DPX-Eindeckmittel aufgebracht.

#### 4.2.3.3 *Histomorphometrie*

Mittels der Histomorphometrie konnten alle relevanten Parameter des Knochens bestimmt werden. Generell wurden alle Messungen nach den Vorgaben der amerikanischen Gesellschaft zur Knochen- und Mineralforschung (American Society for Bone and Mineral Research = ASBMR) durchgeführt<sup>[259]</sup>. Einige der erhobenen Messwerte stellen dreidimensionale Einheiten dar, die auf Basis der tatsächlich gemessenen, zweidimensionalen Werte berechnet wurden. Die entsprechenden Berechnungen und Annahmen, auf denen diese basieren sind ebenfalls von der ASBMR vorgegeben und wurden in der jeweiligen Analysesoftware automatisch durchgeführt.

#### 4.2.3.3.1 Strukturelle Histomorphometrie

Die strukturelle Histomorphometrie erlaubt die Bestimmung struktureller Eigenschaften der Mikroarchitektur des Knochens. Zu diesen zählen BV/TV, Tb.Th, Tb.N und Tb.Sp. Es wurde der trabekuläre Bereich in den Wirbelkörper L4 und L3 in von Kossa/ van Gieson gefärbten Schnitten analysiert. Die Messung erfolgte semi-automatisch mit der Bioquant Osteo Software. Der Schwellenwert zur Identifizierung des Knochens betrug 110 im Rot-Kanal.

#### 4.2.3.3.2 Zelluläre Histomorphometrie

Mit der zellulären Histomorphometrie ist es möglich, die zellulären Eigenschaften des Knochens näher zu untersuchen. Es wurde der trabekuläre Bereich des L4 Wirbelkörpers in den Toluidin Blau-gefärbten Schnitten manuell mit Hilfe der Osteomeasure Software vermessen. Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Messwerte waren:

N.Ob/B.Pm: Number of Osteoblasts per Bone Perimeter, Anzahl der Osteoblasten pro Längeneinheit des Knochenumfangs. Ein Maß für die Osteoblasten Zellzahl relativiert auf die tatsächlich vorhandene Menge an Knochen.

N.Oc/B.Pm: Number of Osteoclasts per Bone Perimeter, Anzahl der Osteoklasten pro Längeneinheit des Knochenumfangs. Ein Maß für die Osteoklasten Zellzahl relativiert auf die tatsächlich vorhandene Menge an Knochen.

Ob.S/BS: Osteoblast Surface per Bone Surface, eine relative Angabe der von Osteoblasten belegten Knochenoberfläche.

Oc.S/BS: Osteoclast Surface per Bone Surface, eine relative Angabe der von Osteoklasten belegten Knochenoberfläche.

N.Ot/B.Ar: Number of Osteocytes per Bone Area, Anzahl der Osteozyten pro Knochenfläche, ein Maß für die Dichte der Osteozyten im Knochen.

OV/BV: Osteoid Volume per Bone Volume, Osteoidvolumen pro Knochenvolumen, ein Maß für den Mineralisationsgrad des Knochens. Dieser Parameter zählt eigentlich zu den strukturellen Eigenschaften, wurde aber im Zuge der zellulären Histomorphometrie bestimmt.

#### 4.2.3.3.3 Dynamische Histomorphometrie

Die dynamische Histomorphometrie ermöglicht es, im Gegensatz zur strukturellen und zellulären Histomorphometrie, die stets nur eine Momentaufnahme repräsentieren, kinetische Parameter zu bestimmen. Es wurde der trabekuläre Bereich des L4 Wirbelkörpers in den Calcein-markierten Schnitten manuell mit Hilfe der Osteomeasure Software vermessen. Der fluoreszierende Calcein-

Farbstoff (Excitation 495 nm, Emission 515 nm) wurde mit entsprechenden Filtersystemen sichtbar gemacht. Es wurde der folgende Messwert bestimmt:

BFR/BS: Bone Formation Rate per Bone Surface, Knochenformationsrate pro Knochenoberfläche. Ein Maß für das relativ zur Knochenmenge erfolgende Knochenwachstum. Die Angabe erfolgt in Volumen pro Fläche pro Zeit.

#### **4.2.4 Biomechanische Analysen**

Zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften des Knochens wurden biomechanische Analysen durchgeführt. Diese Eigenschaften werden sowohl durch die Architektur als auch durch den Grad und die Qualität der Mineralisation beeinflusst. Diese Messungen ermöglichen das Abschätzen der Frakturwahrscheinlichkeit unter spezifischen Bedingungen.

##### **4.2.4.1 3-Punkt Biegesteifigkeitstest**

Bei dem 3-Punkt Biegesteifigkeitstest wird die Widerstandsfähigkeit des Knochens gegenüber einer orthogonal zur physiologischen Hauptkraftlinie einwirkenden Kraft analysiert. Ähnlichen Belastungen ist der Knochen beispielsweise bei einem seitlichen Fall auf eine Kante (Treppenstufe) ausgesetzt. Der Test erfolgte, indem ein isolierter, mit PBS befeuchteter Femur mit der posterioren Seite auf zwei Auflagepunkte mit 2cm Abstand platziert wurde. Der dritte Kraftpunkt wurde mit einer Universalprüfmaschine (Zwick Roell AG) mittig zwischen den beiden Auflagepunkten von der anterioren Seite auf den Knochen abgesenkt. Die auftretenden Kräfte wurden mittels Kraftsensor registriert, der zwischen dem Arm der Universalprüfmaschine und dem dritten Kraftpunkt montiert war. Die Erhebung der Parameter erfolgte unter der vereinfachenden Annahme, dass die Geometrie des Knochens im geprüften Bereich einem perfekten Zylinder entspreche. Es wurden die folgenden Messwerte bestimmt:

$F_{\max}$ : Die maximale Kraft, die der Knochen der Verformung entgegensetzen konnte.

$F_{\text{Break}}$ : Die Kraft, bei der es zum endgültigen Bruch des Knochens kam.

$W_{\text{Break}}$ : Die erforderliche Arbeit um den Bruch des Knochens zu erreichen.

$E_{\text{mod}}$ : Der Elastizitätsmodul, auch Youngs Modul, ein Maß für die Steifigkeit des Knochens.

##### **4.2.4.2 Finite Elemente Analyse**

Die finite Elemente Analyse (FEA) erlaubt es, den Effekt einer Krafteinwirkung auf einen dreidimensionalen Körper mathematisch zu simulieren. Dabei wird der Körper als eine definierte und begrenzte (finite) Anzahl an Elementen dargestellt, für die einzelne Parameter wie Krafteinwirkung und Verformung berechnet werden können. Durch das Setzen von Grenzbedingungen für das gesamte Objekt ist es zum Beispiel möglich die Kraft bis zum Bruch oder die Steifigkeit zu berechnen.

Die FEA wurde mittels der Finite Element-Software (Scanco Medical AG) auf Basis der Femur- $\mu$ CT-Scans durchgeführt. Es wurde eine Kompression des Mittelschaftes entlang der Längsachse, unter der Annahme eines gleichmäßigen Materials, in maximal 10000 Iterationen simuliert. Als Materialeigenschaften des Knochens wurden die von Pistoia *et al.* definierten Werte benutzt (Youngs Modul: 10000 MPa; Poissonzahl: 0,3; Kritisches Volumen: 2 %; Kritischer Wert: 0,007 MPa)<sup>[260]</sup>. Dies bedeutet, dass eine Fraktur angenommen wurde, wenn 2 % des Knochenmaterialvolumens einem Druck von 7 kPa oder mehr ausgesetzt waren.

#### **4.2.5 Zellkultur**

##### **4.2.5.1 Schädeldach-Osteoblasten**

Schädeldach-Osteoblasten wurden aus den Schädeln von drei bis fünf Tage alten Mäusen isoliert. Die Tiere wurden zunächst durch Dekapitation getötet und kurz mit 80 % EtOH sterilisiert. Anschließend wurde das Schädeldach präpariert und mit einem Skalpell das Periost und das Perichondrium auf Zellstoff abgeschabt. Die Schädeldächer wurden mit PBS gewaschen und für 10 min bei 37 °C unter Schütteln mit Verdaumedium inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Schädeldächer erneut mit Verdaumedium für 45 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Der Ansatz wurde durch ein 70  $\mu$ m Zellsieb gefiltert und 10 min bei 430 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 mL Osteoblasten-Medium resuspendiert bevor die Zellzahl mittels Thoma-Kammer bestimmt wurde. Die Zellkonzentration wurde auf 50000 Zellen/mL angepasst bevor je 1 mL pro Vertiefung einer Zellkulturplatte im 12-Vertiefungsformat ausplattiert wurde. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % rH mit Osteoblasten-Medium bis zu einer Konfluenz von ca. 90 % kultiviert. Anschließend wurde die Differenzierung durch Versorgung mit Osteoblasten-Differenzierungsmedium eingeleitet. Medienwechsel erfolgten montags, mittwochs und freitags.

##### **4.2.5.2 Knochenmarkszellen**

Für die Isolation von Zellen aus dem Knochenmark wurden zunächst PCR-Reaktionsgefäße in 1,5-mL Mikroreaktionsgefäße geklemmt und die PCR-Reaktionsgefäße am tiefsten Punkt mit einer Kanüle mit 0,8 mm Durchmesser durchstoßen. Anschließend wurden Tibiae und Femora aus mindestens acht Wochen alten Mäusen präpariert, die zuvor mittels CO<sub>2</sub>-Intoxikation oder zervikaler Dislokation getötet wurden. Der Markraum der Knochen wurde unter sterilen Bedingungen distal (Tibia) oder proximal (Femur) eröffnet. Die Knochen wurden mit der Öffnung nach unten in den PCR-Reaktionsgefäßen platziert. Durch 16 s Zentrifugation bei 5900 g wurde das Knochenmark aus dem Knochen und durch das Loch in den PCR-Reaktionsgefäßen in die 1,5 mL Mikroreaktionsgefäße transferiert. Die weitere Behandlung der Zellen erfolgte je nach Zelltyp, der differenziert werden sollte.

#### 4.2.5.2.1 Knochenmarks-Osteoblasten

Die Knochenmarkszellen wurden in Osteoblastenmedium resuspendiert, in Thoma-Kammern ausgezählt und mit einer Zelldichte von  $5 \cdot 10^6$  Zellen/mL in Zellkulturschalen im 12-Vertiefungsformat ausplattiert (1 mL/Vertiefung). Die weiteren Kultivierungsbedingungen sowie das Differenzierungsverfahren waren identisch mit der Methode, die für Schädeldach-Osteoblasten angewendet wurde.

#### 4.2.5.2.2 Osteoklasten

Für die Differenzierung zu Osteoklasten wurden die Knochenmarkszellen in Osteoklastenmedium resuspendiert und mit einer Zelldichte von  $5 \cdot 10^6$  Zellen/mL in Zellkulturschalen im 12-Vertiefungsformat ausplattiert (1 mL/Vertiefung). In jede Vertiefung wurde zusätzlich  $1 \mu\text{L}$   $10 \mu\text{M}$  Vitamin-D<sub>3</sub> zugegeben. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % rH kultiviert und der erste Mediumwechsel erfolgte nach zwei Tagen mit Osteoklasten-Differenzierungsmedium. Das Medium wurde anschließend alle zwei Tage ausgewechselt.

#### 4.2.5.3 Stimulation

Um die Reaktion von Osteoblasten auf verschiedene Wnt-Moleküle zu testen, wurden Stimulationsversuche durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen zunächst 24h Stunden vor Stimulation nüchtern gestellt, indem das reguläre Medium gegen Minimalmedium gewechselt wurde. Die eigentliche Stimulation erfolgte indem das Minimalmedium gegen Stimulationsmedium mit Wnt-Molekülen in einer Konzentration von 100 ng/mL ausgetauscht wurde. Dieses Stimulationsmedium wurde aus Minimalmedium und  $1 \mu\text{L/mL}$  Stammlösung (100 mg/mL) des jeweiligen Wnt-Liganden gemischt. Die Zellen wurden mit Wnt1, Wnt3a und Wnt5a stimuliert, als Kontrolle diente ein Ansatz bei dem Stammlösung ohne Wnt-Ligand verwendet wurde.

### 4.2.6 Molekularbiologische Methoden

#### 4.2.6.1 DNA Isolation

Zur Genotypisierung der Mauslinien wurde DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien mittels des KAPA Genotyping Kits (Peqlab Biotechnologie GmbH) nach Herstellerangaben isoliert. In allen anderen Fällen wurde DNA mittels der Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert. Hierfür wurde Biopsie-Lysis-Puffer mit  $70 \mu\text{L/ml}$  Proteinase-K-Stammlösung versetzt. Zu jeder Probe wurden  $750 \mu\text{L}$  des Lysis-Puffers zugegeben und für mindestens 2 h bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit  $750 \mu\text{L}$  gebrauchsfertiger Phenol/Chloroform-Lösung (Carl Roth GmbH) versetzt und gemischt bis sich eine Emulsion bildete. Nach 10 min Zentrifugation bei 16000 g wurde die obere Phase in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und die Nukleinsäuren durch Zugabe von  $650 \mu\text{L}$  Isopropanol gefällt. Nach erneuter Zentrifugation unter den zuvor aufgeführten Bedingungen wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit  $500 \mu\text{L}$  70 % EtOH gewaschen. Der Ansatz wurde ein letztes mal 7 min

bei 16000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das DNA Pellet nach kurzer Trocknung bei RT in 50 µL TE-Puffer aufgenommen.

#### **4.2.6.2 DNA Bestimmung**

DNA-Konzentrationen wurden mittels des Nandrop-Spektrophotometers (Thermo Fisher Scientific Inc.) in 1,5 µL großen Volumen bestimmt.

#### **4.2.6.3 Polymerase-Kettenreaktion**

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) erlaubt die Amplifikation von spezifischen DNA-Abschnitten<sup>[261]</sup>. Hierbei dienen Oligonukleotide, die komplementär zu den 5'-und 3'-Enden des zu amplifizierenden Bereiches sind, als Startpunkte für eine DNA-Polymerase. In den meisten Fällen kommt hierbei eine Variante der Taq-Polymerase zum Einsatz. Damit die Amplifikation stattfinden kann, wird die Reaktion mittels Thermocycler zyklisch unter drei distinkten Temperaturbedingungen durchgeführt:

Denaturierung: In dieser Phase trennen sich alle DNA-Doppelstränge.

Hybridisierung, auch *Annealing* genannt: In dieser Phase können sich komplementäre DNA-Stränge aneinander anlagern. Es kommt zu einer Bindung der Primer an die Zielsequenz.

Elongation: Bei der Temperatur in dieser Phase hat die Polymerase ihre maximale Aktivität und verlängert, von den Primern als Startpunkt ausgehend, komplementär zur Vorlage die Oligonukleotidstränge.

Somit ist theoretisch eine Amplifikation der Vorlagen-DNA um den Faktor  $2^n$  möglich, wobei n der Zyklenanzahl entspricht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde, wenn nicht anders aufgeführt, die DreamTaq Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Inc) eingesetzt. Eine Liste der verwendeten Primer befindet sich in Abschnitt 4.1.8, die Reaktionsansätze und Bedingungen sind in der folgenden Tabelle 2 aufgeführt. Die Analyse von PCR-Produkten erfolgte in Agarose-Gelen mit einer Konzentration von 1-2,5 % abhängig von der Produktgröße. Die DNA wurde im Gel mittels Ethidiumbromid (500 ng/mL) sichtbar gemacht.

## Material und Methoden

**Tabelle 2: PCR Reaktionsansätze und Reaktionsbedingungen.**

Name	Col1a1-Krm2	Col1a1-Sost	Flip-Deleter	Fzd9 WT	Fzd9 KO	Lrp5 HBM
10x Puffer	2 µL	2 µL	2 µL	5 µL	5 µL	2 µL
DMSO	2 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	-
Primer 1 (2 pM)	3 µL Globin Intron	3 µL Globin Intron	3 µL Flp-Del F	8 µL Fzd9 WT F v2	8 µL Fzd9 KO F	3 µL Lrp5 HBM F
Primer 2 (2 pM)	3 µL Kremen2-6	3 µL SOST R v3	3 µL Flp-Del R	8 µL Fzd9 WT R v2	8 µL Fzd9 KO R v2	3 µL Lrp5 HBM R
Primer 3 (2 pM)	-	-	-	-	-	-
dNTPs (je 10mM)	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Polymerase	0,3 µL	0,3 µL	0,3 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,3 µL
Vorlagen-DNA	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
H <sub>2</sub> O	8,2 µL	9,7 µL	9,7 µL	26 µL	26 µL	9,7 µL
Reaktionsmenge	20 µL	20 µL	20 µL	50 µL	50 µL	20 µL
Initiale	94 °C 4min	94 °C 2min	94 °C 4min	94 °C 4min	94 °C 4min	94 °C 4min
Denaturierung	94 °C 30s	94 °C 45s	94 °C 30s	94 °C 30s	94 °C 30s	94 °C 30s
Hybridisierung	58 °C 30s	58 °C 45s	52 °C 30s	58 °C 45s	58 °C 45s	62 °C 30s
Elongation	72 °C 1min	72 °C 2min	72 °C 30s	72 °C 1min	72 °C 1min	72 °C 1min
Finale Elongation	72 °C 10min	72 °C 10min	72 °C 10min	72 °C 10min	72 °C 10min	72 °C 10min
Zyklen	37	38	40	40	40	38
Erwartetes Produkt	1000 bp	400 bp	480 bp	672 bp	500 bp	WT: 246 bp HBM: 400 bp

Name	LysM-Cre Cre-	LysM-Cre Cre+	Notch2 flox	Notch2 HCS Neo	Notch2 HCS FRT	Runx2-Cre
10x Puffer	5 µL	5 µL	2 µL	2 µL	2 µL	5 µL
DMSO	0,5 µL	0,5 µL	-	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
Primer 1 (2 pM)	8 µL LysM-Cre Com	8 µL LysM-Cre Com	3 µL Notch2 I	3 µL Notch2 HCS F	3 µL Notch2 HCS F	8 µL Cbfa_24
Primer 2 (2 pM)	8 µL LysM-Cre WT	8 µL LysM-Cre KI	3 µL Notch2 II	3 µL Notch2 HCS NEO R	3 µL Notch2 HCS R v2	8 µL Cbfa_25
Primer 3 (2 pM)	-	-	-	-	-	8 µL Cbfa_30
dNTPs (je 10mM)	1 µL	1 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	1 µL
Polymerase	0,5 µL	0,5 µL	0,3 µL	0,3 µL	0,3 µL	0,5 µL
Vorlagen-DNA	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
H <sub>2</sub> O	26 µL	26 µL	10,2 µL	9,7 µL	9,7 µL	18 µL
Reaktionsmenge	50 µL	50 µL	20 µL	20 µL	20 µL	50 µL
Initiale	94 °C 4min	94 °C 4min	94 °C 2min	94 °C 4min	94 °C 4min	95 °C 5min
Denaturierung	94 °C 30s	94 °C 30s	94 °C 30s	94 °C 30s	94 °C 30s	95 °C 30s
Hybridisierung	63 °C 30s	55 °C 30s	63 °C 30s	58 °C 30s	58 °C 30s	59 °C 30s
Elongation	72 °C 45s	72 °C 45s	72 °C 1min	72 °C 30s	72 °C 30s	72 °C 1min
Finale Elongation	72 °C 10min	72 °C 10min	72 °C 10min	72 °C 10min	72 °C 10min	72 °C 10min
Zyklen	40	40	38	40	40	42
Erwartetes Produkt	350 bp	700 bp	WT: 161 bp Flox: 201 bp	259 bp	WT: 403 KI: 441	Cre-: 780 bp Cre+: 600 bp

Name	KI-Sonden	RT-PCR	Notch2 Rec Flox	Notch2 Del	Long-Range	HCS Sequenz
10x Puffer	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	5 µL	2 µL
DMSO	1 µL	0,5 µL	0,2 µL	0,2 µL	-	0,5 µL
Primer 1 (2 pM)	3 µL N2 Probe 5'/3' For	3 µL RT...F	3 µL Notch2FI F	3 µL Notch2Del F	3 µL LR Notch2 F 1	3 µL HCS Seq F
Primer 2 (2 pM)	3 µL N2 Probe 5'/3' Rev	3 µL RT...R	3 µL Notch2FI R	3 µL Notch2Del R	3 µL LR Neomycin R	3 µL HCS Seq R
Primer 3 (2 pM)	-	-	-	-	-	-
dNTPs (je 10mM)	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	8 µL	0,5 µL
Polymerase	0,3 µL	0,3 µL	0,3 µL	0,3 µL	0,5 µL	0,3 µL
Vorlagen-DNA	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
H <sub>2</sub> O	9,2 µL	9,7 µL	10 µL	10 µL	29,5 µL	9,7 µL
Reaktionsmenge	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	50 µL	20 µL
Initiale	94 °C 4min	94 °C 4min	94 °C 4min	94 °C 4min	94 °C 1min	94 °C 4min
Denaturierung	94 °C 45s	94 °C 30s	94 °C 30s	94 °C 30s	98 °C 10s	94 °C 30s
Hybridisierung	58 °C 45s	58 °C 30s	60 °C 30s	60 °C 30s	68 °C 7min	58 °C 30s
Elongation	72 °C 1min	72 °C 1min	72 °C 45s	72 °C 45s	-	72 °C 1min
Finale Elongation	72 °C 10min	72 °C 10min	72 °C 10min	72 °C 10min	72 °C 10min	72 °C 10min
Zyklen	38	40	40	40	40	40
Erwartetes Produkt	5': 507 3': 969	Diverse	250 bp	450 bp	Ca. 6000 bp	681 bp

#### **4.2.6.4 Long-Range PCR**

Die Long-Range PCR funktioniert prinzipiell wie die reguläre PCR, jedoch ist, dank optimierter Primer, Polymerasen und Reaktionsbedingungen, die Amplifikation deutlich längerer DNA-Abschnitte möglich. Somit eignet sich diese Methode, ähnlich eines Southernblots, auch zum Nachweis der korrekten Integration einer langen Zielsequenz über homologe Rekombination in ein Wirtsgenom. Zur Analyse der *Notch2* Knock-In Klone wurde die LA Taq DNA Polymerase (Takara Bio Inc.) und die mitgelieferten Puffer und Chemikalien verwendet. Der Primer 'LR Notch2 For 1' wurde so gewählt, dass er im 5'-Bereich der genomischen DNA außerhalb des Targeting-Konstruktes bindet. Zusammen mit dem Primer 'LR Neomycin Rev' der ausschließlich in der Neomycin-Kassette innerhalb des Targeting-Konstruktes bindet, sollte es nur zu einer Amplifikation eines Produktes kommen, wenn das Targeting-Konstrukt korrekt integriert war. Die genauen Reaktionsbedingungen sind unter 'Long-Range' in Tabelle 2 aufgeführt. Die Temperatur-Zyklen unterscheiden sich hierbei von der klassischen PCR, da Hybridisierung und Elongation bei der gleichen Temperatur durchgeführt wurden.

#### **4.2.6.5 DNA Sequenzierung**

DNA Sequenzierungen wurden mittels der Didesoxymethode nach Sanger von der Firma SeqLab durchgeführt<sup>[262]</sup>. Hierzu wurde ein 15 µL Ansatz vorbereitet, der 1,2 µg Plasmid DNA oder 22,5 ng/100 bp eines PCR-Produktes (z.B. aus der PCR HCS-Sequenz), 30 pmol des Primers und 4,5 mM Tris, pH 8,5 enthielt. Die Analyse der Chromatogramme erfolgte mittels der Bioedit Software.

#### **4.2.6.6 E.Coli Kultur**

Wenn nicht anders angegeben wurde der *E.coli* Stamm TOP10 verwendet. Als Kulturmedium diente LB-Medium, je nach verfügbarer Resistenz auf dem transformierten Plasmid versetzt mit 100 µg/mL Ampicillin oder 50 µg/mL Kanamycin. Für eine Plasmidpräparation im Minipräp-Format wurden 6 mL LB-Medium in einem 13 mL Bakterienkulturröhrchen verwendet, für eine Präparation im Maxipräp-Format 300 mL in einem autoklavierten Erlenmeyer-Kolben. Die Inkubation erfolgte stets bei 37 °C und horizontalem Schütteln von 250 Umdrehungen pro Minute. Zur langfristigen Lagerung von Bakterienkulturen wurden 625 µL gut angewachsener Kulturen mit 375 µL einer sterilfiltrierten 80 % Glycerol-Lösung vermischt. Der resultierende Glycerolanteil von 30 % erlaubte eine Lagerung bei -80°C.

#### **4.2.6.7 Plasmidpräparation**

##### **4.2.6.7.1 Minipräp**

Zur Plasmidpräparation im Minipräp-Format wurde das QIAprep Spin® Miniprep Kit (Qiagen N.V.) verwendet. Die Elution erfolgte mit 25 µL Elutionspuffer.

#### 4.2.6.7.2 Maxipräp

Zur Endotoxin-freien Plasmidpräparation im Maxipräp-Format wurde das EndoFree® Plasmid Maxi Kit (Qiagen N.V.) verwendet. Das Plasmid-Pellet wurde in 500 µL TE-Puffer gelöst.

#### 4.2.6.8 Enzymatischer Verdau

Für den enzymatischen Verdau von genomischer DNA und Plasmiden wurden die in Abschnitt 4.1.6 aufgeführten Restriktionsenzyme in Kombination mit den mitgelieferten Puffern und Chemikalien nach Herstellerangaben verwendet.

#### 4.2.6.9 Southernblot

Der Southernblot ermöglicht den hochsensitiven Nachweis langer DNA-Fragmente mittels radioaktiv markierter DNA-Sonden<sup>[263]</sup>. Durch das Einfügen von neuen Restriktionsschnittstellen ist es somit beispielsweise möglich, die korrekte Lage eines über homologe Rekombination in das Genom integrierten Knock-In Konstruktes nachzuweisen.

##### 4.2.6.9.1 Generierung der Southernblot-Sonden

Für die Analyse des *Notch2* Knock-Ins wurden zunächst Sonden für die 5'- und 3'-Region des Integrationslokus generiert. Hierfür wurden mit den Primern 'N2 Probe 5' For/Rev' und 'N2 Probe 3' For/Rev' PCR-Produkte, mit spezifischen Sequenzen auf Basis von genomischer Wildtyp-DNA, über das in Tabelle 2 aufgeführte PCR-Protokoll 'KI-Sonden' generiert. Diese wurden im Anschluss mittels TOPO-TA Klonierung nach Herstellerangaben in einen pCR2.1 Vektor kloniert. Mit diesem Vektor wurden chemisch kompetente E.coli TOP10 durch Hitzeschock transformiert und auf LB-Agar Platten mit 100 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37 °C selektiert. Mit einzelnen Klonen wurden Bakterienkulturen im Minipräp-Format angeimpft. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden ein Teil der Kulturen als Cryostock eingefroren, während aus dem restlichen Volumen die Plasmid-DNA mittels Minipräp aufgereinigt wurde. Die Plasmide wurden mit den Primern 'M13 For' und 'M13 Rev' sequenziert, um den korrekten Einbau der Sonde in das Plasmid zu überprüfen. Die Sonden wurden durch einen Restriktionsverdau mit *EcoR1* aus dem Plasmid geschnitten, in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt und aus diesem mittels PCR-Aufreinigungssatz (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Sonden wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

##### 4.2.6.9.2 Blot

Für den eigentlichen Blot des Southernblot Verfahrens wurde zunächst genomische DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen verdaut. Hierbei kam für die Analyse des 5'-Bereiches *ScaI* und für die Analyse des 3'-Bereiches *MunI* zum Einsatz. Der Reaktionsansatz war wie folgt: 20 µL genomische DNA (ca 2 µg), 5 µL 5x-Puffer (beim Restriktionsenzym mitgeliefert), 1 µL RNaseA, 20 U Restriktionsenzym, aufgefüllt auf 50 µL mit H<sub>2</sub>O. Der Verdau erfolgte bei 37 °C über Nacht. Die Restriktionsenzyme wurde durch Erhitzen (85 °C, 10 min) inaktiviert und der Ansatz mit Ladepuffer

gemischt, bevor das gesamte Volumen auf ein 0,7 % Agarose-Gel aufgetragen wurde. Nach elektrophoretischer Auftrennung bei 70 V Spannung wurde die DNA chemisch durch 20 min Inkubation des Gels in 0,25 M HCl fragmentiert, um den Transfer auf die Blotting-Membran zu erleichtern. Die DNA wurde durch 20 min Inkubation des Gels in 0,4 M NaOH stabilisiert um anschließend im Kapillar-Blot Verfahren über Nacht auf eine PVDF-Membran übertragen zu werden. Als Trägerflüssigkeit diente hierbei 0,4 M NaOH. Die Membran wurde danach 2h bei 80 °C getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei RT und vor Staub geschützt gelagert.

### 4.2.6.9.3 Hybridisierung

Die Membran wurde zunächst mit Speed Hyb II Puffer, der Fischsperma-DNA enthielt, bei 65 °C für 90 min in einem Hybridisierungsöfen blockiert. In der Zwischenzeit wurden 100 ng der jeweiligen Sonden mit dem DNA-Markierungssatz (Roche Diagnostics International AG) durch die Verwendung von 5'-[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (Aktivität: 0,37 MBq/ $\mu$ L) nach Herstellerangaben radioaktiv markiert und aufgereinigt. Die markierten Sonden wurden 5 min bei 95 °C denaturiert. Der Blot wurde anschließend mit den markierten Sonden in frischem Speed Hyb II Puffer bei 65 °C über Nacht hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 2x 5 min mit Southernblot Waschpuffer A und 2x 30 min mit Southernblot Waschpuffer B bei 65 °C gewaschen, bevor sie mit Plastikfolie versiegelt wurde

### Entwicklung

Zum Entwickeln des Southernblots wurde auf die versiegelte Membran in einer Röntgenfilmkassette ein Southernblot-Film (Eastman Kodak Company, Inc.) platziert. Die Belichtung erfolgte je nach Intensität der Markierung über einen Zeitraum von 3 bis 14 Tagen bei -80 °C um den Zwischenzustand der Silberionen im Film zu stabilisieren und die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass zwei Photonen auf das Ion treffen um den Übergang in ein reduziertes Silberatom zu ermöglichen. Die Entwicklung des Films erfolgte mit einem automatischen Entwicklersystem (Protec GmbH & Co. KG).

### **4.2.6.10 RNA-Isolation**

#### 4.2.6.10.1 RNA aus kultivierten Zellen

Die RNA aus kultivierten Zellen wurde mittels RNA-Aufreinigungskit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) isoliert. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit dem Lysispuffer des Kits, versetzt mit 10  $\mu$ L/mL  $\beta$ -Mercaptoethanol, lysiert und mit Zellschabern von den Zellkulturplatten abgelöst. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben, wobei auf den DNase-Verdau Schritt verzichtet wurde, da eine äquivalente Reaktion in die cDNA-Synthese integriert war. Die RNA wurde in 50  $\mu$ L H<sub>2</sub>O eluiert. Bei späterer Verwendung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

#### 4.2.6.10.2 RNA aus Gewebe

RNA aus Gewebe wurde mittels RNA-Isolationslösung-Aufreinigung (Trifast™) gewonnen. Gewebe (ca. 50 mg) wurde in 1 mL RNA-Isolationslösung auf Eis mit einem Homogenisierer zerkleinert. Zwischen einzelnen Proben wurde der Homogenisierer mit DEPC-H<sub>2</sub>O gereinigt. Das zerkleinerte Gewebe in RNA-Isolationslösung wurde gründlich mit 300 µL Chloroform vermischt und 10 min bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und mit 650 µL Isopropanol vermischt, bevor die Proben erneut zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde dekantiert und das RNA-Pellet mit 70 % EtOH in DEPC-H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation mit den oben genannten Bedingungen wurde das Pellet je nach Größe in 50 oder 100 µL RNase-freiem Wasser aufgenommen. Bei späterer Verwendung wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

#### **4.2.6.11 cDNA-Synthese**

Zum Umschreiben der RNA zu komplementärer DNA (cDNA) wurden das Verso cDNA Kit mit integriertem DNase-Verdau verwendet (Thermo Fisher Scientific Inc.). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben, es wurden 1 µg RNA als Vorlage und Oligo-(dT) Primer eingesetzt. Die cDNA wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### **4.2.6.12 Genexpressionsanalyse**

Um die Aktivität bestimmter Gene in Gewebe- und Zellkulturproben auf transkriptioneller Ebene überprüfen zu können, wurden diese qualitativ mittels RT-PCR und quantitativ mittels quantitativer Real Time PCR untersucht.

##### 4.2.6.12.1 RT-PCR

Die Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) dient dem primär qualitative Nachweis von Transkripten bestimmter Gene. Hierfür wurden spezifische Primer generiert die, nach Möglichkeit einen im Genom durch Introns separierten, Abschnitt der cDNA amplifizieren, um Kreuzreaktionen mit eventuell in der Reaktion verbliebener genomischer DNA zu minimieren. Die verwendeten Primer sind in Abschnitt 4.1.8 aufgeführt und die Reaktionsbedingungen in Tabelle 2 unter der Bezeichnung 'RT-PCR'. Die PCR-Produkte wurden in 1 % Agarose-Gelen aufgetrennt und mittels Geldokumentationsanlage (Bio-Rad Laboratories, Inc.) analysiert.

##### 4.2.6.12.2 Quantitative Real Time PCR

Die quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) ermöglicht den quantitativen und hochsensitiven Nachweis von Transkriptionsprodukten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das TaqMan-System (Thermo Fisher Scientific Inc.) verwendet. Neben zwei Primern enthält jeder Sonden-Mix ein spezielles Oligonukleotid, das im Bereich zwischen den Primern an die Vorlagen-DNA binden kann. Dieses Oligonukleotid trägt sowohl ein Fluorophor als auch einen Quencher, der das Fluoreszenz-Signal

unterdrückt. Bei der Synthese eines DNA-Stranges durch die Polymerase wird das bereits mit dem Vorlagenstrang hybridisierte Sonden-Oligonukleotid abgebaut und das Fluorophor und der Quencher gehen getrennt voneinander in Lösung. Da der Quencher sich nun nicht mehr in räumlicher Nähe des Fluorophors befindet, kann dieses bei Anregung mit einer entsprechenden Wellenlänge ein Fluoreszenzsignal aussenden, das registriert wird. Mit steigender Zyklenzahl werden immer mehr Fluorophore freigesetzt, wobei die Intensität des Signals mit der ursprünglich im Ansatz vorhandenen Menge an für die Sonde spezifischer cDNA korreliert. Im Detail verläuft der Anstieg des Fluoreszenzsignals exponentiell mit der Zyklenzahl. Bei einer Logarithmischen Auftragung ist im Anfangsbereich eine lineare Entwicklung zu beobachten. In diesem Bereich wird ein Fluoreszenz-Schwellenwert festgelegt und durch eine Ausgleichsrechnung der einzelnen Messwerte, die einmal je Zyklus erhoben werden, lässt sich die Zyklenzahl festlegen, bei der der Schwellenwert in einer bestimmten Proben überschritten wird ( $C_T$ ). Anhand dieses Wertes lässt sich schlussendlich die relative Expression eines Gens in einer Probe berechnen. In dieser Arbeit wurden ausschließlich TaqMan-Sonden von Life Technologies (Thermo Fisher Scientific Inc.) eingesetzt, die vom Hersteller auf Effizienz und Spezifität getestet wurden. Eine vollständige Liste ist in Abschnitt 4.1.9 aufgeführt. Die Reaktionen wurden in optischen Mikrottestplatten im 96-Vertiefungs-Format angesetzt. Eine Reaktion bestand aus 2  $\mu$ L cDNA, 7  $\mu$ L H<sub>2</sub>O und 10  $\mu$ L TaqMan Mastermix mit Roxy als internen, passiven Referenzfarbstoff. Die PCR-Reaktion erfolgte in einem StepOne™ Plus Real-Time-Gerät (Applied Biosystems, Inc.) nach Herstellervorgaben und die Berechnung der  $C_T$ -Werte erfolgte automatisch in der StepOne™ Software. Die Berechnung der Relativen Expression erfolgte mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit GAPDH als Proben-interner Referenz.

$$\Delta C_T = C_{T,Zielgen} - C_{T,Referenz}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T,Probe} - \Delta C_{T,Kontrolle}$$

$$Relative\ Expression = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

## 4.2.7 Biochemische Methoden

### 4.2.7.1 Analyse von Serumparametern

Das Serum der Mäuse wurde auf eine Reihe Knochenstoffwechsel-relevanter Faktoren hin untersucht:

Calcium

Die Calcium-Serumkonzentration wurde mittels des QuantiChrome Calcium Assay Kits (Bioassay Systems) nach Herstellerangaben durch die Komplexbildung mit einem Phenolsulphonphthalein-Farbstoff bestimmt. Es wurden 5  $\mu$ L Serum eingesetzt.

### Phosphat

Die Phosphat-Serumkonzentration wurde mittels Phosphorus Liqui-UV Test (Stanbio Laboratory Inc.) über die Phosphomolybdat-Methode nach Herstellerangaben in UV-Küvetten bestimmt. Es wurden 10 µL Serum eingesetzt

### Osteoprotegerin

Opg wurde mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), einem quantitativen, antikörperbasiertes Nachweisverfahren bestimmt. Hierzu wurde das Mouse Opg/TNFRSF11B Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Inc.) nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden für den Nachweis 5 µL Serum eingesetzt, die mit dem mitgelieferten Verdünnungspuffer 1:10 verdünnt wurden.

### RANKL

RANKL wurde mit dem Mouse TRANCE/RANK L/TNFSF11 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Inc.) nach Herstellerangaben bestimmt. Es wurden 25 µL Serum in einer 1:2 Verdünnung mit mitgeliefertem Verdünnungspuffer eingesetzt.

### PICP

Die Konzentration des Prokollagen-I-C-Terminalen Peptids (PICP) wurde mit dem SEA570Mu ELISA Kit von Uscn Life Science Inc. nachgewiesen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben und es wurden 10 µL Serum in einer 1:10 Verdünnung mit PBS eingesetzt.

### Crosslaps

Die Crosslaps (CTX)-Konzentration im Serum wurde mit dem RatLaps ELISA von Immunodiagnostic Systems Ltd. nach Herstellerangaben nachgewiesen. Es wurden 25 µL Serum eingesetzt.

### Sclerostin

Serum-Sclerostin wurde mit dem Mouse Sclerostin ELISA von ALPCO Diagnostics nach Herstellerangaben nachgewiesen. Es wurden 10 µL Serum in einer 1:10 Verdünnung mit mitgeliefertem Verdünnungspuffer eingesetzt. Sclerostin im Zellkulturmedium wurde mittels des ELISAs SEC864Mu (Uscn Life Science Inc.) in 100 µL Proben nachgewiesen.

