

Aus der Klinik und Poliklinik für
Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. J. M. Rueger

**Funktionelle Untersuchungen zur Regulation der Knochenformation
durch Wnt-abhängige Signaltransduktion**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Felix Friedrich
aus Hamburg

Hamburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 03. April 2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. M. Amling

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: PD Dr. Dr. M. Heiland

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. H.-P. Kruse

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	3
2	Einleitung	6
2.1	Struktur und Funktion des Skelettsystems	6
2.2	Knochenzellen	7
2.2.1	Osteoklasten	7
2.2.2	Osteoblasten	8
2.2.3	Osteozyten	8
2.3	Osteoporose	10
2.3.1	Klinische Relevanz	10
2.3.2	Therapie der Osteoporose.....	11
2.4	Neue Therapieansätze durch Stimulierung der Knochenformation.....	12
2.5	Wnt-Moleküle	13
2.6	Aufgabenstellung und Zielsetzung	16
3	Material und Methoden	17
3.1	Untersuchung der Expression von Wnt-Antagonisten.....	17
3.1.1	Isolierung und Kultivierung primärer Osteoblasten	17
3.1.2	RNA-Isolation	18
3.1.3	cDNA-Synthese	18
3.1.4	RT-PCR-Expressionsanalyse	19
3.1.5	Agarosegel-Elektrophorese	20
3.1.6	Immunhistochemie	21
3.2	Untersuchung der Funktion von Dkk1 in vitro	22
3.2.1	Herstellung des pCRII-TOPO-Dkk1-Plasmids	22
3.2.2	Plasmidpräparation aus E.coli-Kulturen (Mini-Präparation)	23
3.2.3	Plasmid-Sequenzierung	24

3.2.4 Herstellung des CMV-Dkk1-Expressionsplasmids.....	24
3.2.5 Plasmidpräparation aus 500 ml E.coli-Kulturen (Maxi-Präparation)	26
3.2.6 Transfektion von MC3T3-Osteoblasten mit dem pCMV-Dkk1- Expressionsplasmid.....	27
3.2.7 RNA-Elektrophorese und Membrantransfer (Northern Blotting)	28
3.2.8 Von Kossa-Färbung transfizierter MC3T3-Osteoblasten	29
3.3 Herstellung transgener Mäuse	30
3.3.1 Herstellung des Col1a1-Dkk1-Plasmids:	30
3.3.2 Vorbereitung des Konstrukts zur Injektion in Maus-Oozyten	32
3.3.3 PCR-Analyse der transgenen Mäuse	33
3.4 Untersuchung der Interaktion von Dkk1 und Krm2 im Osteoblasten.....	33
3.4.1 Transfektion.....	34
3.4.2 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität	35
3.4.3 Bestimmung der Luziferase-Aktivität	35
3.5 Analyse von Skeletten Fzd9-defizienter Mäuse	36
3.5.1 Kontaktradiographie	36
3.5.2 Histologie.....	36
3.5.3 Histomorphometrie	37
3.5.4 Biomechanik.....	37
4 Ergebnisse.....	38
4.1 Die Expression des Wnt-Antagonisten Dkk1 wird in der terminalen Osteoblasten-Differenzierung stark induziert	38
4.2 Dkk1 wird Knochen-spezifisch exprimiert.....	39
4.3 Dkk1-Überexpression in Osteoblasten führt zu verringerter Mineralisation.....	40
4.4 Dkk1-Überexpression in vivo: Col1a1-Dkk1	42
4.5 PCR-Genotypisierung der Col1a1-Dkk1-Mäuse	43
4.6 Krm2 wird Knochen-spezifisch exprimiert	44

4.7 Untersuchung der Interaktion von Dkk1 und Krm2	45
4.8 Analyse der Fzd-Expression in der frühen Phase der Osteoblasten-Differenzierung.....	48
4.9 Analyse Fzd9-defizienter Mäuse.....	49
5 Diskussion	54
5.1 Dkk1.....	54
5.2 Krm2	57
5.3 Fzd9.....	58
5.4 Ausblick.....	60
6 Zusammenfassung	62
7 Literaturverzeichnis	64
8 Danksagung	83
9 Lebenslauf	84
10 Eidesstattliche Versicherung	85

You may be on the right track,
but if you just sit there,
you'll get run over.

Mark Twain

2 Einleitung

2.1 Struktur und Funktion des Skelettsystems

Knochengewebe erfüllt im wesentlichen zwei wichtige Funktionen. Zum einen stellt der Knochen einen mechanischen Schutz für Gehirn, Rückenmark, Sinnesorgane und Knochenmark dar und ermöglicht als wichtigstes Stützgewebe den Ansatz der Muskulatur für Bewegung und Mobilität. Zum anderen spielt das Knochengewebe eine wichtige Rolle bei der Regulation des Mineralhaushalts.

Die mechanische Belastbarkeit des Knochens wird hauptsächlich durch die lamelläre Struktur gewährleistet, aus der sich die Kortikalis zusammensetzt, die den am stärksten belasteten Anteil des Knochens darstellt. Die Kortikalis ist aus Osteonen oder Haversschen Systemen aufgebaut. Diese bestehen aus parallel zur Längsrichtung der Diaphyse angeordneten Knochenzylindern (Marcus et al., 2001). Neben der Stützfunktion grenzt sie den Markraum nach außen ab und schützt so das blutbildende Knochenmark (Adler, 2000). Die Spongiosa, ein schwammartiges Gerüstwerk feiner Knochenbälkchen, erreicht mit ihrem traktoriellen Bauprinzip ein Maximum an Stabilität mit einem Minimum an Materialaufwand (Böcker et al., 2001). Seine wichtige Funktion in der Regulation des Mineralhaushalts erfüllt das Knochengewebe durch Mobilisierung und Wiedereinbau von Calcium und Phosphat, für die der Knochen ein großes Mineralreservoir darstellt. 99 % des gesamten Calciums, 85 % des Phosphats und 50 % des Magnesiums sind im Knochen gespeichert (Bartl, 2001). Deshalb unterliegt der Knochen im adulten Organismus einem ständigen Prozess des Auf- und Abbaus. Dieser Materialaustausch dient einerseits der Calciummobilisation im Rahmen der Calciumhomöostase, dem Ersatz alten Knochengewebes, aber auch der Adaptation an neue Belastungsanforderungen und der Reparatur beschädigten Knochens (Marcus et al., 2001). Dieses „Knochenremodeling“ befindet sich normalerweise in einem empfindlichen Gleichgewicht. Ist die Balance zwischen Synthese und Resorption

gestört, so kann dies, wie z. B. bei der Osteoporose oder der Osteosklerose, zu Veränderungen in der Statik führen (Marks u. Hermey, 1996).

2.2 Knochenzellen

Der Knochen setzt sich aus drei Zelltypen zusammen, den Knochen-resorbierenden Osteoklasten, den Knochen-bildenden Osteoblasten und den Osteozyten.

2.2.1 Osteoklasten

Die resorbierenden multinukleären Osteoklasten entstehen durch Fusion hämatopoetischer mononukleärer Vorläuferzellen (Boyle et al., 2003). Die Differenzierung der Osteoklasten wurde in den letzten Jahren sehr ausführlich an Mausmodellen untersucht. Es zeigte sich, dass eine Kaskade von Signalmolekülen in verschiedenen Stadien der Osteoklastogenese wirkt (Chambers, 2000). In der frühen Phase der Differenzierung spielt neben dem Proto-Onkogen *c-fos* und dem Transkriptionsfaktor NF- κ B vor allem M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) eine wichtige Rolle, wohingegen die terminale Differenzierung der Regulation vom TNF-ähnlichen Zytokin RANKL (RANK-Ligand) und dessen Antagonisten OPG (Osteoprotegerin) (Simonet et al., 1997) unterliegt (Abb. 1). RANKL wird von Osteoblasten und Lymphozyten synthetisiert und bindet an seinen Osteoklasten-Rezeptor RANK (Boyle et al., 2003; Hsu et al., 1999; Burgess et al., 1999). Dadurch wird intrazellulär eine TRAF6-abhängige Signalkaskade aktiviert (Darnay et al., 1998). OPG hemmt kompetitiv die Bindung von RANKL an RANK. Das Gleichgewicht von RANKL und OPG ist somit entscheidend für die Regulation der Knochenresorption, was durch Befunde der Mausgenetik eindrucksvoll unterstützt wird. So weisen RANKL-defiziente Mäuse eine Osteopetrose auf (Kong et al., 1999), während OPG-defiziente Mäuse osteoporotisch sind (Bucay et al., 1998).

An der dem Knochen zugewandten Seite (ruffled border) bewirken die Osteoklasten durch eine Erhöhung der Protonenkonzentration über verschiedene Moleküle wie den Chloridkanal CLC7 oder die Protonenpumpe ATP6i, sowie die Freisetzung spezifischer Proteasen, wie Cathepsin K und Phosphatasen, den Abbau mineralisierter Knochensubstanz. In diese Gene betreffenden Maus-Defizienz-Modellen zeigte sich eine Osteopetrose bei normaler Anzahl ausdifferenzierter Osteoklasten (Kornak et al., 2001; Li et al., 1999b; Gowen et al., 1999; Hofbauer u. Heufelder, 1999; Saftig et al., 1998).

2.2.2 Osteoblasten

Die aus mesenchymalen Vorläuferzellen hervorgehenden Osteoblasten synthetisieren Kollagenfasern, insbesondere Typ 1-Kollagen, und nicht-Kollagene Strukturproteine, die die wichtigsten Bestandteile der nichtmineralisierten Knochenmatrix darstellen, die anschließend durch Hydroxylapatitablagerung mineralisiert (Karsenty et al., 2003). Weitere wichtige Proteine der Knochenmatrix sind Osteocalcin, Osteopontin und Bone Sialoprotein, deren Funktion im Mineralisierungsprozess noch unklar ist (Abb. 1). Für die Differenzierung der Osteoblasten sind zwei Transkriptionsfaktoren, Runx2 und Osterix, von entscheidender Bedeutung, deren Deletion in Mäusen in einer kompletten Abwesenheit von Knochengewebe resultiert (Ducy et al., 1997; Komori et al., 1997; Otto et al., 1997; Mundlos et al., 1997; Ducy et al., 1999; Karsenty et al., 1999; Liu et al., 2001; Geoffroy et al., 2002; Nakashima et al., 2002).