#### **4.2.7.2 Mineralisationsanalyse**

Die Fähigkeit von Osteoblasten *in vitro* eine mineralisierte Matrix zu bilden wurde mittels Alizarin-Rot-Färbung untersucht. Dieser Farbstoff zeichnet sich dadurch aus, dass er in der Lage ist eine feste

Bindung mit Calcium-Verbindungen einzugehen. Zur Färbung wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen bevor sie für 5 min mit 90 % EtOH Lösung fixiert wurden. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit H<sub>2</sub>O wurden die Zellen für 10 min mit Alizarin-Rot Färbelösung inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen viermal mit H<sub>2</sub>O gewaschen, bevor das Ergebnis der Färbung auf einem Leuchtpult fotografisch dokumentiert wurde. Zur Quantifizierung der Färbung kamen zwei Methoden zum Einsatz. Die digitale Quantifizierung wurde mittels der Bildanalysesoftware ImageJ mit der BoneJ Erweiterung durchgeführt. Die Fotos der Zellkulturschalen-Vertiefungen wurden zunächst in die drei Grund-Farbkanäle aufgespalten. Im Grün-Kanal wurde ein Schwellenwert von 120 angelegt und der zentrale Bereich der Vertiefung mittels des BV/TV Analyse-Algorithmus (Methode: Surface; Resampling: 6) von BoneJ analysiert. Das Ergebnis entsprach dem Anteil der mit mineralisierter Matrix bedeckten Oberfläche. Alternativ wurde der Grad der Mineralisation photometrisch analysiert. Hierzu wurde der Farbstoff zunächst durch 30 min Inkubation in 800 µL 10 % Essigsäure wieder aus dem Calcium-Phosphat gelöst. Nach Überführen des Überstandes und der Zellen in ein 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß, wurde dieses 5 min bei 85 °C erhitzt bevor es 10 min bei 16000 g zentrifugiert wurde. Vom Überstand wurden 400 µL vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 30 µL 10 % Ammoniumhydroxid Lösung versetzt. Bei Bedarf wurde der pH auf 4,1-4,5 mit Essigsäure eingestellt und schlussendlich die Absorption bei 450 nm gemessen.

### **4.2.7.3 Proteinisolation**

Zur Isolation von Proteinen aus Zellen wurden diese pro Vertiefung einer Zellkulturplatte im 12-Vertiefungs-Format mit 100 µL RIPA-Puffer, versetzt mit Protease- und Phosphataseinhibitoren, überschichtet. Die Zellen wurden abgekratzt, in ein 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß überführt und 10 min bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine neues Mikroreaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### **4.2.7.4 Proteinbestimmung**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Proben erfolgte mittels Bradford-Test auf Basis der Komplexbildung des Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G-250 mit unpolaren und kationischen Seitenketten von Proteinen<sup>[264]</sup>. Es wurde eine Eichreihe aus BSA-Stammlösung und H<sub>2</sub>O angesetzt wobei die folgenden Proteinmengen in je 800 µL Volumen erzielt wurden: 0 µg, 5 µg, 10 µg, 15 µg und 20 µg. Die Proben wurden ebenfalls in geeigneten Verdünnungen auf ein Gesamtvolumen von 800 µL mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Zu den Proben und den Standards wurde anschließen 200 µL Bradford-Reagenz zugegeben und die Ansätze gevortext. Nach 3 min Inkubation bei RT wurden je 150 µL in eine Mikrottestplatte überführt und die Absorption bei 595 nm mit einem Lesegerät (Molecular Devices, LLC) gemessen. Anhand der Eichreihe wurde eine lineare Gleichung erstellt, mit der sich die Proteinkonzentration der Proben errechnen ließ.

#### **4.2.7.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ermöglicht das Auftrennen von Proteinen anhand ihres Molekulargewichtes. Im Rahmen dieser Arbeit kam ausschließlich die SDS-PAGE zum Einsatz, bei der die Proteine durch SDS denaturiert werden und eine gleichmäßige Ladung erhalten. Die verwendeten Gele hatten das Mini-Gel-Format und bestanden aus einem Sammelgel mit 4,5 % Acrylamid-Anteil (3 mL H<sub>2</sub>O; 1,25 mL Sammelgelpuffer; 0,75 mL 30 % Acrylamid; 10 µL TEMED, 50 µL APS) und einem Trenngel mit 10 % Acrylamid-Anteil (4,1 mL H<sub>2</sub>O; 2,5 mL Trenngelpuffer; 3,4 mL 30 % Acrylamid; 8 µL TEMED, 50 µL APS). Zur Auftrennung wurden 10 µg Proteine in 15 µL H<sub>2</sub>O mit 5 µL 4x Westernblot-Probenpuffer versetzt und 7 min bei 95 °C aufgekocht. Anschließend wurden die Proben in einem SDS-Polyacrylamidgel bei 100-150 V aufgetrennt.

#### **4.2.7.6 Westernblot**

Der Westernblot erlaubt den spezifischen und sensitiven Nachweis von Proteinen mittels Antikörperreaktion<sup>[265]</sup>. Proteinproben, die wie im Abschnitt oben beschrieben in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt worden sind, wurden im Semi-Dry Verfahren mit Westernblot Transferpuffer auf eine PVDF-Membran transferiert (15 V, 1 h). Anschließend wurde die Membran für 30 min bei RT in Blockpuffer blockiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Die Inkubation mit Primärantikörpern erfolgte in 5 mL Blockpuffer unter Rollen bei 4 °C über Nacht. Die verwendeten Antikörper und Verdünnungen sind in Abschnitt 4.1.7.2 aufgeführt. Nach dreimaligem Waschen für 5 min mit TBST-Puffer wurde die Membran mit dem Sekundär-Antikörper, verdünnt in Blockpuffer, für 30 min bei RT inkubiert bevor sie erneut wie oben beschrieben gewaschen wurde. Die Detektion erfolgte mittels der an den Sekundärantikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase (HRP). Hierzu wurde die Membran mit frisch angesetzter ECL-Chemilumineszenzlösung beträufelt und im Dunkeln ein Westernblot-Film zur Belichtung aufgelegt. Die Belichtungszeit variierte zwischen 30 s und 30 min. Der Film wurde schlussendlich mittels eines automatischen Entwicklersystems (Protec GmbH & Co. KG) entwickelt.

#### **4.2.7.7 Knochenmarksanalyse mittels Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie (FACS) ermöglicht es, einzelne Zellen im Hochdurchsatz auf die Anwesenheit bestimmter Proteine zu analysieren. Zellen werden mit spezifischen Antikörpern, die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt waren, gegen die gewünschten Proteine markiert und in einem hydrodynamischen Fluss vereinzelt. Die Fluoreszenzsignale der einzelnen Zellen werden im Durchfluss registriert und konnten schlussendlich ausgewertet werden. Es wurden Knochenmarkszellen wie in Abschnitt 4.2.5.2 beschrieben isoliert, in FACS-Puffer aufgenommen und mit einem 70 µm Zellsieb gefiltert. Generell wurden alle Schritte wenn möglich auf Eis durchgeführt. Pro Färbereaktion wurden  $1 \cdot 10^6$  Zellen eingesetzt. Vor der eigentlichen Färbung wurden die Fc-Domänen von nativ vorhandenen Antikörpern durch 20 min Inkubation bei 4 °C mit anti-Cluster of

Differentiation (CD) 16/CD32 Antikörpern (Fc-Block) blockiert um Kreuzreaktionen zu vermeiden. Nach Waschen der Zellen durch 4 min Zentrifugation bei 430 g wurden die Zellen in 95 µL der jeweiligen Färbelösung resuspendiert und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut durch Zentrifugation gewaschen und in 500 µL FACS-Puffer resuspendiert. 15 min vor der Messung wurde zu jedem Ansatz 7 µL 7-AAD Färbelösung zur Markierung von nicht-vitalen Zellen zugegeben. Im Rahmen dieses Versuches sollte die basale Zusammensetzung des Knochenmarks analysiert werden. Hierfür wurden die folgenden Zelltypen mit Antikörpern gegen die aufgeführten Zellmarker nachgewiesen: Helfer T-Zellen: CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>; Cytotoxische T-Zellen: CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>; Granulozyten: Gr.1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>; B-Zellen: B220<sup>+</sup>; Mesenchymale Stammzellen (MSC): Sca1<sup>+</sup>. Die Spezifität der Antikörper wurde mittels Isotypenkontrollen überprüft und gegebenenfalls kompensiert. Die genauen Spezifikationen der eingesetzten Antikörper sind in Abschnitt 4.1.7.1 aufgeführt. Die markierten Zellen wurden in einem FACS Calibur Durchflusszytometer (Becton, Dickinson and Co.) vermessen. Anhand der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung der Zellen wurden ganze Zellen von Zellfragmenten unterschieden. Durch ein entsprechendes Selektionsgatter wurden nicht vitale Zellen ausgeschlossen, die ein hohes 7-AAD-Signal zeigten. Von den verbliebenen Zellen wurden 50000 je Messung in den, für die jeweiligen Farbstoffe geeigneten, Kanälen analysiert.

### **4.2.8 Statistische Analyse**

Für den statistischen Vergleich von zwei Gruppen wurde ein unabhängiger Zweistichproben-t-Test mit der Excel Software durchgeführt. Ansonsten wurde die Software Prism (Graphpad Software Inc.) verwendet um eine einfaktorielle Varianzanalyse (One-way ANOVA) gefolgt von einem *post-hoc* Vergleich nach der Bonferroni-Methode durchzuführen. Alle gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert ± Standardabweichung. Als statistisch signifikant wurden p-Werte unterhalb von 0,05 (gegebenenfalls Bonferroni-korrigiert) angesehen.

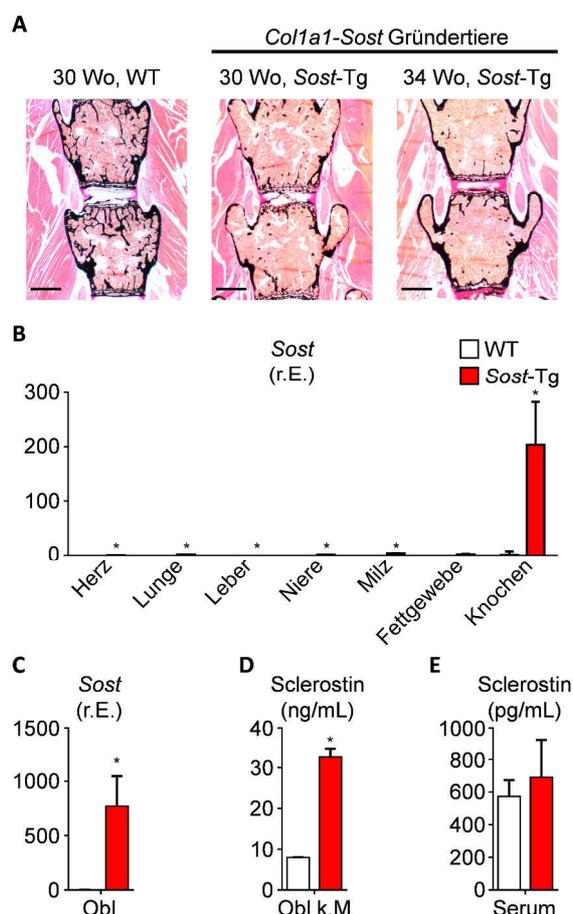
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Charakterisierung des *Col1a1-Sost*-Mausmodells

Das *Col1a1-Sost*-Mausmodell wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals verwendet und sollte daher vor dem Einsatz in weiterführenden Versuchen zunächst, insbesondere mit Hinblick auf den Einfluss des überexprimierten Sclerostins auf den Knochen, genauer charakterisiert werden.

#### 5.1.1 Funktionsbestätigung des transgenen Konstruktes

Zur initialen Charakterisierung des *Col1a1-Sost*-Mausmodells wurde zunächst überprüft, ob der beobachtete Phänotyp durch das transgene Konstrukt hervorgerufen wurde, oder durch das Inaktivieren eines Gens auf Grund der zufälligen Integration. Zu diesem Zweck wurde der histologische Phänotyp von zwei unabhängigen Gründertieren verglichen. Anschließend wurde das Expressionsmuster des *Col1a1-Sost*-Konstruktes in diversen Organen sowie in Zellkultur überprüft und die Sclerostin-Konzentration im Zellkulturüberstand sowie im Serum der Tiere gemessen.



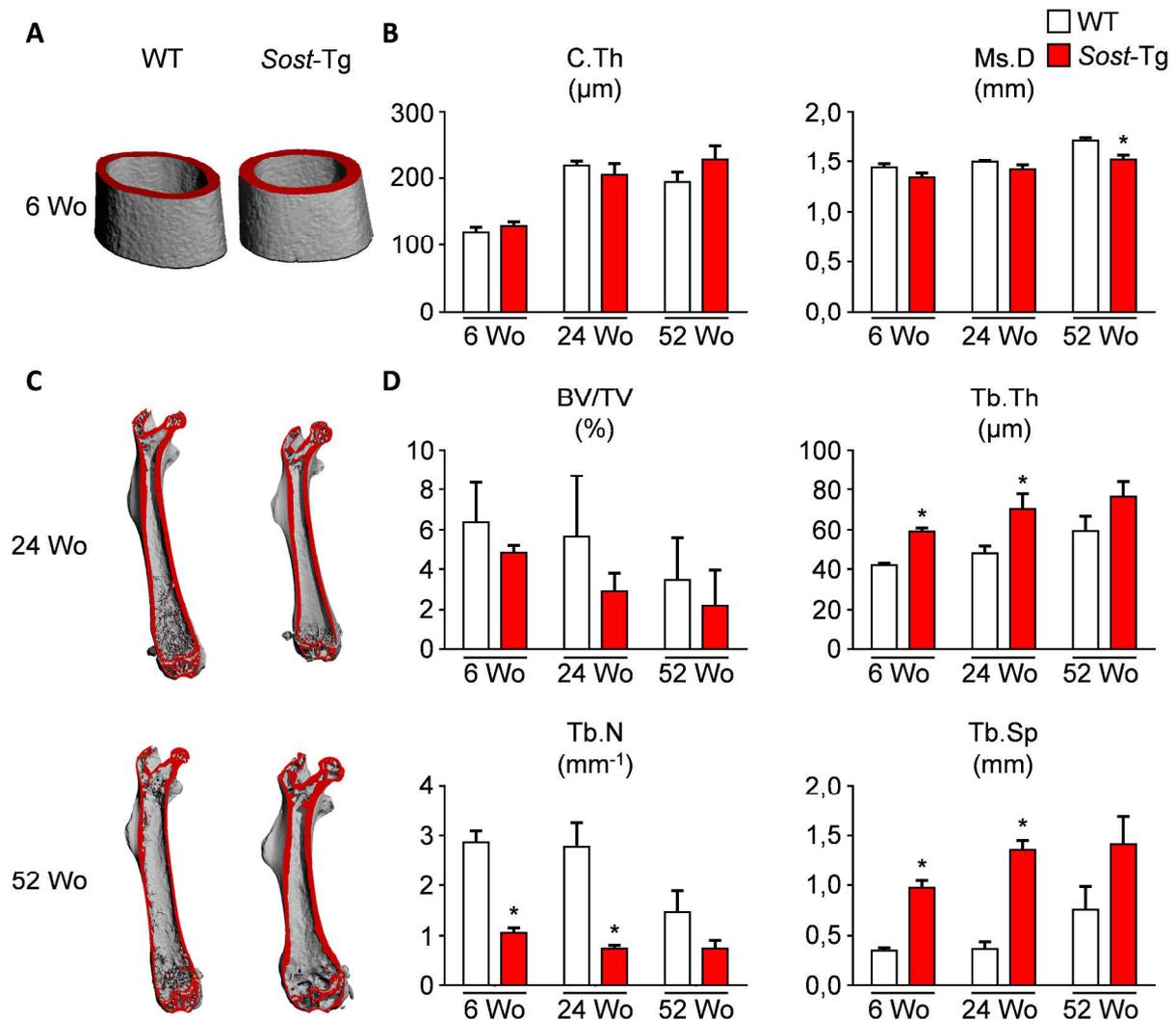
**Abbildung 11: Gewebespezifische Expression von *Sost* in *Col1a1-Sost*-Mäusen.** **A:** Unentkalkte histologische Schnitte der Wirbelkörper von weiblichen *Col1a1-Sost*- (*Sost*-Tg) Gründertieren sowie einer altersgleichen Wildtyp-Maus (WT). Von Kossa/van Gieson Färbung, der Maßstabsbalken entspricht 1 mm. **B:** qRT-PCR *Sost* Expressionsanalyse von ausgewählten Geweben aus 24 Wochen alten WT und *Sost*-Tg Mäusen. Es wird die relative Expression im Vergleich zu WT Knochen gezeigt. n=3 Proben pro Gewebe und Genotyp. \*p<0,05 gegen WT. **C:** qRT-PCR *Sost* Expressionsanalyse von primären Knochenmarks-Osteoblasten isoliert aus WT und *Sost*-Tg Mäusen an Tag 20 der Differenzierung. n=3 Proben pro Genotyp. \*p<0,05 gegen WT. **D:** Bestimmung der Sclerostin-Konzentration in Zellkulturmedium, das für 24 Stunden von WT und *Sost*-

Tg Knochenmarks-Osteoblasten an Tag 15 der Differenzierung konditioniert wurde. n=3 Proben pro Genotyp. \*p<0,05 gegen WT. E: Bestimmung der Sclerostin Konzentration im Serum von 12 Wochen alten WT und *Sost*-Tg Mäusen. n=5 Proben pro Genotyp. \*p<0,05 gegen WT.

Die histologische Untersuchung der Wirbel von zwei unabhängigen Gründertieren zeigte in beiden Fällen eine deutliche Reduktion der trabekulären Knochenmasse im Vergleich zu einer gleichaltrigen und gleichgeschlechtlichen Kontrolle (Abbildung 11A). Die Analyse der Expression des *Sost*-Gens mittels qRT-PCR zeigte eine signifikant erhöhte Expression in Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz und Knochen aus *Col1a1-Sost*- (*Sost*-Tg) Tieren gegenüber Wildtyp- (WT) Geschwistertieren. Lediglich im Fettgewebe konnte kein Unterschied festgestellt werden. In den meisten Fällen war der gemessene Unterschied jedoch gering und lediglich im Knochen kam es zu einem deutlichen Anstieg der *Sost*-Expression (Abbildung 11B). Auch unter *in vitro* Bedingungen konnte eine stark erhöhte *Sost*-Expression in transgenen Osteoblasten an Tag 15 der *ex vivo* Differenzierung aus Knochenmarkszellen gegenüber WT-Kontrollen festgestellt werden (Abbildung 11C). Dies ging einher mit einer messbar erhöhten Sclerostin-Konzentration im Zellkulturmedium, das für 24 Stunden von WT- oder *Col1a1-Sost*-Osteoblasten konditioniert wurde (Abbildung 11D). Es konnte jedoch keine signifikante Veränderung der Serum-Sclerostin-Konzentration in den transgenen Tieren im Vergleich zu WT-Mäusen festgestellt werden (Abbildung 11E).

### 5.1.2 $\mu$ CT-Analyse des *Col1a1-Sost*-Mausmodells

Im nächsten Schritt wurde die Struktur der Femora aus weiblichen, transgenen Tieren mittels  $\mu$ CT untersucht, um einen näheren Einblick in die Auswirkungen von Sclerostin auf die Knochenarchitektur zu erhalten.



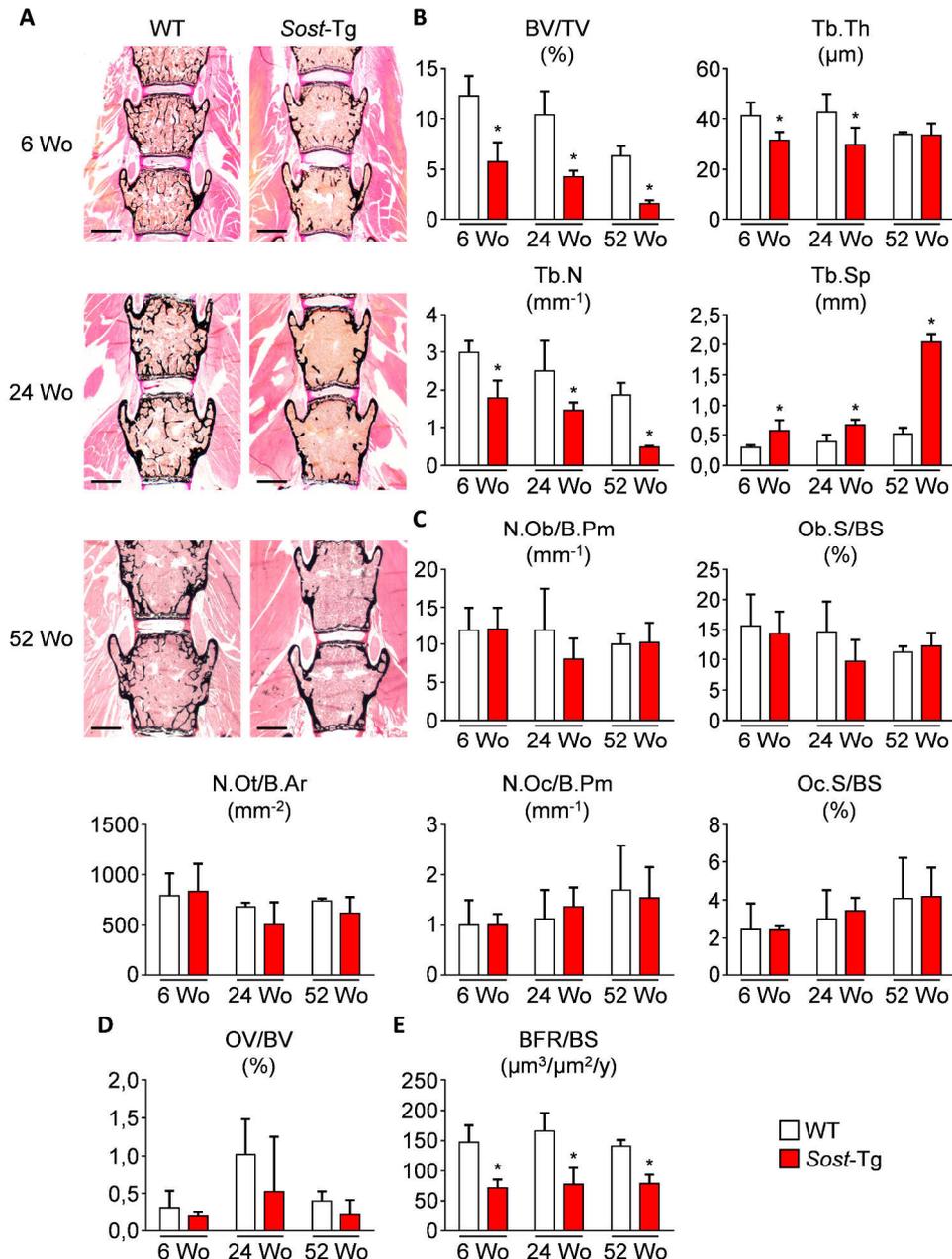
**Abbildung 12:  $\mu$ CT-Analyse der *Col1a1-Sost*-Mäuse.** A: Repräsentative  $\mu$ CT-Aufnahmen des Femur-Mittelschaftes von 6 Wochen alten weiblichen WT und *Sost-Tg* Mäusen. Die virtuellen Schnittkanten sind rot eingefärbt. B: Quantifizierung von kortikalen Strukturparametern des Femur-Mittelschaftes in 6, 24 und 52 Wochen alten WT und *Sost-Tg* Mäusen. C.Th: Kortikale Dicke; Ms.D: Mittelschaftdurchmesser.  $n \geq 3$  Proben pro Alter und Genotyp. \* $p < 0,05$  gegen WT. C: Repräsentative  $\mu$ CT-Aufnahmen des Femur von 24 und 52 Wochen alten weiblichen WT und *Sost-Tg* Mäusen. Die virtuellen Schnittkanten sind rot eingefärbt. D: Quantifizierung von trabekulären Strukturparametern der distalen Femur Metaphyse in 6, 24 und 52 Wochen alten WT und *Sost-Tg* Mäusen. BV/TV: Anteil des Knochenvolumens am Gewebvolumen; Tb.Th: Trabekuläre Dicke; Tb.N: Trabekelanzahl; Tb.Sp: Trabekel-Abstand.  $n \geq 3$  Proben pro Alter und Genotyp. \* $p < 0,05$  gegen WT.

Die Untersuchung der Femora aus *Col1a1-Sost*-Tieren mittels  $\mu$ CT ergab, dass die kortikale Dicke bei allen untersuchten Altern (6, 24 und 52 Wochen) gegenüber WT-Geschwistertieren unverändert blieb. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch beim Durchmesser des Mittelschaftes, der lediglich im Alter von 52 Wochen gering aber signifikant in den *Col1a1-Sost*-Tieren verringert war (Abbildung 12A und B). Bei der trabekulären Knochenmasse im Bereich der distalen Metaphyse konnte in den *Col1a1-Sost*-Tieren eine Tendenz zu einer Verringerung beobachtet werden, die jedoch nie den Signifikanzschwellenwert erreichte. Die trabekuläre Dicke war in 6 und 24 Wochen alten transgenen Tieren erhöht, wohingegen die Trabekelanzahl in den selben Altersklassen signifikant und deutlich

gegenüber den WT-Kontrollen verringert war. Daraus folgte in diesen Gruppen auch ein deutlich erhöhter durchschnittlicher Abstand zwischen den einzelnen Trabekeln (Abbildung 12C und D).

### 5.1.3 Histologische Untersuchung des *Col1a1-Sost*-Mausmodells

Zur tiefergehenden Analyse der Effekte von Sclerostin auf den Knochenstoffwechsel im *Col1a1-Sost*-Mausmodell wurden unentkalkte histologische Schnitte der Wirbelkörper von weiblichen Mäusen histomorphometrisch untersucht.



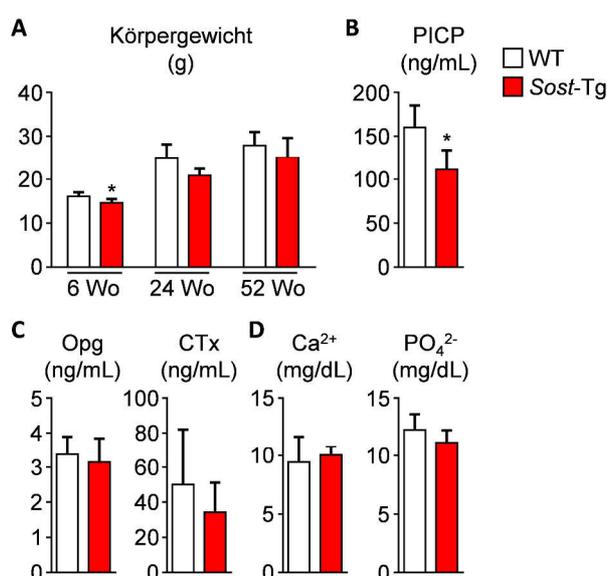
**Abbildung 13: Histomorphometrische Untersuchung der *Col1a1-Sost*-Mäuse.** **A:** Repräsentative, unentkalkte histologische Schnitte der Wirbelkörper von weiblichen WT und *Sost-Tg* Mäusen im Alter von 6, 24 und 52 Wochen. Von Kossa/van Gieson Färbung, der Maßstabsbalken entspricht 1 mm. **B:** Quantifizierung von trabekulären Strukturparametern der Wirbelkörper in 6, 24 und 52 Wochen alten WT und *Sost-Tg* Mäusen. n≥3 Proben pro Alter und Genotyp. \*p<0,05 gegen WT. **C:** Quantifizierung von zellulären Parametern im trabekulären Bereich der Wirbelkörper von 6, 24 und 52 Wochen alten WT und *Sost-Tg* Mäusen. n≥3 Proben pro Alter und Genotyp. N.Ob/B.Pm: Anzahl der Osteoblasten auf der

Knochenoberfläche; Ob.S/BS: Anteil der mit Osteoblasten bedeckten Knochenoberfläche; N.Ot/B.Ar: Anzahl der Osteozyten pro Knochenfläche; N.Oc/B.Pm: Anzahl der Osteoklasten auf der Knochenoberfläche; Oc.S/BS: Anteil der mit Osteoklasten bedeckten Knochenoberfläche. \* $p < 0,05$  gegen WT. **D:** Quantifizierung des Osteoid-Anteils am Knochen im trabekulären Bereich der Wirbelkörper von 6, 24 und 52 Wochen alten WT und *Sost-Tg* Mäusen.  $n \geq 3$  Proben pro Alter und Genotyp. \* $p < 0,05$  gegen WT. **E:** Quantifizierung der Knochenformationsrate im trabekulären Bereich der Wirbelkörper von 6, 24 und 52 Wochen alten WT und *Sost-Tg* Mäusen.  $n \geq 3$  Proben pro Alter und Genotyp. \* $p < 0,05$  gegen WT.

Die strukturelle Histomorphometrie der Wirbelkörper zeigte in allen untersuchten Altersgruppen (6, 24 und 52 Wochen) eine signifikante Reduktion der trabekulären Knochenmasse in den Wirbelkörpern der *Col1a1-Sost*-Tiere (Abbildung 13A & B). Diese dramatisch verringerte Knochenmasse basierte zu allen Zeitpunkten auf einer deutlich verringerten Trabekelanzahl und in den 6 und 24 Wochen alten Tieren zusätzlich auf einer verminderten Trabekeldicke. Die Mineralisation der Knochenmatrix wurde scheinbar nicht beeinflusst, wie am unveränderten Osteoidanteil des Knochens erkennbar ist. Auch auf zellulärer Ebene konnten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten beobachtet werden (Abbildung 13C & D). Eine mögliche Erklärung für den strukturellen Phänotyp liegt in der in allen Altersgruppen deutlich reduzierten Knochenformationsrate, die für eine Reduktion der Osteoblasten-Aktivität bei gleichbleibender Anzahl spricht (Abbildung 13E).

#### 5.1.4 Serumanalyse und morphologische Eigenschaften

Zur Überprüfung, inwiefern sich das *Col1a1-Sost*-Konstrukt auf den Gesamtkörperbau auswirkt, wurde das Gewicht der Mäuse verglichen. Zusätzlich wurden diverse Parameter des Knochenstoffwechsels im Serum bestimmt, um so weitere Einblicke in die beteiligten Vorgänge zu erhalten, die für die Veränderung der Knochenarchitektur verantwortlich sein könnten.



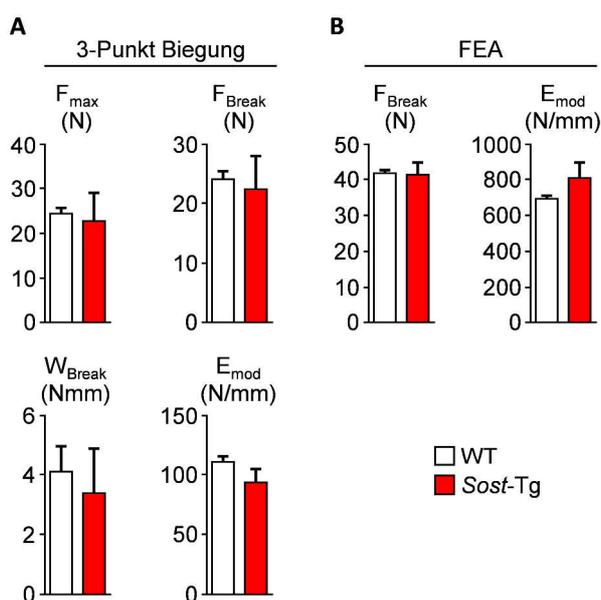
**Abbildung 14: Morphologische Eigenschaften und Serumparameter der *Col1a1-Sost*-Mäuse.** **A:** Vergleich des Körpergewichtes zwischen weiblichen WT und *Sost-Tg* im Alter von 6, 24 und 52 Wochen.  $n \geq 3$  Proben pro Alter und Genotyp. \* $p < 0,05$  gegen WT. **B:** Bestimmung der PICP-Konzentration im Serum von 24 Wochen alten WT und *Sost-Tg* Mäusen.  $n = 6$  Proben pro Genotyp. \* $p < 0,05$  gegen WT. **C:** Bestimmung der Konzentration von Knochenabbaumarkern (Osteoprotegerin und Crosslaps) im Serum von 24 Wochen alten WT und *Sost-Tg* Mäusen.  $n = 6$  Proben pro Genotyp.

\* $p < 0,05$  gegen WT. **D:** Bestimmung des Calcium- und Phosphatspiegels im Serum von 24 Wochen alten WT und *Sost-Tg* Mäusen.  $n=6$  Proben pro Genotyp. \* $p < 0,05$  gegen WT.

Es konnte lediglich in den 6 Wochen alten *Col1a1-Sost*-Mäusen eine signifikante Reduktion des Körpergewichtes beobachtet werden, auch wenn eine gewisse Tendenz in diese Richtung auch in den 24 und 52 Wochen alten Tieren vorhanden war (Abbildung 14A). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der zellulären und dynamischen Histomorphometrie konnte im Serum der transgenen Tiere lediglich eine signifikante Verminderung des Prokollagen-I-C-terminalen Peptids (PICP) gemessen werden, einem Biomarker des Knochenaufbaus (Abbildung 14B). Die Serumkonzentration von Osteoprotegerin (Opg), das die Osteoklasten-Differenzierung beeinflusst und knochen-spezifischen Kollagen-Vernetzungen (Crosslaps, CTx), die bei der Knochenresorption freigesetzt werden, waren unverändert, wie auch die Calcium- und Phosphatspiegel (Abbildung 14C & D).

### 5.1.5 Biomechanische Eigenschaften

Ob die Veränderung der Knochenarchitektur in den *Col1a1-Sost*-Mäusen auch veränderte biomechanischen Eigenschaften zur Folge hatte, wurde mittels 3-Punkte Biegesteifigkeitstest und Finite Elemente Analyse der Femora aus 24 Wochen alten Tieren untersucht.



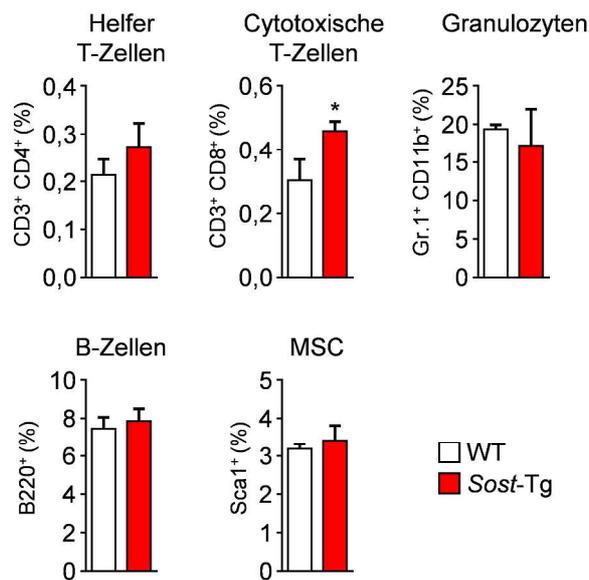
**Abbildung 15: Biomechanische Eigenschaften der *Col1a1-Sost*-Mäuse.** **A:** Mittels 3-Punkt-Biegesteifigkeitstest bestimmte Parameter der Femora aus 24 Wochen alten, weiblichen WT und *Sost-Tg* Mäusen.  $n=3$  Proben pro Genotyp. \* $p < 0,05$  gegen WT. **B:** Finite Elemente Analyse zur Bestimmung der mechanische Eigenschaften der Femur-Mittelschäfte aus 24 Wochen alten, weiblichen WT und *Sost-Tg* Mäusen. Die Berechnung der Werte erfolgte auf Basis der  $\mu$ CT-Aufnahmen der Femora.  $n=3$  Proben pro Genotyp. \* $p < 0,05$  gegen WT.

Der 3-Punkt-Biegesteifigkeitstest, der die Widerstandsfähigkeit des Knochens gegenüber einer orthogonal zur physiologischen Hauptkraftlinie einwirkenden Kraft untersucht, ergab, dass es weder in der maximalen Tragkraft, der Kraft bis zum Bruch, der erforderlichen Arbeit bis zum Bruch noch in der Steifigkeit signifikante Unterschiede zwischen WT- und *Col1a1-Sost*-Femora gab (Abbildung 15A).

Auch die Finite Elemente Analyse, bei der die erforderliche Kraft bis zum Bruch, als auch die Steifigkeit der Femur-Diaphyse, bei einer axial einwirkenden Belastung berechnet wurden, zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (Abbildung 15B).

### 5.1.6 Analyse des Knochenmarks

Da die verringerte trabekuläre Knochenmasse im Umkehrschluss ein größeres Volumen für das Knochenmark bedeutete, sollte untersucht werden, ob dies Veränderungen der zellulären Zusammensetzung, insbesondere mit Hinblick auf das Immunsystem, zur Folge hatte. Hierfür wurde das Knochenmark aus WT- und *Col1a1-Sost*-Mäusen mittels Durchflusszytometrie analysiert.



**Abbildung 16: Knochenmarkszusammensetzung der *Col1a1-Sost*-Mäuse.** Durchflusszytometrische Analyse des Knochenmarks aus 30 Wochen alten, weiblichen WT und *Sost-Tg* Mäusen. Zur Identifizierung wurden die aufgeführten Marker verwendet. Je Messung wurden  $5 \cdot 10^5$  Zellen eingesetzt. Angegeben ist der prozentuale Anteil der für die jeweiligen Marker positiven Zellen im Verhältnis zu der Gesamtzellzahl. n=3 Proben pro Genotyp. \*p<0,05 gegen WT.

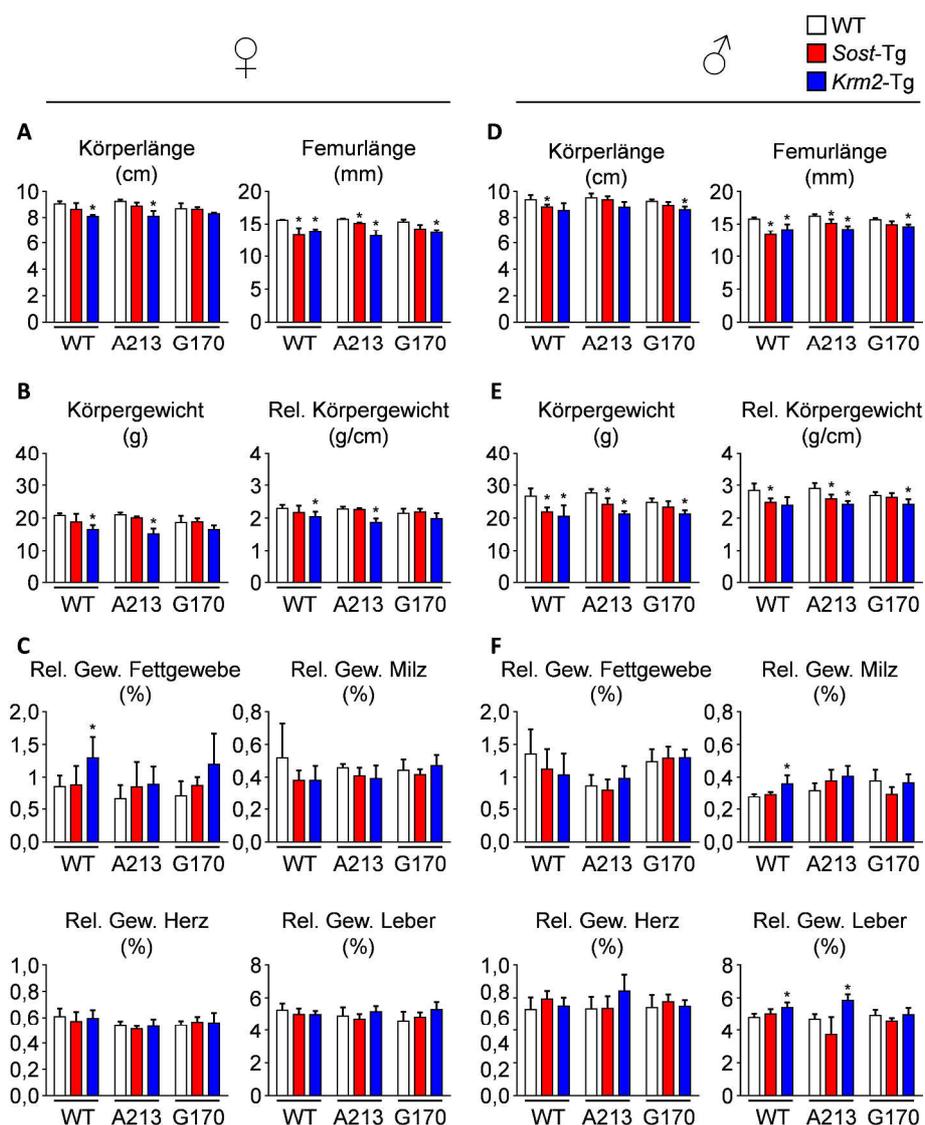
Die Analyse mittels Durchflusszytometrie zeigte, dass das Knochenmark der *Col1a1-Sost*-Tiere einen signifikant erhöhten Anteil an cytotoxischen T-Zellen hatte. Die relative Anzahl an Helfer T-Zellen, Granulozyten, B-Zellen und mesenchymalen Stammzellen war jedoch unverändert im Vergleich mit Knochenmark aus WT-Tieren (Abbildung 16).