Die Knochenformation wird auf mehreren Ebenen reguliert, sowohl lokal, als auch endokrin. Das erst vor kurzem etablierte Konzept der neuronalen Kontrolle der Knochenformation wurde als Erklärung für den inhibitorischen Effekt von Leptin auf die Knochenformation vorgeschlagen. Leptin ist ein Polypeptid, das primär von Adipozyten produziert wird und im Hypothalamus das Körpergewicht und die Fettgewebsmasse über die Unterdrückung des Appetits reguliert. Die Untersuchung sowohl Leptin- als auch Leptin-Rezeptor-defizienter Mäuse zeigte, dass diese Mäuse trotz eines Hypogonadismus und Hyperkortisolismus über eine hohe Knochenformationsrate und eine daraus resultierende hohe Knochenmasse verfügen. Osteoblasten besitzen keine Leptin-Rezeptoren, aber die intracerebroventrikuläre Infusion von Leptin führt zu Knochenmasseverlusten in Leptin-defizienten und Wildtyp-Mäusen. In weiteren Studien konnte demonstriert werden, dass Leptin über das sympathische Nervensystem die Knochenformation reguliert (Takeda et al., 2002; Ducy et al., 2000; Amling et al., 2000).

2.2.3 Osteozyten

Etwa jeder zehnte auf der Knochenoberfläche liegende Osteoblast wird in das neu gebildete Knochengewebe eingebaut und entwickelt sich zum Osteozyten (Abb. 1). Die Osteozyten liegen eingemauert in den Lakunen des Knochengewebes und sind über Zytoplasmafortsätze miteinander durch Nexus verbunden und bilden ein Synzytium (Aarden et al., 1994). Diese Nexus dienen der Weiterleitung von Signalen

zwischen Osteozyten. Angeordnet um einen sogenannten Havers-Kanal bilden sie die funktionelle Einheit eines Osteons. Die Funktion der Osteozyten ist weitestgehend ungeklärt, da dieser Zelltyp nur schwer zu isolieren und in vitro zu untersuchen ist. Es wird jedoch diskutiert, dass Osteozyten bei der Verarbeitung mechanischer Reize auf den Knochen beteiligt sind, wobei dies jedoch noch nicht durch in-vivo-Experimente belegt werden konnte (Knothe Tate et al., 2004).

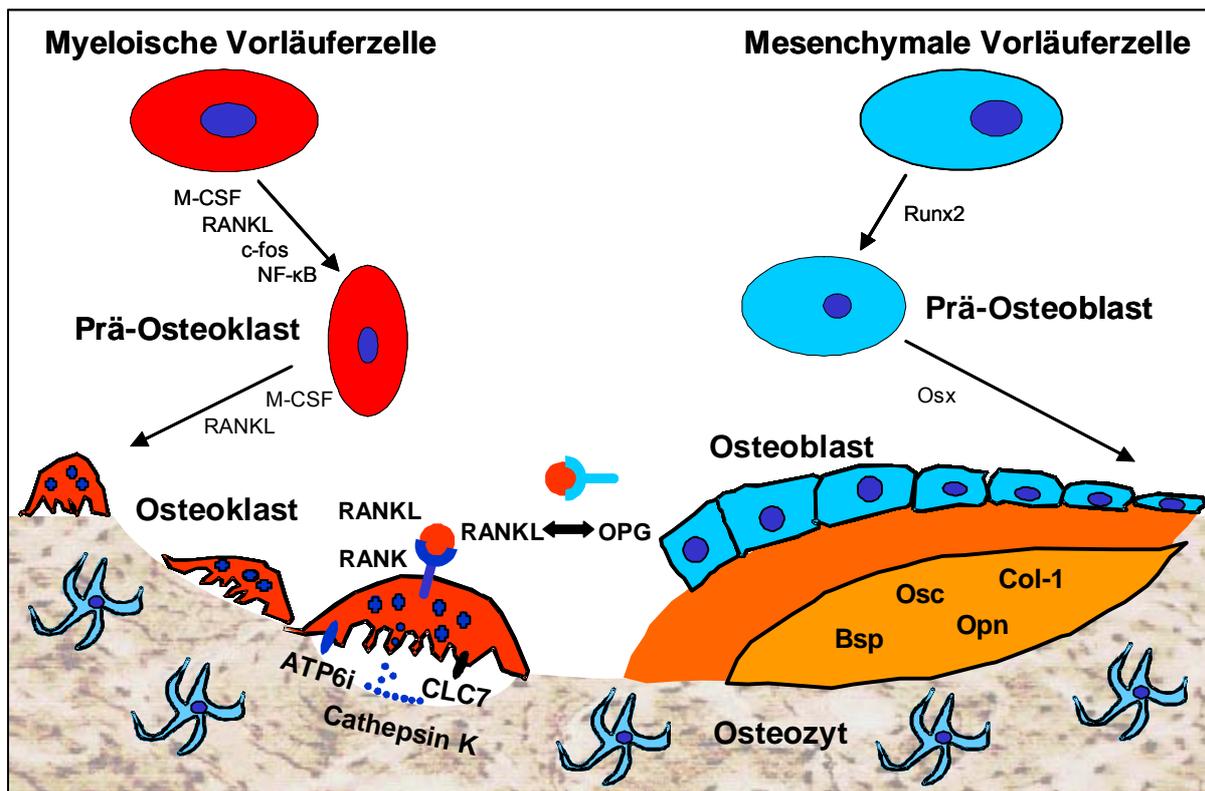


Abbildung 1: Schematische Darstellung der am Knochenremodeling beteiligten Zelltypen: Osteoklasten entstehen aus myeloischen Vorläuferzellen und entwickeln sich im Verlauf der Osteoklastogenese unter dem Einfluß des Proto-Onkogens c-fos, dem Transkriptionsfaktor NF-κB, sowie einer Kaskade von Signalmolekülen wie M-CSF, dem TNF-ähnlichen Zytokin RANKL und dessen Antagonisten OPG (Osteoprotegerin) zu mehrkernigen Osteoklasten, die über verschiedene Moleküle, wie den Chloridkanal CLC7 oder die Protonenpumpe ATP6i, sowie die Freisetzung spezifischer Proteasen, wie Cathepsin K und Phosphatasen, den Abbau mineralisierter Knochensubstanz bewirken. Osteoblasten entstehen aus mesenchymalen Vorläuferzellen und entwickeln sich unter dem Einfluß von Transkriptionsfaktoren wie Runx2 und Osx (Osterix) zu Osteoblasten. Sie synthetisieren Kollagenfasern (Col-1) und nicht-Kollagene Strukturproteine, die anschließend durch Hydroxylapatitablagerung mineralisiert werden. Weitere wichtige Proteine der Knochenmatrix sind Osteocalcin (Osc), Osteopontin (Opn) und Bone Sialoprotein (Bsp). Manche Osteoblasten entwickeln sich zu Osteozyten, die eingemauert in den Lakunen des Knochengewebes liegen. Über Protoplasmfortsätze stehen sie miteinander in Verbindung und bilden ein Synzytium.

2.3 Osteoporose

Für den Umbauprozess des Knochens (Remodeling) stehen 2-5 Millionen Baueinheiten (basic multicellular units, BMUs) bereit (Tayyar et al., 1999; Smit u. Burger, 2000; Jilka, 2003). Diese Selbstreparatur des Knochens ist von entscheidender Bedeutung für die Genese der Osteoporose, die entsteht, wenn etwas mehr Knochen abgebaut als erneuert wird. Diese negative Knochenbilanz kann drei Ursachen haben:

- erhöhte Aktivität der Osteoklasten bei normaler Osteoblasten-Funktion (high turnover)
- normale Osteoklasten-Funktion bei verminderter Aktivität der Osteoblasten (low turnover)
- verminderte Aktivität von Osteoklasten und Osteoblasten (low turnover)

Der Knochenschwund korreliert vor allem mit der Anzahl der aktiven Umbaueinheiten und mit einer gestörten Abstimmung der Zellsysteme. Die Umbauaktivität spiegelt sich in der Calciumausscheidung und in den Abbauprodukten des Kollagens im Urin wider (Bartl, 2001).

2.3.1 Klinische Relevanz

„Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, charakterisiert durch eine Verminderung der Knochenmasse und Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes mit entsprechend reduzierter Festigkeit und erhöhter Frakturneigung“ (Consensus Development Conference 1993, Hong Kong).

Die Osteoporose ist heute ein weltweites Gesundheitsproblem. Die WHO hat sie deshalb auf die Liste der 10 wichtigsten Volkskrankheiten gesetzt. Patienten mit Osteoporose haben einen porösen, instabilen Knochen und leiden an Knochenfrakturen (Bartl, 2001; Amling et al., 1994; Amling et al., 1996a, Amling et al., 1996b). Die Frakturen betreffen häufig Wirbelkörper, Handgelenk und das proximale Femur. Der bei der Osteoporose auftretende Knochenverlust erhöht jedoch das Frakturrisiko des gesamten Skeletts.

Jede dritte Frau und jeder fünfte Mann sind davon betroffen (Seeman, 1995), insgesamt leiden in Deutschland ca. 7 Millionen Menschen an Osteoporose (Bartl,

2001). Eine 50-jährige kaukasisch-amerikanische Frau erleidet mit einer Wahrscheinlichkeit von 45% in ihrem Leben eine osteoporotische Fraktur (Cooper u. Aihie, 1995; Rodan u. Martin, 2000). Bei den 150 000 deutschen Patienten pro Jahr mit Osteoporose bedingten coxalen Frakturen besteht eine erhöhte Mortalität im ersten Jahr nach der Fraktur von 10-20% (Oberender u. Fritschi, 2003), und mehr als ein Drittel der Patienten verliert danach seine funktionale Selbstständigkeit. Die Morbidität und Mortalität an proximalen Femurfrakturen steigen steil mit dem Alter an (Ringe, 1997; Center et al., 1999). Wichtigste Todesursachen sind Embolien, Pneumonien oder Dekompensationen vorbestehender internistisch-geriatrischer Grunderkrankungen.

Mit der weiter ansteigenden Lebenserwartung und der demographischen Entwicklung wird die Osteoporose ein noch ernsteres gesundheitspolitisches Problem werden. Es ist davon auszugehen, dass die Zahl der Osteoporose bedingten Frakturen sich in den nächsten 20 Jahren verdoppeln wird mit der Folge einer erheblichen Steigerung der Kosten (Ringe, 1997). Bereits jetzt verursacht die Osteoporose in Deutschland pro Jahr ca. 4,5-5 Mrd. Euro an direkten und etwa 10 Mrd. Euro an indirekten Kosten (Oberender u. Fritschi, 2003).

2.3.2 Therapie der Osteoporose

Die Behandlung der Osteoporose steht auf drei Säulen. Als erstes ist die Basistherapie zu nennen, die einerseits aus knochenbewusster Ernährung (Calcium- und Vitamin-D-reich), Bewegungstherapie und der Eliminierung von Risikofaktoren wie Nikotin oder Alkohol, sowie andererseits auf der täglichen Gabe von Calcium und Vitamin D beruht. Die zweite Säule beinhaltet die Schmerzbekämpfung bei akuten oder chronischen Schmerzen. Die dritte Säule führt mit Hilfe antiresorptiver und osteoanaboler Substanzen zu einer Positivierung der Skelettbilanz (Ringe, 1997).

Zu den Hemmstoffen des Knochenumsatzes zählen Östrogene (Riggs et al., 2002, Rossouw, 2002), Gestagene, Calcitonin, Vitamin-D-Metabolite und Bisphosphonate (Rodan, 1997; Baran, 2001; Harris, 2001; Delmas, 2002; Ravn, 2002; Daragon u. Pouplin, 2004). Die Stickstoff-haltigen Bisphosphonate sind derzeit die effektivsten Medikamente zur Behandlung aller Osteoporoseformen. Die genauen Mechanismen der Resorptionshemmung sind bisher nicht ganz geklärt. Es wird vermutet, dass sie sich aufgrund ihrer Affinität zu Calcium-Phosphat-Kristallen an Knochenoberflächen selektiv anlagern und die Osteoklasten-Aktivität hemmen (Jung et al., 1973), indem

sie die Osteoklasten-Rekrutierung inhibieren (Hughes et al., 1989; Boonekamp et al., 1986; Boonekamp et al., 1987), die Adhäsion der Osteoklasten an die mineralisierte Matrix verhindern (Colucci et al., 1998), eine verfrühte Apoptose induzieren (Hughes et al., 1995) und insbesondere durch Inhibierung der Protonen-ATPase die Säureproduktion senken (Zimolo et al., 1995; David et al., 1996). Die Aktivitätsverminderung des Osteoklasten und die früher eintretende Apoptose kommen durch Inhibierung des Mevalonatstoffwechsels zustande, der essentiell ist für die posttranslationale Prenylierung bestimmter Proteine, wie Ras, Rho, Rac und Rab, die für viele Zellfunktionen wie Cytoskelett-Anordnung und intrazelluläre Signalkaskaden wichtig sind (Luckman et al., 1998a; Luckman et al., 1998b; Fisher et al., 1999). Durch ihren Einbau in die Hydroxylapatit-Kristalle kommt es zu einer verminderten Auflösbarkeit der Knochensubstanz und zu Veränderungen des Mineralisationsprozesses (Fleisch et al., 1969). Die abgelagerten Bisphosphonate werden Wochen bis Monate später in den Knochen eingebaut und bleiben dort über viele Monate bis Jahre nachweisbar, jedoch solange inaktiv, bis sie im Rahmen des Knochenremodelings wieder an die Oberfläche kommen. Über einen längeren Zeitraum bewirkt die Hemmung der Resorption eine positive Bilanz der Knochenmasse mit entsprechender Zunahme der mechanischen Belastbarkeit (Bartl, 2001). Zum jetzigen Zeitpunkt stellt die Therapie mit Bisphosphonaten die Therapie der Wahl dar (Cranney et al., 2002). Zu den primär osteoanabolen Substanzen zählen Fluorid- und Strontiumsalze (Meunier et al., 2004), anabole Steroide, Parathormon (Seeman, 2001; Neer et al., 2001; Miyakoshi, 2004), Wachstumshormon (HGH), Prostaglandine (Yoshida et al., 2002, Vrotsos et al., 2003) und lokale Wachstumsfaktoren, deren Potenz zur Osteoporose-Therapie allerdings noch umstritten ist.

2.4 Neue Therapieansätze durch Stimulierung der Knochenformation

Abgesehen von der oben genannten Basistherapie, der rein symptomatischen Schmerztherapie und der aktuellen, nur durch geringe Effektivität auffallenden osteoanabolen Therapie setzt die heutige Osteoporosetherapie hauptsächlich auf die antiresorptive Therapie in Form von Bisphosphonatgabe. Deshalb kann eine bereits bestehende Osteoporose nur am Fortschreiten gehindert werden. Ideal wäre hingegen ein therapeutischer Ansatz zur Stimulation der Knochenformation, um die bereits verminderte Knochensubstanz wieder neu zu bilden.

Neue Erkenntnisse in der Regulation der Knochenformation lassen auf Osteoblasten-stimulierende Mechanismen und Therapien hoffen. Kürzlich wurde beschrieben, dass das Osteoporose-Pseudoglioma-Syndrom (OPPG), eine schwere Form der Osteoporose im Menschen, durch Mutationen im Gen für Low-density lipoprotein (LDL)-receptor-related protein 5 (LRP5) verursacht wird (Gong et al., 2001). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass aktivierende Mutationen im LRP5-Gen zu einer gesteigerten osteoblastären Knochenformation führen und mit einer stark erhöhten Knochendichte einhergehen (Boyden et al., 2002, Little et al., 2002). Mutationsanalysen an zwei Familien, die diesen Phänotyp mit gesteigerter Knochenmasse aufwiesen, zeigten eine G-zu-T-Punktmutation in Exon 3, die in einem Glycin-zu-Valin-Aminosäureaustausch an Position 171 resultierte (Little et al., 2002; Boyden et al., 2002).

Die Rolle von LRP5 in der Knochenformation konnte im Mausmodell weiter verfolgt werden. Die Arbeitsgruppe von Dr. Bex konnte durch Generierung einer transgenen Mauslinie, die die G171V-Mutation exprimiert, demonstrieren, dass es über eine Erhöhung der Zahl aktiver Osteoblasten zu einem Phänotyp mit gesteigerter Knochenmasse kommt. Dieser Mausphänotyp ähnelte sehr dem Phänotyp, der zuvor von Dr. Little et al. anhand der Familie mit derselben Punktmutation beschrieben worden war (Little et al., 2002). Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe von Dr. Chan durch die Entwicklung einer LRP5-defizienten Maus zeigen, dass sich durch das Fehlen von LRP5 ein Phänotyp mit geringer Knochenmasse entwickelt, hervorgerufen durch erniedrigte Osteoblasten-Proliferation und Knochenformation (Kato et al., 2002). Außerdem sind diese Mäuse, genau wie viele der von OPPG betroffenen Menschen, von Geburt an blind, was auf Störungen der normalen Augenentwicklung zurückzuführen ist.

LRP5 ist ein Co-Rezeptor für Signalmoleküle der Wnt-Familie, die wichtige Funktionen bei der Ausbildung diverser Organsysteme aufweisen. Dementsprechend könnte die Wnt-vermittelte Signaltransduktion auch bei der Knochenformation eine entscheidende Rolle spielen.

2.5 Wnt-Moleküle

Die Wnt-Familie der sezernierten Glykoproteine gehört zu den wichtigsten Signalmolekülen während der Entwicklung und im adulten Organismus. Wnt-Gene werden in einer großen Anzahl verschiedener Gewebe und Organe exprimiert.

Verschiedene homologe Wnt-Gene werden für viele bestimmte Entwicklungsprozesse benötigt, darunter fallen die Segmentation in *Drosophila* (Perrimon, 1994), Endoderm-Entwicklung in *Caenorhabditis elegans* (Rocheleau et al., 1997; Thorpe et al., 1997), Gliedmaßenpolarität (Yang u. Niswander, 1995; Riddle et al., 1995; Parr u. McMahon, 1995), Nierenmorphogenese (Stark et al., 1994; Herzlinger et al., 1994) und die Entwicklung von Gehirn und Rückenmark (Parr u. McMahon, 1994).

Wnt-Proteine üben ihre Effekte auf benachbarte Zellen durch Interaktion mit 7-Transmembranrezeptoren der Frizzled-Familie (Fzd) und ihren Corezeptoren LRP5 oder LRP6 aus (Bain et al., 2003, Pinson et al., 2000; Tamai et al., 2000; Wehrli et al., 2000; Mao et al., 2001a) und aktivieren somit eine Signalkaskade, die über die Stabilisierung von intrazellulärem β -Catenin bis in den Zellkern führt und dort über bestimmte Transkriptionsfaktoren der lymphoid enhancer factor/T cell factor (LEF/TCF)-Familie die Expression von Zielgenen aktiviert (Dale et al., 1998; Gumbiner, 1998; Wodarz und Nüsse, 1998).