## 5.2 Interaktion von Komponenten des Wnt-Rezeptorkomplexes

Um das Zusammenspiel der diversen Komponenten des Wnt-Rezeptorkomplexes adäquat untersuchen zu können, wurden das *Col1a1-Sost* (*Sost*-Tg)-, das *Col1a1-Krm2* (*Krm2*-Tg)- und das *Fzd9*-defiziente (*Fzd9*-KO)-Mausmodell mit zwei verschiedenen Linien gekreuzt, die Mutationen im *Lrp5*-Gen tragen, die eine erhöhte Knochenmasse zur Folge haben (*Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> und *Lrp5*<sup>G170V/G170V</sup>). Auf Grund des unterschiedlichen genetischen Hintergrundes, wurden die Untersuchungen und Auswertungen der *Fzd9*-KO-Mäuse gesondert von denen der *Col1a1-Sost* und *Col1a1-Krm2* enthaltenden Linien durchgeführt.

### 5.2.1 Analyse von *Col1a1-Sost* und *Col1a1-Krm2* in Kombination mit *Lrp5*-Varianten

Zunächst wurden 12 Wochen alte weibliche und männliche Tiere, die das *Col1a1-Sost*- oder *Col1a1-Krm2*-Transgen einzeln oder in Kombination mit einem der beiden *Lrp5*-HBM-Varianten (*Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> oder *Lrp5*<sup>G170V/G170V</sup>) trugen, auf grundlegende morphologische Veränderungen untersucht. Hierzu wurde sowohl die Körpergröße als auch die Femurlänge sowie das Gewicht des Körpers und ausgewählter einzelner Organe gemessen.



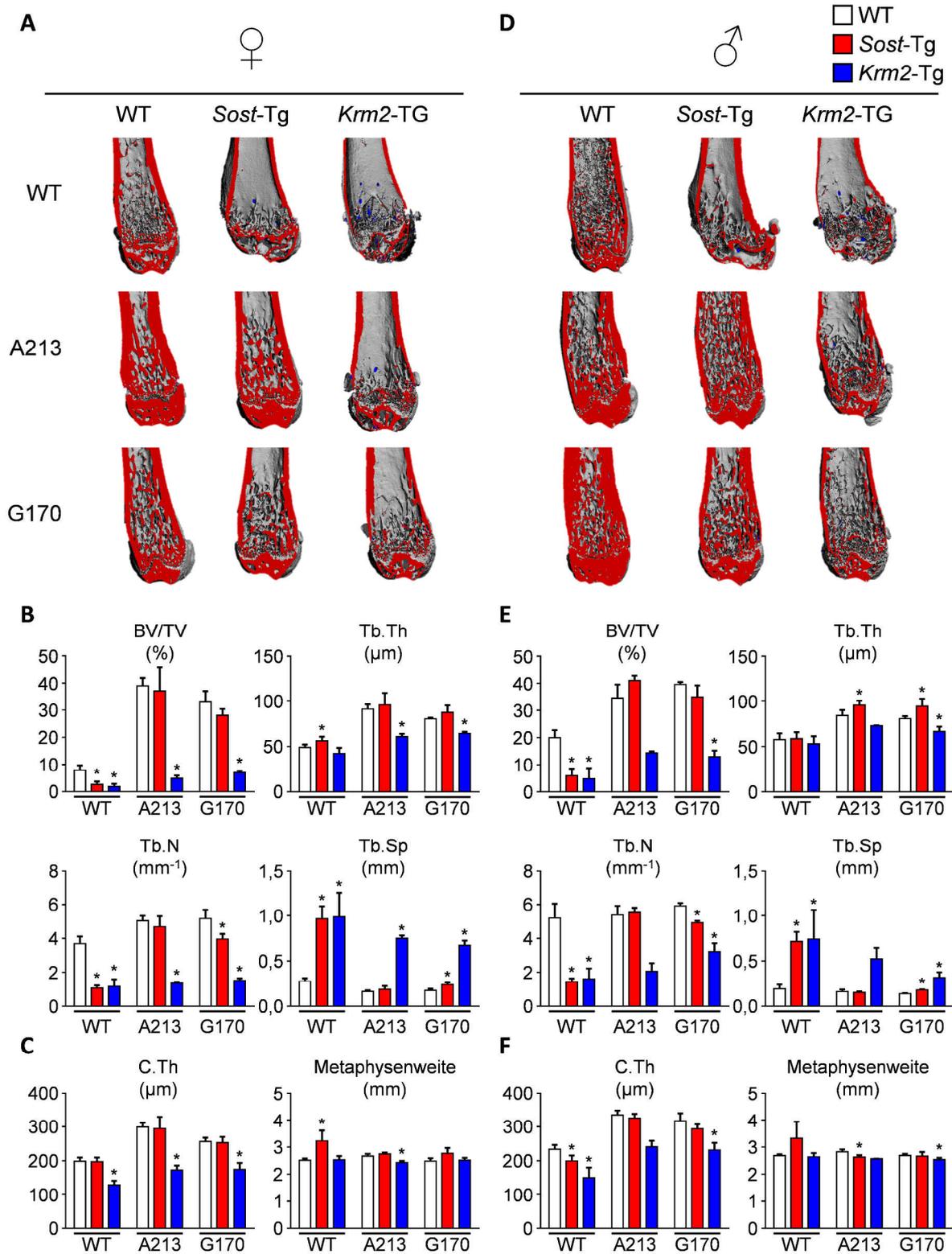
**Abbildung 17: Untersuchungen der *Col1a1-Sost*- und *Col1a1-Krm2*-Mäuse in Kombination mit *Lrp5*-HBM-Varianten. A:** Länge des Körpers von der Kopfspitze bis zum Ende des siebten Beckenwirbels im gestreckten Zustand sowie des Femurs in axialer Richtung von 12 Wochen alten, weiblichen Mäusen mit den aufgeführten Genotypen (Wildtyp, *Col1a1-Sost*, *Col1a1-Krm2*, *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> und *Lrp5*<sup>G170V/G170V</sup>) einzeln oder in Kombination. n≥5 Mäuse pro Gruppe. \*p<0,05 gegen nicht-transgene Kontrollen. **B:** Körpergewicht und auf die Körperlänge bezogenes Körpergewicht der oben beschriebenen, weiblichen Mäuse mit den jeweils angegebenen Genotypen. n≥5 Mäuse pro Gruppe. \*p<0,05 gegen nicht-transgene Kontrollen. **C:** Gewichte ausgewählter Organe in Relation zum Gesamtkörpergewicht der oben beschriebenen, weiblichen Mäuse mit den jeweils angegebenen Genotypen. n≥5 Mäuse pro Gruppe. \*p<0,05 gegen nicht-transgene Kontrollen. **D:** Länge des Körpers von der Kopfspitze bis zum Ende des siebten Beckenwirbels im gestreckten Zustand sowie des Femurs in axialer Richtung von 12 Wochen alten, männlichen Mäusen mit den aufgeführten Genotypen (Wildtyp, *Col1a1-Sost*, *Col1a1-Krm2*, *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> und *Lrp5*<sup>G170V/G170V</sup>) einzeln oder in Kombination. n≥5 Mäuse pro Gruppe außer *Col1a1-Krm2/Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> (n=3). \*p<0,05 gegen nicht-transgene Kontrollen. **E:** Körpergewicht und auf die Körperlänge bezogenes Körpergewicht der oben beschriebenen, männlichen Mäuse mit den jeweils angegebenen Genotypen. n≥5 Mäuse pro Gruppe außer *Col1a1-Krm2/Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> (n=3). \*p<0,05 gegen nicht-transgene Kontrollen. **F:** Gewichte ausgewählter Organe in Relation zum Gesamtkörpergewicht der oben beschriebenen, männlichen Mäuse mit den jeweils angegebenen Genotypen. n≥5 Mäuse pro Gruppe außer *Col1a1-Krm2/Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> (n=3). \*p<0,05 gegen nicht-transgene Kontrollen.

Im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrolltieren war die Körperlänge der weiblichen *Col1a1-Krm2*-Mäuse in Gegenwart der *Lrp5*<sup>WT/WT</sup> und *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> Varianten signifikant reduziert (Abbildung 17A). Bei männlichen Tieren war dies bei *Col1a1-Sost*-Mäusen in Präsenz von *Lrp5*<sup>WT/WT</sup> und bei *Col1a1-Krm2*-Mäusen in Präsenz von *Lrp5*<sup>G170V/G170V</sup> der Fall (Abbildung 17D). Jedoch waren alle beobachteten

Veränderungen als geringfügig anzusehen. Die Femurlänge war in *Col1a1-Sost*- und *Col1a1-Krm2*-Tieren verkürzt. Während die Kombination von *Col1a1-Sost* mit *Lrp5*-HBM-Varianten teilweise eine Verbesserung zur Folge hatte, war kein Einfluss der *Lrp5*-HBM-Varianten den Effekt des *Col1a1-Krm2*-Transgens zu beobachten (Abbildung 17A&D). Die Untersuchung der Masse des gesamten Körpers sowie ausgewählter einzelner Organe (Viszeralfett, Milz, Herz und Leber) zeigte keine auffälligen Veränderungen zwischen den Gruppen (Abbildung 17).

### **5.2.2 $\mu$ CT-Analyse von *Col1a1-Sost* und *Col1a1-Krm2* in Kombination mit *Lrp5*-Varianten**

Jede der untersuchten Mauslinien hatte für sich genommen einen eindeutigen Effekt auf die Knochenmasse und Knochenstruktur. Um den Einfluss der Kombination dieser Genotypen auf eben diese Eigenschaften zu untersuchen, wurden die Femora aus 12 Wochen alten weiblichen und männlichen Tieren, die das *Col1a1-Sost*- oder *Col1a1-Krm2*-Transgen einzeln oder in Kombination mit einer der beiden *Lrp5*-HBM-Varianten (*Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> oder *Lrp5*<sup>G170V/G170V</sup>) trugen mittels  $\mu$ CT analysiert.



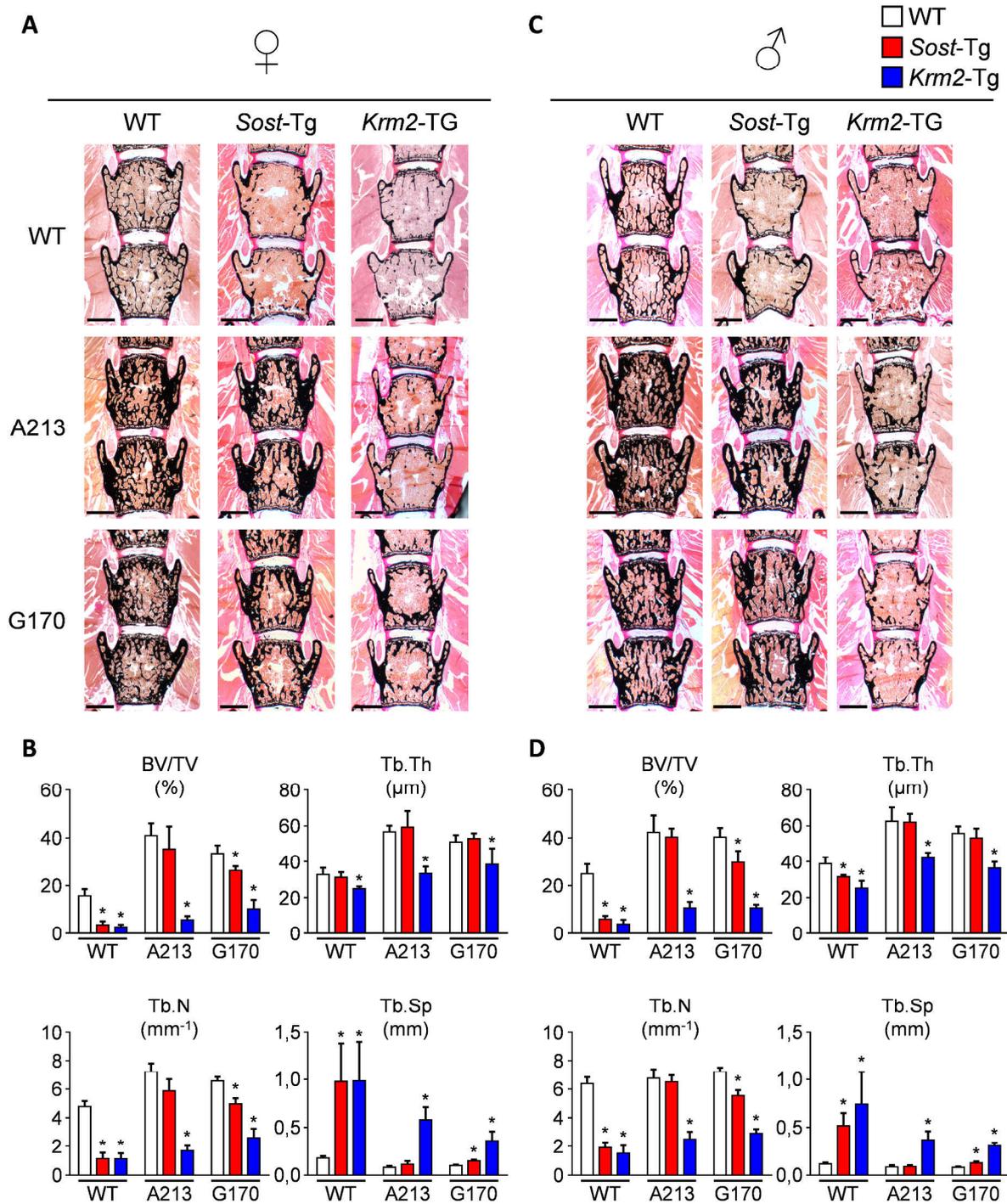
**Abbildung 18:**  $\mu$ CT-Analyse der *Col1a1-Sost*- und *Col1a1-Krm2*-Mäuse in Kombination mit *Lrp5*-HBM-Varianten. **A:** Repräsentative  $\mu$ CT-Aufnahmen des distalen Femurs von 12 Wochen alten, weiblichen Mäusen mit den aufgeführten Genotypen (Wildtyp, *Col1a1-Sost*, *Col1a1-Krm2*, *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> und *Lrp5*<sup>G170V/G170V</sup>) einzeln oder in Kombination. Die virtuellen Schnitkanten sind rot eingefärbt. **B:** Quantifizierung von trabekulären Strukturparametern der distalen Femur Metaphyse in den oben beschriebenen, weiblichen Mäusen mit den jeweils angegebenen Genotypen.  $n \geq 5$  Mäuse pro Gruppe. \* $p < 0,05$  gegen nicht-transgene Kontrollen. **C:** Quantifizierung der kortikalen Dicke des Femur-Mittelschaftes sowie der Weite der distalen Metaphyse der oben beschriebenen, weiblichen Mäusen mit den jeweils angegebenen Genotypen.  $n \geq 5$  Mäuse pro Gruppe. \* $p < 0,05$  gegen nicht-transgene Kontrollen. **D:** Repräsentative  $\mu$ CT-Aufnahmen des distalen Femurs von 12 Wochen alten, männlichen Mäusen mit den aufgeführten Genotypen (Wildtyp, *Col1a1-Sost*, *Col1a1-Krm2*,

*Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> und *Lrp5*<sup>G170V/G170V</sup> ) einzeln oder in Kombination. Die virtuellen Schnittkanten sind rot eingefärbt. E: Quantifizierung von trabekulären Strukturparametern der distalen Femur Metaphyse in den oben beschriebenen, männlichen Mäuse mit den jeweils angegebenen Genotypen. n≥5 Mäuse pro Gruppe außer *Col1a1-Krm2/Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> (n=3). \*p<0,05 gegen nicht-transgene Kontrollen. F: Quantifizierung der kortikalen Dicke des Femur-Mittelschaftes sowie der Weite der distalen Metaphyse der oben beschriebenen, männlichen Mäuse mit den jeweils angegebenen Genotypen. n≥5 Mäuse pro Gruppe außer *Col1a1-Krm2/Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> (n=3). \*p<0,05 gegen nicht-transgene Kontrollen.

Der Effekt der Kombination der verschiedenen Genotypen war bereits durch visuelle Inspektion eindeutig zu erkennen (Abbildung 18A&D). Die Quantifizierung einzelner Parameter der Knochenstruktur bestätigte diesen ersten Eindruck. So ist das trabekuläre Knochenvolumen im distalen Metaphysen-Bereich der Femora der *Col1a1-Sost*- und *Col1a1-Krm2*-Tiere in beiden Geschlechtern deutlich reduziert. In Kombination mit sowohl *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup>, als auch *Lrp5*<sup>G170V/G170V</sup> wird der Effekt von Sclerostin völlig aufgehoben, wohingegen die Überexpression von Kremen2 nach wie vor einer Reduktion der Knochenmasse zur Folge hat (Abbildung 18B&E). Gleiches gilt auch für die Trabekelanzahl und den Trabekelabstand, wobei hier *Lrp5*<sup>G170V/G170V</sup> den Effekt von Sclerostin zwar größtenteils aber nicht so vollständig wie *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> unterdrücken kann (Abbildung 18B&E). Die Trabekeldicke ist bei weiblichen *Col1a1-Sost*-Mäusen in Kombination mit *Lrp5*<sup>WT/WT</sup> leicht aber signifikant erhöht wohingegen dies bei männlichen Tieren nur in Kombination mit beiden HBM Varianten von *Lrp5* der Fall ist (Abbildung 18B&E). Die kortikale Dicke wurde lediglich durch *Col1a1-Krm2* verringert und hier hatten die *Lrp5*-Varianten keinen Einfluss (Abbildung 18C&F). Bei den Analysen wurde in *Col1a1-Sost*-Mäusen eine Aufweitung der distalen Femurmetaphyse festgestellt. Die Quantifizierung der Femurweite in diesem Bereich ergab, dass dieser Phänotyp in Präsenz der *Lrp5*-HBM-Varianten revidiert wurde (Abbildung 18C&F).

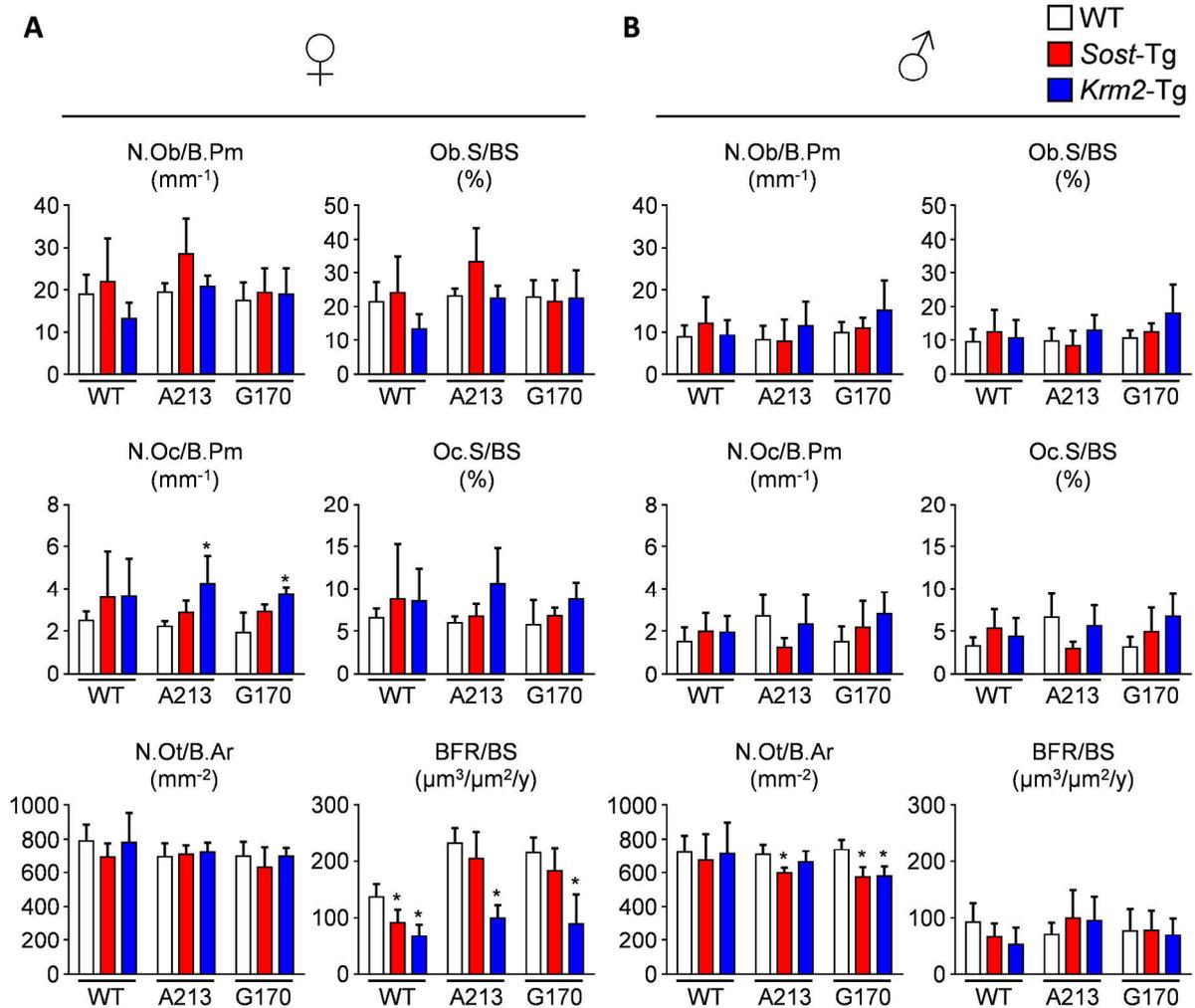
### 5.2.3 Histologie von *Col1a1-Sost/Krm2* in Kombination mit *Lrp5*-HBM-Varianten

Zur tiefergehenden Analyse des in den Femora beobachteten Knochenphänotyps wurden histologische Schnitte der Wirbelkörper von 12 Wochen alten Tieren beider Geschlechter, die das *Col1a1-Sost*- oder *Col1a1-Krm2*-Transgen einzeln oder in Kombination mit einer der beiden *Lrp5*-HBM-Varianten (*Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> oder *Lrp5*<sup>G170V/G170V</sup>) trugen, angefertigt und analysiert. Somit konnten sowohl die Strukturparameter in diesem Skelettbereich, als auch zelluläre und dynamische Parameter quantifiziert werden.



**Abbildung 19: Strukturelle histomorphometrische Untersuchung der *Col1a1-Sost*- und *Col1a1-Krm2*-Mäuse in Kombination mit *Lrp5*-HBM-Varianten.** **A:** Repräsentative, unentkalkte histologische Schnitte der Wirbelkörper von 12 Wochen alten, weiblichen Mäusen mit den aufgeführten Genotypen (Wildtyp, *Col1a1-Sost*, *Col1a1-Krm2*, *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> und *Lrp5*<sup>G170V/G170V</sup>) einzeln oder in Kombination. Von Kossa/van Gieson Färbung, der Maßstabsbalken entspricht 1 mm. **B:** Quantifizierung von trabekulären Strukturparametern der Wirbelkörper in den oben beschriebenen, weiblichen Mäusen mit den jeweils angegebenen Genotypen. n≥5 Mäuse pro Gruppe. \*p<0,05 gegen nicht-transgene Kontrollen. **C:** Repräsentative, unentkalkte histologische Schnitte der Wirbelkörper von 12 Wochen alten, männlichen Mäusen mit den aufgeführten Genotypen (Wildtyp, *Col1a1-Sost*, *Col1a1-Krm2*, *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> und *Lrp5*<sup>G170V/G170V</sup>) einzeln oder in Kombination. Von Kossa/van Gieson Färbung, der Maßstabsbalken entspricht 1 mm. **D:** Quantifizierung von trabekulären Strukturparametern der Wirbelkörper in den oben beschriebenen, männlichen Mäusen mit den jeweils angegebenen Genotypen. n≥5 Mäuse pro Gruppe außer *Col1a1-Krm2/Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> (n=3). \*p<0,05 gegen nicht-transgene Kontrollen.

Bei der Analyse der trabekulären Struktur der Wirbelkörper konnten die Beobachtungen der  $\mu$ CT-Analyse weitestgehend bestätigt werden (Abbildung 19). So wurde der Effekt, den das *Col1a1-Sost*-Konstrukt auf die Knochenarchitektur hatte, in Präsenz von *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> aufgehoben und in Präsenz von *Lrp5*<sup>G170V/G170V</sup> großteils reduziert. Im Gegensatz dazu war der Effekt des *Col1a1-Krm2*-Konstruktes auch in Gegenwart der beiden *Lrp5*-HBM-Varianten deutlich vorhanden.



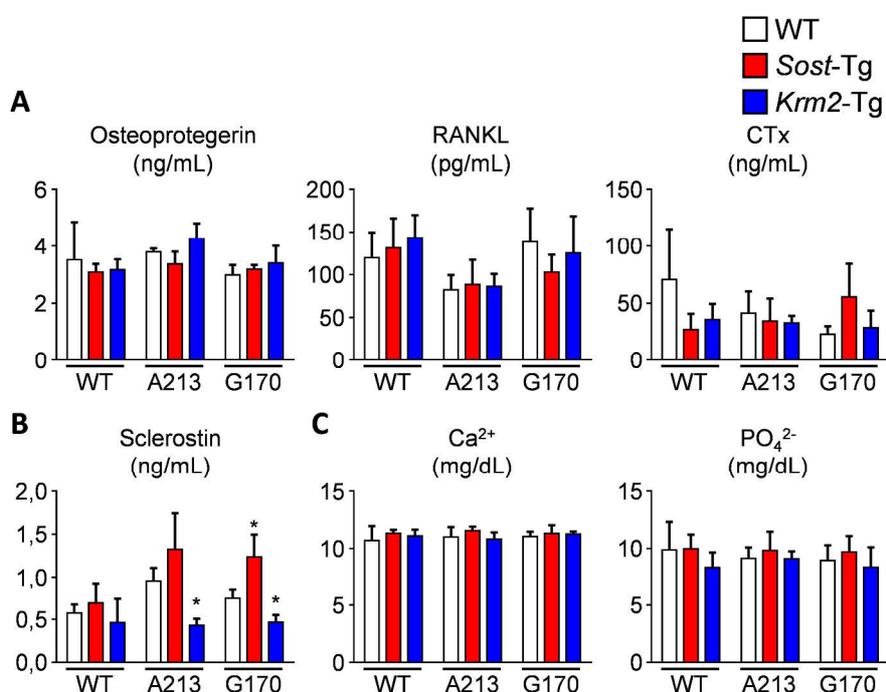
**Abbildung 20: Zelluläre und dynamische histomorphometrische Untersuchung der *Col1a1-Sost*- und *Col1a1-Krm2*-Mäuse in Kombination mit *Lrp5*-HBM-Varianten.** **A:** Quantifizierung von zellulären und dynamischen Parametern im trabekulären Bereich der Wirbelkörper in 12 Wochen alten, weiblichen Mäusen mit den aufgeführten Genotypen (Wildtyp, *Col1a1-Sost*, *Col1a1-Krm2*, *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> und *Lrp5*<sup>G170V/G170V</sup>) einzeln oder in Kombination. n $\geq$ 5 Mäuse pro Gruppe. \*p<0,05 gegen nicht-transgene Kontrollen. **B:** Quantifizierung von zellulären und dynamischen Parametern im trabekulären Bereich der Wirbelkörper in 12 Wochen alten, männlichen Mäusen mit den aufgeführten Genotypen (Wildtyp, *Col1a1-Sost*, *Col1a1-Krm2*, *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> und *Lrp5*<sup>G170V/G170V</sup>) einzeln oder in Kombination. n $\geq$ 5 Mäuse pro Gruppe außer *Col1a1-Krm2/Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> (n=3). \*p<0,05 gegen nicht-transgene Kontrollen.

Auf zellulärer Ebene konnte nur bei weiblichen Mäusen, die das *Col1a1-Krm2* Konstrukt in Kombination mit *Lrp5*-HBM-Varianten trugen, eine erhöhte Osteoklasten-Anzahl gemessen werden (Abbildung 20A). Alle weiteren zellulären Parameter wurden durch keine der Genotypkombinationen signifikant beeinflusst. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse der dynamischen Histomorphometrie, die eine plausible Erklärung für die veränderte Knochenarchitektur der entsprechenden Genotypen

lieferten. Die Knochenformationsrate im trabekulären Bereich der Wirbelkörper weiblicher Tiere war signifikant reduziert, wenn diese das *Col1a1-Sost*- oder *Col1a1-Krm2*-Konstrukt trugen. In Kombination mit *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> oder *Lrp5*<sup>G170V/G170V</sup> wurde der Effekt von *Col1a1-Sost* aufgehoben, wohingegen der des *Col1a1-Krm2*-Konstruktes nach wie vor vorhanden war (Abbildung 20A). Bei männlichen Mäusen wurde eine generell deutlich geringere Knochenformationsrate als bei weiblichen Tieren gemessen, die sich, zum Teil auch auf Grund der hohen Variabilität innerhalb eines Genotyps, zwischen keiner der untersuchten Gruppen signifikant unterschied (Abbildung 20B).

#### 5.2.4 Serumparameter von *Col1a1-Sost/Krm2* in Kombination mit *Lrp5*-HBM-Varianten

Auf Grund des ausgeprägten und eindeutigeren Phänotyps der 12 Wochen alten, weiblichen Mäuse wurde das Serum dieser Tiere auf diverse Parameter des Knochenstoffwechsels untersucht.



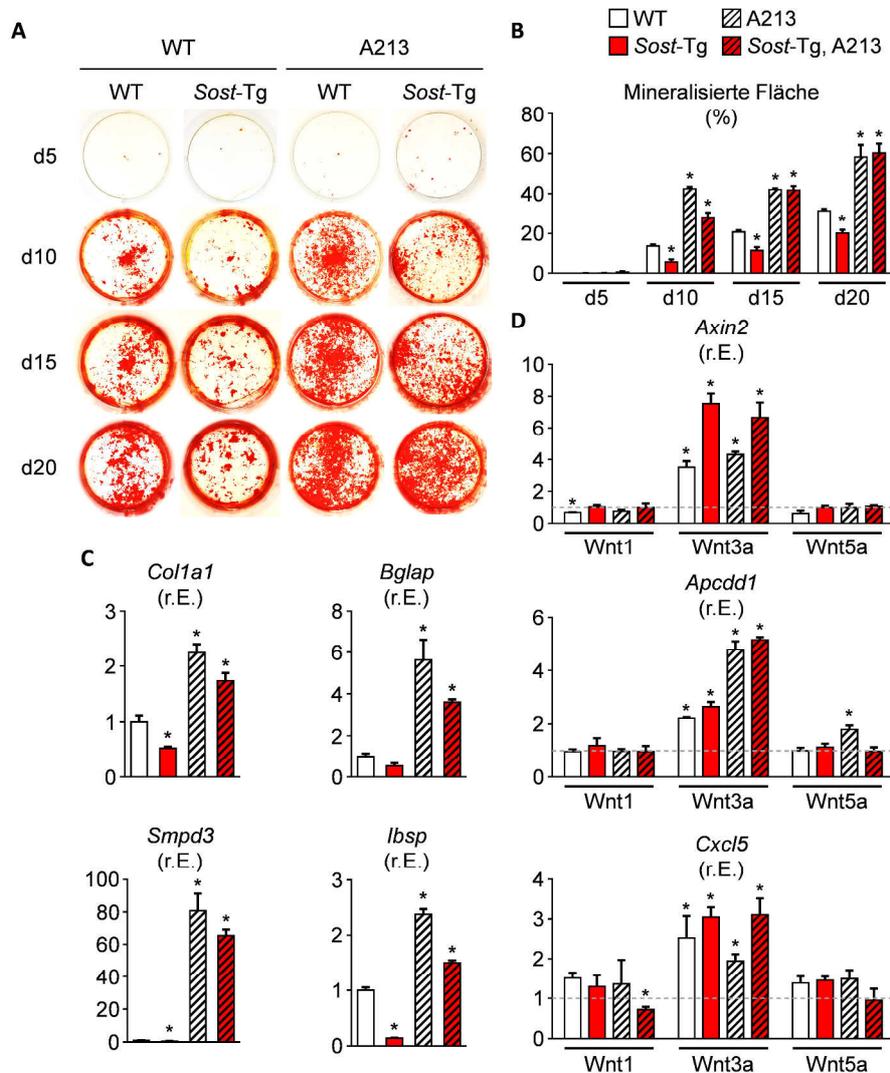
**Abbildung 21: Serumparameter der *Col1a1-Sost*- und *Col1a1-Krm2*-Mäuse in Kombination mit *Lrp5*-HBM-Varianten.** **A:** Bestimmung der Konzentration von mit Osteoklasten im Zusammenhang stehenden Markern im Serum von 12 Wochen alten, weiblichen Mäusen mit den aufgeführten Genotypen (Wildtyp, *Col1a1-Sost*, *Col1a1-Krm2*, *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> und *Lrp5*<sup>G170V/G170V</sup>) einzeln oder in Kombination. n=5 Mäuse pro Gruppe. \*p<0,05 gegen nicht-transgene Kontrollen. **B:** Bestimmung der Sclerostin-Serumkonzentration der oben beschriebenen Mäuse. n=5 Mäuse pro Gruppe. \*p<0,05 gegen nicht-transgene Kontrollen. **C:** Bestimmung des Calcium- und Phosphatspiegels im Serum von 12 Wochen alten, weiblichen Mäusen mit den jeweils angegebenen Genotypen. n=5 Mäuse pro Gruppe. \*p<0,05 gegen nicht-transgene Kontrollen.

Die Bestimmung der Serumkonzentration von Faktoren, die die Osteoklasten-Differenzierung beeinflussen (Osteoprotegerin und RANKL) oder bei der Knochenresorption freigesetzt werden (Crosslaps), zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 21A). Auch der Calcium- und Phosphatspiegel war in allen Gruppen unverändert (Abbildung 21C). Lediglich bei der Sclerostin-Konzentration wurden signifikante Unterschiede festgestellt (Abbildung 21B). Im Vergleich zu den nicht-transgenen Kontrollen war die Sclerostin-Konzentration im Serum von Mäusen, die das *Col1a1*-

*Krm2*-Transgen in Kombination mit *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> oder *Lrp5*<sup>G170V/G170V</sup> trugen reduziert. Im Serum von Tieren mit dem kombinierten Genotyp aus *Col1a1-Sost* und *Lrp5*<sup>G170V/G170V</sup> konnte eine signifikant erhöhte Sclerostin-Konzentration gemessen werden, die als Trend auch in der Kombination *Col1a1-Sost* mit *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> erkennbar war.

### 5.2.5 Ex vivo Analyse der *Col1a1-Sost*-Osteoblasten in Kombination mit *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup>

Da in den vorhergegangenen *in vivo* Versuchen der Effekt des *Col1a1-Sost*-Transgens durch die Präsenz von *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> vollständig aufgehoben wurde und nicht mehr von dem Phänotyp der *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup>-Mäuse ohne transgenes Konstrukt unterschieden werden konnte, wurde diese Kombination gewählt, um mit *ex vivo* differenzierten Schädeldach-Osteoblasten den zellulären Phänotyp und den zugrunde liegenden molekularen Mechanismus zu analysieren und möglichst eindeutige Ergebnisse zu erhalten.

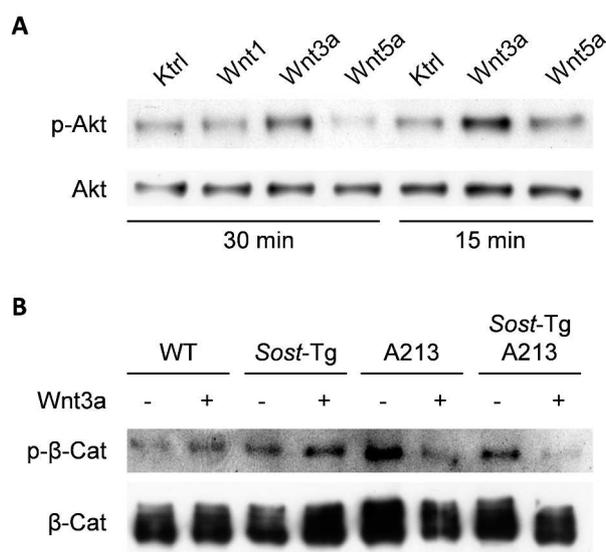


**Abbildung 22: Ex vivo Untersuchungen der Osteoblasten aus *Col1a1-Sost*-Mäuse in Kombination mit dem *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup>-Genotyp.** **A:** Repräsentative Alizarinrot-Färbungen der primären Schädeldach-Osteoblasten isoliert aus Mäusen mit den angegebenen Genotypen an den Tagen 5, 10, 15 und 20 der *ex vivo* Differenzierung. **B:** Quantifizierung der mineralisierten Fläche anhand der Alizarinrot-Färbung zu den angegebenen Zeitpunkten der *ex vivo* Differenzierung der Osteoblasten mit

den angegebenen Genotypen. n=3 Kulturen pro Gruppe. \*p<0,05 gegen Wildtyp-Zellen. C: qRT-PCR Analyse der relativen Expression von *Col1a1*, *Bglap*, *Smpd3* und *Ibsp* in primären Schädeldach-Osteoblasten der angegebenen Genotypen an Tag 10 der *ex vivo* Differenzierung bezogen auf Wildtyp-Zellen. n=3 Kulturen pro Gruppe. \*p<0,05 gegen Wildtyp-Zellen. D: qRT-PCR Analyse der relativen Expression von *Axin2*, *Apcdd1* und *Cxcl5* nach Stimulation mit Wnt1, Wnt3a und Wnt5a in Schädeldach-Osteoblasten der angegebenen Genotypen an Tag 10 der *ex vivo* Differenzierung bezogen auf unstimulierte Kontrollen (grau-gestrichelte Linie). n=3 Kulturen pro Gruppe. \*p<0,05 gegen Wildtyp-Zellen.

Die Fähigkeit der Schädeldach-Osteoblasten bei der *ex vivo* Differenzierung mineralisierte Matrix zu bilden, korrelierte mit der *in vivo* beobachteten Knochenformationsrate. Über einen Zeitraum von 20 Tagen zeigten *Col1a1-Sost*-Osteoblasten gegenüber WT-Zellen eine verminderte Mineralisationskapazität wohingegen Zellen, die *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> alleine oder in Kombination mit *Col1a1-Sost* trugen, deutlich besser als WT-Zellen mineralisierten (Abbildung 22A&B). Dies spiegelte sich auch in der mittels qRT-PCR bestimmten, relativen Expression von Osteoblasten-Differenzierungsmarkern (*Col1a1*, *Bglap*, Sphingomyelin Phosphodiesterase 3 (*Smpd3*) und Integrin Binding Sialoprotein (*Ibsp*)) wieder, die in *Col1a1-Sost*-Osteoblasten geringer und sowohl in reinen *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup>-Osteoblasten als auch in Kombination mit *Col1a1-Sost* signifikant stärker war als in WT-Osteoblasten zum gleichen Zeitpunkt (Abbildung 22C). Um zu überprüfen, inwieweit die hier vorgenommenen Modifikationen des Wnt-Rezeptorkomplexes die Wnt-Signaltransduktion der Zellen beeinflussen konnte, wurden sie mit Wnt1, Wnt3a und Wnt5a stimuliert und die Expression kanonischer und nicht kanonischer Wnt-Zielgene mittels qRT-PCR analysiert. Zusätzlich wurde das Zelllysate stimulierter Zellen mittels Westernblot auf den Phosphorylierungsstatus intrazellulärer Komponenten der Wnt-Signaltransduktion untersucht.

Die Stimulation mit Wnt1 führte zu keiner erhöhten Expression der kanonischen Wnt-Zielgene *Axin2* und *Apcdd1* (Adenomatosis Polyposis Coli Down-Regulated 1) und des nicht-kanonischen Wnt-Zielgens Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 5 (*Cxcl5*). Wnt3a erhöhte in allen Gruppen die Expression der kanonischen als auch der nicht-kanonischen Wnt-Zielgene. Des Weiteren konnte keine dämpfende Wirkung des *Col1a1-Sost*-Transgens gegenüber WT-Zellen festgestellt werden. In der Tat zeigten Zellen, die das *Col1a1-Sost*-Transgen trugen, unabhängig von der *Lrp5*-Variante, die höchste relative *Axin2*-Expression, wohingegen *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup>-Zellen deutlich stärker in Bezug auf die *Apcdd1* Transkription reagierten. Die Stimulation mit Wnt5a führte hingegen in keiner der Gruppen zu einer erhöhten Expression von *Cxcl5* (Abbildung 22D).

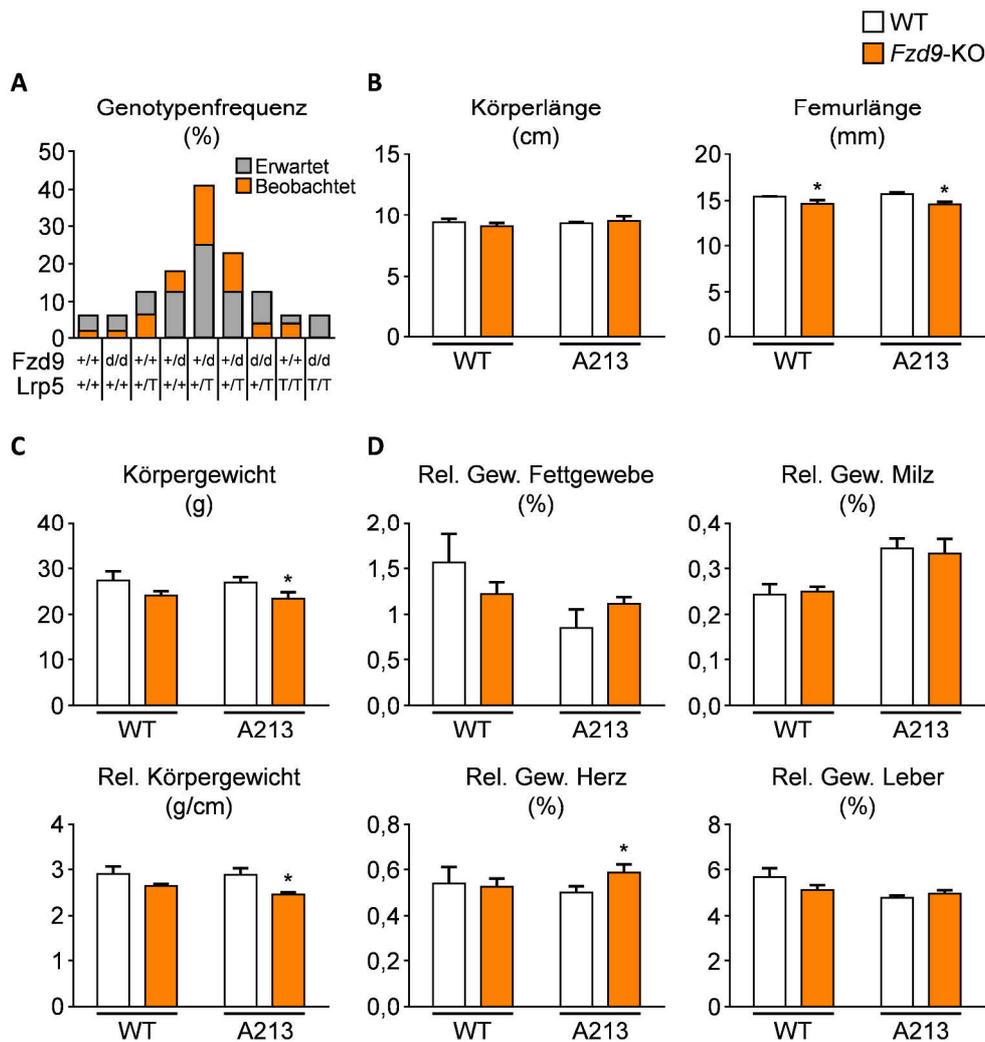


**Abbildung 23: Westernblot-Analyse von Komponenten der Wnt-Signalkaskade.** **A:** Nachweis von Akt und phosphoryliertem Akt in Wildtyp Osteoblasten an Tag 10 der *ex vivo* Differenzierung in unstimulierten Zellen (Ktrl) oder nach 15 oder 30 min Stimulation mit den angegebenen Wnt-Liganden. **B:** Nachweis von  $\beta$ -Catenin und phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin in Osteoblasten mit den angegebenen Genotypen an Tag 10 der *ex vivo* Differenzierung nach 30 min Stimulation mit Wnt3a (+) oder PBS (-).

Diese Ergebnisse der Expressionsanalyse konnten auch teilweise auf Proteinebene nachvollzogen werden. So spiegelt sich die Beobachtung, dass unter den hier angewandten experimentellen Bedingungen, Wnt3a aber nicht Wnt5a nicht-kanonische Wnt-Signaltransduktionswege stimuliert, im Akt-Phosphorylierungsstatus wieder. Akt wird bekanntermaßen nach Stimulation der Zellen mit Wnt5a phosphoryliert<sup>[266]</sup>. In diesem Fall kam es jedoch in WT-Zellen zu keiner deutlichen Veränderung gegenüber unstimulierten Zellen, wohingegen nach 30- und sogar 15-minütiger Stimulation mit Wnt3a eine stärkere Phosphorylierung von Akt zu beobachten war (Abbildung 23A). Die Stimulation von *Col1a1-Sost*-Osteoblasten mit Wnt3a zeigte keine deutliche Veränderung in der Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin, einer der Schlüsselkomponenten des kanonischen Wnt-Signalwegs. *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup>-Zellen zeigten sowohl ohne, als auch in Kombination mit *Col1a1-Sost* nach Stimulation mit Wnt3a eine deutlich verringerte Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin, was ein Indiz für dessen Stabilisierung und die Weiterleitung des Wnt-Signals ist (Abbildung 23B). Andererseits war in den unstimulierten Zellen dieser Genotypen auch scheinbar mehr Phospho- $\beta$ -Catenin vorhanden als dies bei WT- oder *Col1a1-Sost*-Zellen der Fall war.

### 5.2.6 Eigenschaften der *Fzd9*-defizienten Mäuse in Kombination mit *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup>

Auch bei der Kombination der *Fzd9*-defizienten Mäuse mit der *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup>-Variante wurden dieselben Parameter untersucht wie dies bei den *Sost*- und *Krm2*-transgenen Tieren der Fall war. Da es jedoch nur eine geringe Anzahl an Nachkommen mit den gewünschten Genotypen gab, wurden lediglich männliche, 12 Wochen alte Tiere und nur die A213V Variante von *Lrp5* untersucht.



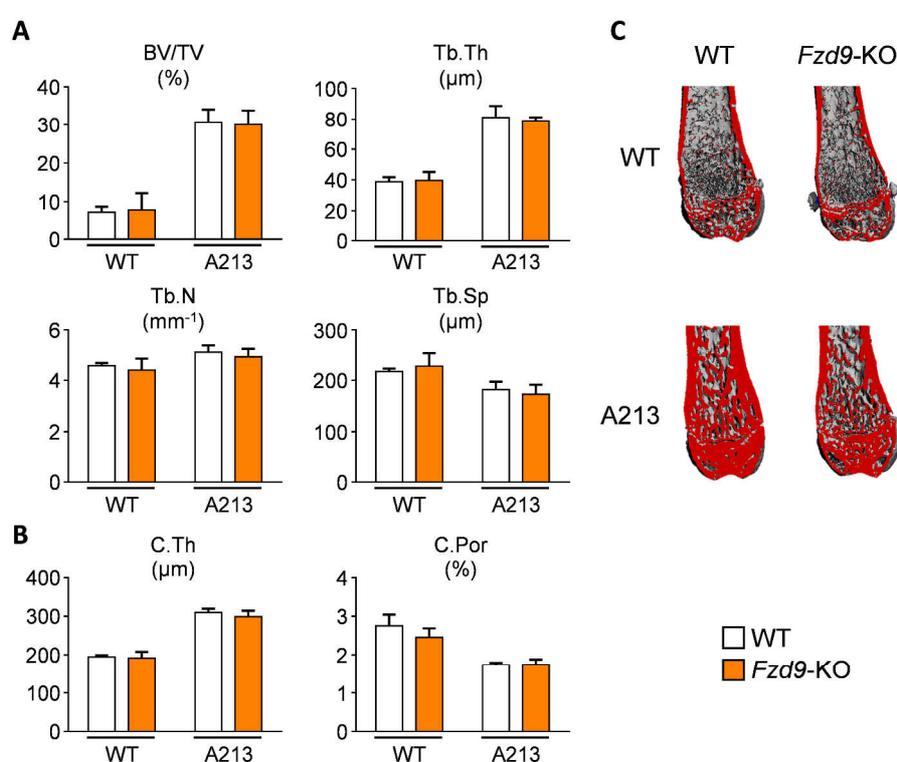
**Abbildung 24: Eigenschaften der *Fzd9*-defizienten Mäuse in Kombination mit *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup>.** A: Auswertung der Genotypenfrequenz von 105 Nachkommen aus drei unabhängigen, doppelt heterozygoten Verpaarungen. Gezeigt ist die Beobachtete Frequenz als prozentualer Anteil der Gesamtanzahl im Vergleich zur erwarteten Frequenz bei einer gleichmäßigen Aufteilung der Allele. B: Länge des Körpers von der Kopfspitze bis zum Ende des siebten Beckenwirbels im gestreckten Zustand sowie des Femurs in axialer Richtung von 12 Wochen alten, männlichen Mäusen mit den aufgeführten Genotypen (Wildtyp, *Fzd9*-KO, *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup>) einzeln oder in Kombination. n≥3 Mäuse pro Gruppe. \*p<0,05 gegen nicht-KO Kontrollen. C: Körpergewicht und auf die Körperlänge bezogenes Körpergewicht der oben beschriebenen, männlichen Mäuse mit den jeweils angegebenen Genotypen. n≥3 Mäuse pro Gruppe. \*p<0,05 gegen nicht-KO Kontrollen. D: Gewichte ausgewählter Organe in Relation zum Gesamtkörpergewicht der oben beschriebenen, männlichen Mäuse mit den jeweils angegebenen Genotypen. n≥3 Mäuse pro Gruppe. \*p<0,05 gegen nicht-KO Kontrollen.

Die Analyse der Genotypenfrequenz von insgesamt 105 Tieren aus drei unabhängigen, doppelt heterozygoten (*Fzd9* +/d, *Lrp5* +/T) Verpaarungen ergab, dass die Genotypen der Nachkommen in der Tat nicht mit der erwarteten Mendelschen-Verteilung geboren wurden (Abbildung 24A). Es wurden mehr Tiere mit einem heterozygoten *Fzd9*-KO-Allel beobachtet und weniger mit rein homozygoten Allelen. Besonders hervorzuheben ist hierbei, dass kein einziges Tier mit sowohl homozygotem *Fzd9*-KO als auch *Lrp5*-HBM-Allelen geboren wurde, was ein Hinweis auf ein mögliches Problem dieser Kombination während der Embryonalentwicklung sein könnte. Die im weiteren Verlauf analysierten Tiere wurden aus Verpaarungen gewonnen, die die Präsenz bestimmter Allele auf Grund homozygoter Elterntiere begünstigten.

Die Analyse von grundlegenden körperlichen Eigenschaften der *Fzd9*-KO-Mäuse in Kombination mit *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> zeigte keine Veränderungen der Körperlänge, jedoch eine signifikante, geringfügige Verkürzung der Femurlänge in den *Fzd9*-KO-Tieren unabhängig von der *Lrp5*-Variante (Abbildung 24B). Das relative Körpergewicht der *Fzd9*-KO-Tiere in Kombination mit *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> sowie die Gewichte der untersuchten Organe zeigten keine auffälligen Veränderungen gegenüber nicht-KO Kontrolltieren (Abbildung 24C&D).

### 5.2.7 $\mu$ CT-Analyse des *Fzd9*-KOs in Kombination mit *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup>

Analog zu den *Col1a1-Sost*- und *Col1a1-Krm2*-Mausmodellen wurden auch die Femora der *Fzd9*-KO-Mäuse in Kombination mit *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> mittels  $\mu$ CT untersucht. Auf Grund der oben beschriebenen Problematik der Genotypenfrequenz wurden hier lediglich männliche Mäuse analysiert.

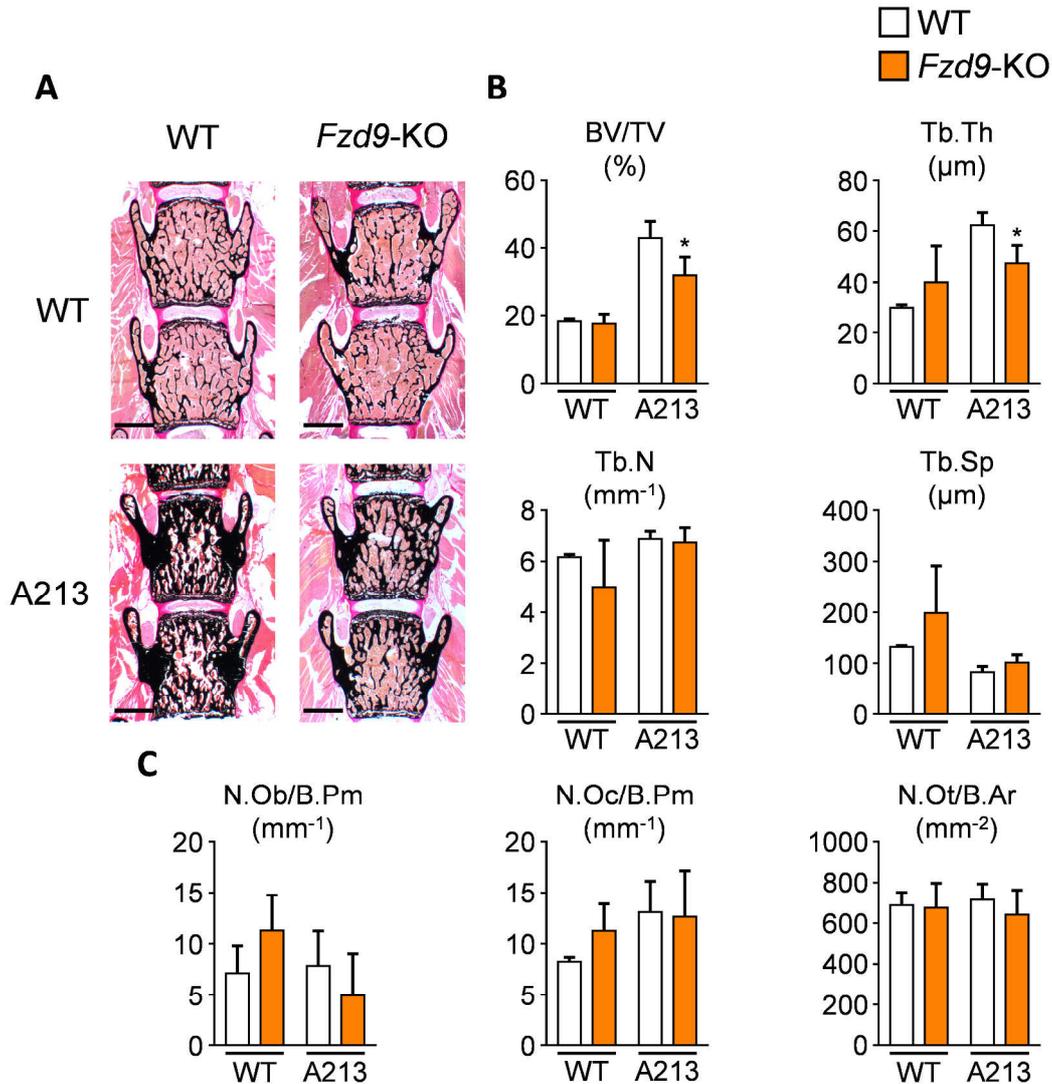


**Abbildung 25:  $\mu$ CT-Analyse der *Fzd9*-KO-Mäuse in Kombination mit *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup>.** A: Quantifizierung von trabekulären Strukturparametern der distalen Femur Metaphyse in 12 Wochen alten, männlichen Mäusen mit den aufgeführten Genotypen (Wildtyp, *Fzd9*-KO, *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup>) einzeln oder in Kombination.  $n \geq 3$  Mäuse pro Gruppe. \* $p < 0,05$  gegen nicht-KO Kontrollen. B: Quantifizierung von kortikalen Parametern des Femur-Mittelschaftes der oben beschriebenen Mäuse mit den jeweils angegebenen Genotypen.  $n \geq 3$  Mäuse pro Gruppe. \* $p < 0,05$  gegen nicht-KO Kontrollen. C: Repräsentative  $\mu$ CT-Aufnahmen des distalen Femurs von 12 Wochen alten, männlichen Mäusen mit den aufgeführten Genotypen. Die virtuellen Schnittkanten sind rot eingefärbt.

Die  $\mu$ CT-Analyse ergab, dass keiner der analysierten Parameter durch die Defizienz von Frizzled9 beeinflusst wurde (Abbildung 25). In der distalen Femurmetaphyse der 12 Wochen alten, männlichen Mäuse konnte auch keine Reduktion der trabekulären Knochenmasse in den Tieren mit *Fzd9*-KO-Genotyp in Kombination mit *Lrp5*<sup>WT/WT</sup> festgestellt werden.

### 5.2.8 Histologie des *Fzd9*-KOs in Kombination mit *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup>

Auch die Wirbelkörper der 12 Wochen alten, männlichen *Fzd9*-KO-Mäuse in Kombination mit *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> wurden histologisch untersucht um den skelettalen Phänotyp zu bestätigen und die zu Grunde liegenden, zellulären Faktoren näher zu beleuchten.



**Abbildung 26: Histomorphometrische Untersuchung der *Fzd9*-KO-Mäuse in Kombination mit *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup>.** A: Repräsentative, unentkalkte histologische Schnitte der Wirbelkörper von 12 Wochen alten, männlichen Mäusen mit den aufgeführten Genotypen (Wildtyp, *Fzd9*-KO, *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup>) einzeln oder in Kombination. Von Kossa/van Gieson Färbung, der Maßstabsbalken entspricht 1 mm. B: Quantifizierung von trabekulären Strukturparametern der Wirbelkörper in den oben beschriebenen Mäusen mit den jeweils angegebenen Genotypen. n≥3 Mäuse pro Gruppe. \*p<0,05 gegen nicht-KO Kontrollen. C: Quantifizierung von zellulären Parametern im trabekulären Bereich der Wirbelkörper von 12 Wochen alten, männlichen Mäusen mit den aufgeführten Genotypen. n≥3 Mäuse pro Gruppe. \*p<0,05 gegen nicht-KO Kontrollen.

Wie auch in den  $\mu$ CT-Analysen der distalen Femur-Metaphysen, konnte kein Unterschied des trabekulären Knochenvolumens in den Wirbelkörpern zwischen 12 Wochen alten, männlichen WT- und *Fzd9*-KO-Mäusen festgestellt werden (Abbildung 26B). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der radiologischen Untersuchung, konnte in den histologischen Schnitten jedoch ein Effekt der *Fzd9*-

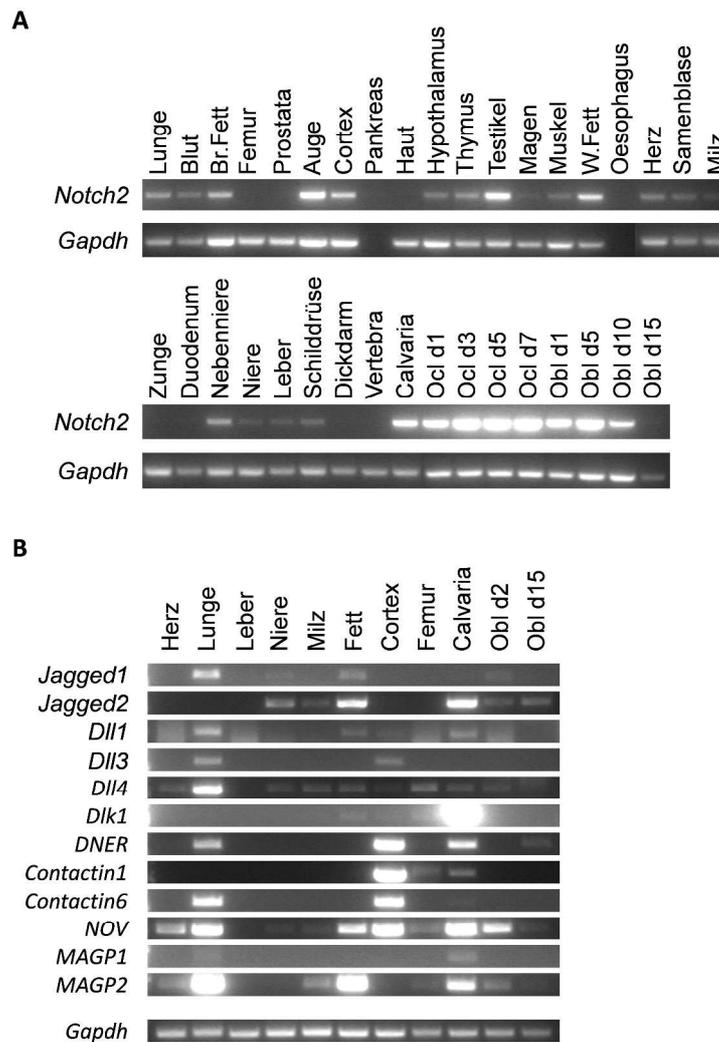
Defizienz in Kombination mit *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> festgestellt werden. Dieser führte zu einer signifikanten Reduktion des Knochenvolumens gegenüber den *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup>-Kontrolltieren mit vollständigem *Fzd9*-Gen. Das resultierende Knochenvolumen lag aber dennoch deutlich über dem der WT-Tiere. Dieses Auswirkungsmuster der Genotypkombinationen konnte auch anhand der trabekulären Dicke nachvollzogen werden. Alle weiteren strukturellen und zellulären Parameter waren nicht signifikant verändert (Abbildung 26C).

### **5.3 Die Bedeutung von Notch2 im Knochenstoffwechsel**

Zur Untersuchung der Bedeutung des Notch-Signalweges, insbesondere des Notch2-Rezeptors wurde zunächst das Expressionsmuster von *Notch2* und Notch-Liganden in diversen Geweben und Zelltypen verglichen, bevor Mausmodelle untersucht wurden, in denen das *Notch2*-Gen spezifisch in Osteoklasten oder Osteoblasten inaktiviert wurde. Zusätzlich wurde ein Mausmodell mit einer mit dem Hajdu-Cheney Syndrom assoziierten Mutation im *Notch2*-Gen generiert, die theoretisch zu einem länger anhaltenden Notch-Signal führen sollte.

#### **5.3.1 Expressionsmuster von *Notch2* und Notch-Liganden**

Das Expressionsmuster von *Notch2* und allen Notch-Liganden wurde in ausgewählten Organen und Zelltypen mit Schwerpunkt auf knochenassoziierte Gewebe mittels RT-PCR analysiert.

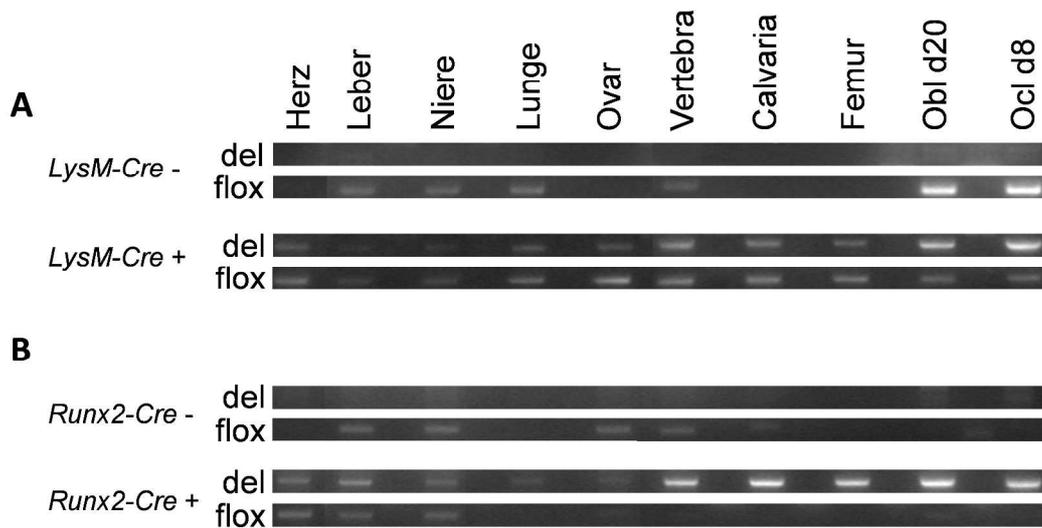


**Abbildung 27: RT-PCR Expressionsanalyse von *Notch2* und Notch-Liganden. A:** RT-PCR Expressionsnachweis von *Notch2* in ausgewählten Wildtyp-Geweben und Zellen *Gapdh* dient als Konzentrationskontrolle. **B:** RT-PCR Expressionsanalyse aller Notch-Liganden in ausgewählten Wildtyp-Geweben und Zellen. *Gapdh* dient als Konzentrationskontrolle.

Die Analyse der *Notch2*-Expression zeigte, dass dieser Notch-Rezeptor in einer Vielzahl von Geweben und Organen exprimiert wird, insbesondere auch im Schädeldach sowie in Osteoklasten und Osteoblasten (Abbildung 27A). Interessanterweise konnte keine Expression im Femur und Wirbelkörper, sowie in Osteoblasten zu einem späten Differenzierungszeitpunkt (Tag 15 der ex vivo Differenzierung) nachgewiesen werden. Im Schädeldach konnte auch die Expression der meisten Notch-Liganden außer *Jagged1* und *Dll3* gezeigt werden. Im Femur wurde *Dll1*, *Dll4*, *Dlk1*, *Contactin1*, *NOV* und *MAGP2* exprimiert, wohingegen in Osteoblasten je nach Differenzierungszeitpunkt *Jagged1*, *Jagged2*, *Dll1*, *Dll4*, *DNER*, *NOV* und *MAGP2* erkennbar war. Als Liganden mit einer relativen Spezifität für Knochen in der hier untersuchten Gewebe- und Zellauswahl konnte *Dlk1*, mit einer starken Expression in der Calvaria, und *Contactin1*, das neben in Femur und Calvaria, lediglich noch im Cortex exprimiert wurde, identifiziert werden (Abbildung 27B).

### 5.3.2 Zellspezifische Inaktivierung von *Notch2*

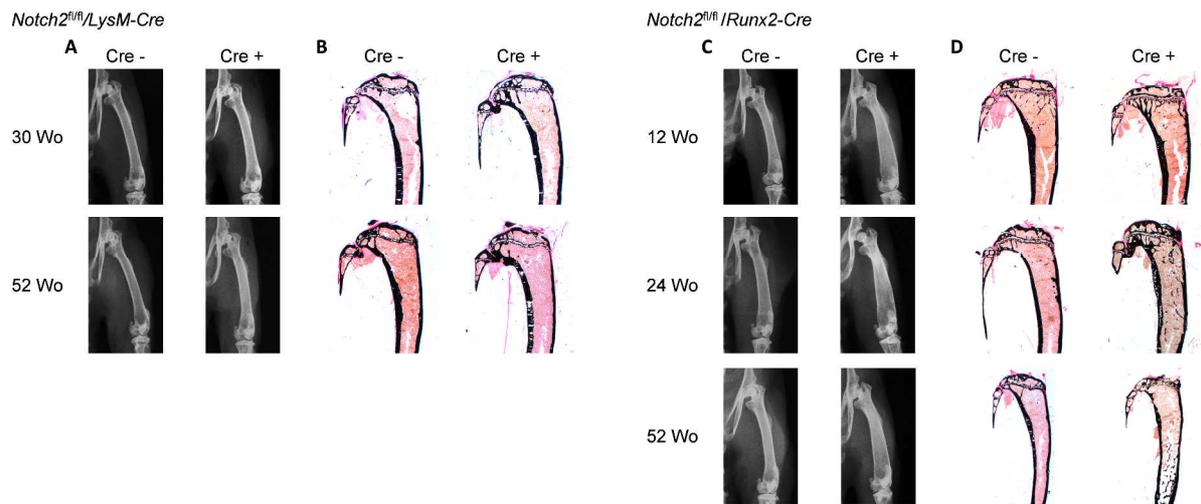
Um eine Zellspezifische Inaktivierung des *Notch2*-Gens zu erreichen, wurden Mäuse, die eine Variante des *Notch2*-Gens trugen, bei dem das dritte Exon von loxP Regionen flankiert war (floxed), mit Mäusen verpaart, die die Cre-Rekombinase transgen entweder unter Kontrolle des *LysM*-Promoters (Osteoklasten-Spezifität) oder des *Runx2*-Promoters (Osteoblasten-Spezifität) exprimierten.



**Abbildung 28: Rekombinationsnachweis des geflochtenen *Notch2*-Exons.** **A:** PCR-basierter Nachweis des geflochtenen (*flox*) oder deletierten (*del*) Bereichs des *Notch2*-Gens in ausgewählten Geweben und Zellen aus *Notch2<sup>fl/fl</sup>*-Mäusen mit (*Cre*+) oder ohne (*Cre*-) Cre-Rekombinase, die unter Kontrolle des *LysM*-Promoters exprimiert wurde. **B:** PCR-basierter Nachweis des geflochtenen (*flox*) oder deletierten (*del*) Bereichs des *Notch2*-Gens in ausgewählten Geweben und Zellen aus *Notch2<sup>fl/fl</sup>*-Mäusen mit (*Cre*+) oder ohne (*Cre*-) Cre-Rekombinase, die unter Kontrolle des *Runx2*-Promoters exprimiert wurde.

Die Analyse des Rekombinationsmusters in ausgewählten Organen und Zelltypen mittels PCR ergab, dass eine Deletion des gewünschten genomischen Bereiches in Wirbelkörpern, Schädeldächern und Femora in Anwesenheit der Cre-Rekombinase in beiden Linien stattgefunden hatte (Abbildung 28). In Abwesenheit der Cre-Rekombinase kam es in keinem Fall zu einer unerwünschten Deletion. Interessanterweise kam es sowohl bei der unter *LysM*-Kontrolle, als auch bei der unter *Runx2*-Kontrolle exprimierten Cre-Rekombinase zu einer Rekombination des *Notch2*-Gens *ex vivo* aus Knochenmark differenzierten Osteoblasten und Osteoklasten. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das gewählte System nicht absolut spezifisch arbeitete, da in einer Reihe von nicht Knochen-assoziierten Organen und Geweben auch schwache Deletions-Signale erkennbar waren.

Vor der tiefgehenden Analyse der generierten Mausmodelle wurden diese zunächst mittels Kontaktradiographie auf morphologische Auffälligkeiten hin untersucht. Im Rahmen dieser initialen Betrachtung wurden auch histologische Schnitte der Tibiae angefertigt.

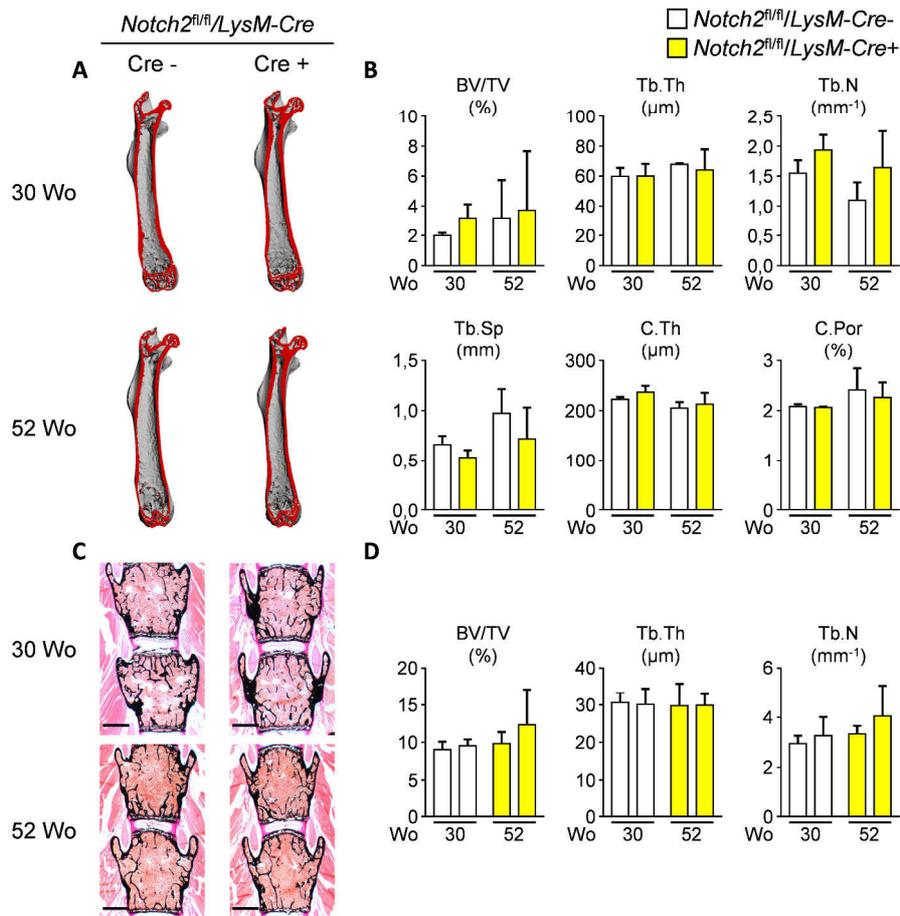


**Abbildung 29: Morphologische Übersicht über Femora und Tibiae der *Notch2<sup>fl/fl</sup>* Mäuse in Kombination mit unterschiedlichen Cre-Rekombinase-Konstrukten.** **A:** Repräsentative Röntgenbilder von Femora aus 30 und 52 Wochen alten weiblichen *Notch2<sup>fl/fl</sup>* Mäusen mit (Cre+) oder ohne (Cre-) Cre-Rekombinase, die unter Kontrolle des *LysM*-Promoters exprimiert wurde. **B:** Repräsentative unentkalkte histologische Schnitte von Femora aus 30 und 52 Wochen alten weiblichen *Notch2<sup>fl/fl</sup>* Mäusen mit (Cre+) oder ohne (Cre-) Cre-Rekombinase, die unter Kontrolle des *LysM*-Promoters exprimiert wurde. Von Kossa/Van Gieson Färbung. **C:** Repräsentative Röntgenbilder von Femora aus 12, 24 und 52 Wochen alten weiblichen *Notch2<sup>fl/fl</sup>* Mäusen mit (Cre+) oder ohne (Cre-) Cre-Rekombinase, die unter Kontrolle des *Runx2*-Promoters exprimiert wurde. **D:** Repräsentative unentkalkte histologische Schnitte von Femora aus 12, 24 und 52 Wochen alten weiblichen *Notch2<sup>fl/fl</sup>* Mäusen mit (Cre+) oder ohne (Cre-) Cre-Rekombinase, die unter Kontrolle des *Runx2*-Promoters exprimiert wurde. Von Kossa/Van Gieson Färbung.

Die radiologische Untersuchung der Femora und Histologie der Tibiae der 30 und 52 Wochen alten *Notch2<sup>fl/fl</sup>/LysM-Cre+* Tiere zeigte keine auffälligen Veränderungen gegenüber den Geschwistertieren ohne Cre-Rekombinase (Abbildung 29A&B). Bei den *Notch2<sup>fl/fl</sup>/Runx2-Cre+* Tieren war hingegen in allen untersuchten Altersgruppen (12, 24 und 52 Wochen) eine Veränderung des Femurs in der Kontaktradiographie zu beobachten. Hier kam es vor allem in der Diaphyse und in der distalen Metaphyse zu einer Aufweitung des Schaftes (Abbildung 29C). Auch in den histologischen Schnitten der Tibiae der 24 und 52 Wochen alten *Notch2<sup>fl/fl</sup>/Runx2-Cre+* Mäuse waren auffällige Veränderungen der Trabekelverteilung und Anzahl zu erkennen (Abbildung 29D).

### 5.3.2.1 Osteoklasten-spezifische *Notch2*-Inaktivierung

Um die initialen Beobachtungen zu bestätigen und zu erhärten, wurde die Knochenarchitektur der Femora und Wirbelkörper der *Notch2<sup>fl/fl</sup>/LysM-Cre+* Mäuse im Vergleich zu Geschwistertieren ohne Cre-Rekombinase mittels  $\mu$ CT und Histomorphometrie analysiert.