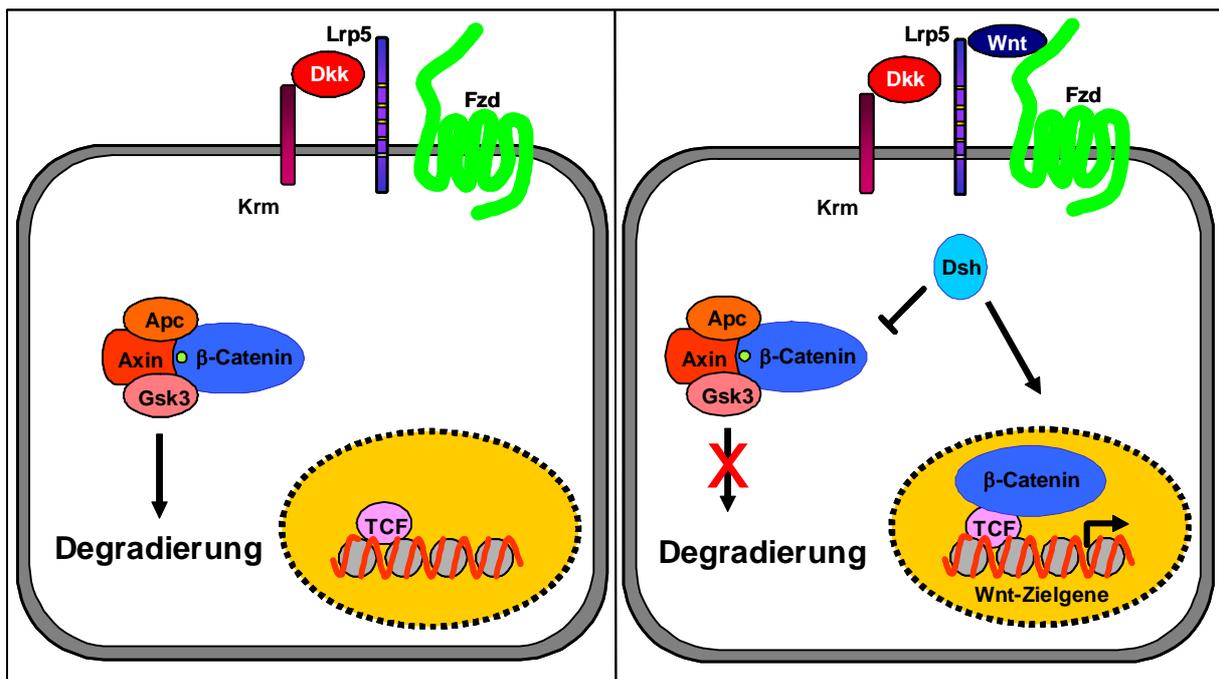


Abbildung 2: Die Wnt-Signalkaskade: Ohne die Bindung von Wnt-Moleküle an Frizzled-Rezeptoren und ihre Co-Rezeptoren LRP5/6 wird intrazelluläres β -Catenin in einem Komplex mit Glykogensynthasekinase 3 β (Gsk3), Axin und APC (adenomatöse Polyposis coli) gebunden und für die Degradierung in Proteasomen markiert. Durch die Anwesenheit von Wnt-Molekülen verhindert Dishevelled (Dsh) die Degradation und führt so über eine Stabilisierung von β -Catenin zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie, wodurch es zur Expression von Zielgenen kommt. Dkk- und Kremen-Proteine wirken dabei als Antagonisten, die das Wnt-Signalling verhindern.

Darüberhinaus wird das Wnt-Signalling über verschiedene extrazelluläre Antagonisten reguliert, wie z. B. Frizzled-related protein (FrzB), Cerberus (Cer) und WIF-1 (Kawano und Kypta, 2003). Diese Inhibitoren binden Wnt-Liganden und verhindern so die Signalkaskade. Eine andere Gruppe von Wnt-Antagonisten ist die Familie der Dickkopf-Proteine (Dkks). Es konnte gezeigt werden, dass Dkk-Moleküle das Wnt-Signalling durch Bindung und Antagonisierung von LRP5 verhindern können (Bafico et al., 2001; Mao et al., 2001b; Semenov et al., 2001; Zorn, 2001). Bei der Antagonisierung des Wnt-Signallings kooperieren Dkk-Proteine mit Transmembranproteinen der Kremen-Familie (Krm) durch Ausbildung eines ternären Komplexes mit LRP5, das daraufhin per Endozytose von der Zellmembran entfernt wird (Mao et al., 2002).

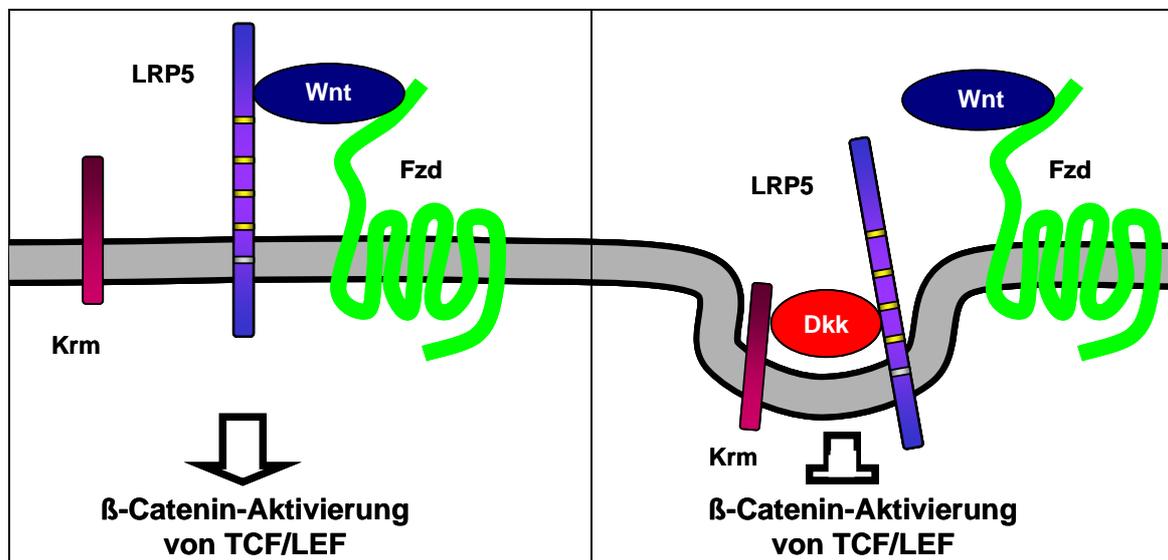


Abbildung 3: Antagonismus der Wnt-Signaltransduktion durch Proteine der Dkk- und Krm-Familie: Links: Durch Bindung von Wnt-Molekülen an die Co-Rezeptoren Frizzled (Fzd) und LRP5 wird die Wnt-Signalkaskade aktiviert, die über eine Stabilisierung von β -Catenin zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie führt. Rechts: Diese Aktivierung kann durch die Interaktion von Dkk- und Krm-Proteinen antagonisiert werden, die mit LRP5 einen ternären Komplex ausbilden, der die Endozytose und Entfernung von LRP5 von der Zellmembran induziert (Mao et al., 2002).

Dieser Regulationsmechanismus ist auch physiologisch von Bedeutung, da Boyden et al. in ihren Studien zeigen konnten, dass die G171V-Mutation in LRP5 die Wnt-Wirkung verstärkt, da der Wnt-Antagonismus von Dkk aufgrund einer veränderten Dkk-Bindungsstelle an LRP5 vermindert ist (Boyden et al., 2002). Dem

widersprechen allerdings Ergebnisse, die Zhang et al. in ihren Studien produzierten. Laut ihrer Arbeitsgruppe handelt es sich nicht um eine veränderte Bindungsstelle von Dkk1 an LRP5, sondern um eine veränderte Bindungsstelle von Mesd, einem Chaperon-Protein von LRP5, das notwendig für den Transport von LRP5 an die Zelloberfläche ist (Zhang et al., 2004).

Die Erkenntnis, dass LRP5 eine entscheidende Rolle als Knochendichte-regulierendes Gen spielt, ist ein wichtiger Ansatzpunkt, der allerdings weitere Fragen aufwirft. Hierbei ist anzumerken, dass verschiedene Fzd-Rezeptoren, sowie Dkk- und Krm-Proteine existieren, die zwar eindeutige Sequenzhomologien aufweisen, aber in ihren Expressionsmustern und funktionellen Eigenschaften unterschiedlich sind. So gibt es im Säugetier-Genom mindestens 10 Gene für Rezeptoren der Fzd-Familie, 4 Gene für Proteine der Dkk-Familie und 2 Gene für Krm-Proteine. Die Identifizierung der spezifischen Interaktionspartner von LRP5 im Osteoblasten ist deshalb von zentraler Bedeutung für das Verständnis des Knochenstoffwechsels sowie der Identifizierung weiterer therapeutischer Ansatzpunkte zur Behandlung von Osteoporose.

2.6 Aufgabenstellung und Zielsetzung

In der Experimentellen Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Eppendorf wurde in Zusammenarbeit mit Dr. T. Streichert aus dem Institut der Klinischen Chemie (Direktor: Prof. Dr. C. Wagener) eine Micro-Array-Analyse durchgeführt, in der das Expressionsprofil von Osteoblastenkulturen in verschiedenen Differenzierungsstadien untersucht wurde. Die Auswertung dieser Ergebnisse in Hinblick auf die Wnt-Rezeptoren und Antagonisten sollte zur Identifizierung von Kandidatengenen führen, die in der Wnt-regulierten Osteoblasten-Differenzierung eine Rolle spielen könnten. Hierbei konnte einerseits nachgewiesen werden, dass Dkk1 und Krm2 im Verlauf der Osteoblasten-Differenzierung gegenläufig reguliert werden und in der RT-PCR-Expressionsanalyse Knochen-spezifische Expressionsmuster zeigen, weshalb ihre Rolle in der Osteoblasten-Differenzierung durch in-vitro und in-vivo-Experimente aufgeklärt werden sollte. Zum anderen zeigte sich, dass in der frühen Phase der Osteoblasten-Differenzierung Fzd9 spezifisch in seiner Expression induziert wird. Dementsprechend sollte die physiologische Funktion von Fzd9 für die Knochenformation anhand eines Fzd9-defizienten Mausmodells aufgeklärt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchung der Expression von Wnt-Antagonisten

Da LRP5 eine wichtige Rolle bei der Regulation der Knochenformation spielt, war es wichtig, herauszufinden, welche Interaktionspartner LRP5 im Osteoblasten hat. Dazu wurde das Expressionsverhalten der Wnt-Antagonisten in einer RT-Expressionsanalyse untersucht, indem zunächst aus primären Osteoblasten-Kulturen RNA gewonnen wurde, diese in cDNA umgeschrieben wurde und mit spezifischen Primerpaaren die entsprechenden Wnt-Antagonisten in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert wurden.

3.1.1 Isolierung und Kultivierung primärer Osteoblasten

Zur Kultivierung von primären Osteoblasten wurden die Schädeldächer aus drei Tage alten C57Bl6-Mäusen entnommen und in PBS (Gibco, 14190-094) eingelegt. Die präparierten Schädeldächer wurden 5 mal für 10 Minuten in Lösung 1 bei 37° C in einem Schüttler verdaut. Die Überstände der ersten beiden Verdaus wurden verworfen. Die Überstände der letzten 3 Verdaus wurden kombiniert, durch einen Zell-Filter filtriert (Cell strainer 40 µm, 352340 BD), in ein 50 ml-Gefäß aufgenommen (Falcon 50 ml, 352070 BD) und danach bei 1200 g (Megafuge 1.0 R, Kendro) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in Kulturmedium aufgenommen. Je 500.000 Zellen wurden auf 94/16mm Zellkulturschalen (Cellstar Greiner bio-one, 633171) ausplattiert und bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 %-iger CO₂-Sättigung kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um nicht-adhärenente Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Nach drei Tagen wurde das Kulturmedium durch Differenzierungsmedium ersetzt, welches alle zwei Tage gewechselt wurde.

Lösung 1:	Minimal essential medium (alpha-modification)-eagle (Sigma, M-0644) 0,1 % Kollagenase Typ Ia (Sigma C-9891) 0,2 % Dispase Grade II (Roche, 165859)
Kulturmedium:	Minimal essential medium (alpha-modification)-eagle 10 % fötales Kälberserum (Perbio, 30160) 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco, 15140-122)
Differenzierungsmedium:	Kulturmedium +50 µg/ml Ascorbat (Sigma, 205-126-1) +10 mM β-Glycerophosphat (Sigma, 212-464-3)

3.1.2 RNA-Isolation

An Tag 5 und Tag 25 der Differenzierung wurde RNA aus den isolierten Osteoblasten gewonnen. Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurden die Zellen auf der Schale 2-mal mit kaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml TRIzol-Reagenz (Invitrogen, 15596-018) wurden die Zellen mit einem Zellschaber (Greiner bio-one, 541070) abgekratzt und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nachdem die Suspension fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde, wurden 200 µl Chloroform zugegeben und weitere zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 15 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. 600 µl der oberen wässrigen Phase wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol zur Ausfällung der RNA vermischt. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur und einer erneuten Zentrifugation wie oben beschrieben, wurde der Überstand abgenommen und das Pellet (RNA) mit 1 ml 70 % Ethanol (in DEPC (Sigma, D-5758)-behandeltem H₂O) gewaschen. Anschließend wurde wieder für 10 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Pellet in 25 µl DEPC-H₂O gelöst. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 4 µl dieser Lösung in 400 µl DEPC-H₂O verdünnt und die Absorption bei 260 nm (Ultrospec 2100 pro, Biochrom, England) gegen 400 µl DEPC-H₂O als Referenz gemessen.

Die RNA aus verschiedenen Geweben wurde ebenfalls mit dem TRIzol-Reagenz isoliert. Zunächst wurden die jeweiligen Organe (Herz, Leber, Gehirn, Milz, Niere, Fettgewebe, Femur und Schädeldach) aus 10 Tage alten Mäusen isoliert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach Zugabe von 1 ml TRIzol wurden die Organe unmittelbar danach mit einem Ultra-Turrax Dispergiergerät (IKA-Werke, Deutschland) für 10-15 Sekunden homogenisiert und anschließend auf Eis gelagert. Die homogenisierten Gewebe in 1 ml TRIzol-Reagenz wurden anschließend in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und wie oben beschrieben weiterverarbeitet.

3.1.3 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese musste zunächst die genomische DNA aus der gewonnenen RNA eliminiert werden. Dazu wurden 10 µg RNA mit 89 µl DEPC-H₂O aufgefüllt. Dann wurden 10 µl DNase-Puffer und 1 µl DNase I (Roche) zugegeben und die Lösung für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach anschließender Zugabe von 100 µl DEPC-H₂O wurden 200 µl Phenol/Chloroform (Roth, A 1562) zugesetzt und 2

Minuten bei 13.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 400 µl Chloroform zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation und Überführung der oberen Phase wurden 30 µl 3 M Natriumacetat pH 6 sowie 400 µl 100 % Ethanol zugefügt und für 15 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde in 10 µl DEPC-H₂O gelöst.

Für die weitere cDNA-Synthese wurden zu 5 µl der DNase behandelten RNA 100 ng Oligo-(dT)-Primer (Invitrogen) zugesetzt und mit DEPC-H₂O auf 33 µl aufgefüllt. Der 10-minütigen Inkubation in einem Heizblock bei 65°C folgte der Transfer auf Eis. Jetzt wurden 10 µl 5x RT-Puffer (Roche), 2 µl dNTP-Mix (10 mM), 1 µl RNase-Inhibitor (Roche) und 1 µl AMV-Reverse Transkriptase (Roche) zugesetzt und bei 45°C für eine Stunde inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 0,5 µl RNase-Inhibitor und 0,5 µl AMV-Reverse Transkriptase folgte eine weitere Inkubation bei 55°C für 15 Minuten.

DNase-Puffer: 400 mM Tris, pH 8
 100 mM NaCl
 60 mM MgCl₂

3.1.4 RT-PCR-Expressionsanalyse

Zur Amplifikation der kodierenden Sequenzen wurden 2 µl der hergestellten cDNA zusammen mit 2 µl 10x PCR-Puffer (Roche), 1 µl 5 mM dNTPs, je 3 µl der spezifischen Primer (2mM), 0,3 µl Taq-DNA-Polymerase (Roche) vermischt, mit sterilem Wasser auf 20 µl aufgefüllt und in einem Thermocycler (i-Cycler, Bio-Rad, München) folgendermaßen inkubiert:

4 Minuten bei 94°C (initiale Denaturierung)
36 Zyklen von: 1 Minute bei 94°C (Denaturierung)
 1 Minute bei 55°C (Anlagerung der Primer)
 1 Minute bei 72°C (Polymerisation)
10 Minuten bei 72°C (abschließende Extension)

3.1.6 Immunhistochemie

Um die Expression von Dkk1 im Osteoblasten auf Protein-Ebene zu bestätigen, wurde eine Immunhistochemie durchgeführt. Aus 4 Tage alten C57/Bl6-Mäusen wurden dazu die Calvarien isoliert und zunächst in Paraformaldehyd für 24 Stunden gelagert. Es folgte eine Entwässerung in einer absteigenden Ethanolreihe (70 %, 96 %, 100 %, 100 %, jeweils 30 Minuten) und der Transfer in Xylol für 30 Minuten. Nun wurden die Gewebestücke zur Infiltration bei 60°C in flüssiges Paraffin eingelegt und anschließend in einer Form mit Paraffin ausgehärtet, um nach der Aushärtung geschnitten zu werden.

Die Paraffin-Zellschnitte der Calvarien wurden über Nacht bei 42°C aufgewärmt und 15 Minuten in Xylol unter dem Abzug entparaffiniert. Anschließend wurden sie in einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 100 %, 96 %, 70 %, aqua dest., jeweils 2 Minuten) gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Schnitte in einem Citratpuffer erst 5 Minuten bei 800 Watt, dann 10 Minuten bei 400 Watt in der Mikrowelle erwärmt. Danach wurden sie 30 Minuten im Citratpuffer abgekühlt. Nun wurden die Schnitte 5 Minuten in 1 x PBS gewaschen und für 10 Minuten ein Peroxidase-Block mit 3 % H₂O₂ (DakoCytomation, S2001) durchgeführt. Nach weiterem PBS-Waschen wurde der Dkk1-Antikörper tropfenweise auf die Schnitte gegeben und die Schnitte 90 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Nun wurde wieder mit PBS gewaschen und der zweite Antikörper auf die Schnitte gegeben und für 30 Minuten inkubiert. Nach PBS-Waschen wurde der dritte Antikörper appliziert, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation in der feuchten Kammer. Nun wurde nochmals mit PBS gewaschen und 2 Tropfen DAB in 1 ml DAB-Puffer (DakoCytomation, K3467) für sieben Minuten auf die Schnitte gegeben. Anschließend wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gewaschen, für 60 Sekunden in Mayers Hämalaun (1:5 Verdünnung, Merck) gefärbt und 10 Minuten fließend gewässert. Nach dem Waschen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %, 100 %) wurden die Schnitte dreimal in Xylol gewaschen und mit DPX eingedeckt.

- | | |
|---------------------------------|--|
| Dkk1-Antikörper: | Santa Cruz, (Y-17) sc-14949
1:100 Verdünnung in BSA (1%)-PBS |
| 2. Antikörper-Ziegen-IgG-biot.: | DakoCytomation, E 0466
1:200 Verdünnung in BSA (1%)-PBS mit 1:50 Mäuseserum
(DakoCytomation, X 0910) |
| 3. Antikörper Streptavidin: | DakoCytomation, P 0397
1:200 Verdünnung in BSA (1%)-PBS |

	10 x PBS:
	4 g KCl
	4 g K_2HPO_4
	160 g NaCl
	28,8 g $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$
	pH 7,2-7,4
	Dieser Puffer wurde 10 x mit Wasser verdünnt
Citratpuffer:	Lösung A: 0,1 M Citronensäure
	Lösung B: 0,1 M Na-Citrat
	9 ml Lösung A + 41 ml Lösung B auf 500 ml mit Wasser auffüllen

3.2 Untersuchung der Funktion von Dkk1 in vitro

Um den Einfluss von Dkk1 auf die Osteoblasten-Differenzierung in vitro zu untersuchen, sollten Osteoblasten der MC3T3-Zelllinie stabil mit einem Plasmid transfiziert werden, in dem Dkk1 unter dem Einfluß des stark aktiven CMV-Promoters stand. Dies sollte zur Überexpression von Dkk1 in den transfizierten Osteoblasten führen. Hierzu wurde zunächst der kodierende Abschnitt der Dkk1-cDNA in den Expressionsvektor pCMV-Tag4-Expressionsplasmid (Stratagene, 211174) eingefügt.