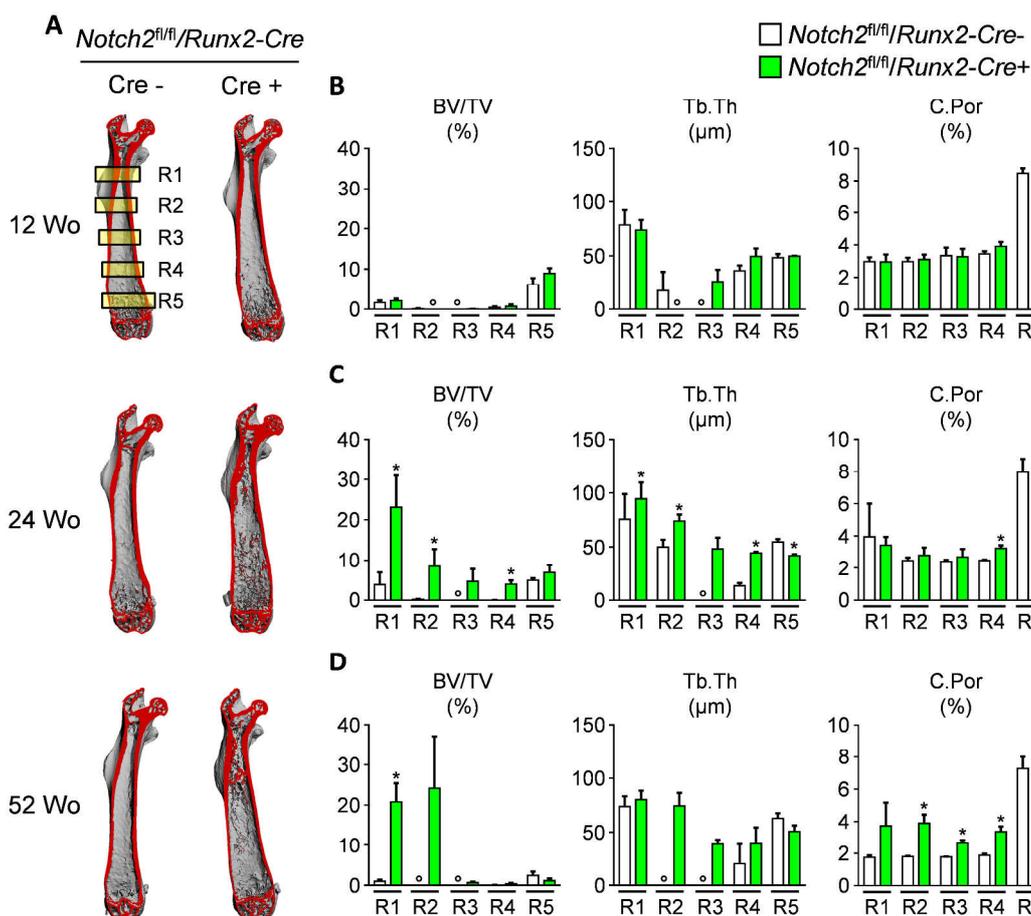


**Abbildung 30: Strukturelle histomorphometrische Untersuchung der *Notch2<sup>fl/fl</sup>/LysM-Cre* Mäuse.** **A:** Repräsentative  $\mu$ CT-Aufnahmen der Femora von 30 und 52 Wochen alten, weiblichen *Notch2<sup>fl/fl</sup>* Mäusen mit oder ohne Cre-Rekombinase unter Kontrolle des *LysM*-Promoters. Die virtuellen Schnittkanten sind rot eingefärbt. **B:**  $\mu$ CT-basierte Quantifizierung von Strukturparametern des Femurs in den oben beschriebenen Mäusen mit den jeweils angegebenen Genotypen.  $n \geq 3$  Mäuse pro Gruppe. \* $p < 0,05$  gegen Kontrollen ohne Cre-Rekombinase. **C:** Repräsentative, unentkalkte histologische Schnitte der Wirbelkörper von 30 und 52 Wochen alten, weiblichen *Notch2<sup>fl/fl</sup>* Mäusen mit oder ohne Cre-Rekombinase unter Kontrolle des *LysM*-Promoters. Von Kossa/van Gieson Färbung, der Maßstabsbalken entspricht 1 mm. **D:** Quantifizierung von trabekulären Strukturparametern der Wirbelkörper in weiblichen Mäusen mit den jeweils angegebenen Genotypen und Altern.  $n \geq 3$  Mäuse pro Gruppe. \* $p < 0,05$  gegen Kontrollen ohne Cre-Rekombinase.

Die  $\mu$ CT-Analyse der Femora als wie auch die histomorphometrische Untersuchung der Wirbelkörper von 30 und 52 Wochen alten, weiblichen *Notch2<sup>fl/fl</sup>* mit und ohne Cre-Rekombinase unter Kontrolle des *LysM*-Promoters zeigte, dass keine signifikanten Unterschiede der trabekulären Knochenarchitektur zwischen den Gruppen vorhanden waren (Abbildung 30).

### 5.3.2.2 Osteoblasten-spezifische *Notch2* Inaktivierung

Da die Initiale Übersicht über die Röhrenknochen, insbesondere den Tibiae der *Notch2<sup>fl/fl</sup>/Runx2-Cre+* Tiere, gezeigt hatte, dass ein möglicher Phänotyp nicht nur aus eine höhere trabekuläre Knochenmasse, sondern auch aus eine veränderte Verteilung der Trabekel innerhalb des Knochenschaftes bestehen könnte, wurden die Femora der Mäuse mittels  $\mu$ CT in fünf Regionen untersucht, die gleichmäßig entlang des Mittelschaftes verteilt waren.

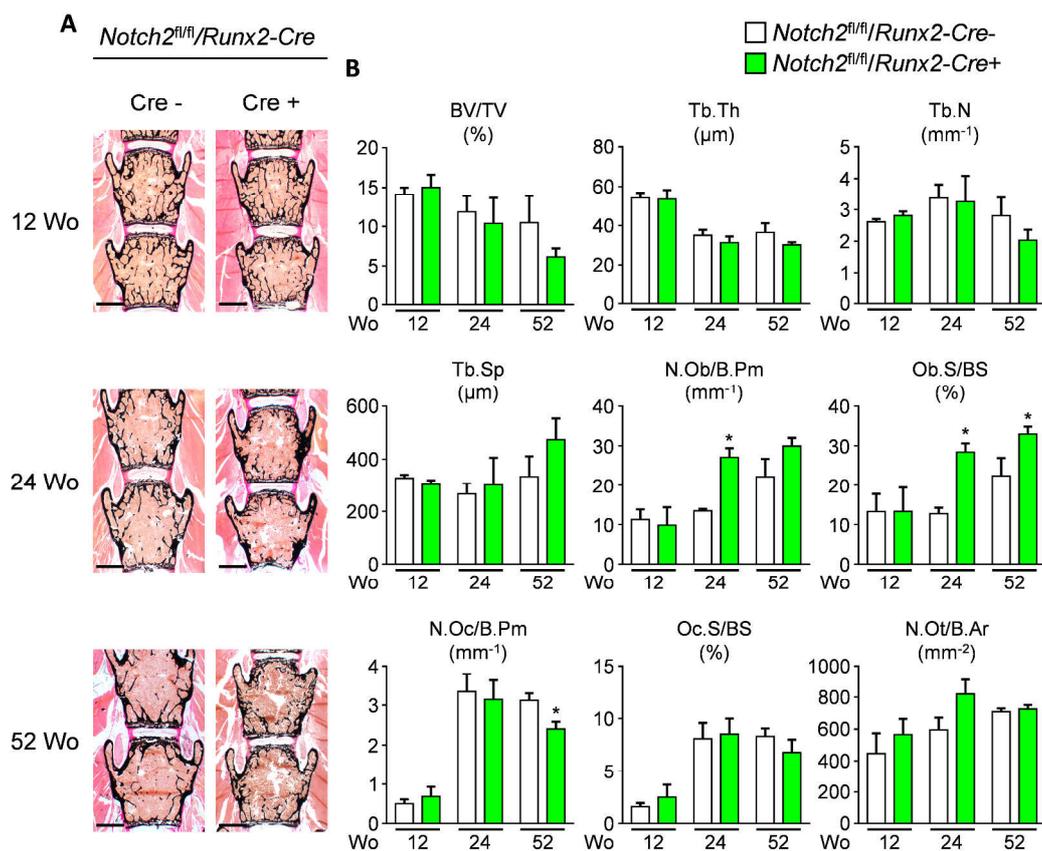


**Abbildung 31:  $\mu$ CT-Analyse der *Notch2<sup>fl/fl</sup>/Runx2-Cre* Mäuse. A:** Repräsentative  $\mu$ CT-Aufnahmen der Femora von 12, 24 und 52 Wochen alten, weiblichen *Notch2<sup>fl/fl</sup>* Mäusen mit oder ohne Cre-Rekombinase unter Kontrolle des *Runx2*-Promoters. Die virtuellen Schnittkanten sind rot eingefärbt. Die semitransparenten Kästen im 12Wo, Cre- Femur zeigen annäherungsweise die einzeln untersuchten Femur-Abschnitte (R1-R5). **B:** Quantifizierung von Strukturparametern der Femora-Abschnitte R1-R5 in 12 Wochen alten, weiblichen *Notch2<sup>fl/fl</sup>* Mäusen mit oder ohne Cre-Rekombinase unter Kontrolle des *Runx2*-Promoters.  $n \geq 3$  Mäuse pro Gruppe. \* $p < 0,05$  gegen Kontrollen ohne Cre-Rekombinase.  $\circ$  = nicht nachweisbar. **C:** Quantifizierung von Strukturparametern der Femora-Abschnitte R1-R5 in 24 Wochen alten, weiblichen Mäusen mit den angegebenen Genotypen.  $n \geq 3$  Mäuse pro Gruppe. \* $p < 0,05$  gegen Kontrollen ohne Cre-Rekombinase.  $\circ$  = nicht nachweisbar. **D:** Quantifizierung von Strukturparametern der Femora-Abschnitte R1-R5 in 52 Wochen alten, weiblichen Mäusen mit den angegebenen Genotypen.  $n \geq 3$  Mäuse pro Gruppe. \* $p < 0,05$  gegen Kontrollen ohne Cre-Rekombinase.  $\circ$  = nicht nachweisbar.

Die abschnittsweise  $\mu$ CT-Analyse der Femora von weiblichen *Notch2<sup>fl/fl</sup>* Mäusen mit und ohne Cre-Rekombinase unter Kontrolle des *Runx2*-Promoters ergab, dass im Alter von 12 Wochen noch keine Unterschiede in der Knochenarchitektur vorhanden waren (Abbildung 31B). Im Alter von 24 Wochen zeigte sich jedoch bereits eindeutig ein Phänotyp (Abbildung 31A&C). Generell war der Schaft des Femurs der *Notch2<sup>fl/fl</sup>/Cre+* Mäuse, im Gegensatz zu den Cre-negativen, mit Trabekeln durchzogen, wie am Verhältnis des Knochenvolumens zum Gewebevolumen erkennbar ist. Außer in der distalsten untersuchten Region, waren die Trabekel der *Notch2<sup>fl/fl</sup>/Cre+* Tiere auch deutlich dicker. Im Alter von 52 Wochen war der trabekuläre Knochen im mittleren und distalen Bereich der Femurschaftes zwar größtenteils resorbiert, dennoch war der proximale Bereich nach wie vor und konträr zu den Cre-negativen Kontrollen mit Trabekeln durchzogen (Abbildung 31A&D). In diesem Alter waren auch

deutliche Unterschiede in der kortikalen Porosität erkennbar, die in den Regionen 2 bis 4 der *Notch2<sup>fl/fl</sup>/Cre+* Mäuse signifikant ausgeprägter war als bei den *Cre*-negativen Tieren.

Im Zuge dieser Ergebnisse wurden die Wirbelkörper dieser Tiere histologisch untersucht, um einerseits den Phänotyp in diesem Bereich des Skeletts zu charakterisieren und andererseits über die zelluläre Histomorphometrie möglicherweise einen Anhaltspunkt für eine mögliche Erklärung zu finden.

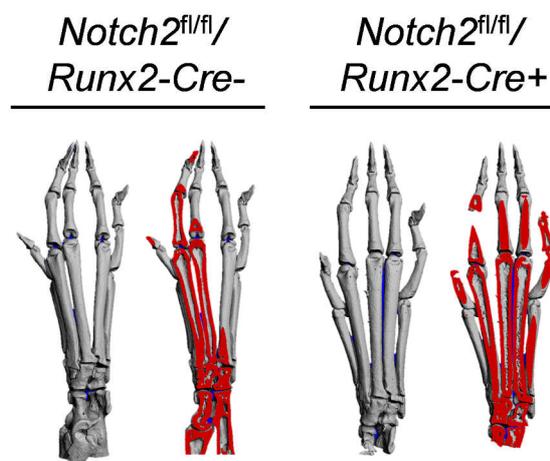


**Abbildung 32: Histomorphometrische Untersuchung der *Notch2<sup>fl/fl</sup>/Runx2-Cre* Mäuse.** A: Repräsentative, unentkalkte histologische Schnitte der Wirbelkörper von 12, 24 und 52 Wochen alten, weiblichen *Notch2<sup>fl/fl</sup>* Mäusen mit oder ohne Cre-Rekombinase unter Kontrolle des *Runx2*-Promoters. Von Kossa/van Gieson Färbung, der Maßstabsbalken entspricht 1 mm. B: Quantifizierung von strukturellen und zellulären histomorphometrischen Parametern im trabekulären Bereich der Wirbelkörper von weiblichen Mäusen mit den angegebenen Alters und Genotypen. n≥3 Mäuse pro Gruppe. \*p<0,05 gegen Kontrollen ohne Cre-Rekombinase.

Ein möglicher struktureller Phänotyp in den Wirbelkörpern der *Notch2<sup>fl/fl</sup>/Runx2-Cre+* Mäuse konnte in den histologischen Schnitten mit den hier untersuchten Parametern (BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp) nicht erfasst werden (Abbildung 32). Jedoch konnten mittels zellulärer Histomorphometrie Hinweise auf eine mögliche Erklärung des, in anderen Skelettbereichen beobachteten, Phänotyps gefunden werden. Im trabekulären Bereich der Wirbelkörper aus 24 Wochen alten *Notch2<sup>fl/fl</sup>/Runx2-Cre+* Mäusen konnte eine signifikant erhöhte Osteoblasten-Anzahl und eine größere von Osteoblasten bedeckte Knochenoberfläche gemessen werden, als dies bei den Wurfgeschwistern ohne Cre-

Rekombinase der Fall war. In 52 Wochen alten *Notch2<sup>fl/fl</sup>/Runx2-Cre+* Tieren war die von Osteoblasten bedeckte Knochenoberfläche nach wie vor vergrößert, jedoch war eine Erhöhung der Osteoblastenzahl nur noch als Tendenz erkennbar. In dieser Altersgruppe kam jedoch eine Veränderung der Osteoklasten-Anzahl hinzu, die in den *Notch2<sup>fl/fl</sup>/Runx2-Cre+* Mäuse signifikant verringert war (Abbildung 32B).

Auf Grund der Erkenntnis, dass das Hajdu-Cheney Syndrom, das sich unter anderem durch Acro-Osteolysen der distalen Phalangen auszeichnet, durch Mutationen im *Notch2*-Gen hervorgerufen wird, wurde dieser Skelettbereich auch in den 24 Wochen alten, weiblichen Mäusen mit einer Osteoblasten-spezifischen *Notch2*-Inaktivierung untersucht.



**Abbildung 33:** Die Hinterpfoten der *Notch2<sup>fl/fl</sup>/Runx2-Cre* Mäuse. Repräsentative  $\mu$ CT-Aufnahmen der Hinterpfoten von 24 Wochen alten, weiblichen *Notch2<sup>fl/fl</sup>* Mäusen mit oder ohne Cre-Rekombinase unter Kontrolle des *Runx2*-Promoters im geschlossenen oder virtuell eröffneten Zustand. Die virtuellen Schnittkanten sind rot eingefärbt.

Die  $\mu$ CT-Analyse der Hinterpfoten zeigte keine Veränderung der Morphologie der Phalangen in den *Notch2<sup>fl/fl</sup>/Runx2-Cre+* Tieren im Vergleich zu Geschwistertieren ohne Cre-Rekombinase. Im Inneren der Metatarsalia und Phalangen konnten in den Cre-positiven Tieren jedoch trabekuläre Strukturen beobachtet werden, die in den Kontrolltieren nicht vorhanden waren (Abbildung 33). Aufgrund der sowohl kompakten, als auch komplexen Knochenanordnung in den Gliedmaßenanspitzen war eine Quantifizierung dieser qualitativen Beobachtung mittels automatisierter Algorithmen nicht möglich.

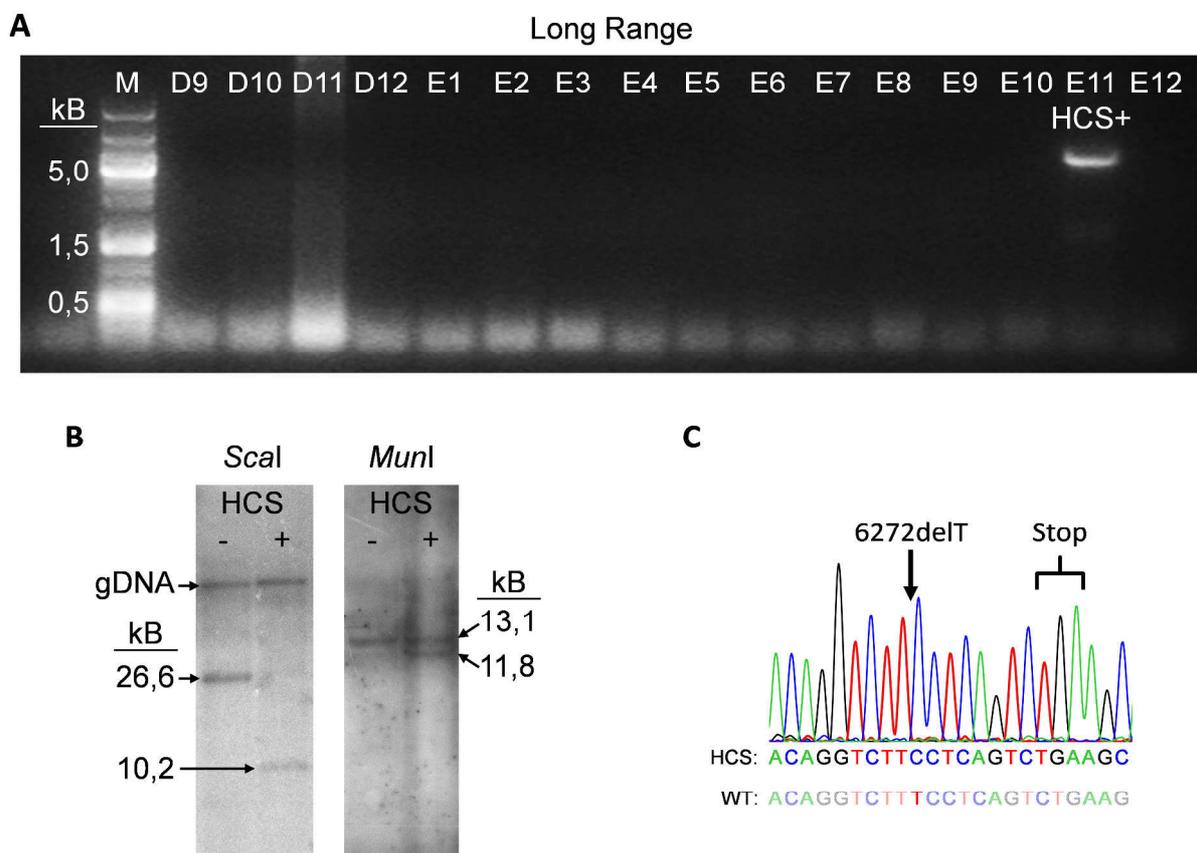
### 5.3.3 Das Hajdu-Cheney Mausmodell

Das Hajdu-Cheney Syndrom, eine seltene Osteodysplasie, die sich unter anderem durch Osteoporose und Acro-Osteolysen auszeichnet, konnte mit Mutationen im *NOTCH2*-Gen assoziiert werden. Um die involvierten Mechanismen und die Bedeutung von *Notch2* im Kontext des Knochenstoffwechsels untersuchen zu können, sollte ein Mausmodell generiert werden, das eine der HCS-verursachenden Mutationen trägt. Diese Mutation, 6272delT, führt zu einem verkürzten *Notch2*-Genprodukt auf

Grund eines vorzeitigen Stop-Codons, das theoretisch eine verlängert Halbwertszeit nach Aktivierung haben sollte.

### 5.3.3.1 Generierung des Hajdu-Cheney Mausmodells

Das HCS-Mausmodell sollte durch den Knock-In eines DNA-Konstruktes in murine, embryonale Stammzellen generiert werden. Dieses Konstrukt mit der 6272delT *Notch2*-Mutation konnte potentiell über homologe Rekombination in das Genom der Zelle integriert werden und eines der vorhandenen *Notch2*-Allele ersetzen. Zur Erzeugung des Mausmodells mussten diese erfolgreich rekombinierten Klone mittels Long-Range PCR und Southernblot identifiziert werden. Nachdem die ersten Mäuse verfügbar waren, wurde die Präsenz der Mutation überprüft und durch den Vergleich verschiedener, unabhängiger Klone sichergestellt, dass der Phänotyp auf das Konstrukt und nicht auf etwaige andere Veränderungen im Genom zurückzuführen ist.



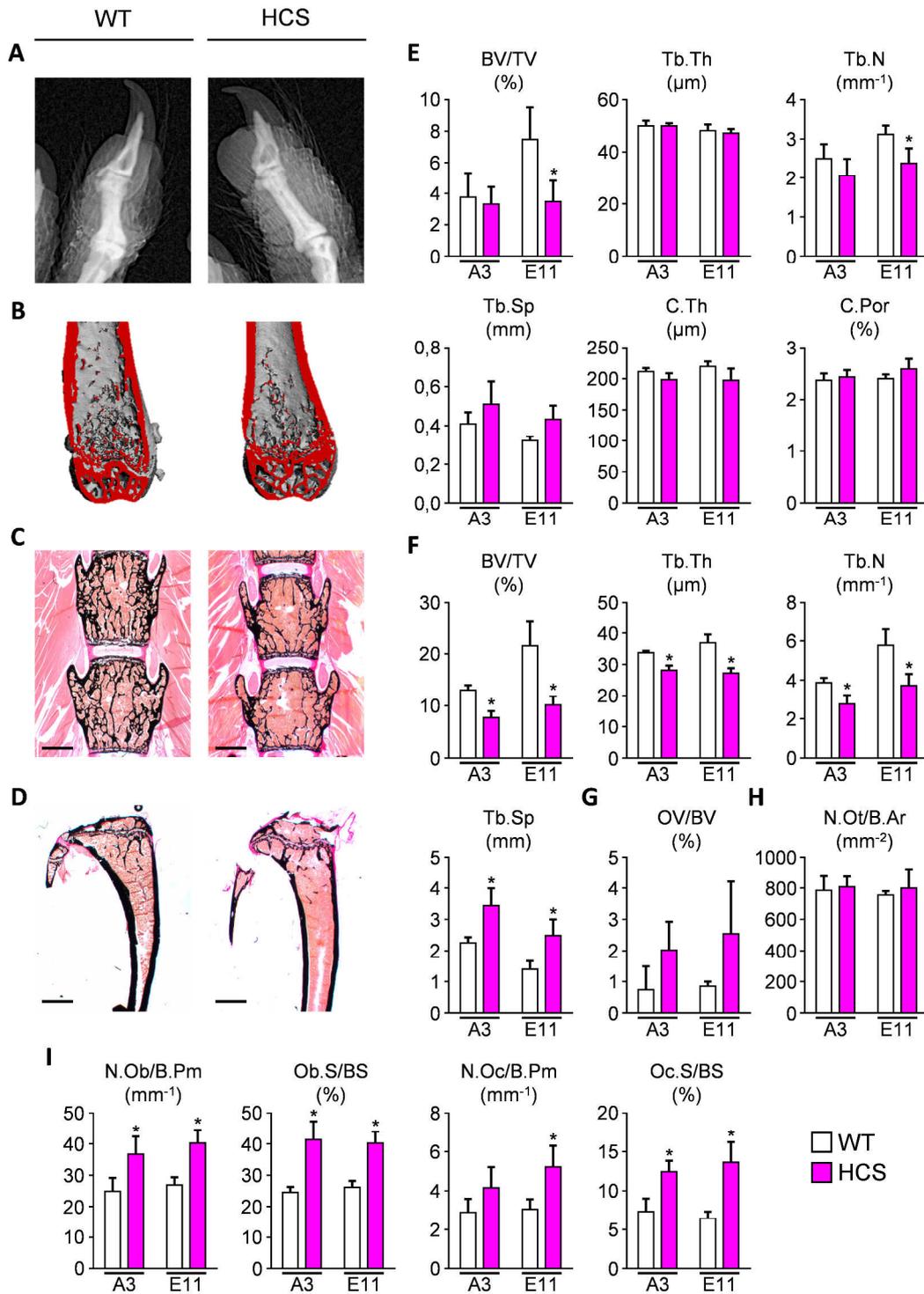
**Abbildung 34: Identifizierung und initiale Charakterisierung der Klone mit der Hajdu-Cheney Syndrom Variante des *Notch2*-Gens.** **A:** Beispielhaftes Gelbild eines mittels Long-Range PCR identifizierten Klons. HCS+: Positives PCR-Signal aus embryonalen Stammzellen für das korrekt integrierte Hajdu-Cheney-Konstrukt. M: DNA-Größenmarker. **B:** Southernblots zur Überprüfung der Integration des HCS-Konstruktes in das Genom der embryonalen Stammzellen. Die veränderte Größe der Signale in positiven Klone nach *Scal* und *MunI* Verdau entspricht der korrekten Integration im respektive 5'- und 3'-Bereich des Gens. **C:** Sequenzierung zum Nachweis der HCS-Mutation in der DNA aus der Schwanzspitze einer positiv genotypisierten Maus. Zum Vergleich wurde auch die WT-Sequenz aufgeführt.

Mittels Long-Range PCR konnten aus 384 Klone fünf identifiziert werden, bei denen eine Integration des *Notch2*-HCS-Konstruktes stattgefunden hatte (Abbildung 34A). Diese wurden zusätzlich mittels

Southernblot verifiziert, bevor zwei Klone (A3 und E11) zur Generierung des Mausmodells mittels Blastozysteninjektion ausgewählt wurden (Abbildung 34B). Nachdem Nachkommen der chimären Mäuse identifiziert wurden, die das mutierte *Notch2*-Gen trugen, wurden diese mit Flip-Deleter Mäusen verpaart, die mit Hilfe der Flip-Rekombinase die von FRT-Regionen flankierte Selektionskassette des *Notch2*-HCS-Konstruktes entfernen konnten. Nach dem Auskreuzen der Flip-Rekombinase wurde das *Notch2*-Gen von einer Stichprobe der positiv genotypisierten Mäuse sequenziert. Hier konnte sowohl die erwartete 6272delT Mutation als auch das daraus resultierende, vorzeitige Stop-Codon (TGA) nachgewiesen werden (Abbildung 34C).

### **5.3.3.2 Skelettanalyse des Hajdu-Cheney Mausmodells**

Der skelettale Phänotyp des Hajdu-Cheney Mausmodells wurde radiologisch, mittels Kontaktradiographie und  $\mu$ CT, sowie histologisch, mittels unentkalkter Knochenhistologie und anschließenden histomorphometrischen Messungen, im Detail analysiert. Hierzu wurden sowohl von Klon A3 als auch von Klon E11 abstammende, 24 Wochen alte, weibliche Tiere untersucht.



**Abbildung 35: Analyse des skelettalen Phänotyps des Hajdu-Cheney Mausmodells.** **A:** Repräsentative Kontakttradiographien der distalen Phalangen von den Vorderpfoten der WT- und heterozygoten *Notch2*-HCS Tiere (HCS), Klon E11. **B:** Repräsentative  $\mu$ CT-Aufnahmen der distalen Femora von 24 Wochen alten, weiblichen WT- und HCS-Tieren, Klon E11. Die virtuellen Schnittkanten sind rot eingefärbt. **C:** Repräsentative, unentkalkte histologische Schnitte der Wirbelkörper der oben beschriebenen Tiere (Klon E11). Von Kossa/van Gieson Färbung, der Maßstabsbalken entspricht 1 mm. **D:** Repräsentative, unentkalkte histologische Schnitte der Tibiae der oben beschriebenen Tiere (Klon E11). Von Kossa/van Gieson Färbung, der Maßstabsbalken entspricht 1 mm. **E:**  $\mu$ CT-basierte Quantifizierung von Strukturparametern des Femurs in WT- und HCS-Mäusen der Klone A3 und E11.  $n \geq 3$  Mäuse pro Gruppe. \* $p < 0,05$  gegen WT des jeweiligen Klons. **F:** Quantifizierung von strukturellen histomorphometrischen Parametern im trabekulären Bereich der Wirbelkörper der 24 Wochen alten, weiblichen WT- und HCS-Tiere (Klone A3 und E11).  $n \geq 3$  Mäuse pro Gruppe. \* $p < 0,05$  gegen WT des jeweiligen Klons. **G:** Quantifizierung des Osteoidanteils am Knochen in der oben beschriebenen Region.  $n \geq 3$  Mäuse pro Gruppe. \* $p < 0,05$  gegen WT des jeweiligen Klons. **H:** Quantifizierung der Osteozytenanzahl in der beschriebenen Region der

angegebenen Genotypen.  $n \geq 3$  Mäuse pro Gruppe.  $*p < 0,05$  gegen WT des jeweiligen Klons. I: Quantifizierung von mit Osteoblasten und Osteoklasten im Zusammenhang stehenden, zellulären histomorphometrischen Parametern in der trabekulären Region der Wirbelkörper.  $n \geq 3$  Mäuse pro Gruppe.  $*p < 0,05$  gegen WT des jeweiligen Klons.

Die Kontaktradiographien der Gliedmaßenenden zeigten keine radiologisch auffälligen Veränderungen der Phalangen und keine Hinweise auf Acro-Osteolysen (Abbildung 35A). Per  $\mu$ CT konnte in den Femora der von Klon E11 abstammenden Mäuse, die heterozygot die HCS-Variante des *Notch2*-Allels trugen, im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistertieren, ein reduziertes trabekuläres Knochenvolumen ermittelt werden. Dieses war auf eine Reduktion der Trabekelanzahl, aber nicht auf eine Veränderung der Trabekeldicke zurückzuführen (Abbildung 35B & E). Im Rahmen dieser Messungen konnte auch gezeigt werden, dass die kortikale Dicke und Porosität nicht durch das HCS-Allel verändert wurden. Die aus dem Klon A3 hervorgegangenen Tiere zeigten generell eine geringere Knochenmasse und Veränderungen des Knochenvolumens und der Trabekelanzahl waren nur als schwacher Trend zu erkennen. Histologisch zeigten jedoch die aus beiden Klonen hervorgegangenen Tiere einen ähnlichen Phänotyp, der den Befund der  $\mu$ CT-Analysen der von Klon E11 abstammenden Tiere weitestgehend bestätigte (Abbildung 35C & D). Die verringerte trabekuläre Knochenmasse in den Wirbelkörpern der HCS-Tiere wurde nicht nur durch eine kleinere Trabekelanzahl, sondern auch durch signifikant schmalere Trabekel bedingt (Abbildung 35F). Der Osteoidanteil der Knochenmatrix war im Hajdu-Cheney Mausmodell nicht signifikant erhöht und auch die Osteozytenanzahl blieb im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistertieren unverändert (Abbildung 35G & H). Deutliche Veränderungen konnten in der Anzahl und Ausbreitung der Osteoblasten und Osteoklasten gemessen werden, die in den Tieren mit dem *Notch2*-HCS Allel signifikant erhöht waren (Abbildung 35I). Zusammenfassend ergibt sich aus den hier ermittelten Daten in den HCS-Tieren ein Zustand mit erhöhtem Knochenumsatz, es konnten jedoch keine offensichtlichen Osteozyten-Defekte beobachtet werden.

## 6 Diskussion

Die Osteoporose ist eine der weltweit vorherrschenden Erkrankungen mit enormen sozialökonomischen Auswirkungen<sup>[212]</sup>. Da bisher noch keine adäquaten Therapien etabliert werden konnten, wurde in dieser Arbeit der Einfluss zweier Signalwege auf den Knochenstoffwechsel untersucht, um Anhaltspunkte für dringend benötigte, kosteneffiziente osteoanabole Therapieoptionen zur Behandlung der Osteoporose zu finden: Zum einen der Wnt-Signalweg, dessen Wirkung auf die Knochenhomöostase gut etabliert ist, aber dessen genaue regulatorischen Mechanismen und Interaktionen nach wie vor nicht endgültig geklärt sind, und zum anderen der Notch-Signalweg, dessen Bedeutung im Kontext des Knochens noch weitestgehend unerforscht ist. Im Zuge dieser Untersuchungen sollte auch abgeklärt werden, ob die Differenzierung von Osteozyten durch Notch-Signale reguliert wird, da dieser Zelltyp als zentraler Regulator des Knochenstoffwechsels gilt und unter anderem in der Lage sein soll, Wnt-Signale zu modulieren.

Genauer gesagt wurde die Interaktion der Komponenten des Wnt-Rezeptorkomplexes Sclerostin, Kremen2, Frizzled9 und Lrp5 *in vivo* näher untersucht. Bei Sclerostin handelt es sich um einen putativen Wnt-Inhibitor und bei Kremen2 um einen Co-Rezeptor für Wnt-Inhibitoren der Dickkopf-Familie<sup>[116,119,120]</sup>. Für beide gibt es Hinweise, dass sie in der Lage sind mit Lrp5, einem Wnt-Co-Rezeptor, zu interagieren<sup>[119,120,267,268]</sup>. Frizzled9 ist wiederum ein Wnt-Rezeptor, von dem gezeigt werden konnte, dass er prinzipiell im Knochenstoffwechsel involviert ist, wobei die Größe seiner Rolle noch nicht endgültig geklärt ist<sup>[149]</sup>.

Zur Analyse der Interaktion dieser Komponenten wurde zunächst ein Mausmodell charakterisiert, in dem das für Sclerostin kodierende Gen *Sost* spezifisch in Osteoblasten überexprimiert werden sollte. Dieses Mausmodell und zwei weitere, mit Osteoblasten-spezifischer Kremen2-Überexpression<sup>[118]</sup> oder systemischer *Fzd9*-Defizienz<sup>[149]</sup>, wurden im nächsten Schritt mit zwei Linien verpaart, die unterschiedliche Varianten des *Lrp5*-Gens trugen, die beide eine erhöhte Knochenmasse zur Folge haben<sup>[155]</sup>, um Rückschlüsse auf die Interaktion dieser Komponenten des Wnt-Rezeptorkomplexes anhand des resultierenden Knochenphänotyps ziehen zu können.

Die Bedeutung von Notch2 im Kontext des Knochenstoffwechsels wurde mit Hilfe von drei Mausmodellen untersucht. So wurde das *Notch2*-Gen mittels Zelltyp-spezifisch exprimierter Cre-Rekombinasen entweder in Osteoklasten oder in Osteoblasten inaktiviert. Das dritte Mausmodell stand in direkter Verbindung zu der Entdeckung, die das *Notch2*-Gen in den Fokus der Knochenforschung gerückt hatte. Eine der kürzlich beschriebenen, mit dem Hajdu-Cheney-Syndrom assoziierten, Mutationen<sup>[45-47]</sup> wurde mittels homologer Rekombination in das *Notch2*-Gen eingebracht, die in einem länger anhaltendem Notch-Signal resultieren sollte<sup>[45,195]</sup>. Durch Analyse

des skelettalen Phänotyps dieser Mäuse, sollten zum einen ein Einblick in die Funktion von Notch2 und zum anderen ein Hinweis auf die beteiligten Zelltypen ermöglicht werden.

### 6.1 Charakterisierung der *Col1a1-Sost*-Mäuse

Die Untersuchung der *Col1a1-Sost*-Mäuse zeigte, dass das trabekuläre Knochenvolumen in den Wirbelkörpern in allen analysierten Altersgruppen (6,24 und 52 Wochen) signifikant reduziert war. Diese Reduktion der Knochenmasse war auf eine verminderte Knochenformationsrate zurückzuführen, da die relative Anzahl der für die Knochengeweberemodellierung verantwortlichen Zellen, den Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten, nicht verändert war. Diese Schlussfolgerung wird durch die Daten der Serumanalyse unterstützt. Bei den gemessenen Markern war lediglich PICP, das bei der Knochenformation freigesetzt wird, signifikant reduziert.

Interessanterweise konnten mittels  $\mu$ CT-Analyse des Femurs zwar die Veränderungen der trabekulären Architektur nachvollzogen werden, jedoch war die Reduktion des Knochenvolumens nur als Trend erkennbar. Dieses Ergebnis zeigt eine der Schwächen der Analyse der Röhrenknochen auf, da auf Grund der hohen Variabilität, die Reduktion eines bereits eher geringen Knochenvolumens, unter bestimmten Umständen, nicht messbar nachvollzogen werden kann.

Dass die beobachteten Effekte tatsächlich auf die Expression von *Sost* zurückzuführen sind und nicht durch die Inaktivierung eines anderen Gens, die durch die zufällige Integration des *Col1a1-Sost*-Konstruktes in das Genom verursacht worden sein könnten, zeigte der Vergleich verschiedener Gründertiere, die ähnliche Phänotypen aufwiesen. Die Funktionalität des Konstruktes konnte mittels Expressionsanalysen belegt werden. Zunächst konnte gezeigt werden, dass *Sost* in den transgenen Tieren im Knochen deutlich stärker exprimiert wurde als in Kontrolltieren. Die Spezifität dieser Expression war nicht vollständig auf den Knochen beschränkt, da signifikant erhöhte Expressionswerte in diversen anderen Organen gemessen werden konnten, auch wenn das hier verwendete 2,3 kB *Col1a1*-Promoter-Fragment für die Eigenschaft bekannt ist, Gentranskription postnatal in differenzierten Osteoblasten zu aktivieren<sup>[253,254]</sup>. Dennoch waren diese Unterschiede, verglichen mit dem Expressionsanstieg im Knochen, als sehr gering zu betrachten. Auch *in vitro* war eine enorm erhöhte, relative Expression von *Sost* in transgenen Osteoblasten im Vergleich zu Wildtyp-Osteoblasten zu beobachten.

In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis konnte auch eine erhöhte Sclerostin-Konzentration in von Osteoblasten konditioniertem Medium gemessen werden. Im Gegensatz dazu, konnte keine Veränderung der Sclerostin-Konzentration im Serum beobachtet werden. Dieses zunächst kontraintuitive Ergebnis ist bei näherer Betrachtung dadurch zu erklären, dass die Tiere, trotz einer deutlich erhöhten Expression im Knochen, ebenso über viel weniger Knochenmasse verfügten. Dies

bedeutet wiederum, dass viel weniger Osteoblasten vorhanden waren, die Sclerostin produzieren können. Das trotzdem so eine eindeutige Wirkung zu beobachten war, ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass für Sclerostin eine lokale Wirkung angenommen wird<sup>[57]</sup>. Somit könnten diese Ergebnisse dadurch erklärt werden, dass zwar die systemische Serum-Konzentration von Sclerostin auf Grund der verringerten absoluten Osteoblastenzahl nicht erhöht war, jedoch die lokale Konzentration im unmittelbaren Umfeld der Osteoblasten gesteigert war, auf die dieser Inhibitor eine Wirkung haben sollte.