3.2.1 Herstellung des pCRII-TOPO-Dkk1-Plasmids

Der erste Schritt zur Herstellung des Dkk1-Expressionsplasmids war die PCR-Amplifikation unter Anwendung der oben erwähnten Primer (Dkk1-Primer 3 und 4, siehe Tabelle 1) aus der vorher durch die Osteoblasten-Kultivierung gewonnenen cDNA. Nach der Amplifikation wurde die Dkk1-Bande der Osteoblasten-cDNA nach Auftrennung durch Gelelektrophorese aus dem Gel extrahiert und in ein Spin Column (Sigma, S-6501) überführt. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm erfolgte nun die Ligation des Dkk1-Fragments mit dem pCRII-TOPO-II-Vektor aus dem „TOPO TA Cloning Kit“ (Invitrogen, K4500-01). Dazu wurde 1 µl des gewonnenen Durchflusses mit folgenden Reagenzien vermischt:

- 1 µl Salz-Lösung
- 1 µl Vektor pCRII-TOPO-II
- 3 µl steriles Wasser

Im nächsten Schritt wurde die ligierte DNA durch Transformation in Bakterien des Stamms E.coli eingebracht. Hierzu wurden nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur 2 µl dieser Lösung zu einer aufgetauten E.coli-Kultur (ebenfalls aus

dem TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen) zugegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die E.coli-Zellen in einem 42°C Wasserbad für 3 Minuten inkubiert (Hitze-Schock). Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C inkubiert, und 50 µl des Ansatzes auf einer mit 40 µl X-Gal (40 mg/ml, Roche, 745740) und 20 µl Ampicillin (100 µg/ml, Roche, 835269) behandelten LB-Agar-Platte (Invitrogen, 22700-025) verteilt. Diese Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden mindestens 2 der weißen Kolonien, die im Gegensatz zu den blauen Kolonien aufgrund der gelungenen Transformation die Fähigkeit verloren hatten, X-Gal umzusetzen, mit einer Pipettenspitze gepickt und in 3 ml LB-Medium (Invitrogen, 12780-052) mit 3 µl Ampicillin bei 37°C und 230 rpm für mindestens 6 Stunden inkubiert.

3.2.2 Plasmidpräparation aus E.coli-Kulturen (Mini-Präparation)

Um die Transformation zu überprüfen, musste die DNA aus den Bakterien gewonnen und sequenziert werden. Für die DNA-Isolation aus den 3 ml-Kulturen wurde das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ der Firma Qiagen (27106) benutzt. Dazu wurden 1,5 ml der Kulturen für 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Bakterien in 250 µl P1-Puffer resuspendiert. Es wurden 250 µl P2-Puffer, 350 µl N3-Puffer zugegeben und die Suspension durch Invertieren vermischt. Anschließend wurde für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in eine QIAprep Column transferiert. Nun folgte eine 60-sekündige Zentrifugation, nach der der Durchfluss verworfen wurde. Nach einem Waschschrift mit 500 µl PB-Puffer und einer weiteren Zentrifugation mit Durchflussentfernung wurden 750 µl PE-Puffer zugegeben und nochmals für eine Minute zentrifugiert. Wieder wurde der Durchfluss entfernt und abermals zentrifugiert, um Restpuffer zu eliminieren. Die QIAprep Column wurde in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 50 µl Wasser gelöst und abzentrifugiert. Anschließend wurde ihre Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

3.2.3 Plasmid-Sequenzierung

Von der so gewonnenen Plasmid-DNA wurden je 500 ng zur Sequenzierung benutzt. Den 500 ng Plasmid-DNA wurden hinzugefügt:

6 µl 2,5x BigDye-Sequenzierungspuffer (Applied Biosciences, 4305603)
15 pmol Primer (M13 Forward Primer (Invitrogen) oder M13 Reverse Primer (Invitrogen) für TOPO-Plasmide)
2 µl Big Dye (Applied Biosciences, 4337449)
9 µl steriles Wasser

Diese Lösung wurde im Thermocycler zu folgenden Konditionen weiterverarbeitet:

25 Zyklen: 10 Sekunden bei 96°C
 5 Sekunden bei 50°C
 4 Minuten bei 60°C

Anschließend wurde das Sequenzier-Produkt mit 80 µl DEPC-H₂O versetzt und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 10 µl 3 M Natriumacetat pH 6 und 300 µl 100 % Ethanol behandelt. Nach einer 5-minütigen Inkubation wurde für 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand komplett entfernt. Das entstandene Pellet wurde 5 Minuten bei RT getrocknet und anschließend zur Sequenzierung im Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, abgegeben.

3.2.4 Herstellung des CMV-Dkk1-Expressionsplasmids

Die cDNA aus dem Plasmid pCRII-TOPO-Dkk1 wurde nun durch gerichtete Restriktion in das pCMV-Tag4-Expressionsplasmid (Stratagene, 211174) überführt. Dazu wurden 2 µg des pCRII-TOPO-Dkk1-Plasmids mit folgendem vermischt:

2 µl 10 x Restriktions-Puffer (Roche)
1 µl Not I-Restriktionsenzym (Roche)
1 µl Hind III-Restriktionsenzym (Roche)
14 µl steriles Wasser

Dieser Restriktionsansatz wurde bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Gleichzeitig wurden ebenfalls 2 µg des pCMV-Tag4-Plasmids mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Die Restriktionen wurden auf ein 1 %-iges

Agarosegel aufgetragen. Beim pCRII-TOPO-Dkk1-Plasmid wurde die 1019 bp große Bande ausgeschnitten, beim pCMV-Tag4 die 4319 bp große Bande. Unter Anwendung des „QIAEX II Gel Extraction Kits“ (Qiagen, 20051) wurde die DNA aus den Gelfragmenten extrahiert. Dazu wurden 500 µl des QX1 Puffers, sowie 10 µl der QIAEX-Glasperlen-Suspension den beiden Gelfragmenten zugegeben und das Ganze für 15 Minuten bei 50°C erhitzt, um die Agarose aufzulösen und die DNA an die QIAEX-Perlen zu binden. Alle 2 Minuten wurde diese Suspension auf dem Vortex aufgerührt. Nach 1-minütiger Zentrifugation und Entfernen des Überstands wurde das Pellet mit weiteren 500 µl des QX1 Puffers gelöst und zentrifugiert. Anschließend wurde das entstandene Pellet zweimal mit einem PE-Puffer gewaschen. Nun wurde das Pellet an der Luft bis zu 70 % getrocknet, in 20 µl Wasser gelöst und 5 Minuten inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation wurden 15 µl des Überstands abgenommen und davon 2 µl auf einem Agarosegel auf seine Konzentration hin überprüft. Für die Ligation wurden anschließend folgende Reagenzien genommen:

- 1 µl pCMV-Tag4
- 2 µl Dkk1-Insert
- 2 µl T4-Ligations-Puffer (Roche)
- 1 µl T4-Ligase (Roche)
- 14 µl steriles Wasser

Sowohl die Ligation als auch eine Kontrolle ohne Dkk1-Insert wurden über Nacht bei 16°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden 5 µl der Ligation als auch der Kontrolle in kompetente *E. coli* transformiert und ausplattiert, wobei hier als Selektionsantibiotikum Kanamycin (Roche) benutzt wurde. Von den gewachsenen Kolonien wurden fünf gepickt und die Plasmid-DNA mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (siehe 3.2.2.) gewonnen. Diese Plasmid-DNA wurde nun einer Kontrollrestriktion mit Not I und Hind III unterworfen:

- 6 µl Plasmid-DNA
- 2 µl Restriktions-Puffer (Roche)
- 0,5 µl Not I-Restriktionsenzym (Roche)
- 0,5 µl Hind III-Restriktionsenzym (Roche)
- 11 µl steriles Wasser

Hierbei zeigte sich bei allen Plasmiden die erwartete Bande bei 1019 bp. Eine der Kulturen wurde dementsprechend in einer Maxi-Präparation vervielfältigt.

3.2.5 Plasmidpräparation aus 500 ml E.coli-Kulturen (Maxi-Präparation)

Der nächste Schritt bestand nun in einer Vervielfältigung der durch Kontrollrestriktion bestätigten Plasmid-DNA, um genügend Plasmid-DNA für die Zelltransfektionen zur Verfügung zu haben. Dazu wurden 500 µl der schon vorher zur Isolierung der Plasmid-DNA benutzten E.coli-Kultur in 3ml LB-Medium mit 3 µl Ampicillin aufgenommen und für 6 Stunden bei 37°C und 230 rpm hochgeschüttelt. Von dieser Kultur wurde wiederum 1 ml in 500 ml LB-Medium mit 500 µl Ampicillin aufgenommen und für 18 Stunden bei 37°C über Nacht geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und 5000 rpm pelletiert, der Überstand mit dem Medium wurde entfernt, und die Zellen in 16 ml kalter GTE-Lösung aufgenommen. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden 32 ml einer frisch vorbereiteten 0,2 M NaOH/1 % SDS-Lösung zugegeben. Diese Lösung wurde weitere 5 Minuten inkubiert und dann mit 24 ml Kaliumacetat-Lösung versetzt, woraufhin weitere 15 Minuten Inkubation folgten. Nachdem 15 Minuten bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert wurde, wurde der Überstand durch einen Filter in ein anderes Gefäß übertragen und 36 ml Isopropanol zugesetzt und sofort anschließend für 15 Minuten bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das entstandene Pellet an der Luft getrocknet, um schließlich in 6 ml TE gelöst zu werden.

Nach Zugabe von 3 ml 7,5 M Ammoniumacetat, sowie 15-minütiger Inkubation auf Eis und Zentrifugation zur RNA-Ausfällung, wurde der Überstand in ein neues Gefäß übernommen und 18 ml Ethanol zugegeben und bei -80°C für 5 Minuten gelagert. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation, nach der der Überstand entfernt und das gebildete Pellet an der Luft getrocknet wurde. Das Pellet wurde nun in zweimal 400 µl TE gelöst, auf zwei 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt. Nach Zugabe von je 8 µl RNase A (Roche) folgte eine Inkubation bei 37°C für mindestens eine Stunde. Anschließend wurde das Pellet durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ammoniumacetat-Ethanol-Präzipitation wie oben beschrieben ausgefällt und in 500 µl TE gelöst. Um die Plasmid-DNA noch weiter aufzureinigen, wurde sie mit 200 µl einer 30 %-igen PEG 8000-Lösung versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde sie für 20 Minuten zentrifugiert und mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Dann wurde sie in 200 µl TE gelöst, um die Konzentration zu messen.

GTE:	50 mM Glukose 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA Sterilfiltration, Lagerung bei 4°C
Kaliumacetatlösung:	294 g 5 M Kaliumacetat 115 ml Essigsäure mit Wasser auf 1 l auffüllen Sterilfiltration, Lagerung bei 4°C
TE:	10 mM tris-Cl, pH 7,4 1 mM EDTA, pH 8,0 (Sigma, E 7889)
PEG-Lösung:	15 g PEG 8000 (Promega, V301) 4,67 g 1,6 M NaCl mit Wasser auf 50 ml auffüllen, Lagerung bei 4°C

3.2.6 Transfektion von MC3T3-Osteoblasten mit dem pCMV-Dkk1-Expressionsplasmid

Zur Transfektion der MC3T3-Osteoblasten wurden die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Zellen aufgetaut, kurz abzentrifugiert, in Kulturmedium aufgenommen und in eine Kulturflasche transferiert. Die MC3T3-Osteoblasten wurden solange in Kultur gehalten, bis sie in der Zellzählung eine Konzentration von 150 000 Zellen/ml erreicht hatten. Dann wurden sie durch Zugabe von Trypsin (Gibco) von der Oberfläche der Kulturflasche abgelöst und 500 000 Zellen in eine 94/16mm-Zellkulturschale ausplattiert. Es wurden 1,5 ml Kulturmedium ohne Serum vorbereitet und mit 24 ng des CMV-Dkk1-Expressionsplasmids versetzt. Es wurden ebenfalls 1,5 ml Kulturmedium ohne Serum mit 60 µl „Lipofectamine 2000“ (Invitrogen, 11668-019) vermischt und nach 5-minütiger Inkubation mit der CMV-Dkk1-Medium-Lösung vermengt. Nach weiteren 20 Minuten, in denen sich die DNA des Plasmids mit dem „Lipofectamine 2000“ kombinierte, wurde dann diese Lösung auf der Zellkulturschale verteilt. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden bei 37°C aufbewahrt.

Nach 24 Stunden wurden die Zellen wieder mit PBS gespült, mit Trypsin gelöst und in eine größere Kulturschale mit 30 ml Medium und 300 µl G418 (Sigma, G 5013) transferiert. Alle 2-3 Tage wurde von nun an das Medium gewechselt und mit G418 selektioniert, bis sich Klone zeigten.

10 der Klone wurden letztendlich mit „Cloning Zylindern“ (Specialty Media, TR-1005) gepickt und einzeln in Kultur mit Kulturmedium gebracht. Nachdem sie eine Konfluenz von 80 % erreicht hatten, wurde aus ihnen wie oben beschrieben RNA

(Siehe 3.1.2.) gewonnen und diese für die Überprüfung der Transfektion per Northern Blotting benutzt.

3.2.7 RNA-Elektrophorese und Membrantransfer (Northern Blotting)

Zur Herstellung des Agarosegels für die RNA-Elektrophorese wurden 80 ml DEPC-Wasser und 10 ml 10x MOPS zusammen mit 1 g Agarosepulver in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlen wurden 12 ml 37 %-iges Formaldehyd zugesetzt und das Gel unter dem Abzug gegossen. Jeweils 2 μ g gewonnene RNA aus den Zellkulturen wurden mit 20 μ l RNA Ladepuffer versetzt, erst 10 Minuten bei 65°C im Heizblock erhitzt und dann auf Eis gelagert. Anschließend wurde das Gel mit der RNA geladen und bei 60 Volt in 1 %-igem MOPS-Puffer laufen gelassen.

Nach ca. 45 Minuten wurde das Gel 5 Minuten in 200 ml einer Wasser-Ethidiumbromid-Lösung (1 μ l/ml Ethidiumbromid) gefärbt und 3-4 Stunden in Wasser gewaschen, um schließlich unter UV-Licht fotografiert zu werden.

Nun wurde das Gel in 10 x SSC äquilibriert und über Nacht mit 10 x SSC auf eine „Hybond-N⁺-Membran“ (Amersham Biosciences, RPN 303B) transferiert. Am nächsten Tag wurde die RNA auf der „Hybond-N⁺-Membran“ durch UV-Licht vernetzt, die Membran wurde 15 Minuten in 6 x SSC gelegt und anschließend mit Wasser gewaschen. Nun folgte der Transfer der Membran in den Hybridisierungssofen in Hybridisierungspuffer bei 60°C für 2 Stunden.

Zur Vorbereitung der Hybridisierungssonde für den Northern Blot wurden 2 μ g des pCRII-TOPO-Dkk1-Plasmids mit EcoR I (Roche) geschnitten, die Restriktion in einem Gel aufgetrennt und die Dkk1-Bande aus dem Gel durch das „QIAEX II Gel Extraction Kit“ (wie in 3.2.4. beschrieben) extrahiert und aufgereinigt. Ca. 50 ng der Dkk1-DNA-Sonde wurden mit 5 μ l Wasser aufgegossen, 5 Minuten gekocht und auf Eis gestellt. Nun wurde folgendes zugesetzt:

2 μ l Random Primer (Roche)

3 μ l ATG-Nucleotid-Mix (Roche)

4 μ l P³²-dCTP (Roche)

1 μ l Klenow Enzym (Roche)

Nach Zugabe der Reagenzien wurde dieses Labeling-Mix 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nun wurde eine G50-Spin-Column (Roche, 1273973) mit 150 μ l STE und Zentrifugation äquilibriert. Dem Labeling-Mix wurden 80 μ l STE zugegeben und die

100 μ l auf die Spin Column gegeben und 2 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde 5 Minuten gekocht und auf Eis gelagert. Vom Durchfluss wurde 1 μ l zur Aktivitätsbestimmung abgenommen und gemessen. Anschließend wurde das Labeling-Mix der Hybridisierungslösung zugegeben. Das Waschen erfolgte einen Tag später. Dazu wurde die Membran zunächst mit 2 x SSC und 0,1 % SDS und dann zweimal 30 Minuten mit 0,5 x SSC und 0,1 % SDS bei 60°C gewaschen. Anschließend wurde die Membran in der Dunkelkammer auf einen Film (X-omat, Kodak, Frankreich) aufgelegt und die Filmkassette bei -80°C gelagert. Nach 7 Tagen wurde der Film entwickelt.

10 x MOPS:	0,4 M MOPS, pH 7 (Roche, 1124684) 0,5 M Natriumacetat 10 mM EDTA DEPC-H ₂ O
RNA Ladepuffer:	720 μ l Formamid 160 μ l 10 MOPS 260 μ l 37 % Formaldehyd 180 μ l DEPC-H ₂ O 100 μ l 80 % Glycerol (in DEPC-H ₂ O) 20 μ l gesättigtes Bromphenolblau (in DEPC-H ₂ O)
20 x SSC:	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat, pH 7
Hybridisierungspuffer:	330 mM Natriumphosphat, pH 7 6,6 % SDS
STE:	10 mM Tris, pH 7,4 10 mM NaCl 1mM EDTA

3.2.8 Von Kossa-Färbung transfizierter MC3T3-Osteoblasten

Zur Charakterisierung des Mineralisationsverhaltens sowohl der transfizierten als auch nicht-transfizierter MC3T3-Osteoblastenkulturen, wurden sie nach von Kossa gefärbt. Dazu wurden Kulturen durch Zugabe von Differenzierungsmedium differenziert. Alle 2-3 Tage wurde das Differenzierungsmedium gewechselt. Nach 20 Tagen wurde bei den Kulturen das Medium abgesaugt und die Zellen wurden dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Nun wurden die Zellen durch Zugabe von kaltem Methanol auf Eis fixiert, anschließend dreimal mit sterilem Wasser gewaschen und mit 5 %-igem Silbernitrat für 30 Minuten bei Raumtemperatur bedeckt. Im nun

folgenden Schritt wurden die Zellen wiederum dreimal mit sterilem Wasser gewaschen und mit Wasser bedeckt gelagert.

Differenzierungsmedium: Minimal essential medium (alpha-modification)-eagle
 10 % fötales Kälberserum (Perbio, 30160)
 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco, 15140-122)
 50 µg/ml Ascorbat (Sigma, 205-126-1)
 10 mM β -Glycerophosphat (Sigma, 212-464-3)

3.3 Herstellung transgener Mäuse

Um langfristig die Effekte von Dkk1 auch in vivo untersuchen zu können, sollte desweiteren ein Konstrukt hergestellt werden, das zu einer Überexpression von Dkk1 in Mäusen führen sollte. Hierzu wurde wiederum die Dkk1-cDNA in einem zur Verfügung stehenden Plasmid unter die Kontrolle eines Osteoblasten-spezifischen Promotor-Fragments des Col1a1-Gens gebracht (Abb. 10A) (Rossert et al., 1995). Das Plasmid wurde anschliessend linearisiert und aufgereinigt, um es in Zusammenarbeit mit dem ZMNH in Maus-Oozyten zu injizieren. Hierdurch soll es in einigen Zellen zu einer stabilen genomischen Integration der betreffenden Transgene (Col1a1-Dkk1) kommen. Die injizierten Oozyten wurden schliesslich von Mitarbeitern des Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) in scheinchwangere Mäuse implantiert, wobei etwa 10 % deren Nachkommenschaft ein integriertes Transgen enthalten sollten. Im Anschluß ist es für das Etablieren von Mauslinien, die Dkk1 dauerhaft überexprimieren, wichtig, diejenigen Mäuse zu identifizieren, bei denen es zu einer stabilen genomischen Integration des Col1a1-Dkk1-Transgens gekommen ist. Diese sogenannten „Founder“ wurden anhand von Schwanzbiopsien durch PCR identifiziert.

3.3.1 Herstellung des Col1a1-Dkk1-Plasmids:

Aus dem vorher hergestellten pCRII-TOPO-Dkk1-Plasmid (siehe 3.2.1.) wurde die Dkk1-cDNA herausgeschnitten. Dazu wurden folgende Reagenzien miteinander vermischt:

3 µg pCRII-TOPO -Dkk1
2 µl 10 x Restriktionspuffer (Roche)
1 µl EcoR I (Roche)
14 µl steriles Wasser

Gleichzeitig wurde auch das zur Verfügung gestellte Plasmid pCol1a1-globin, das den Osteoblasten-spezifischen Collagen-I-Promoter beherbergt und als Klonierungsvektor für das Dkk1-Insert dienen sollte, folgendermaßen geschnitten:

3 µg pCol1a1-globin
2 µl 10 x Restriktionspuffer (Roche)
1 µl Cla I (Roche)
14 µl steriles Wasser

Beide Restriktionen wurden für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden beiden Reaktionsansätzen 1 µl dNTPs (Roche) und 1 µl Klenow-Enzym (Roche) zugegeben und weitere 30 Minuten inkubiert, um eine blunt end-Ligation zu erreichen. Der pCol1a1-globin-Vektor wurde nun noch 30 Minuten lang bei 37°C mit 1 µl alkalischer Phosphatase (Roche) behandelt.