Insbesondere mit Hinblick auf die verringerte Knochenmasse entspricht der beobachtete Phänotyp weitestgehend dem erwarteten. Da bereits früh gezeigt werden konnte, dass Sclerostin primär von reifen Osteoblasten und Osteozyten produziert wird<sup>[57]</sup>, war durch die transgene Überexpression von *Sost* unter der Kontrolle des 2,3 kB *Col1a1*-Promoter-Fragmentes, trotz der, im Vergleich zu physiologischen Bedingungen früher und deutlich stärker einsetzenden Expression, keine generelle Veränderung der Wirkweise anzunehmen. Der in dieser Arbeit gezeigte Phänotyp der *Col1a1-Sost*-Mäuse deckt sich in einigen Schlüsselaspekten mit dem Phänotyp eines transgenen *Sost*-Mausmodells, das bereits 2003 untersucht wurde<sup>[57]</sup>. Dieses Modell unterscheidet sich von dem hier verwendete durch die Wahl des Promoters zur Osteoblasten-spezifischen Expression (*Osteocalcin-Gen2-OG2*) und der Tatsache, dass nicht das murine sondern das humane SOST-Gen in das Konstrukt eingebaut wurde. Aber auch in dem von Winkler *et al.* veröffentlichten Modell konnte, wie auch in dieser Arbeit, ein verringertes, trabekuläres Knochenvolumen und eine Reduktion der Knochenformationsrate beobachtet werden. Im Gegensatz zum *Col1a1-Sost*-Modell, wurde im *OG2-SOST*-Modell auch eine verringerte von Osteoblasten bedeckte Knochenoberfläche beobachtet. Ebenso konnte, konträr zu den *Col1a1-Sost*-Mäusen, in den *OG2-SOST*-Mäusen eine verringerte biomechanische Stabilität des Knochens gezeigt werden. Letzteres ist aber mit hoher Wahrscheinlichkeit auf methodische Unterschiede zurückzuführen, da die in dieser Arbeit gezeigten Resultate der mechanischen Testung und der finite Elemente Analyse der *Col1a1-Sost*-Mäuse primär vom kortikalen und nicht vom trabekulären Knochen abhängig waren. Somit ist es einerseits naheliegend, dass bei einer unveränderten kortikalen Stärke auch die mechanischen Eigenschaften nicht beeinflusst wurden, und andererseits ist dies ein indirekter Hinweis darauf, dass auch die Qualität des vorhandenen Knochengewebes vergleichbar mit dem der Wildtyp-Tiere war.

Da Veränderungen des Knochenvolumens zwangsweise den für das Knochenmark zur Verfügung stehenden Raum beeinflussen, wurde die Zusammensetzung dieses, für das Immunsystem und die Blutbildung wichtigen, Gewebes analysiert. Die Analyse ergab, dass das Knochenmark der *Col1a1-Sost*-Mäuse lediglich über einen erhöhten relativen Anteil an CD8-postiven, cytotoxischen T-Zellen

verfügte. Hinweise auf immunologische oder hämatopoetische Defekte konnten nicht gefunden werden.

Auch wenn der exakte Wirkmechanismus von Sclerostin bisher nicht vollständig geklärt wurde, so ist die generelle anti-osteoblastische Wirkung auf den Knochen unumstritten. Das SOST-Gen gewann erstmals an Bedeutung im Zuge von genetischen Untersuchungen an Familien mit gehäufter Osteosklerose-Fällen. Der erste Bericht identifizierte inaktivierende Mutationen in diesem Gen, die zur Sklerosteose führten, wodurch es auch seinen Namen erhielt<sup>[175]</sup>. Kurz darauf konnte gezeigt werden, dass auch die van Buchem Krankheit, die sich durch eine der Sklerosteose ähnlichen aber etwas milderen Symptomatik auszeichnet, durch eine 52 kB große genomische Deletion im nicht-kodierenden 3'-Bereich des SOST-Gens verursacht wird, durch die ein Enhancer-Bereich verloren ging<sup>[239]</sup>.

Auch die Generierung und Analyse entsprechender *Sost*-defizienter Mausmodelle konnte die anti-osteoblastische Wirkung von Sclerostin weiter verdeutlichen, da die Mäuse, ähnlich wie die Menschen, eine deutlich erhöhte Knochenmasse entwickelten<sup>[177]</sup>. Als mögliche Ursachen konnten in dem *Sost*-KO-Modell eine größere, von Osteoblasten belegte Knochenoberfläche und eine gesteigerte Knochenformationsrate identifiziert werden<sup>[177]</sup>. Somit fügen sich die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen der *Col1a1-Sost*-Mäuse gut in das bisherige Bild der Sclerostin-Wirkung auf den Knochen ein und können durch die beobachtete Modulation der Osteoblastenaktivität ohne deren Anzahl zu beeinflussen, neue Aspekte dieser Beziehung aufzeigen, die als eines der Schlüsselemente in der negativen Rückkopplungsschleife, die die physiologische Knochenbildung limitiert, angesehen werden kann.

## 6.2 Interaktion von Komponenten des Wnt-Rezeptorkomplexes

Obwohl die Sequenz von Sclerostin im Bereich der Cystein-Knoten eine hohe Homologie zur DAN (differential screening selected gene aberrative in neuroblastoma)-Familie der BMP-Antagonisten zeigt, kam auf Grund der Ähnlichkeit der SOST-bedingten Phänotypen zu denen, die durch Mutationen im LRP5-Gen hervorgerufen wurden, schnell die Hypothese auf, dass es sich bei Sclerostin um einen Lrp5-Antagonisten handeln könnte<sup>[175]</sup>. Diese Vermutung wurde durch einige *in vitro* Studien unterstützt, die zeigen konnten, dass es zu einer Bindung zwischen Sclerostin und Lrp5 kommen kann<sup>[119,120,184,185]</sup>.

Genauer gesagt, sollte die Sclerostin-vermittelte Antagonisierung der Wnt-Signaltransduktion über eine Interaktion mit der extrazellulären Domäne von Lrp5 erfolgen. Die mutierten Varianten A214V und G171V von Lrp5, die auch in dieser Arbeit in einer murin adaptierten Form (A213V und G170V) verwendet wurden und die im Menschen mit Osteosklerose assoziiert sind, sollen eben diese

Interaktion verhindern<sup>[133,134,155,158,184]</sup>. Dieser Mechanismus ähnelt der Wirkung der Wnt-Antagonisten aus der Dkk-Familie, die ebenfalls eine Bildung des Wnt-Rezeptorkomplexes durch Interaktion mit dem extrazellulären Bereich von Lrp5 verhindern<sup>[121,180,267,268]</sup>. Im Gegensatz zu dem vorgeschlagenen Wirkmechanismus von Sclerostin, benötigen Dkk-Moleküle zusätzlich den Co-Rezeptor Kremen2<sup>[116]</sup>. Ein weiterer Hinweis für die Interaktion von Sclerostin und Lrp5 ist beispielsweise eine Co-Lokalisation beider Moleküle in immunhistochemischen Analysen von Röhrenknochen<sup>[184]</sup>. Diese Studie dient gleichermaßen auch als Beispiel für einen häufig auftretenden Schwachpunkt derartiger Untersuchungen. Die verwendeten Antikörper konnten, auf Grund der hohen Sequenzhomologie beider Moleküle, nicht zwischen Lrp5 und dem verwandten Lrp6 differenzieren.

Bei Lrp6 handelt es sich wie bei Lrp5 um einen Wnt Co-Rezeptor<sup>[100]</sup>, der auch im Kontext des Knochens wichtige und zum Teil mit Lrp5 überlappende Funktionen haben soll<sup>[161]</sup>. Die Bedeutung von Lrp6 im Knochenstoffwechsel ist aber nicht so hervorstechend wie die von Lrp5, da die bisher einzige, im Menschen mit Veränderungen des Knochenstatus assoziierte Mutation des LRP6-Gens nur eine äußerst geringfügige Reduktion der Knochenmasse zur Folge hat<sup>[269]</sup>. Nichtsdestotrotz wurde in den einzigen beiden Studien, die die Wirkung der Interaktion von Sclerostin mit Lrp5/6 *in vivo* näher beleuchteten, indem Mäuse mit gleichzeitiger Deletion von *Sost* und *Lrp5* analysiert wurden, festgestellt, dass die Wirkung von Sclerostin zumindest teilweise über Lrp6 vermittelt wird<sup>[186,270]</sup>.

Ein weiterer postulierter Interaktionspartner von Sclerostin ist Lrp4, das in mutierter Form in Menschen zu verstärktem skelettalen Wachstum führen kann<sup>[151]</sup>. Dieses mutierte Lrp4 zeigte in *in vitro* Versuchen, ähnlich wie die mutierten Formen von Lrp5, eine verringerte Affinität zu Sclerostin<sup>[152,153]</sup>. Schlussendlich wurde auch in Betracht gezogen, dass die Hauptfunktion von Sclerostin die Sequestrierung von BMPs ist<sup>[271]</sup>.

Obwohl der zugrunde liegende Mechanismus noch nicht vollständig geklärt worden ist, wurden, auf Grund der eindeutigen Fähigkeit Sclerostins den Knochenstoffwechsel zu beeinflussen, monoklonale Antikörper (Romosozumab und Blosozumab) gegen Sclerostin entwickelt und auf ihr Potential hin untersucht, als anti-osteoporotisches Medikamente eingesetzt werden zu können<sup>[187,188]</sup>. Die Studie, in der Romosozumab untersucht wurde, zeigte, dass die monatliche Injektion des Antikörpers für die Dauer eines Jahres einen deutlich stärkeren Anstieg der Knochendichte zur Folge hatte, als die Behandlung mit Teriparatid oder Alendronat<sup>[187]</sup>. Zwar führte die erste Injektion zu einer Verdopplung der Serum-Konzentration des Knochenformationsmarkers Prokollagen-I N-terminales Peptid (PINP), doch interessanterweise nahm dieser Effekt und auch die osteoanabole Wirkung des Antikörpers im Laufe der Behandlung ab<sup>[187]</sup>. Diese Befunde betonen somit weiter die Relevanz des Bestrebens den Mechanismus der Sclerostin-Wirkung zu verstehen und den tatsächlichen Rezeptor zu identifizieren.

Da die vorherrschende Hypothese die Interaktion von Sclerostin mit der extrazellulären Domäne von Lrp5 postuliert, sollte dies in dieser Arbeit mittels eines geradlinigen *in vivo* Versuchs untersucht werden. Die *Col1a1-Sost*-Mauslinie wurde auf verschiedene Hintergründe gekreuzt, die entweder das WT *Lrp5*-Gen oder die *Lrp5*-Varianten A213V oder G170V besaßen. Die beiden mutierten Formen von Lrp5 führen zu einer Veränderung der Konformation im gleichen Bereich der extrazellulären Domäne des Proteins, die die Affinität zu Sclerostin verringern soll und die eine erhöhte Knochenformationsrate und massiv erhöhte Knochenmasse (HBM) zur Folge haben<sup>[121,155,185]</sup>. Da auch Dkk-Moleküle über diese Domäne des Lrp5-Rezeptors wirken, wurde analog zur *Col1a1-Sost*-Mauslinie auch die *Col1a1-Krm2*-Mauslinie eingekreuzt<sup>[121,180,267,268]</sup>. Letztere exprimieren Osteoblasten-spezifisch den für die Dkk-Lrp5 Interaktion erforderlichen Co-Rezeptor Kremen2 und zeichnen sich durch eine drastisch reduzierte Knochenmasse aus, die einerseits auf eine verringerte Knochenformationsrate und andererseits auf eine erhöhte Osteoklastenzahl zurückzuführen war<sup>[118]</sup>. Zusätzlich wurde auch die Auswirkung einer *Fzd9*-Defizienz, die für sich genommen in Mäusen zu einer verringerten Knochenmasse auf Grund einer reduzierten Osteoblastenzahl und damit einhergehende Senkung der Knochenformation führt<sup>[149]</sup>, in Kombination mit den *Lrp5*-HBM-Varianten untersucht.

Das Ergebnis der *in vivo* Analyse der Interaktion von Komponenten des Wnt-Rezeptorkomplexes fiel in Bezug auf den wichtigsten Schlüsselaspekt, dem Knochenvolumen, eindeutig aus.  $\mu$ CT-Analysen der Femora und histologische Untersuchungen der Wirbelkörper belegten, dass die Wirkung, die die Sclerostin-Überexpression auf das Knochenvolumen aber auch auf die trabekulären Strukturparameter wie Trabekeldicke und Anzahl hatte, durch die Präsenz der *Lrp5*-HBM-Varianten aufgehoben wurde. Auch morphologische Veränderungen des Knochens, die durch die übermäßige *Sost*-Expression hervorgerufen wurden, wie die Aufweitung der distalen Femur-Metaphyse, konnten durch die mutierten *Lrp5*-Varianten verhindert werden.

Es konnte auch ein geringfügiger Unterschied zwischen den beiden verwendeten *Lrp5*-HBM-Varianten beobachtet werden. Der Phänotyp, der durch *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> in Kombination mit dem *Col1a1-Sost*-Konstrukt hervorgerufen wurde, war nicht von dem Phänotyp der Tiere mit dem *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup>-Genotyp ohne *Col1a1-Sost*-Konstrukt zu unterscheiden. Der *Lrp5*<sup>G170V/G170V</sup>-Genotyp wiederum konnte den Effekt des *Col1a1-Sost*-Transgens zwar ebenfalls großteils aber nicht vollständig in den *Lrp5*-HBM-Phänotyp umkehren. Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen weiterer Studien, die mit Mausmodellen der beiden *Lrp5*-Varianten A213V und G170V durchgeführt wurden. Auch hier konnten unter bestimmten Bedingungen, wie der Frakturheilung bei Belastung des Knochens, geringe Unterschiede zwischen den beiden Mutationen festgestellt werden<sup>[256,257]</sup>.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen des *Col1a1-Sost*-Transgens, blieb die anti-osteoblastische Wirkung von *Kremen2* auch in Präsenz beider *Lrp5*-HBM-Varianten weitestgehend erhalten. Diese Beobachtungen konnten auch anhand der Knochenformationsrate der weiblichen Mäuse nachvollzogen werden, die die Veränderungen der Strukturparameter widerspiegelt. Die in Mäusen mit kombiniertem *Col1a1-Sost*- und *Lrp5*<sup>G170V/G170V</sup>-Genotyp signifikant erhöhte Sclerostin Serumkonzentration, konnte die bei der Charakterisierung der *Col1a1-Sost*-Mäuse aufgestellte Vermutung bekräftigen, dass der Effekt der *Sost*-Überexpression erst systemisch messbar wird, wenn eine ausreichende Gesamtzahl an Osteoblasten vorhanden ist. Im Rahmen der zellulären Histomorphometrie konnten keine markanten Unterschiede in den zellulären Parametern der untersuchten Knochen festgestellt werden. Im Falle der *Col1a1-Sost*-Mäuse entspricht dies den, auf den Daten der initialen Charakterisierung basierenden, Erwartungen. Die *Col1a1-Krm2*-transgenen Mäuse sollten bekanntermaßen aber eine erhöhte Osteoklasten-Anzahl aufweisen<sup>[118]</sup>, die in dieser Versuchsreihe nur in Kombination mit *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> oder *Lrp5*<sup>G170V/G170V</sup> zu beobachten war. Eine mögliche Erklärung hierfür ist der auf Grund der Kreuzungen veränderte genetische Hintergrund der Tiere, der zum einen eine höhere Varianz zur Folge haben könnte und zum anderen auch die Zellzahl selbst beeinflussen könnte.

Der Vergleich der relativen Organengewichte, die nur in wenigen Fällen geringfügige, signifikante Unterschiede aufwiesen, zeigt einen weiteren wichtigen Aspekt der von Sclerostin und *Lrp5* modulierten Signale. Wie auch beim Menschen sind die Auswirkungen bei Veränderung der Aktivität dieser Moleküle primär auf das Knochengewebe beschränkt, wodurch sie einen idealen Ansatzpunkt für die Intervention zur Modulation des Knochenstoffwechsels darstellen.

Generell zeigten in dieser Versuchsreihe weibliche und männliche Mäuse einen ähnlichen Phänotyp und die Veränderung der Knochenarchitektur ist in beiden Geschlechtern gleichermaßen aussagekräftig. Nichtsdestotrotz ist der Phänotyp der weiblichen Mäuse eindeutiger, insbesondere mit Hinblick auf die Knochenformationsrate, die in männlichen Mäusen in allen Genotypen äußerst niedrig ausfiel. Möglicherweise ist dies auf ein schneller voranschreitendes Wachstum in den männlichen Tieren zurückzuführen, das zu einer negativen Rückkopplung oder Erschöpfung der Fähigkeit zur Knochenbildung zum Zeitpunkt der Analyse führte. Unabhängig von der Erklärung für diese Diskrepanz, wird durch diese Ergebnisse die auf Erfahrungen basierte Annahme bekräftigt, dass ein Phänotyp in weiblichen Mäusen eindeutiger ausfällt, die auch in dieser Arbeit zur bevorzugten Analyse von Tieren dieses Geschlechtes führte.

Der kombinierte Effekt von *Col1a1-Sost* und *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> konnte auch *in vitro* nachvollzogen werden, wo Sclerostin die Mineralisation und Expression von Differenzierungsmarkern während der *ex vivo* Differenzierung von Schädeldach-Osteoblasten reduziert, die durch die Präsenz des

*Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup>-Genotyps gegenüber Wildtyp-Zellen signifikant gesteigert wurden. Die Kombination von *Col1a1-Sost* und *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup> wiederum führte zu einem Phänotyp, der äquivalent mit dem der *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup>-Zellen war. Inwiefern die Modulation des kanonischen oder nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs für diesen Effekt verantwortlich war, ließ sich in dieser Versuchsanordnung nicht endgültig klären, da die Stimulation mit den Liganden Wnt1, Wnt3a und Wnt5a sowohl auf Transkriptionsebene als auch *in puncto* Phosphorylierungsstatus von Proteinen, die an der Signaltransduktion beteiligt sein sollen, kein eindeutiges Ergebnis liefern konnte.

Die *in vivo* Analyse der Interaktion von Frizzled9 und Lrp5 stellte sich als schwierig heraus, da Tiere mit den benötigten, doppelt homozygoten Genotypen mit einer deutlich geringeren Frequenz als erwartet geboren wurden. Da die Gene für *Fzd9* und *Lrp5* nicht auf dem gleichen Chromosom colokalisieren, sondern in der Maus respektive auf Chromosom 5 und 19 liegen, konnte ein Segregationskonflikt als mögliche Ursache ausgeschlossen werden. Somit könnte diese Beobachtung auch beispielsweise auf Probleme bei der Embryonalentwicklung hinweisen. Die  $\mu$ CT-basierte und histologische Analyse der verfügbaren Tiere, die durch gezielte Verpaarungen erzeugt wurden, ergab, dass die *Fzd9*-Defizienz nur einen geringen Einfluss auf den skelettalen Phänotyp des *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup>-Genotyps hatte. Unerwarteterweise konnte in Kombination mit *Lrp5*<sup>WT/WT</sup> kein markanter Unterschied der Knochenarchitektur festgestellt werden. Lediglich morphologisch führte die *Fzd9*-Defizienz, unabhängig von der *Lrp5*-Variante, zu einer Verkürzung des Femurs.

Das Ausbleiben des beschriebenen Phänotyps der reinen *Fzd9*-KO-Mäuse ist möglicherweise auf das erwähnte Phänomen zurückzuführen, dass sich die Effekte von genetischen Veränderungen in männlichen Mäusen nicht so durchsetzen wie in Tieren weiblichen Geschlechts. Hinzu kommt, dass die Tiere in der Arbeit von Albers et al. in einem höheren Alter untersucht wurden und der Phänotyp sich möglicherweise erst im Laufe der Zeit ausprägt<sup>[149]</sup>. Dies mindert zwar die Aussagekraft der Ergebnisse, dennoch kann auf Grund des durch die *Fzd9*-Defizienz nur leicht veränderten Phänotyps des *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup>-Genotyps, der an sich klar von Wildtypen zu unterscheiden war, davon ausgegangen werden, dass *Fzd9* nicht der Wnt-Rezeptor ist, der primär an dem selben Rezeptorkomplex wie *Lrp5* beteiligt ist und über diesen die Modulation der Knochenformation vermittelt. Nichtsdestotrotz sind diese Daten auch ein Hinweis darauf, dass *Fzd9* möglicherweise zu einem geringen Anteil an dieser Signalkaskade beteiligt ist, da durch die Kombination mit dem *Lrp5*<sup>A213V/A213V</sup>-Genotyp Bedingungen geschaffen werden, unter denen die *Fzd9*-Defizienz bereits in 12 Wochen alten Mäusen die Knochenmasse beeinflussen kann.

Auf Grund der in dieser Arbeit generierten Daten, die zeigen dass die anti-osteoblastische Wirkung von Sclerostin in zwei Mauslinien mit *Lrp5*-HBM-Mutationen aufgehoben wurde, konnte die Hypothese, dass die Wirkung von Sclerostin auf der Interaktion mit *Lrp5* basiert, die bisher nur auf *in vitro*

Nachweisen gestützt war, *in vivo* belegt werden. Durch den Phänotyp der *Krm2*-Überexpression, der auch in Präsenz der *Lrp5*-HBM-Mutationen erhalten blieb, konnte auch indirekt gezeigt werden, dass Mitglieder der *Dkk*-Familie für die *Lrp5*-abhängige Inhibition von Wnt-Signalen eine anders geartete Bindung mit der extrazellulären Domäne von *Lrp5* eingehen, als Sclerostin oder möglicherweise eine solche Interaktion *in vivo* nicht relevant ist. Letzteres ist eine mögliche Erklärung, da Interaktionen von *Dkk-1* mit *Lrp5* zwar nachgewiesen werden konnten<sup>[121,180,267,268]</sup>, aber es auch zahlreiche Hinweise darauf gibt, dass der dem *Lrp5* nah verwandte Rezeptor *Lrp6* der primäre Interaktionspartner von *Dkk*-Molekülen ist<sup>[115,272,273]</sup>. Somit können die Ergebnisse dieser Arbeit als weiteres Indiz für diese Hypothese interpretiert werden.

### 6.3 Die Bedeutung von Notch2 im Knochenstoffwechsel

Sclerostin, einer der Schlüsselmodulatoren der Knochenformation, wird unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich von Osteozyten produziert<sup>[57]</sup>. Diese im Knochen eingebetteten Zellen entstehen aus Osteoblasten, jedoch werden nicht alle Osteoblasten zu Osteozyten, und wie genau diese Auswahl stattfindet, wurde bisher noch nicht geklärt<sup>[22]</sup>. Da Osteoblasten in der Regel in großen, sich zweidimensional auf der Knochenoberfläche ausbreitenden Zellverbänden vorkommen, hat der Prozess, das einzelne Zellen aus einem Verband gleichartiger Zellen sich anders entwickeln, als ihre Nachbarn, eine nicht von der Hand zu weisende Ähnlichkeit zum Prozess der lateralen Inhibition<sup>[14,44]</sup>. Dieser Prozess ist an der Entwicklung und Homöostase vieler Organe und Gewebe beteiligt und wird durch juxtakrine Notch-Signale vermittelt. Zusammen mit den Entdeckungen, dass Notch-Signale den Wnt Signalweg beeinflussen können<sup>[274]</sup> sowie, dass Mutationen im NOTCH2-Gen für das Hajdu-Cheney Syndrom, einer seltenen Osteodysplasie, verantwortlich sind<sup>[45-47]</sup> und einigen bisherigen Untersuchungen der Notch-Signale im Knochenkontext, die eine essentielle Rolle vermuten lassen<sup>[135]</sup>, bildete dies den Ausgangspunkt für die Entscheidung, die Bedeutung von Notch2 im Knochenstoffwechsel näher zu untersuchen.

In den wenigen Arbeiten, die bisher in diesem Bereich durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass Notch1 und Notch2 in Skelett-assoziierten Zellen exprimiert werden<sup>[275]</sup> und die Knochenarchitektur beeinflussen können. Diese Beobachtungen sind prinzipiell mit der Hypothese einer Osteozyten-Beteiligung vereinbar. Der Einfluss der Notch-Signale scheint jedoch vom Zelltyp und Differenzierungsgrad der Zellen abhängig zu sein. Wurde beispielsweise die NICD-Domäne von Notch1, die für die intrazelluläre Weiterleitung des Notch-Signals verantwortlich ist, während der frühen Phase der Osteoblasten-Differenzierung exprimiert, so führte dies zu einer reduzierten Knochenmasse<sup>[208]</sup>, wohingegen die Expression zu einem späteren Zeitpunkt die Knochenmasse auf Grund einer höheren Osteoblastenanzahl steigerte<sup>[205]</sup>. Die Expression der NICD in reifen Osteoblasten und Osteozyten resultierte zwar ebenfalls in einer erhöhten Knochenmasse, die aber

auf eine reduzierte Osteoklastenzahl, bedingt durch verstärkte Osteoprotegerin-Produktion, zurückzuführen war<sup>[206]</sup>. Ebenso konnte gezeigt werden, dass *Notch1* die Osteoklastogenese auch zellautonom regulieren kann<sup>[276]</sup>. Die Expression der *Notch1*-NICD zu verschiedenen Zeitpunkten der Osteoblasten-Differenzierung mittels der Osterix- (*Osx*), Osteocalcin- (*Ocn*), *Col1a1*- und *Dmp1*-Promotoren führte zu einer strukturellen Veränderung bis hin zu einer vollständigen Trabekularisierung des kortikalen Knochens<sup>[206]</sup>.

Die kombinierte Defizienz von *Notch1* und *Notch2* in Mäusen, die Zelltyp-spezifisch erfolgte, hatte ebenfalls einen Einfluss auf die trabekuläre und kortikale Knochengeweberemodellierung, welche durch eine veränderte Anzahl an Osteoblasten und Osteoklasten vermittelt wurde und zu einem erhöhten trabekulären Knochenvolumen in den Tieren mit *Notch1/2*-defizienten Zellen führte<sup>[277,278]</sup>. Wie aus dieser Übersicht hervorgeht, wurde im Rahmen der bisherigen Studien häufig nur das NICD-Fragment von *Notch1* oder eine kombinierte *Notch1*- und *Notch2*-Defizienz zur Untersuchung des Einflusses von Notch auf Knochen herangezogen.

Die Wirkung von *Notch2* alleine wurde bisher noch nicht näher analysiert, weshalb dies im Rahmen dieser Arbeit erfolgte. Hierfür wurde der skelettale Phänotyp von Mäusen analysiert, bei denen das *Notch2*-Gen mittels Cre-Rekombinase entweder in Osteoklasten oder in Osteoblasten inaktiviert wurde. Schlussendlich wurde auch ein Mausmodell generiert, das eine der im Menschen HCS-verursachenden Mutationen (6272delT) im *Notch2*-Gen trägt.

Zunächst konnte durch Expressionsanalysen gezeigt werden, dass eine gezielte Inaktivierung von *Notch2* in Osteoblasten und Osteoklasten sinnvoll ist, da das Gen neben diversen anderen Organen auch in diesen Zelltypen exprimiert wird. Im Rahmen dieser Analysen wurden auch die Expressionsmuster der Notch-Liganden überprüft, bei denen insbesondere *Contactin1* und *Dlk1* durch ihre relative Knochen-Spezifität auffielen. Der letztere Ligand ist bereits im Knochenkontext untersucht worden und es konnte gezeigt werden, dass die transgene Überexpression von *Dlk1* zu einer verringerten Knochendichte führt. Physiologisch scheint *Dlk1* am Östrogen-Defizienz-induzierten Knochenmasseverlust beteiligt zu sein<sup>[279]</sup>. Insgesamt können die beobachteten Expressionsmuster als weiteres Indiz für die Bedeutung von Notch-Signalen im Knochenstoffwechsel interpretiert werden.

Die Inaktivierung des *Notch2*-Gens mittels des Cre-loxP-Systems war in der hier verwendeten Versuchsanordnung erfolgreich, aber nicht absolut spezifisch für den gewünschten Zelltyp. So konnte das rekombinierte Gen, unabhängig vom verwendeten Promoter der Cre-Rekombinase sowohl *in ex vivo* differenzierten Osteoklasten, als auch in Osteoblasten nachgewiesen werden. Dies ist dadurch zu erklären, dass in beiden Fällen als Ausgangsmaterial Knochenmark verwendet wurde, welches

auch Vorläufer-Zellen des jeweils anderen Typs enthielt. Obwohl mit dem hier gewählten Nachweis der Rekombination keine eindeutigen Unterschiede des Rekombinationsmusters festgestellt werden konnten, so ist der Unterschied des Phänotyps ein ausschlaggebendes Argument dafür, dass auf zellulärer Ebene sehr wohl eine differenzielle Rekombination stattgefunden hatte. Die über den *LysM*-Promoter vermittelte *Notch2*-Defizienz in Osteoklasten (*Notch2<sup>fl/fl</sup>/LysM-Cre+*) hatte weder in den radiologischen Untersuchungen der Femora noch in den histologischen Analysen der Wirbelkörper einen messbaren Effekt auf die Knochenarchitektur. Da morphologisch kein Phänotyp erkennbar war, wurde auf eine nähere Bestimmung der zellulären Parameter verzichtet. Obgleich *Notch1* zellautonom an der Osteoklastogenese beteiligt sein soll<sup>[276]</sup>, ist auf Grund der hier generierten Daten davon auszugehen, dass dies für *Notch2* nicht der Fall ist, da bei einer veränderten Osteoklasten-Anzahl oder Aktivität, auch eine korrespondierende Veränderung der Knochenmasse zu erwarten gewesen wäre.

Im Gegensatz dazu, führte die *Runx2*-Cre-vermittelte *Notch2*-Defizienz in Osteoblasten (*Notch2<sup>fl/fl</sup>/Runx2-Cre+*) zu einem eindeutigen Phänotyp in den Röhrenknochen, der sich im Laufe des Wachstums entwickelte und in dieser Arbeit beispielhaft an Hand von Femur, Tibia und den Metatarsalia gezeigt wurde. So ist in 12 Wochen alten Tieren noch kein signifikanter Unterschied der trabekulären Strukturparameter im Femur zwischen *Cre*-transgenen und Geschwistertieren ohne *Cre*-Rekombinase zu erkennen. Mit 24 Wochen ist aber bereits der gesamte Schaft der Femora in den *Notch2<sup>fl/fl</sup>/Runx2-Cre+* Mäusen mit trabekulärem Knochen durchzogen. Im Alter von 52 Wochen wandelte sich dieser Phänotyp in eine Verschiebung des trabekularisierten Bereiches von distal zu proximal um und stand damit im Kontrast zu dem der Kontrolltiere, die generell weniger trabekulären Knochen aufwiesen, der primär in der distalen Metaphyse des Femurs lokalisiert war. Erstaunlicherweise konnte in den Wirbelkörpern der beiden Genotypen zu keinem der Untersuchungszeitpunkte Unterschiede in den analysierten Strukturparametern festgestellt werden. Dennoch lieferte die zelluläre Untersuchung der Wirbelkörper plausible Hinweise auf die Ursache des in den Röhrenknochen beobachteten Phänotyps. In den 24 Wochen alten *Notch2<sup>fl/fl</sup>/Runx2-Cre+* Tieren war die Osteoblastenanzahl und damit einhergehend die von Osteoblasten bedeckte Knochenoberfläche signifikant erhöht, wodurch sich die erhöhte Knochenmasse erklären ließ. In den 52 Wochen alten *Notch2<sup>fl/fl</sup>/Runx2-Cre+* Tieren war eine Steigerung der Osteoblastenanzahl nur noch als Tendenz zu erkennen, die aber durch die nach wie vor signifikant vergrößerte von Osteoblasten bedeckte Knochenoberfläche untermauert wurde. Hinzu kommt in dieser Altersgruppe eine signifikant reduzierte Osteoklastenanzahl gegenüber Kontrolltieren. Diese könnte sich für die Rückbildung des trabekulären Knochens in der distalen Metaphyse des Femurs verantwortlich zeichnen.

Im Kontext der bisherigen Erkenntnisse auf diesem Feld erscheinen die Ergebnisse dieser Arbeit schlüssig, da auch die kombinierte Defizienz von *Notch1* und *Notch2* zu einer erhöhten trabekulären Knochenmasse führte, die ebenso auf eine veränderte Komposition der Knochenzellen zurückzuführen war<sup>[277,278]</sup>. Die Wirkung von *Notch2* im Knochen scheint des Weiteren der von *Notch1* oder zumindest der NICD von *Notch1* entgegengesetzt zu sein, da die Überexpression in reifen Osteoblasten, die mechanistisch das Gegenteil der Defizienz darstellt, generell zu einer erhöhten Knochenmasse führte<sup>[205,206]</sup>. Falls diese entgegengesetzte Wirkung von *Notch1* und *Notch2* auch die Expression von *Opg* in Osteoblasten umfasst<sup>[276]</sup>, könnte dies eine mögliche Erklärung für die erniedrigte Osteoklastenzahl in den 52 Wochen alten *Notch2<sup>fl/fl</sup>/Runx2-Cre+* Mäusen sein. Im Gegensatz zur initialen Vermutung konnte in Tieren mit *Runx2-Cre*-vermittelter, zelltypspezifischer *Notch2*-Defizienz keine Veränderung der Osteozytenzahl gemessen werden. Dieses Ergebnis spricht einerseits gegen eine Beteiligung des Notch-Signalweges an der Festlegung des zellulären Schicksals reifer Osteoblasten, andererseits stimmt es mit dem aus den bisherigen Veröffentlichungen hervorgehenden Konsens überein, dass Notch-Signale eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten spielen<sup>[280]</sup>. Inwiefern diese Schlussfolgerungen auch bei einer pathologisch veränderten Notch-Signal Aktivität zutreffen, wurde mit Hilfe eines Mausmodells des Hajdu-Cheney Syndroms erörtert.

Zum Verständnis der Bedeutung eines bestimmten Signalweges für die Funktion eines Organs werden häufig die Analysen genetisch bedingter Krankheiten, in denen Komponenten ebendieser Signaltransduktionsmechanismen betroffen sind, als Informationsquelle herangezogen. Dies war bis vor kurzem im Falle des Notch-Signalweges im Knochen nur unzureichend möglich. Zwar wurden eine Reihe von Krankheiten, bei denen auch das Skelett betroffen ist, in Zusammenhang mit Notch-Liganden und Rezeptoren gebracht, jedoch sind diese meist auf Probleme bei der Organentwicklung und nicht der Homöostase zurückzuführen. So führen beispielsweise Mutationen im Gen *JAG2* zu einer bestimmten Form der Brachydaktylie<sup>[281]</sup> und Mutationen im Gen des Notch-Liganden *Dll3* zu Dysostosen<sup>[282]</sup>, die auch im Mausmodell nachvollzogen werden konnten<sup>[283,284]</sup>. Ebenso sind die Symptome des Alagille-Syndroms, das meist durch Mutationen des *JAG1*-Gens<sup>[285]</sup>, in seltenen Fällen aber auch durch Mutationen in *NOTCH2* hervorgerufen wird<sup>[286]</sup>, auf Komplikationen während der Organentwicklung zurückzuführen. Dadurch sind ein Großteil der Organe betroffen<sup>[287]</sup> und auch die Wirbelkörper können ihre Entwicklung nicht korrekt abschließen und bilden sogenannte Schmetterlingswirbel<sup>[288]</sup>. Auch die in Alagille-Patienten beobachtete Osteoporose ist vermutlich ein sekundärer Effekt der eingeschränkten Leberfunktion<sup>[289]</sup>.

Erst die Assoziation von vermutlich aktivierenden Mutationen des *NOTCH2*-Gens mit dem Hajdu-Cheney Syndrom, brachte eine Krankheit, die die Homöostase des Knochens betrifft, mit

Komponenten des Notch-Signalweges in Verbindung<sup>[45-47]</sup>. Genauer gesagt zählen zu den skelettalen Symptomen der Hajdu-Cheney Patienten eine fortschreitende Osteoporose, sowie mit dem Alter zunehmende Acro-Osteolysen<sup>[290]</sup>, wodurch die Relevanz dieser Krankheit und somit die, des in dieser Arbeit generierten Mausmodells für die Untersuchung der Rolle des NOTCH2-Gens im Knochenstoffwechsel, weiter unterstrichen wird.

Die mutierte Variante des *Notch2*-Gens wurde mittels homologer Rekombination in das Genom von murinen embryonalen Stammzellen integriert und Klone, bei denen dieser Vorgang erfolgreich vonstattenging, mittels Long-Range PCR und Southernblot identifiziert. Die Sequenzierung des entsprechenden Genbereichs in den, aus den selektierten Klonen hervorgegangenen, Mäusen bestätigte die Präsenz der 6272delT Mutation. Diese ist eine der Mutationen im NOTCH2-Gen, die mit dem Hajdu-Cheney Syndrom assoziiert werden konnten. Alle identifizierten Mutationen liegen in der gleichen Region des Gens und führen zu einem vorzeitigen Stop-Codon<sup>[45-47]</sup>. Dieses wiederum resultiert in einem unvollständigen Genprodukt, dem die letzte N-terminale Domäne, die PEST-Domäne, fehlt. Funktionell konnte gezeigt werden, dass die PEST-Domäne als Ubiquitinierungs-Position essentiell für den zügigen Abbau und somit der negativen Regulation der signalvermittelnden NICD ist. Folglich sollte das Fehlen dieser Domäne in einer deutlich längeren Halbwertszeit der aktivierten NICD und einem länger anhaltendem Notch-Signal resultieren<sup>[195]</sup>.

In Bezug auf den skelettalen Phänotyp führte diese Mutation in Mäusen zu einer Reduktion der Knochendichte, wie sie auch durch die beschriebene humane Symptomatik von HCS zu erwarten war. Beide untersuchten Mauslinien, die von unterschiedlichen ES-Zell-Klonen abstammten, zeigten tendenziell die gleichen Veränderungen, auch wenn auffällige Unterschiede des basalen Knochenvolumens beobachtet wurden, die vermutlich auf einen andersgearteten genetischen Hintergrund zurückzuführen sind, der durch den Einsatz von chimären Mäusen hervorgerufen wurde. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass der zu Grunde liegende, zelluläre Mechanismus möglicherweise ein erhöhter Knochenumsatz ist. Hierfür sprechen sowohl die signifikant erhöhte Osteoblasten- als auch Osteoklastenzahl. Unterstützt wird diese Annahme durch die Tendenz zu einem erhöhten Osteoidanteil an der Knochenmatrix in den HCS-Tieren, der durch eine hohe Knochenbildungsaktivität bei nicht ausreichender Zeit, um die Knochenmatrix zu mineralisieren, hervorgerufen werden kann. Eine genaue Ursache für diesen Zustand konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht ermittelt werden und auch das Erstellen einer Hypothese gestaltet sich als schwierig, da das mutierte Allel in allen Zellen vorhanden ist.

Dennoch könnte unter der Annahme, dass die aktive Notch2- und Notch1-NICD ähnlich wirken, vermutet werden, dass die Kombination der beschriebenen Effekte auf Osteoklasten, Osteoblasten und Osteozyten zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten<sup>[205,206,208,276]</sup> in der Summe die hier

beobachtete Reduktion der Knochenmasse mit einem hohen Knochenumsatz zur Folge haben. Insbesondere die höhere Osteoblastenzahl in den HCS-Tieren scheint auf den ersten Blick im Widerspruch zu dem Phänotyp der Osteoblasten-spezifischen *Notch2*-Defizienz zu stehen, da scheinbar sowohl die Defizienz als auch eine verstärkte Aktivität einen ähnlichen Effekt haben. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Auswirkungen dieser genetischen Veränderungen auf die Knochenmasse der beiden Mausmodelle in der Tat gegensätzlich sind. Nichtsdestotrotz ist diese vermeintliche Diskrepanz vereinbar, wenn man von einer Kombination aller Effekte zu allen Differenzierungszeitpunkten ausgeht. Dadurch würde ein negativer Effekt von aktivem Notch2 auf die Differenzierung möglicherweise durch einen positiven zu einem früheren Zeitpunkt kompensiert werden. In Bezug auf die Osteozyten-Differenzierung, bei der ursprünglich eine Beteiligung von Notch2 vermutet wurde, waren die Ergebnisse der Osteoblasten-spezifischen Inaktivierung von *Notch2*, als auch die des HCS-Mausmodells schlüssig. Da es in keinem Fall zu einer Veränderung der Osteozytenzahl kam, ist eine maßgebende Beteiligung von Notch2 an der Osteozyten-Differenzierung auszuschließen.

Ein weiteres charakteristisches Symptom des Hajdu-Cheney Syndroms, die Acro-Osteolysen in den distalen Phalangen, konnte in dem hier generierten Mausmodell nicht beobachtet werden. Dies ist jedoch nachvollziehbar, wenn die involvierten Zeitspannen in Betracht gezogen werden. Bei Menschen treten diese Symptome im Verlauf mehrerer Jahrzehnte auf und schreiten langsam voran<sup>[46]</sup>. Eine gängige Vermutung ist, dass die Acro-Osteolysen durch Mikrofrakturen verursacht werden, die nicht korrekt verheilen und somit über einen langen Zeitraum akkumulieren, wodurch es schlussendlich zu einer Erosion des Knochens kommt<sup>[243,244]</sup>. Von dieser Hypothese ausgehend, handelt es sich bei den Acro-Osteolysen um ein sekundäres Symptom, das als Voraussetzung mindestens zwei veränderte Eigenschaften des Knochenstoffwechsels erfordert. Zum einen muss die Frakturheilung eingeschränkt sein und zum anderen sollte eine verringerte Stabilität des vorhandenen Knochengewebes die Bildung von Mikrofrakturen begünstigen. Hinweise auf eine dieser Eigenschaften, der verringerten Knochenstabilität, konnten bereits im Rahmen dieser Arbeit gefunden werden. Auch wenn an den Knochen der HCS-Tiere keine biomechanischen Testungen vorgenommen wurden, so ist auf Grund des reduzierten Knochenvolumens, das aus weniger und dünneren Trabekeln besteht, die wahrscheinlich sogar schlechter mineralisiert sind, von einer reduzierten mechanischen Stabilität auszugehen.

Die Untersuchungen der Bedeutung von Notch2 im Knochenstoffwechsel, mit Hilfe von Zelltyp-spezifischer Defizienz und der Generierung eines Hajdu-Cheney Mausmodells, haben somit ergeben, dass dieser Rezeptor eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel und den assoziierten Zelltypen spielt. Notch2 wirkt unter anderem in Osteoblasten unter bestimmten Bedingungen

Differenzierungs-hemmend, wohingegen kein Hinweis auf eine Beteiligung an der Osteozyten-Differenzierung gefunden werden konnte.

#### **6.4 Fazit**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Wirkung des Wnt-Inhibitors Sclerostin *in vivo* vollständig vom Wnt-Co-Rezeptor Lrp5 abhängig ist und dass der Notch-Rezeptor Notch2 eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel, insbesondere in der Osteoblasten-Differenzierung spielt. Dies ist von hoher klinischer Relevanz da dies einerseits eine schlüssige Bestätigung der vereinheitlichende Hypothese der Funktion von Sclerostin und Lrp5 darstellt, die in Personen mit Osteosklerose mutiert sind und die als Ziel für eine osteoanabole Therapie dienen sollen. Andererseits tragen die Ergebnisse dieser Arbeit zum Verständnis des Hajdu-Cheney Syndroms bei und zeigen, dass auch die Modulation von Notch-Signalen ein sinnvoller Ansatzpunkt für eine osteoanabole Therapie ist.

## 7 Ausblick

Auch wenn in dieser Arbeit bereits die Interaktion von Komponenten des Wnt-Rezeptorkomplexes anhand der *in vivo* Auswirkungen auf die skelettalen Phänotypen der entsprechenden Mausmodelle klar gezeigt werden konnte, so sind nach wie vor einige Aspekte vorhanden, die tiefere Analysen rechtfertigen würden. So konnte beispielsweise in den *Fzd9*-defizienten Mäusen unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen kein eindeutiger Phänotyp beobachtet werden, wodurch die Aussagekraft der Ergebnisse der Kombinationsstudie mit der *Lrp5* A213V-Variante verringert wurde. Daher wäre es zur endgültigen Abklärung des hier vorliegenden Sachverhaltes erstrebenswert, trotz der problematischen Geburtenfrequenz, den Phänotyp in weiblichen Mäusen und auch in Kombination mit der *Lrp5* G170V-Variante zu untersuchen. Im Zuge dieser Analysen wäre es auch denkbar, der Ursache für die unerwartete Genotypenverteilung auf den Grund zu gehen, indem Embryonen zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten untersucht werden, da nicht auszuschließen ist, dass die Kombination aus *Frizzled9* und *Lrp5* ein essentieller Wnt-Rezeptorkomplex während der Embryogenese sein könnte.

Generell zeigten die in der vorliegenden Arbeit untersuchten männlichen Mäuse nicht die in gleichaltrigen, weiblichen Mäusen beobachtete, eindeutige Veränderung der Knochenformationsrate. Da dies durch eine negative Rückkopplung oder Erschöpfung der Fähigkeit zur Knochenbildung erklärt werden könnte, wäre es in diesem Fall sinnvoll, die vorhandenen Daten durch die Analyse jüngerer, männlicher Mäuse zu ergänzen. Die Mineralisation von *in vitro* Osteoblastenkulturen zeigte einen ähnlichen Genotyp-abhängigen Effekt, wie die Knochenmasse *in vivo*, aber die Ergebnisse im Hinblick auf den molekularen Mechanismus waren nicht eindeutig. Zur vollständigen Klärung des Mechanismus könnten die Versuche mit Wnt-Molekülen anderer Hersteller wiederholt werden und weitere Komponenten der Wnt-Signalkaskaden auf ihren Phosphorylierungsstatus hin untersucht werden. Zusätzliche Experimente, die in diesem Kontext zielführend sein könnten, sind Bindungsstudien mit rekombinanten Sclerostin an Zellen, die verschiedene *Lrp5*-Varianten exprimieren und Stimulationsversuche mit Zellen verschiedener kombinierter Genotypen, die mit einem Luciferase-basiertem *Tcf/Lef* Wnt-Reporter-Konstrukt transfiziert wurden.

Die Analyse der *Notch2*-assoziierten Mausmodelle in dieser Arbeit konnte bereits die außerordentliche Bedeutung dieses Notch-Rezeptors für den Knochenstoffwechsel aufzeigen und erste Hinweise liefern, dass die primär involvierten Zellen Osteoblasten sind. Weiterführende Versuche wären hierbei sicherlich zunächst das *in vitro* Verhalten von *Notch2*-defizienten Osteoblasten in Bezug auf die Differenzierung und Mineralisationsfähigkeit zu untersuchen. Dies könnte ebenso mit Osteoblasten durchgeführt werden, die die Hajdu-Cheney Mutation tragen.

Anhand solcher Zellen könnte auch überprüft werden, ob tatsächlich ein länger anhaltendes Notch-Signal vorliegt, indem die Expressionskinetik von Notch-Zielgenen wie *Hes* und *Hey* analysiert wird. Im Zusammenhang mit dem Hajdu-Cheney Mausmodell wäre es aber wahrscheinlich am wichtigsten, zunächst die Präsenz von über die Osteoporose hinausgehenden, am Menschen beobachteten Symptomen abzuklären. Zu diesen zählen beispielsweise renale Zysten, die histologisch nachweisbar sein sollten, und Veränderungen der Knochen im Gesichtsbereich, die möglicherweise mittels  $\mu$ CT ermittelt werden könnten. Auch der Nachweis des vermuteten hohen Knochenumsatzes mittels der Analyse von entsprechenden Serumparametern und die Identifizierung der Ursache für diesen Zustand könnten wertvolle Resultate erzielen. Zusätzlich ist in diesem Zusammenhang auch die Qualität des Knochens von Interesse, weshalb einerseits biomechanische Studien durchgeführt werden könnten und andererseits die Zusammensetzung der Knochenmatrix untersucht werden könnte. Schlussendlich könnte die Hypothese, dass die Acro-Osteolysen in Menschen auf eine verminderte Regeneration von Mikrofrakturen zurückzuführen sei, durch Frakturheilungsstudien erörtert werden.

## 8 Sicherheit und Entsorgung

Der Umgang mit Chemikalien erfolgte unter Beachtung der jeweiligen, aktuellen Sicherheitsdatenblätter. Substanzen deren Gefährdungspotential noch nicht ermittelt wurde, wurden als potentiell gesundheitsschädliche Substanzen behandelt. Der Umgang mit Tieren und den daraus gewonnenen Proben erfolgte entsprechend der zutreffenden Sicherheitsrichtlinien. Alle Materialien, Lösungen und Komponenten der Versuchstiere wurden entsprechend der Entsorgungsrichtlinien des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und in Rücksprache mit der Entsorgungsbeauftragten entsorgt. Alle Bakterien- und Zellkulturen sowie kontaminierte Materialien wurden vor der Entsorgung autoklaviert. Der Umgang mit radioaktivem Material erfolgte ausschließlich in den dafür vorgesehenen Laboren der Isotopen-Core Facility des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf nach den geltenden Vorschriften und unter Beachtung der zutreffenden Sicherheitsvorkehrungen. Radioaktive Lösungen und kontaminierte Materialien wurden, entsprechend der Bestimmungen des Isotopen-Labors, dem Abklinglager zugeführt, bevor sie entsorgt wurden.

### 8.1 H- und P-Sätze der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	CAS-Nr.	H-Sätze	P-Sätze
Acrylamid	79-06-1	350-340-361f-301-372-332-312-319-315-317	201-280-301+310-305+351+338-308+313
Agarose	9012-36-6	-	-
7-Amino-Actinomycin D	7240-37-1	300	264-301+310
3-Aminophthalhydrazid	521-31-3	315-319-335	261-305+351+338
Ammoniumhydroxid	1336-21-6	314-400	273-280-305+351+338-309+310
Ammoniumperoxodisulfat	7727-54-0	272-302-315-319-335-334-317	280-305+351+338-302+352-304+341-342+311
Ampicillin	69-53-4	315-317-319-334-335	261-280-305+351+338-342+311
L-Ascorbinsäure	50-81-7	-	-
Benzoylperoxid	94-36-0	242-319-317	210-220-280-305+351+338-302+352
5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranoside	7240-90-6	-	-
Calcein	1461-15-0	-	-
Chrom(III)-kaliumsulfat	7788-99-0	315-319	302+352-305+351+338
5'-[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-dCTP	-	-	-
Diethylpyrocarbonat	1609-47-8	302-315-319-335	261-305+351+338
1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin-D <sub>3</sub>	32222-06-3	300-310-330-361	260-264-280-284-301 + 310-302 + 350
1,4-Dimethylbenzol	106-42-3	226-312+332-315	210-302+352
N,N-Dimethylformamid	68-12-2	360D-226-332-312-319	201-302+352-305+351+338-308+313
N,N Dimethyl-p-Toluidin	99-97-8	301+311+331-373-412	261-273-280-301+310-311
Dimethylsulfoxid	67-68-5	-	-
Di-Natriumhydrogenphosphat	7558-79-4	-	-
Dithiothreitol	7634-42-6	302-315-319	302+352-305+351+338
Essigsäure	64-19-7	226-314	280-301+330+331-307+310-305+351+338
Ethanol	64-17-5	225	210
Ethylendiamintetraacetat	60-00-4	319	305+351+338
Formaldehyd	50-00-0	351-331-311-301-314-317	301+310-303+361+353-305+351+338 320-361-405-501
Glycerin	56-81-5	-	-
$\beta$ -Glycerolphosphat	13408-09-8	-	-
Glycin	56-40-6	-	-
4-Hydroxyzimtsäure	7400-08-0	315-319-335	302+352-304+340-305+351+338
Isopropanol	67-63-0	225-319-336	210-233-305+351+338
2-Isopropyl-5-methylphenol	89-83-8	302-314-411	273-301+330+331-305+351+338-309+310
Kaliumchlorid	7447-40-7	-	-
Kaliumhydrogenphosphat	7778-77-0	-	-

Kohlendioxid	124-38-9	280	410+403
Methanol	67-56-1	225-331-311-301-370	210-233-280-302+352
2-Methoxyethylacetat	110-49-6	302-312-332-360FD	201-280-308+313
Methylmethacrylat	80-62-6	225-335-315-317	210-262-280-301+310-315
Monoglycol-Butylether	111-76-2	311-331-302-315-319	261-270-280-301+312-302+352-305+351+338
Natrium-3,4-dihydroxy-9,10-dioxo-2-anthracenesulfonat	130-22-3	315-319-335	261-305+351+338
Natriumcarbonat	497-19-8	319	260-305+351+338
Natriumchlorid	7647-14-5	-	-
Natriumcitrat	68-04-2	-	-
Natriumdesoxycholat	83-44-3	302-315-319-335	261-305+351+338
Natriumdihydrogenphosphat	7558-80-7	-	-
Natriumhydrogencarbonat	144-55-8	-	-
Natriumhydroxid	1310-73-2	314-290	280-301+330+331-309+310-305+351+338
Natriumlaurylsulfat	151-21-3	228-311-302-335-315-319	210-280-304+340-305+351+338-309+310
Natriumphosphat	7601-54-9	314	305+351+338-310
Natriumthiosulfat	7772-98-7	-	-
Nonylphenyl-polyethyleneglykol-acetat	54612-40-7	-	260-262
Penicillin	118-53-6	315-317-320-334-335-361	264-304+340-305+351+338-312-337+313-332+313
Phenol	108-95-2	341-331-311-301-373-314	280-302+352-301+330+331-309-310-305+351+338
Pikrinsäure	88-89-1	201-331-311-301	210-280-301+310-312
Polyethylenglycol 6000	25322-68-3	-	-
Polyethylenglycol(40)-nonylphenoether	9016-45-9	302-318-335-400	261-273-280-305+351+338
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat	9005-64-5	-	-
Propan-1,2,3-triol	56-81-5	-	-
Salpetersäure	7697-37-2	272-314	220-280-305+351+338-310
Salzsäure	7647-01-0	290-314-335	234-260-304+340-303+361+353 305+351+338-309+311-501
Säurefuchsin	3244-88-0	315-319-335	261-305+351+338
Silbernitrat	7761-88-8	272-314-410	273-280-301+330+331-305+351+338-309+310
Stickstoff	7727-37-9	280	403
Streptomycin	57-92-1	302	-
3,3',5,5'-Tetrabromphenolsulfonphthalein	115-39-9	-	-
Tetramethylethylendiamin	110-18-9	225-332-302-314	210-233-280-301+330+331-305+351+338-309+310
Toluidinblau O	92-31-9	-	-
Trichlormethan	67-66-3	302-315-351-373	302+352-314
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	77-86-1	315-319-335	261-305+351+338
Tris(hydroxymethyl)aminomethane Hydrochlorid	1185-53-1	315-319-335	261-305+351+338
Wasserstoffperoxid	7722-84-1	271-332-302-314	220-261-280-305+351+338-310
β-Mercaptoethanol	60-24-2	301-310-330-315-318-410	280-273-302+352-304+340-305+351+338-309-310

## 8.2 Schlüssel für H-Sätze

H-Satz	Gefährdung
225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
228	Entzündbarer Feststoff.
242	Erwärmung kann Brand verursachen.
271	Kann Brand oder Explosion verursachen; starkes Oxidationsmittel.
272	Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel
280	Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.
290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
300	Lebensgefahr bei Verschlucken.
301	Giftig bei Verschlucken.
302	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
310	Lebensgefahr bei Hautkontakt.
311	Giftig bei Hautkontakt.
312	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.

314	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
315	Verursacht Hautreizungen.
317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
318	Verursacht schwere Augenschäden.
319	Verursacht schwere Augenreizung.
320	Verursacht Augenreizung.
330	Lebensgefahr bei Einatmen.
331	Giftig bei Einatmen.
332	Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
334	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
335	Kann die Atemwege reizen.
336	Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
340	Kann genetische Defekte verursachen.
341	Kann vermutlich genetische Defekte verursachen.
350	Kann Krebs erzeugen.
351	Kann vermutlich Krebs erzeugen.
360d	Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
360f	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
361	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.
361f	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
370	Schädigt die Organe.
372	Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition.
373	Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.
400	Sehr giftig für Wasserorganismen.
410	Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.
411	Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
412	Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

### 8.3 Schlüssel für P-Sätze

#### P-Satz    Sicherheitshinweis

201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
210	Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.
220	Von Kleidung / brennbaren Materialien fernhalten / entfernt aufbewahren.
233	Behälter dicht verschlossen halten.
234	Nur im Originalbehälter aufbewahren.
260	Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol nicht einatmen.
261	Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden.
262	Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen.
264	Nach Gebrauch gründlich waschen.
270	Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
280	Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.
284	Atemschutz tragen.
301	Bei Verschlucken:
302	Bei Berührung mit der Haut:
303	Bei Berührung mit der Haut (oder dem Haar):
304	Bei Einatmen:
305	Bei Kontakt mit den Augen:
308	Bei Exposition oder falls betroffen:
309	Bei Exposition oder Unwohlsein:
310	Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
311	Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
312	Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
313	Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
314	Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
315	Sofort ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
320	Besondere Behandlung dringend erforderlich
330	Mund ausspülen.
331	Kein Erbrechen herbeiführen.
332	Bei Hautreizung:
337	Bei anhaltender Augenreizung:
338	Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
340	Die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
341	Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
342	Bei Symptomen der Atemwege:
350	Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.
351	Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.
352	Mit viel Wasser und Seife waschen.
353	Haut mit Wasser abwaschen / duschen.

- 361 Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.
- 403 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- 405 Unter Verschluss aufbewahren.
- 410 Vor Sonnenbestrahlung schützen.
- 501 Inhalt / Behälter der entsprechenden Entsorgung zuführen.

## 9 Quellennachweis

Textreferenzen und Bildnachweise sind unter den entsprechenden Abschnitten detailliert aufgeführt. Alle verwendete Firmen-, Markennamen und Warenzeichen sind Eigentum der jeweiligen Inhaber und dienen lediglich zur Identifikation und Beschreibung der Produkte und Dienstleistungen. Eine Haftung für Richtigkeit, Vollständigkeit und Aktualität wird nicht übernommen.

### 9.1 Literaturverzeichnis

1. Borggreffe T, Oswald F (2009) The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci* 66: 1631-1646.
2. Nalla RK, Kruzic JJ, Kinney JH, Balooch M, Ager JW, et al. (2006) Role of microstructure in the aging-related deterioration of the toughness of human cortical bone. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems* 26: 1251-1260.
3. Yorgan T, Schinke T (2014) Relevance of Wnt signaling for osteoanabolic therapy. *Molecular and Cellular Therapies* 2: 22.
4. Hadjidakis DJ, Androulakis, II (2006) Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 1092: 385-396.
5. Arron JR, Choi Y (2000) Bone versus immune system. *Nature* 408: 535-536.
6. Johnell O, Kanis JA (2006) An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 17: 1726-1733.
7. Shane E, Burr D, Abrahamsen B, Adler RA, Brown TD, et al. (2014) Atypical subtrochanteric and diaphyseal femoral fractures: second report of a task force of the american society for bone and mineral research. *J Bone Miner Res* 29: 1-23.
8. Baron R, Hesse E (2012) Update on bone anabolics in osteoporosis treatment: rationale, current status, and perspectives. *J Clin Endocrinol Metab* 97: 311-325.
9. Jerosch JB, A.; Uhr, G. (2002) *Knochen -curasan Taschenatlas spezial*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
10. Wuelling M, Vortkamp A (2011) Chondrocyte proliferation and differentiation. *Endocr Dev* 21: 1-11.
11. Yang Y (2008) Skeletal Morphogenesis and Embryonic Development. In: Rosen CJ, editor. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 7 ed. Washington: American Society For Bone And Mineral Research. pp. 2-7.
12. Franz-Odenaal TA (2011) Induction and patterning of intramembranous bone. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16: 2734-2746.
13. Böcker WD, H.; Heitz, P.U.; Moch, H. (2001) *Pathologie*. München: Urban & Fischer Verlag/.
14. Clarke B (2008) Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 3 Suppl 3: S131-139.
15. Currey JD (2002) *Bones : structure and mechanics*. Princeton, NJ: Princeton University Press. xii, 436 p. p.
16. Seeman E (2008) Bone quality: the material and structural basis of bone strength. *J Bone Miner Metab* 26: 1-8.
17. Green J (1994) The physicochemical structure of bone: cellular and noncellular elements. *Miner Electrolyte Metab* 20: 7-15.
18. Garnero P (2012) The contribution of collagen crosslinks to bone strength. *Bonekey Rep* 1: 182.
19. Robey PGB, A.L. (2008) The Composition of Bone. In: Rosen CJ, editor. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Washington: American Society for Bone and Mineral Research. pp. 32-38.
20. Wick D (2005) *Biomechanische Grundlagen sportlicher Bewegung*. Balingen: Spitta Verlag.
21. Cohen MM, Jr. (2006) The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am J Med Genet A* 140: 2646-2706.
22. Bellido T (2014) Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcif Tissue Int* 94: 25-34.
23. Parfitt AM (2002) Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone* 30: 5-7.

24. Bielby R, Jones E, McGonagle D (2007) The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury* 38 Suppl 1: S26-32.
25. Ryser MD, Nigam N, Komarova SV (2009) Mathematical modeling of spatio-temporal dynamics of a single bone multicellular unit. *J Bone Miner Res* 24: 860-870.
26. Maeda K, Takahashi N, Kobayashi Y (2013) Roles of Wnt signals in bone resorption during physiological and pathological states. *J Mol Med (Berl)* 91: 15-23.
27. Raisz LG (2008) Overview of Pathogenesis. In: Rosen CJ, editor. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 7 ed. Washington: American Society for Bone and Mineral Research. pp. 203-206.
28. Krause CdG, D.J.J.; Karperien, M.; ten Dijke, P. (2008) Signal Transduction Cascades Controlling Osteoblast Differentiation. In: Rosen CJ, editor. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 7 ed. Washington: Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. pp. 10-16.
29. Kang S, Bennett CN, Gerin I, Rapp LA, Hankenson KD, et al. (2007) Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 282: 14515-14524.
30. Case N, Rubin J (2010) Beta-catenin--a supporting role in the skeleton. *J Cell Biochem* 110: 545-553.
31. Franceschi RT, Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R, Yang S, et al. (2003) Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation. *Connect Tissue Res* 44 Suppl 1: 109-116.
32. Wozney JM, Rosen V (1998) Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res*: 26-37.
33. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, et al. (1994) Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 127: 1755-1766.
34. Benayahu D, Shur I, Ben-Eliyahu S (2000) Hormonal changes affect the bone and bone marrow cells in a rat model. *J Cell Biochem* 79: 407-415.
35. van de Peppel J, van Leeuwen JP (2014) Vitamin D and gene networks in human osteoblasts. *Front Physiol* 5: 137.
36. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, et al. (1999) Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest* 104: 439-446.
37. Hisada K, Hata K, Ichida F, Matsubara T, Orimo H, et al. (2013) Retinoic acid regulates commitment of undifferentiated mesenchymal stem cells into osteoblasts and adipocytes. *J Bone Miner Metab* 31: 53-63.
38. Keller J, Catala-Lehnen P, Huebner AK, Jeschke A, Heckt T, et al. (2014) Calcitonin controls bone formation by inhibiting the release of sphingosine 1-phosphate from osteoclasts. *Nat Commun* 5: 5215.
39. Yoshida CA, Komori H, Maruyama Z, Miyazaki T, Kawasaki K, et al. (2012) SP7 inhibits osteoblast differentiation at a late stage in mice. *PLoS One* 7: e32364.
40. Fleisch H, Bisaz S (1962) Mechanism of calcification: inhibitory role of pyrophosphate. *Nature* 195: 911.
41. Harmey D, Hesse L, Narisawa S, Johnson KA, Terkeltaub R, et al. (2004) Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by *akp2*, *enpp1*, and *ank*: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders. *Am J Pathol* 164: 1199-1209.
42. Park EA (1940) The therapy of rickets. *Journal of the American Medical Association* 115: 370-379.
43. Bonewald LF (2011) The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 26: 229-238.
44. Katsube K, Sakamoto K (2005) Notch in vertebrates--molecular aspects of the signal. *Int J Dev Biol* 49: 369-374.

45. Simpson MA, Irving MD, Asilmaz E, Gray MJ, Dafou D, et al. (2011) Mutations in NOTCH2 cause Hajdu-Cheney syndrome, a disorder of severe and progressive bone loss. *Nat Genet* 43: 303-305.
46. Isidor B, Lindenbaum P, Pichon O, Bezieau S, Dina C, et al. (2011) Truncating mutations in the last exon of NOTCH2 cause a rare skeletal disorder with osteoporosis. *Nat Genet* 43: 306-308.
47. Majewski J, Schwartzenuber JA, Caqueret A, Patry L, Marcadier J, et al. (2011) Mutations in NOTCH2 in families with Hajdu-Cheney syndrome. *Hum Mutat* 32: 1114-1117.
48. Nefussi JR, Sautier JM, Nicolas V, Forest N (1991) How osteoblasts become osteocytes: a decreasing matrix forming process. *J Biol Buccale* 19: 75-82.
49. Cherian PP, Siller-Jackson AJ, Gu S, Wang X, Bonewald LF, 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.
50. Pead MJ, Lanyon LE (1989) Indomethacin modulation of load-related stimulation of new bone formation in vivo. *Calcif Tissue Int* 45: 34-40.
51. Malone AM, Anderson CT, Tummala P, Kwon RY, Johnston TR, et al. (2007) Primary cilia mediate mechanosensing in bone cells by a calcium-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 13325-13330.
52. Kitase Y, Barragan L, Qing H, Kondoh S, Jiang JX, et al. (2010) Mechanical induction of PGE2 in osteocytes blocks glucocorticoid-induced apoptosis through both the beta-catenin and PKA pathways. *J Bone Miner Res* 25: 2657-2668.
53. Jilka RL, Noble B, Weinstein RS (2013) Osteocyte apoptosis. *Bone* 54: 264-271.
54. Verborgt O, Gibson GJ, Schaffler MB (2000) Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo. *J Bone Miner Res* 15: 60-67.
55. Kramer I, Halleux C, Keller H, Pegurri M, Gooi JH, et al. (2010) Osteocyte Wnt/beta-catenin signaling is required for normal bone homeostasis. *Mol Cell Biol* 30: 3071-3085.
56. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, et al. (2011) Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 17: 1231-1234.
57. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, et al. (2003) Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J* 22: 6267-6276.
58. Burgers TA, Williams BO (2013) Regulation of Wnt/beta-catenin signaling within and from osteocytes. *Bone* 54: 244-249.
59. Bonewald LF, Wacker MJ (2013) FGF23 production by osteocytes. *Pediatr Nephrol* 28: 563-568.
60. Kamioka H, Miki Y, Sumitani K, Tagami K, Terai K, et al. (1995) Extracellular calcium causes the release of calcium from intracellular stores in chick osteocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 212: 692-696.
61. Belanger LF (1969) Osteocytic osteolysis. *Calcif Tissue Res* 4: 1-12.
62. Mikuni-Takagaki Y, Kakai Y, Satoyoshi M, Kawano E, Suzuki Y, et al. (1995) Matrix mineralization and the differentiation of osteocyte-like cells in culture. *J Bone Miner Res* 10: 231-242.
63. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337-342.
64. Teitelbaum SL (2000) Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289: 1504-1508.
65. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, et al. (1990) Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87: 7260-7264.
66. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, et al. (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3597-3602.
67. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, et al. (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93: 165-176.
68. Glass DA, 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, et al. (2005) Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 8: 751-764.

69. Lee SK, Lorenzo JA (1999) Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* 140: 3552-3561.
70. Datta NS, Abou-Samra AB (2009) PTH and PTHrP signaling in osteoblasts. *Cell Signal* 21: 1245-1254.
71. Rouleau MF, Mitchell J, Goltzman D (1988) In vivo distribution of parathyroid hormone receptors in bone: evidence that a predominant osseous target cell is not the mature osteoblast. *Endocrinology* 123: 187-191.
72. Vaananen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM (2000) The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 113 ( Pt 3): 377-381.
73. Ross FP, Teitelbaum SL (2005) alphavbeta3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. *Immunol Rev* 208: 88-105.
74. Segovia-Silvestre T, Neutzsky-Wulff AV, Sorensen MG, Christiansen C, Bollerslev J, et al. (2009) Advances in osteoclast biology resulting from the study of osteopetrotic mutations. *Hum Genet* 124: 561-577.
75. Teitelbaum SL, Ross FP (2003) Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4: 638-649.
76. Gowen M, Lazner F, Dodds R, Kapadia R, Feild J, et al. (1999) Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization. *J Bone Miner Res* 14: 1654-1663.
77. Goto T, Yamaza T, Tanaka T (2003) Cathepsins in the osteoclast. *J Electron Microsc (Tokyo)* 52: 551-558.
78. Okada Y, Naka K, Kawamura K, Matsumoto T, Nakanishi I, et al. (1995) Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. *Lab Invest* 72: 311-322.
79. Nakamura H, Sato G, Hirata A, Yamamoto T (2004) Immunolocalization of matrix metalloproteinase-13 on bone surface under osteoclasts in rat tibia. *Bone* 34: 48-56.
80. Minkin C (1982) Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 34: 285-290.
81. Halleen JM, Raisanen S, Salo JJ, Reddy SV, Roodman GD, et al. (1999) Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J Biol Chem* 274: 22907-22910.
82. Mundy GR (1993) Role of cytokines in bone resorption. *J Cell Biochem* 53: 296-300.
83. Garnero P, Gineyts E, Riou JP, Delmas PD (1994) Assessment of bone resorption with a new marker of collagen degradation in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 780-785.
84. Deldar A, Lewis H, Weiss L (1985) Bone lining cells and hematopoiesis: an electron microscopic study of canine bone marrow. *Anat Rec* 213: 187-201.
85. Chambers TJ, Darby JA, Fuller K (1985) Mammalian collagenase predisposes bone surfaces to osteoclastic resorption. *Cell Tissue Res* 241: 671-675.
86. Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J (2012) An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem* 45: 863-873.
87. Eriksen EF, Eghbali-Fatourehchi GZ, Khosla S (2007) Remodeling and vascular spaces in bone. *J Bone Miner Res* 22: 1-6.
88. Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F (2001) Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J Bone Miner Res* 16: 1575-1582.
89. Saito-Diaz K, Chen TW, Wang X, Thorne CA, Wallace HA, et al. (2013) The way Wnt works: components and mechanism. *Growth Factors* 31: 1-31.
90. Baron R, Kneissel M (2013) WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med* 19: 179-192.

91. Cadigan KM, Nusse R (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11: 3286-3305.
92. Nusse R, Varmus HE (1982) Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31: 99-109.
93. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287: 795-801.
94. Wong GT, Gavin BJ, McMahon AP (1994) Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Mol Cell Biol* 14: 6278-6286.
95. Niehrs C (2012) The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 767-779.
96. Clevers H (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127: 469-480.
97. Angers S, Moon RT (2009) Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 468-477.
98. Wang HY, Liu T, Malbon CC (2006) Structure-function analysis of Frizzleds. *Cell Signal* 18: 934-941.
99. Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC (2000) An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 407: 535-538.
100. Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, et al. (2000) LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407: 530-535.
101. Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, O'Keefe L, Schwartz S, et al. (2000) arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* 407: 527-530.
102. Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, et al. (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382: 638-642.
103. Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, et al. (1996) XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 86: 391-399.
104. Kohn AD, Moon RT (2005) Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium* 38: 439-446.
105. Komiya Y, Habas R (2008) Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4: 68-75.
106. Kuhl M (2004) The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. *Front Biosci* 9: 967-974.
107. Nishita M, Yoo SK, Nomachi A, Kani S, Sougawa N, et al. (2006) Filopodia formation mediated by receptor tyrosine kinase Ror2 is required for Wnt5a-induced cell migration. *J Cell Biol* 175: 555-562.
108. Lu X, Borchers AG, Jolicoeur C, Rayburn H, Baker JC, et al. (2004) PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. *Nature* 430: 93-98.
109. Sasai N, Nakazawa Y, Haraguchi T, Sasai Y (2004) The neurotrophin-receptor-related protein NRH1 is essential for convergent extension movements. *Nat Cell Biol* 6: 741-748.
110. Julian L, Olson MF (2014) Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): Structure, regulation, and functions. *Small GTPases* 5.
111. Liu F, Kohlmeier S, Wang CY (2008) Wnt signaling and skeletal development. *Cell Signal* 20: 999-1009.
112. Li Y, Dudley AT (2009) Noncanonical frizzled signaling regulates cell polarity of growth plate chondrocytes. *Development* 136: 1083-1092.
113. Theil T, Aydin S, Koch S, Grotewold L, Ruther U (2002) Wnt and Bmp signalling cooperatively regulate graded *Emx2* expression in the dorsal telencephalon. *Development* 129: 3045-3054.
114. Liu Y, Zhang R, Wang X, Huang F, Yan Z, et al. (2014) All-trans retinoic acid modulates bone morphogenic protein 9-induced osteogenesis and adipogenesis of preadipocytes through BMP/Smad and Wnt/beta-catenin signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 47: 47-56.
115. Semenov MV, Tamai K, Brott BK, Kuhl M, Sokol S, et al. (2001) Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol* 11: 951-961.
116. Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, et al. (2002) Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* 417: 664-667.

117. Hassler C, Cruciat CM, Huang YL, Kuriyama S, Mayor R, et al. (2007) Kremen is required for neural crest induction in *Xenopus* and promotes LRP6-mediated Wnt signaling. *Development* 134: 4255-4263.
118. Schulze J, Seitz S, Saito H, Schneebauer M, Marshall RP, et al. (2010) Negative regulation of bone formation by the transmembrane Wnt antagonist Kremen-2. *PLoS One* 5: e10309.
119. Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, et al. (2005) Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 280: 19883-19887.
120. Semenov M, Tamai K, He X (2005) SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem* 280: 26770-26775.
121. Bourhis E, Wang W, Tam C, Hwang J, Zhang Y, et al. (2011) Wnt antagonists bind through a short peptide to the first beta-propeller domain of LRP5/6. *Structure* 19: 1433-1442.
122. Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J (2008) Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci* 121: 737-746.
123. Hill TP, Spater D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C (2005) Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell* 8: 727-738.
124. Takada I, Mihara M, Suzawa M, Ohtake F, Kobayashi S, et al. (2007) A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation. *Nat Cell Biol* 9: 1273-1285.
125. Bennett CN, Ouyang H, Ma YL, Zeng Q, Gerin I, et al. (2007) Wnt10b increases postnatal bone formation by enhancing osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 22: 1924-1932.
126. Albers J, Keller J, Baranowsky A, Beil FT, Catala-Lehnen P, et al. (2013) Canonical Wnt signaling inhibits osteoclastogenesis independent of osteoprotegerin. *J Cell Biol* 200: 537-549.
127. Wei W, Zeve D, Suh JM, Wang X, Du Y, et al. (2011) Biphasic and dosage-dependent regulation of osteoclastogenesis by beta-catenin. *Mol Cell Biol* 31: 4706-4719.
128. Otero K, Shinohara M, Zhao H, Cella M, Gilfillan S, et al. (2012) TREM2 and beta-catenin regulate bone homeostasis by controlling the rate of osteoclastogenesis. *J Immunol* 188: 2612-2621.
129. Gong Y, Vikkula M, Boon L, Liu J, Beighton P, et al. (1996) Osteoporosis-pseudoglioma syndrome, a disorder affecting skeletal strength and vision, is assigned to chromosome region 11q12-13. *Am J Hum Genet* 59: 146-151.
130. Johnson ML, Gong G, Kimberling W, Recker SM, Kimmel DB, et al. (1997) Linkage of a gene causing high bone mass to human chromosome 11 (11q12-13). *Am J Hum Genet* 60: 1326-1332.
131. Frontali M, Stomeo C, Dallapiccola B (1985) Osteoporosis-pseudoglioma syndrome: report of three affected sibs and an overview. *Am J Med Genet* 22: 35-47.
132. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, et al. (2001) LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 107: 513-523.
133. Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, et al. (2002) High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 346: 1513-1521.
134. Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, Dupuis J, Osborne M, et al. (2002) A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet* 70: 11-19.
135. Chen L, Wang K, Shao Y, Huang J, Li X, et al. (2008) Structural insight into the mechanisms of Wnt signaling antagonism by Dkk. *J Biol Chem* 283: 23364-23370.
136. Keupp K, Beleggia F, Kayserili H, Barnes AM, Steiner M, et al. (2013) Mutations in WNT1 cause different forms of bone fragility. *Am J Hum Genet* 92: 565-574.
137. Joeng KS, Lee YC, Jiang MM, Bertin TK, Chen Y, et al. (2014) The swaying mouse as a model of osteogenesis imperfecta caused by WNT1 mutations. *Hum Mol Genet* 23: 4035-4042.
138. Laine CM, Joeng KS, Campeau PM, Kiviranta R, Tarkkonen K, et al. (2013) WNT1 mutations in early-onset osteoporosis and osteogenesis imperfecta. *N Engl J Med* 368: 1809-1816.

139. Pyott SM, Tran TT, Leistriz DF, Pepin MG, Mendelsohn NJ, et al. (2013) WNT1 mutations in families affected by moderately severe and progressive recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 92: 590-597.
140. Velazquez-Cruz R, Garcia-Ortiz H, Castillejos-Lopez M, Quiterio M, Valdes-Flores M, et al. (2014) WNT3A gene polymorphisms are associated with bone mineral density variation in postmenopausal mestizo women of an urban Mexican population: findings of a pathway-based high-density single nucleotide screening. *Age (Dordr)* 36: 9635.
141. Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS (2004) Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 93: 1210-1230.
142. Baksh D, Boland GM, Tuan RS (2007) Cross-talk between Wnt signaling pathways in human mesenchymal stem cells leads to functional antagonism during osteogenic differentiation. *J Cell Biochem* 101: 1109-1124.
143. Wang B, Sinha T, Jiao K, Serra R, Wang J (2011) Disruption of PCP signaling causes limb morphogenesis and skeletal defects and may underlie Robinow syndrome and brachydactyly type B. *Hum Mol Genet* 20: 271-285.
144. Tu X, Joeng KS, Nakayama KI, Nakayama K, Rajagopal J, et al. (2007) Noncanonical Wnt signaling through G protein-linked PKCdelta activation promotes bone formation. *Dev Cell* 12: 113-127.
145. Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, et al. (2005) Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3324-3329.
146. Stevens JR, Miranda-Carboni GA, Singer MA, Brugger SM, Lyons KM, et al. (2010) Wnt10b deficiency results in age-dependent loss of bone mass and progressive reduction of mesenchymal progenitor cells. *J Bone Miner Res* 25: 2138-2147.
147. Garcia-Ibarbia C, Perez-Nunez MI, Olmos JM, Valero C, Perez-Aguilar MD, et al. (2013) Missense polymorphisms of the WNT16 gene are associated with bone mass, hip geometry and fractures. *Osteoporos Int* 24: 2449-2454.
148. Koller DL, Zheng HF, Karasik D, Yerges-Armstrong L, Liu CT, et al. (2013) Meta-analysis of genome-wide studies identifies WNT16 and ESR1 SNPs associated with bone mineral density in premenopausal women. *J Bone Miner Res* 28: 547-558.
149. Albers J, Schulze J, Beil FT, Gebauer M, Baranowsky A, et al. (2011) Control of bone formation by the serpentine receptor Frizzled-9. *J Cell Biol* 192: 1057-1072.
150. Heilmann A, Schinke T, Bindl R, Wehner T, Rapp A, et al. (2013) The Wnt serpentine receptor Frizzled-9 regulates new bone formation in fracture healing. *PLoS One* 8: e84232.
151. Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, et al. (2009) New sequence variants associated with bone mineral density. *Nat Genet* 41: 15-17.
152. Leupin O, Piters E, Halleux C, Hu S, Kramer I, et al. (2011) Bone overgrowth-associated mutations in the LRP4 gene impair sclerostin facilitator function. *J Biol Chem* 286: 19489-19500.
153. Choi HY, Dieckmann M, Herz J, Niemeier A (2009) Lrp4, a novel receptor for Dickkopf 1 and sclerostin, is expressed by osteoblasts and regulates bone growth and turnover in vivo. *PLoS One* 4: e7930.
154. Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH, 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.
155. Cui Y, Niziolek PJ, MacDonald BT, Zylstra CR, Alenina N, et al. (2011) Lrp5 functions in bone to regulate bone mass. *Nat Med* 17: 684-691.
156. Babij P, Zhao W, Small C, Kharode Y, Yaworsky PJ, et al. (2003) High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene. *J Bone Miner Res* 18: 960-974.
157. Holmen SL, Giambernardi TA, Zylstra CR, Buckner-Berghuis BD, Resau JH, et al. (2004) Decreased BMD and limb deformities in mice carrying mutations in both Lrp5 and Lrp6. *J Bone Miner Res* 19: 2033-2040.

158. Van Wesenbeeck L, Cleiren E, Gram J, Beals RK, Benichou O, et al. (2003) Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density. *Am J Hum Genet* 72: 763-771.
159. Kubota T, Michigami T, Sakaguchi N, Kokubu C, Suzuki A, et al. (2008) Lrp6 hypomorphic mutation affects bone mass through bone resorption in mice and impairs interaction with Mesd. *J Bone Miner Res* 23: 1661-1671.
160. Riancho JA, Olmos JM, Pineda B, Garcia-Ibarbia C, Perez-Nunez MI, et al. (2011) Wnt receptors, bone mass, and fractures: gene-wide association analysis of LRP5 and LRP6 polymorphisms with replication. *Eur J Endocrinol* 164: 123-131.
161. Riddle RC, Diegel CR, Leslie JM, Van Koeveering KK, Faugere MC, et al. (2013) Lrp5 and Lrp6 exert overlapping functions in osteoblasts during postnatal bone acquisition. *PLoS One* 8: e63323.
162. Bodine PV, Zhao W, Kharode YP, Bex FJ, Lambert AJ, et al. (2004) The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice. *Mol Endocrinol* 18: 1222-1237.
163. Bodine PV, Billiard J, Moran RA, Ponce-de-Leon H, McLarney S, et al. (2005) The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 controls osteoblast and osteocyte apoptosis. *J Cell Biochem* 96: 1212-1230.
164. Liu D, Wise GE (2007) A DNA microarray analysis of chemokine and receptor genes in the rat dental follicle--role of secreted frizzled-related protein-1 in osteoclastogenesis. *Bone* 41: 266-272.
165. Yao W, Cheng Z, Shahnazari M, Dai W, Johnson ML, et al. (2010) Overexpression of secreted frizzled-related protein 1 inhibits bone formation and attenuates parathyroid hormone bone anabolic effects. *J Bone Miner Res* 25: 190-199.
166. Nakanishi R, Akiyama H, Kimura H, Otsuki B, Shimizu M, et al. (2008) Osteoblast-targeted expression of Sfrp4 in mice results in low bone mass. *J Bone Miner Res* 23: 271-277.
167. Morvan F, Boulukos K, Clement-Lacroix P, Roman Roman S, Suc-Royer I, et al. (2006) Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *J Bone Miner Res* 21: 934-945.
168. Li J, Sarosi I, Cattle RC, Pretorius J, Asuncion F, et al. (2006) Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone* 39: 754-766.
169. Wang FS, Ko JY, Lin CL, Wu HL, Ke HJ, et al. (2007) Knocking down dickkopf-1 alleviates estrogen deficiency induction of bone loss. A histomorphological study in ovariectomized rats. *Bone* 40: 485-492.
170. Yao GQ, Wu JJ, Troiano N, Insogna K (2011) Targeted overexpression of Dkk1 in osteoblasts reduces bone mass but does not impair the anabolic response to intermittent PTH treatment in mice. *J Bone Miner Metab* 29: 141-148.
171. Li L, Mao J, Sun L, Liu W, Wu D (2002) Second cysteine-rich domain of Dickkopf-2 activates canonical Wnt signaling pathway via LRP-6 independently of dishevelled. *J Biol Chem* 277: 5977-5981.
172. Li X, Liu P, Liu W, Maye P, Zhang J, et al. (2005) Dkk2 has a role in terminal osteoblast differentiation and mineralized matrix formation. *Nat Genet* 37: 945-952.
173. Sims AM, Shephard N, Carter K, Doan T, Dowling A, et al. (2008) Genetic analyses in a sample of individuals with high or low BMD shows association with multiple Wnt pathway genes. *J Bone Miner Res* 23: 499-506.
174. Ellwanger K, Saito H, Clement-Lacroix P, Maltry N, Niedermeyer J, et al. (2008) Targeted disruption of the Wnt regulator Kremen induces limb defects and high bone density. *Mol Cell Biol* 28: 4875-4882.
175. Balemans W, Ebeling M, Patel N, Van Hul E, Olson P, et al. (2001) Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet* 10: 537-543.

176. Loots GG, Kneissel M, Keller H, Baptist M, Chang J, et al. (2005) Genomic deletion of a long-range bone enhancer misregulates sclerostin in Van Buchem disease. *Genome Res* 15: 928-935.
177. Li X, Ominsky MS, Niu QT, Sun N, Daugherty B, et al. (2008) Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J Bone Miner Res* 23: 860-869.
178. He JW, Yue H, Hu WW, Hu YQ, Zhang ZL (2011) Contribution of the sclerostin domain-containing protein 1 (SOSTDC1) gene to normal variation of peak bone mineral density in Chinese women and men. *J Bone Miner Metab* 29: 571-581.
179. Ellies DL, Economou A, Viviano B, Rey JP, Paine-Saunders S, et al. (2014) Wise regulates bone deposition through genetic interactions with Lrp5. *PLoS One* 9: e96257.
180. Ai M, Holmen SL, Van Hul W, Williams BO, Warman ML (2005) Reduced affinity to and inhibition by DKK1 form a common mechanism by which high bone mass-associated missense mutations in LRP5 affect canonical Wnt signaling. *Mol Cell Biol* 25: 4946-4955.
181. Holmen SL, Zylstra CR, Mukherjee A, Sigler RE, Faugere MC, et al. (2005) Essential role of beta-catenin in postnatal bone acquisition. *J Biol Chem* 280: 21162-21168.
182. Yadav VK, Ryu JH, Suda N, Tanaka KF, Gingrich JA, et al. (2008) Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell* 135: 825-837.
183. Brunkow ME, Gardner JC, Van Ness J, Paeper BW, Kovacevich BR, et al. (2001) Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am J Hum Genet* 68: 577-589.
184. Ellies DL, Viviano B, McCarthy J, Rey JP, Itasaki N, et al. (2006) Bone density ligand, Sclerostin, directly interacts with LRP5 but not LRP5G171V to modulate Wnt activity. *J Bone Miner Res* 21: 1738-1749.
185. Semenov MV, He X (2006) LRP5 mutations linked to high bone mass diseases cause reduced LRP5 binding and inhibition by SOST. *J Biol Chem* 281: 38276-38284.
186. Chang MK, Kramer I, Keller H, Gooi JH, Collett C, et al. (2014) Reversing LRP5-dependent osteoporosis and SOST deficiency-induced sclerosing bone disorders by altering WNT signaling activity. *J Bone Miner Res* 29: 29-42.
187. McClung MR, Grauer A, Boonen S, Bolognese MA, Brown JP, et al. (2014) Romosozumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 370: 412-420.
188. McColm J, Hu L, Womack T, Tang CC, Chiang AY (2014) Single- and multiple-dose randomized studies of blosozumab, a monoclonal antibody against sclerostin, in healthy postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 29: 935-943.
189. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284: 770-776.
190. Zanotti S, Canalis E (2010) Notch and the skeleton. *Mol Cell Biol* 30: 886-896.
191. Fortini ME (2009) Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Dev Cell* 16: 633-647.
192. Struhl G, Adachi A (1998) Nuclear access and action of notch in vivo. *Cell* 93: 649-660.
193. Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, et al. (1995) Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 377: 355-358.
194. Kopan R, Ilagan MX (2009) The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137: 216-233.
195. Rechsteiner M, Rogers SW (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21: 267-271.
196. Feller J, Schneider A, Schuster-Gossler K, Gossler A (2008) Noncyclic Notch activity in the presomitic mesoderm demonstrates uncoupling of somite compartmentalization and boundary formation. *Genes Dev* 22: 2166-2171.
197. Kageyama R, Masamizu Y, Niwa Y (2007) Oscillator mechanism of Notch pathway in the segmentation clock. *Dev Dyn* 236: 1403-1409.

198. Redmond L, Oh SR, Hicks C, Weinmaster G, Ghosh A (2000) Nuclear Notch1 signaling and the regulation of dendritic development. *Nat Neurosci* 3: 30-40.
199. Kume T (2012) Ligand-dependent Notch signaling in vascular formation. *Adv Exp Med Biol* 727: 210-222.
200. Apelqvist A, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, et al. (1999) Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400: 877-881.
201. Crosnier C, Vargesson N, Gschmeissner S, Ariza-McNaughton L, Morrison A, et al. (2005) Delta-Notch signalling controls commitment to a secretory fate in the zebrafish intestine. *Development* 132: 1093-1104.
202. Watanabe N, Tezuka Y, Matsuno K, Miyatani S, Morimura N, et al. (2003) Suppression of differentiation and proliferation of early chondrogenic cells by Notch. *J Bone Miner Metab* 21: 344-352.
203. Nobta M, Tsukazaki T, Shibata Y, Xin C, Moriishi T, et al. (2005) Critical regulation of bone morphogenetic protein-induced osteoblastic differentiation by Delta1/Jagged1-activated Notch1 signaling. *J Biol Chem* 280: 15842-15848.
204. Yamada T, Yamazaki H, Yamane T, Yoshino M, Okuyama H, et al. (2003) Regulation of osteoclast development by Notch signaling directed to osteoclast precursors and through stromal cells. *Blood* 101: 2227-2234.
205. Engin F, Yao Z, Yang T, Zhou G, Bertin T, et al. (2008) Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis. *Nat Med* 14: 299-305.
206. Canalis E, Parker K, Feng JQ, Zanotti S (2013) Osteoblast lineage-specific effects of notch activation in the skeleton. *Endocrinology* 154: 623-634.
207. Hilton MJ, Tu X, Wu X, Bai S, Zhao H, et al. (2008) Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation. *Nat Med* 14: 306-314.
208. Zanotti S, Smerdel-Ramoya A, Stadmeier L, Durant D, Radtke F, et al. (2008) Notch inhibits osteoblast differentiation and causes osteopenia. *Endocrinology* 149: 3890-3899.
209. Tao J, Chen S, Yang T, Dawson B, Munivez E, et al. (2010) Osteosclerosis owing to Notch gain of function is solely Rbpj-dependent. *J Bone Miner Res* 25: 2175-2183.
210. World Health Organization. (1994) Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 843: 1-129.
211. World Health Organization. (2004) *The World health report : 2004 : Changing history*. Geneva: World Health Organization. 169 p. p.
212. Kanis JA, Oden A, McCloskey EV, Johansson H, Wahl DA, et al. (2012) A systematic review of hip fracture incidence and probability of fracture worldwide. *Osteoporos Int* 23: 2239-2256.
213. Haussler B, Gothe H, Gol D, Glaeske G, Pientka L, et al. (2007) Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study. *Osteoporos Int* 18: 77-84.
214. Kanis JA, Borgstrom F, De Laet C, Johansson H, Johnell O, et al. (2005) Assessment of fracture risk. *Osteoporos Int* 16: 581-589.
215. Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Cooper C, Rizzoli R, et al. (2013) European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 24: 23-57.
216. Frost HM (1969) Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcif Tissue Res* 3: 211-237.
217. Honig S, Rajapakse CS, Chang G (2013) Current treatment approaches to osteoporosis - 2013. *Bull Hosp Jt Dis* (2013) 71: 184-188.
218. Duque G, Troen BR (2008) Understanding the mechanisms of senile osteoporosis: new facts for a major geriatric syndrome. *J Am Geriatr Soc* 56: 935-941.
219. Power ML, Heaney RP, Kalkwarf HJ, Pitkin RM, Repke JT, et al. (1999) The role of calcium in health and disease. *Am J Obstet Gynecol* 181: 1560-1569.
220. Wu S, Liu Y, Zhang L, Han Y, Lin Y, et al. (2013) Genome-wide approaches for identifying genetic risk factors for osteoporosis. *Genome Med* 5: 44.

221. Tobias JH, Gould V, Brunton L, Deere K, Rittweger J, et al. (2014) Physical Activity and Bone: May the Force be with You. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5: 20.
222. Walker-Bone K (2012) Recognizing and treating secondary osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol* 8: 480-492.
223. Amling M, Grote HJ, Posl M, Hahn M, Delling G (1994) Polyostotic heterogeneity of the spine in osteoporosis. Quantitative analysis and three-dimensional morphology. *Bone Miner* 27: 193-208.
224. Old JL, Calvert M (2004) Vertebral compression fractures in the elderly. *Am Fam Physician* 69: 111-116.
225. Johnell O, Kanis J (2005) Epidemiology of osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 16 Suppl 2: S3-7.
226. Moyer VA, LeFevre ML, Siu AL (2013) Vitamin D and calcium supplementation to prevent fractures in adults. *Ann Intern Med* 159: 856-857.
227. Das S, Crockett JC (2013) Osteoporosis - a current view of pharmacological prevention and treatment. *Drug Des Devel Ther* 7: 435-448.
228. Fleisch H (2002) Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res* 4: 30-34.
229. Cummings SR, San Martin J, McClung MR, Siris ES, Eastell R, et al. (2009) Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 361: 756-765.
230. O'Donnell S, Cranney A, Wells GA, Adachi JD, Reginster JY (2006) Strontium ranelate for preventing and treating postmenopausal osteoporosis. *Cochrane Database Syst Rev*: CD005326.
231. Busse B, Jobke B, Hahn M, Priemel M, Niecke M, et al. (2010) Effects of strontium ranelate administration on bisphosphonate-altered hydroxyapatite: Matrix incorporation of strontium is accompanied by changes in mineralization and microstructure. *Acta Biomater* 6: 4513-4521.
232. Fratzl P, Roschger P, Eschberger J, Abendroth B, Klaushofer K (1994) Abnormal bone mineralization after fluoride treatment in osteoporosis: a small-angle x-ray-scattering study. *J Bone Miner Res* 9: 1541-1549.
233. Greenspan SL, Bone HG, Ettinger MP, Hanley DA, Lindsay R, et al. (2007) Effect of recombinant human parathyroid hormone (1-84) on vertebral fracture and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 146: 326-339.
234. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, et al. (2001) Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 344: 1434-1441.
235. Tolar J, Teitelbaum SL, Orchard PJ (2004) Osteopetrosis. *N Engl J Med* 351: 2839-2849.
236. Stark Z, Savarirayan R (2009) Osteopetrosis. *Orphanet J Rare Dis* 4: 5.
237. Driessen GJ, Gerritsen EJ, Fischer A, Fasth A, Hop WC, et al. (2003) Long-term outcome of haematopoietic stem cell transplantation in autosomal recessive osteopetrosis: an EBMT report. *Bone Marrow Transplant* 32: 657-663.
238. Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS, Kostenuik PJ, Dougall WC, et al. (2012) Bench to bedside: elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab. *Nat Rev Drug Discov* 11: 401-419.
239. Balemans W, Patel N, Ebeling M, Van Hul E, Wuyts W, et al. (2002) Identification of a 52 kb deletion downstream of the SOST gene in patients with van Buchem disease. *J Med Genet* 39: 91-97.
240. Hamersma H, Gardner J, Beighton P (2003) The natural history of sclerosteosis. *Clin Genet* 63: 192-197.
241. Hajdu N, Kauntze R (1948) Cranio-skeletal dysplasia. *Br J Radiol* 21: 42-48.
242. Cheney WD (1965) Acro-Osteolysis. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 94: 595-607.

243. Iwaya T, Taniguchi K, Watanabe J, Iinuma K, Hamazaki Y, et al. (1979) Hajdu-Cheney syndrome. *Arch Orthop Trauma Surg* 95: 293-302.
244. Zhao W, Petit E, Gafni RI, Collins MT, Robey PG, et al. (2013) Mutations in NOTCH2 in patients with Hajdu-Cheney syndrome. *Osteoporos Int* 24: 2275-2281.
245. Paget J (1877) On a Form of Chronic Inflammation of Bones (Osteitis Deformans). *Med Chir Trans* 60: 37-64 39.
246. Barker DJ, Clough PW, Guyer PB, Gardner MJ (1977) Paget's disease of bone in 14 British towns. *Br Med J* 1: 1181-1183.
247. Cooper C, Harvey NC, Dennison EM, van Staa TP (2006) Update on the epidemiology of Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res* 21 Suppl 2: P3-8.
248. Tan A, Ralston SH (2014) Paget's disease of bone. *QJM*.
249. Ziegler R, Holz G, Rotzler B, Minne H (1985) Paget's disease of bone in West Germany. Prevalence and distribution. *Clin Orthop Relat Res*: 199-204.
250. Mangham DC, Davie MW, Grimer RJ (2009) Sarcoma arising in Paget's disease of bone: declining incidence and increasing age at presentation. *Bone* 44: 431-436.
251. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9: 676-682.
252. Doube M, Klosowski MM, Arganda-Carreras I, Cordeliers FP, Dougherty RP, et al. (2010) BoneJ: Free and extensible bone image analysis in ImageJ. *Bone* 47: 1076-1079.
253. Rossert J, Eberspaecher H, de Crombrughe B (1995) Separate cis-acting DNA elements of the mouse pro-alpha 1(I) collagen promoter direct expression of reporter genes to different type I collagen-producing cells in transgenic mice. *J Cell Biol* 129: 1421-1432.
254. Dacquin R, Starbuck M, Schinke T, Karsenty G (2002) Mouse alpha1(I)-collagen promoter is the best known promoter to drive efficient Cre recombinase expression in osteoblast. *Dev Dyn* 224: 245-251.
255. Ranheim EA, Kwan HC, Reya T, Wang YK, Weissman IL, et al. (2005) Frizzled 9 knock-out mice have abnormal B-cell development. *Blood* 105: 2487-2494.
256. Niziolek PJ, Farmer TL, Cui Y, Turner CH, Warman ML, et al. (2011) High-bone-mass-producing mutations in the Wnt signaling pathway result in distinct skeletal phenotypes. *Bone* 49: 1010-1019.
257. Niziolek PJ, Warman ML, Robling AG (2012) Mechanotransduction in bone tissue: The A214V and G171V mutations in Lrp5 enhance load-induced osteogenesis in a surface-selective manner. *Bone* 51: 459-465.
258. Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Forster I (1999) Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* 8: 265-277.
259. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, et al. (1987) Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2: 595-610.
260. Pistoia W, van Rietbergen B, Lochmuller EM, Lill CA, Eckstein F, et al. (2002) Estimation of distal radius failure load with micro-finite element analysis models based on three-dimensional peripheral quantitative computed tomography images. *Bone* 30: 842-848.
261. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, et al. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
262. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
263. Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517.
264. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

265. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4354.
266. Kawasaki A, Torii K, Yamashita Y, Nishizawa K, Kanekura K, et al. (2007) Wnt5a promotes adhesion of human dermal fibroblasts by triggering a phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signal. *Cell Signal* 19: 2498-2506.
267. Zhang Y, Wang Y, Li X, Zhang J, Mao J, et al. (2004) The LRP5 high-bone-mass G171V mutation disrupts LRP5 interaction with Mesd. *Mol Cell Biol* 24: 4677-4684.
268. Bao J, Zheng JJ, Wu D (2012) The structural basis of DKK-mediated inhibition of Wnt/LRP signaling. *Sci Signal* 5: pe22.
269. van Meurs JB, Rivadeneira F, Jhamai M, Hugens W, Hofman A, et al. (2006) Common genetic variation of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6 genes determines fracture risk in elderly white men. *J Bone Miner Res* 21: 141-150.
270. Kedlaya R, Veera S, Horan DJ, Moss RE, Ayturk UM, et al. (2013) Sclerostin inhibition reverses skeletal fragility in an Lrp5-deficient mouse model of OPPG syndrome. *Sci Transl Med* 5: 211ra158.
271. Kusu N, Laurikkala J, Imanishi M, Usui H, Konishi M, et al. (2003) Sclerostin is a novel secreted osteoclast-derived bone morphogenetic protein antagonist with unique ligand specificity. *J Biol Chem* 278: 24113-24117.
272. Mao B, Wu W, Li Y, Hoppe D, Stannek P, et al. (2001) LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 411: 321-325.
273. Bafico A, Liu G, Yaniv A, Gazit A, Aaronson SA (2001) Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol* 3: 683-686.
274. Deregowski V, Gazzero E, Priest L, Rydziel S, Canalis E (2006) Notch 1 overexpression inhibits osteoblastogenesis by suppressing Wnt/beta-catenin but not bone morphogenetic protein signaling. *J Biol Chem* 281: 6203-6210.
275. Dallas DJ, Genever PG, Patton AJ, Millichip MI, McKie N, et al. (1999) Localization of ADAM10 and Notch receptors in bone. *Bone* 25: 9-15.
276. Bai S, Kopan R, Zou W, Hilton MJ, Ong CT, et al. (2008) NOTCH1 regulates osteoclastogenesis directly in osteoclast precursors and indirectly via osteoblast lineage cells. *J Biol Chem* 283: 6509-6518.
277. Canalis E, Adams DJ, Boskey A, Parker K, Kranz L, et al. (2013) Notch signaling in osteocytes differentially regulates cancellous and cortical bone remodeling. *J Biol Chem* 288: 25614-25625.
278. Zanotti S, Canalis E (2014) Notch1 and Notch2 expression in osteoblast precursors regulates femoral microarchitecture. *Bone* 62: 22-28.
279. Abdallah BM, Bay-Jensen AC, Srinivasan B, Tabassi NC, Garnero P, et al. (2011) Estrogen inhibits Dlk1/FA1 production: a potential mechanism for estrogen effects on bone turnover. *J Bone Miner Res* 26: 2548-2551.
280. Chen S, Lee BH, Bae Y (2014) Notch signaling in skeletal stem cells. *Calcif Tissue Int* 94: 68-77.
281. Temtamy SA, Aglan MS (2008) Brachydactyly. *Orphanet J Rare Dis* 3: 15.
282. Gridley T (2003) Notch signaling and inherited disease syndromes. *Hum Mol Genet* 12 Spec No 1: R9-13.
283. Bulman MP, Kusumi K, Frayling TM, McKeown C, Garrett C, et al. (2000) Mutations in the human delta homologue, DLL3, cause axial skeletal defects in spondylocostal dysostosis. *Nat Genet* 24: 438-441.
284. Dunwoodie SL, Clements M, Sparrow DB, Sa X, Conlon RA, et al. (2002) Axial skeletal defects caused by mutation in the spondylocostal dysplasia/pudgy gene Dll3 are associated with disruption of the segmentation clock within the presomitic mesoderm. *Development* 129: 1795-1806.

285. Crosnier C, Driancourt C, Raynaud N, Dhorne-Pollet S, Pollet N, et al. (1999) Mutations in JAGGED1 gene are predominantly sporadic in Alagille syndrome. *Gastroenterology* 116: 1141-1148.
286. Kamath BM, Bauer RC, Loomes KM, Chao G, Gerfen J, et al. (2012) NOTCH2 mutations in Alagille syndrome. *J Med Genet* 49: 138-144.
287. Alagille D, Estrada A, Hadchouel M, Gautier M, Odievre M, et al. (1987) Syndromic paucity of interlobular bile ducts (Alagille syndrome or arteriohepatic dysplasia): review of 80 cases. *J Pediatr* 110: 195-200.
288. Emerick KM, Rand EB, Goldmuntz E, Krantz ID, Spinner NB, et al. (1999) Features of Alagille syndrome in 92 patients: frequency and relation to prognosis. *Hepatology* 29: 822-829.
289. Turnpenny PD, Ellard S (2012) Alagille syndrome: pathogenesis, diagnosis and management. *Eur J Hum Genet* 20: 251-257.
290. Zanotti S, Canalis E (2013) Notch signaling in skeletal health and disease. *Eur J Endocrinol* 168: R95-103.

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1:** Modifiziert nach M. Villarreal & Furfur, 2007 und S. Muskopf, 2014. A: M. Villarreal & Furfur, 2007, bereitgestellt unter der Lizenz CC BY-SA 3.0 B: Bezogen am 20.07.2014 von [http://www.biologycorner.com/worksheets/rat\\_external.html](http://www.biologycorner.com/worksheets/rat_external.html) wo die Abbildung von S. Muskopf unter der Lizenz CC BY-NC 3.0 bereitgestellt wurde.

**Abbildung 2:** Wiederverwendung und Übersetzung aus *Materials Science and Engineering C*, 26, Nalla RK, Kruzic JJ, Kinney JH, Balooch M, Ager JW III, Ritchie RO, Role of microstructure in the aging-related deterioration of the toughness of human cortical bone, 1251-1260, Copyright (2006), mit Genehmigung von Elsevier.

Reprint and translation from *Materials Science and Engineering C*, 26, Nalla RK, Kruzic JJ, Kinney JH, Balooch M, Ager JW III, Ritchie RO, Role of microstructure in the aging-related deterioration of the toughness of human cortical bone, 1251-1260, Copyright (2006), with permission from Elsevier.

**Abbildung 3:** Angepasst nach Yorgan TA und Schinke T, Relevance of Wnt signaling for osteoanabolic therapy, *Molecular and Cellular Therapies*, 2014 2:22 (14 July 2014). Die Verwendung erfolgte in Übereinstimmung mit dem Open Access Konzept von BioMed Central Ltd unter der Lizenz CC BY-NC 4.0

**Abbildung 4:** Die Abbildung wurde basierend auf der in Bellido T, Osteocyte-driven bone remodeling, *Calcif Tissue Int*, 2014 Jan, 94(1):25-34 veröffentlichten Figure 1A erstellt.

**Abbildung 5:** Angepasst mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: [Nature Reviews Molecular Cell Biology] (Niehrs C, The complex world of WNT receptor signaling, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012 Dec, 13(12):767-79), Urheberrecht (2012)

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [Nature Reviews Molecular Cell Biology] (Niehrs C, The complex world of WNT receptor signaling, Nat Rev Mol Cell Biol, 2012 Dec, 13(12):767-79), copyright (2012)

**Abbildung 6:** Angepasst nach Yorgan TA und Schinke T, Relevance of Wnt signaling for osteoanabolic therapy, Molecular and Cellular Therapies, 2014 2:22 (14 July 2014). Die Verwendung erfolgte in Übereinstimmung mit dem Open Access Konzept von BioMed Central Ltd unter der Lizenz CC BY-NC 4.0

**Abbildung 7:** Angepasst nach Borggreffe T und Oswald F, The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes, Cell Mol Life Sci, 2009 May, 66(10):1631-46. Die Verwendung erfolgte in Übereinstimmung mit dem Open Access Konzept der Springer-Verlag GmbH unter der Lizenz CC BY-NC 4.0

Alle weiteren Abbildungen wurden für diese Arbeit erstellt.

## 10 Abkürzungsverzeichnis

Die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen sind in der nachfolgenden Liste aufgeführt.

Abkürzungen der verwendeten Chemikalien sind in Abschnitt 4.1.3 aufgeführt.

<u>Abkürzung</u>	<u>Vollständig</u>
μCT	Mikro Computertomographie
A213	<i>Lrp5</i> <sup>A213V/A213V</sup> Genotyp
A213V	<i>Lrp5</i> <sup>A213V/A213V</sup> Genotyp
ANOVA	Analysis of Variance = Varianzanalyse
APC	Adenomatous Polyposis Coli
Apcdd1	Adenomatosis Polyposis Coli Down-Regulated 1
ASBMR	American Society for Bone and Mineral Research
Axin	Axis Inhibition Protein
BFR/BS	Bone Formation Rate per Bone Surface = Knochenformationsrate pro Knochenoberfläche
Bglap	Bone Gamma-Carboxylglutamic Acid-Containing Protein = OCN
BMP	Bone Morphogenic Protein
BMU	Bone Multicellular Units
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BV/TV	Bone Volume per Tissue Volume = Knochenvolumen pro Gewebevolumen
C.Por	Cortical Porosity = kortikale Porosität
C.Th	Cortical Thickness = kortikale Dicke
Cbfa1	Core-binding Factor Subunit Alpha-1, = Runx2
CD	Cluster of Differentiation = Unterscheidungsgruppe
cDNA	complementary DNA = komplementäre DNA
CK1α	Casein Kinase 1, alpha
Clcn7	Chloride Channel, Voltage-Sensitive 7
Col1a1	Kollagen, Typ I, alpha 1
CtIP	CtBP-Interacting Protein
CTx	Crosslaps
Cxcl5	Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 5
DAAM1	Dishevelled Associated Activator of Morphogenesis 1
Dkk	Dickkopf
Dlk	Delta-Like Homolog
Dll	Distal-Less
Dmp1	Dentin Matrix Protein 1
DNA	Deoxyribonucleic Acid = Desoxyribonukleinsäure
DNER	Delta/Notch-Like EGF-Related Receptor
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dpi	dots per inch = Punkte pro Zoll
Dvl	Dishevelled
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
E <sub>mod</sub>	Elastizitätsmodul
ETO	Runt-Related Transcription Factor 1; Translocated to, 1

FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting = Durchflusszytometrie
$F_{\text{Break}}$	Kraft beim Bruch
FCS	Fetal Calf Serum = Fötales Kälberserum
FEA	Finite Elemente Analyse
FGF23	Fibroblast Growth Factor 23
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
$F_{\text{max}}$	Maximale Kraft
Fzd	Frizzled
<i>Fzd9</i> -KO	<i>Frizzled9</i> -defizienter Genotyp
G170	<i>Lrp5</i> <sup>G170V/G170V</sup> Genotyp
G170V	<i>Lrp5</i> <sup>G170V/G170V</sup> Genotyp
gDNA	genomische DNA
GSK3 $\beta$	Glycogen Synthase Kinase 3 beta
GWAS	Genome Wide Association Study = Genomweite Assoziationsstudie
HBM	High Bone Mass = Hohe Knochenmasse
HCS	Hajdu-Cheney Syndrom
HES	Hairy and Enhancer of Split
HEY	Hairy Ears, Y-Linked
HRP	Horse Raddish Peroxidase = Meerrettichperoxidase
Ibsp	Integrin Binding Sialoprotein
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
JAG	Jagged
JNK	c-Jun N-Terminal Kinase
JUN	Jun Proto-Oncogene
k.M	konditioniertes Medium
kB	Kilobasen
KI	Knock-In
KO	Knock-Out
Krm2	Kremen 2
Krm2-Tg	<i>Col1a1-Krm2</i> -Transgen
kVp	kilovolt peak = maximale Spannung
LB	Lysogeny Broth
Lef	Lymphoid Enhancer-Binding Factor
Lrp	Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein
MAGP	Microfibril-Associated Glycoprotein
Maml	Mastermind-like
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MEPE	Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein
Ms.D	Midshaft Diameter = Durchmesser im mittleren Schaftbereich
MSC	Mesenchymal Stem Cell = Mesenchymale Stammzelle
N.Ob/B.Pm	Number of Osteoblasts per Bone Perimeter = Osteoblastenanzahl pro Knochenumfang
N.Oc/B.Pm	Number of Osteoclasts per Bone Perimeter = Osteoklastenanzahl pro Knochenumfang
N.Ot/B.Ar	Number of Osteocytes per Bone Area = Osteozytenanzahl pro Knochenfläche
NICD	Notch Intracellular Domain
NOV	Nephroblastoma Overexpressed
NRH1	Neurotrophin Receptor Homolog

Ob.S/BS	Osteoblast Surface per Bone Surface = Osteoblastenoberfläche pro Knochenoberfläche
Obl	Osteoblast
Oc.S/BS	Osteoclast Surface per Bone Surface = Osteoklastenoberfläche pro Knochenoberfläche
Ocl	Osteoklast
OCN	Osteocalcin = Bglap
Opg	Osteoprotegerin
OPPG	Osteoporose Pseudoglioma Syndrom
OSE2	Osteoblast-Specific Element 2
Osx	Osterix
Ot	Osteozyt
OV/BV	Osteoid Volume per Tissue Volume = Osteoidvolumen pro Gewebevolumen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline = Phosphatgepufferte Salzlösung</i>
PCP	Planar Cell Polarity
PCR	Polymerase Chain Reaction= Polymerase Kettenreaktion
PE	Phytoerythrin
PEST	Proline-, Glutamin-, Serin-, und Threonin-reich
PHEX	Phosphate Regulating Endopeptidase Homolog, X-linked
PICP	Prokollagen-I C-terminales Peptid
PINP	Prokollagen-I N-terminales Peptid
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PPAR $\gamma$	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma
PTH	Parathormon
PTK7	Protein Tyrosine Kinase 7
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Real Time PCR
r.E.	relative Expression
RAC1	Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1
RANKL	Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand
RBP-J $\kappa$	Recombination Signal Binding Protein for Immunoglobulin kappa J Region
Rel. Gew.	Relatives Gewicht
rH	Relative Humidity = Relative Luftfeuchtigkeit
ROCK	Rho Kinase
ROR2	Receptor Tyrosine Kinase-Like Orphan Receptor 2
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
Runx2	Runt-Related Transcription Factor 2
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SFRP	Secreted Frizzled-Related Protein
Smpd3	Sphingomyelin Phosphodiesterase 3, Neutral
SNP	Single Nukleotide Polymorphism = Einzelnukleotid-Polymorphismen
Sost-Tg	<i>Col1a1-Sost-Transgen</i>
SP7	Osterix
Tb.N	Trabecular Number = Trabekelanzahl
Tb.Sp	Trabecular Spacing = Trabekelabstand
Tb.Th	Trabecular Thickness = Trabekeldicke

TCF	Transcription Factor (T-Cell Specific, HMG-Box)
TRAP	Tartrate-Resistant Acid Phosphatase
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
$W_{\text{Break}}$	Arbeit bis zum Bruch
Wnt	Wingless-Type MMTV Integration Site Family
Wo	Wochen
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## **11 Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Erstgutachter Prof. Dr. Thorsten Schinke sowie dem Institutsdirektor Prof. Dr. Michael Amling für diese großartige Möglichkeit meine Promotion am Institut für Osteologie und Biomechanik durchzuführen und auch für ihre exzellente Betreuung, die wissenschaftlichen Diskussionen sowie die Bereitstellung der Materialien und Arbeitsplätze. Auch bei Prof. Dr. Elke Oetjen möchte ich mich sehr herzlich für die Übernahme der Co-Betreuung und des zweiten Gutachtens bedanken.

Mein Dank gilt auch den zahlreichen Personen, die durch ihre Unterstützung und Hilfe diese Arbeit erst ermöglicht haben (alphabetische Reihenfolge):

Gudrun Arndt, Peggy Benisch, Thomas Bickert, Marion Dietzmann, Timo Heckt,  
Irm Hermans-Borgmeyer, Sarah Homann, Franz Jakob, Anke Jeschke, Johannes Keller, Till Köhne,  
Sonja Christin Kühn, Daniela Mau, Mona Neven, Stephanie Peters, Denise Reck, Claudia Reymers

Finanziell wurde dieses Projekt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SCHI-504/5-2; SCHI-504/6-1) und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (OsteoPath) gefördert.

Zu guter Letzt bedanke ich mich sehr herzlich bei Kaja, Jutta und Yil für den Rückhalt und die seelische Unterstützung.

## 12 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Yorgan  
Vorname: Timur Alexander  
Geburtsdatum: 10.11.1987  
Geburtsort: Düsseldorf  
Geschlecht: Männlich  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Sprachkenntnisse:

Deutsch in Wort und Schrift (Muttersprache)  
Englisch in Wort und Schrift  
Französisch in Wort und Schrift  
Großes Latinum

### Beruflicher Werdegang:

12.2011- : Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Institut für Osteologie und Biomechanik  
Doktorand

01. - 03.2011: Universität zu Lübeck  
SIAS Juniorgruppe (Dr. L. Redecke)  
Studentische Hilfskraft, Strukturbiologie

12.2008 - 02.2009: Ekural GmbH  
Hildesheim, Deutschland  
Software Entwicklung, ERP Systeme

07. - 09.2008: Bioglobe GmbH  
Hamburg, Deutschland  
Betriebspraktikum  
Medizinische- und Dispositionsgenetik

### Studium:

2011-2014: Universität Hamburg  
Promotion Chemie  
Abschluss: noch nicht erfolgt  
Thema der Abschlussarbeit:  
Wnt- und Notch-Signale im Knochenstoffwechsel (Prof. Dr. Thorsten Schinke)

2009- 2011:           Universität Hamburg  
M.Sc. Molecular Life Science  
Abschluss:           Master of Science (1,11)  
Thema der Abschlussarbeit:  
Einfluss eines neuen ADPR-Antagonisten auf das Ca<sup>2+</sup>-Signal und die  
Chemotaxis humaner neutrophiler Granulozyten (Prof. Dr. Dr. A. H. Guse)

2006 - 2009:           Universität Hamburg  
B.Sc. Molecular Life Science  
Abschluss:           Bachelor of Science (1,35)  
Thema der Abschlussarbeit:  
Untersuchungen zur Quartärstruktur der Glutathion-S-Transferase 1 von  
*Plasmodium falciparum*. (Prof. Dr. Dr. C. Betzel)

Schulische Ausbildung:

1998-2006:           Europagymnasium Auhof  
AHS "Linz International School Auhof" (LISA)  
Linz, Österreich  
Abschluss:           Österreichische Matura (1,2)  
                                  International Baccalaureate Diploma (37 pt)

1994-1998:           Volksschule Steyregg / Österreich  
Steyregg, Österreich

Auslandsaufenthalte:

1989-2006:           AT, Linz  
2002:                 UK, London & Tollesbury (Sprachreise)  
2003:                 USA, New York & St. Louis (Schüleraustausch)  
2004:                 FR, Paris & Brest (Sprachreise)

Publikationsverzeichnis

**Yorgan TA**, Schinke T. Relevance of Wnt signaling for osteoanabolic therapy. Mol and Cell Ther. 2014  
Jul 14;2:22

Bartelt A, Beil FT, Müller B, Koehne T, **Yorgan TA**, Heine M, Yilmaz T, Rüther W, Heeren J, Schinke T, Niemeier A. Hepatic lipase is expressed by osteoblasts and modulates bone remodeling in obesity. *Bone*. 2014 May;62:90-8.

Rendenbach C, **Yorgan TA**, Heckt T, Otto B, Baldauf C, Jeschke A, Streichert T, David JP, Amling M, Schinke T. Effects of extracellular phosphate on gene expression in murine osteoblasts. *Calcif Tissue Int*. 2014 May;94(5):474-83.

Moreau C, Kirchberger T, Swarbrick JM, Bartlett SJ, Fliegert R, **Yorgan T**, Bauche A, Harneit A, Guse AH, Potter BV. Structure-activity relationship of adenosine 5'-diphosphoribose at the transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) channel: rational design of antagonists. *J Med Chem*. 2013 Dec 27;56(24):10079-102

**Yorgan T**, Rendenbach C, Jeschke A, Amling M, Cheah KS, Schinke T. Increased Col10a1 expression is not causative for the phenotype of Phex-deficient Hyp mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Dec 13;442(3-4):209-13.

Kongressbeiträge:

2014 Annual ASBMR-Meeting, 9/2014:

The anti-osteoblastic function of Sclerostin is blunted in mice carrying the high bone mass mutation of Lrp5.

Posterpräsentation.

### **13 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben.

Datum, Unterschrift