Beide Restriktionen wurden auf einem 0,8 %-igen Agarosegel aufgetrennt und mit dem „QIAEX II Gel Extraction Kit“ (siehe 3.2.4.) aus dem Gel extrahiert und 2 µl der extrahierten DNA auf einem Gel geprüft.

Für den Ligationsansatz wurden die folgenden Reagenzien vermischt:

2 µl des aus dem Gel gewonnenen pCol1a1-globin
2 µl der aus dem Gel gewonnenen Dkk1-DNA
2 µl 10 x Ligationspuffer (Roche)
1 µl T4-Ligase (Roche)
13 µl steriles Wasser

Zusätzlich zum Ligationsansatz wurde noch eine Kontrolle ohne Dkk1-Insert angesetzt. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur ligiert. Am nächsten Tag wurden 5 µl des Ligationsansatzes und der Kontrolle in kompetente E.coli mit dem TOPO TA Cloning Kit (siehe 3.2.1.) transformiert, die Bakterien ausplattiert und über Nacht inkubiert.

24 Stunden später wurden 12 Kolonien der Bakterien, die mit dem pCol1a1-Dkk1-Ligationsansatz transformiert worden waren, mit einer Pipettenspitze gepickt, in 3 ml LB-Medium mit 3 µl Ampicillin bei 37°C und 230 rpm hochgeschüttelt und deren Plasmid-DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (siehe 3.2.2.) gewonnen.

Jeweils 10 µl der Plasmid-DNA wurden in einer Kontrollrestriktion untersucht, indem sie über Nacht mit dem Restriktionsenzym Sma I (bei Raumtemperatur, Roche) in

Anwesenheit von 2 µl Restriktionspuffer geschnitten wurden. Die Kontrollrestriktionen wurden auf einem 0,8 %-igen Agarosegel unter UV-Licht dargestellt. Kulturen 7 und 12 zeigten die korrekten Restriktionsbanden und dementsprechend wurde aus diesen Kulturen mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit die Plasmid-DNA gewonnen und mit dem GH-1-Primer Kontroll-sequenziert (siehe 3.2.3.). Nach Bestätigung der gelungenen Transformation durch die Sequenzierung wurde die Plasmid-DNA von Kultur 7 in einer Maxi-Präparation vervielfältigt. Um ganz sicher zu gehen, dass es sich bei dem besagten Col1a1-Dkk1-Plasmid tatsächlich um das richtige handelte, wurden noch zwei weitere Kontrollsequenzierungen angesetzt, bei denen jeweils als Primer entweder ein Primer für das Globin-Intron des Col1a1-Plasmids oder ein Primer für den Col1a1-Promoter benutzt wurde. Beide Sequenzierungen bestätigten die Richtigkeit des Konstrukts.

GH-1-Primer:	5'-GGACAAGGCTGGTGGGCAC-3'
Globin-Intron-Primer:	5'-ACTACATCCTCCTGGTCATCATCCTGC-3'
Col1a1-Promoter-Primer:	5'-CCAGGATGGCCTGAAAGATTACTAGC-3'

3.3.2 Vorbereitung des Konstrukts zur Injektion in Maus-Oozyten

Für ein Weiterverarbeiten des Col1a1-Dkk1-Konstrukts war eine weitere Restriktion mit dem Enzym Asp 718 (Roche) nötig. 4 Ansätze mit jeweils 2 µg Col1a1-Dkk1-Plasmid, 1 µl Asp 718, 2 µl Restriktionspuffer (Roche) und 15 µl Wasser wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag auf einem 0,8 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Die 4700 bp großen Col1a1-Dkk1-Fragmente wurde mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit isoliert. Der erste Col1a1-Dkk1-Restriktionsansatz wurde anschließend nicht in 20 µl Wasser, sondern in 30 µl eines Injektionspuffers eluiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei 50°C und 2-minütiger Zentrifugation bei 13 000 rpm wurde der Überstand zur Elution des zweiten Restriktionsansatzes verwendet. Es wurde 5 Minuten bei 50°C inkubiert, 2 Minuten zentrifugiert und der Überstand zur Elution des dritten Ansatzes benutzt. Das gleiche Procedere vollzog sich zur Elution des vierten Ansatzes, bei dem am Ende 20 µl des Überstands in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß transferiert wurden. 1 µl dieser Lösung wurden auf einem Gel kontrolliert und weitere 5 µl in 500 µl Wasser bei 260 nm auf ihre Konzentration hin untersucht. Es ergab sich eine Konzentration von 100 ng/µl.

Mikroinjektionspuffer: 10 mM Tris-Cl, pH 7,4
0,1 mM EDTA, pH 8,0 (Sigma, E 7889)

3.3.3 PCR-Analyse der transgenen Mäuse

Zur Identifizierung der Mäuse, bei denen es zu einer stabilen genomischen Integration des Col1a1-Dkk1-Transgens gekommen war, wurden nun den Mäusen 1-2 cm lange Schwanzbiopsien entnommen und zunächst in 700 µl Lysis-Puffer zusammen mit 50 µl Proteinase K (10 mg/ml) in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen über Nacht bei 55°C verdaut.

Lysis-Puffer: 50 mM Tris, pH 8,0
100 mM EDTA
100 mM NaCl
1 % SDS

Anschliessend wurden die Proben bei 13 000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert und vom Überstand 700 µl in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß transferiert. Nun wurden die Pellets durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Isopropanol-Ethanol-Präzipitation ausgefällt und in 50 µl TE mehrere Stunden gelöst. Für die Genotypisierungs-PCR wurden die Lösungen 10 x verdünnt und 1 µl benutzt (siehe 3.1.4.). Als entsprechendes Primerpaar wurden folgende Primer benutzt:

Dkk1-TG-back: 5'-GGCTGGTAGTTGTCAAGAGTCTGG-3'
Globin-Intron-Primer: 5'-ACTACATCCTCCTGGTCATCATCCTGC-3'

3.4 Untersuchung der Interaktion von Dkk1 und Krm2 im Osteoblasten

Als nächster Schritt sollte die Wnt-Signalkaskade in den MC3T3-Osteoblasten untersucht werden. Dies sollte durch transiente Transfektionsexperimente erreicht werden, in denen die Zellen mit dem Reporterplasmid TOPflash transfiziert wurden, das mehrere Bindungsstellen für LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren vor einem Luciferase-Gen enthält (Hsu et al., 1998; Li et al., 1999). Durch die Stimulierung der Wnt-Signalkaskade werden die LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren aktiviert und besetzen die Bindungsstellen am TOPflash Reporterplasmid, was zu einer Aktivierung des Luziferase-Gens führt und durch Umsetzung des Luziferin-Farbstoffes in einem Luminometer gemessen werden kann. Es wurden Transfektionsexperimente mit den Wnt-Expressionsplasmiden pLNC-Wnt1, -2 und -3

durchgeführt. Zum einen wurde die Aktivität der Wnt-Signalkaskade nur nach Zugabe von den jeweiligen Wnt-Expressionsplasmiden, als auch durch Kotransfektion mit den Expressionsplasmiden pCMV-Dkk1, pCS-Krm2 wie auch in Kombination gemessen.

3.4.1 Transfektion

Am ersten Tag wurden 50 000 undifferenzierte MC3T3-Zellen/well pro 6-well-Kulturschale ausplattiert. Am zweiten Tag wurden die Transfektions-Ansätze wie folgt vorbereitet:

Tabelle 2: Volumina für die einzelnen Transfektionsansätze

	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15
pCMV-LacZ	2µg	2µg	2µg	2µg	2µg
pTOPflash	2µg	2µg	2µg	2µg	2µg
pLNC-Wnt1		2µg	2µg	2µg	2µg
pCMV-Dkk1			2µg		2µg
pCS-Krm2				2µg	2µg
2,5 M Calciumchlorid	10µl	10µl	10µl	10µl	10µl
2 x BBS	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
H ₂ O	90µl	90µl	90µl	90µl	90µl

Die gleichen Transfektionsansätze wurden anstelle von pLNC-Wnt1 noch mit den Expressionsplasmiden pLNC-Wnt2 bzw. pLNC-Wnt3 durchgeführt. Alle Wnt-Expressionsplasmide wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Kitajewski aus New York, USA, zur Verfügung gestellt. Das pCS-Krm2-Expressionsplasmid wurde von Herrn Prof. Dr. Chr. Niehrs, Deutsches Krebsforschungszentrum in Heidelberg, bereitgestellt.

Die Transfektions-Ansätze wurden 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise auf die Zellen gegeben. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt. Am vierten Tag wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und 100 µl Zell-Lysis-Puffer zugegeben und die Zellen abgekratzt. Nach Transfer in ein 1,5 ml-

Reaktionsgefäß wurden die Zellen durch dreimaliges Gefrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff aufgebrochen. Nun wurde 5 Minuten bei 4°C und 13 000 rpm zentrifugiert und 100 µl des Überstands für den β-Galaktosidase und den Luziferin-Assay verwendet.

2 x BBS:	50 mM BES 280 mM NaCl 1,5 mM Natriumphosphat, pH 6,95
Zell-Lysis-Puffer:	100 mM Tris, pH 7,8 1 mM DTT

3.4.2 Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität

Für den β-Galaktosidase-Assay wurden 40 µl Zelllysat mit 950 µl β-Galaktosidase-Puffer und 10 µl Resorufin-β-Galaktopyranosid (7,5 mg/ml in DMSO) versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde die Umsetzung des Resorufin-β-Galaktopyranosid durch Absorptionsmessung bei 572 nm gemessen.

β-Galaktosidase-Puffer:	50 mM Tris, pH 7,5 10 mM MgCl ₂ 100 mM NaCl
-------------------------	--

3.4.3 Bestimmung der Luziferase-Aktivität

Für den Luziferin-Assay wurden 40 µl Zelllysat mit 330 µl Luziferin-Puffer, 100 µl 50 x Luziferin-Lösung (D-Luziferin, PJK GmbH, Kleinbittersdorf) vermischt und anschließend die Umsetzung des Luziferins im Luminometer (Monolight 3010, Pharmingen) gemessen.

Luziferin-Puffer:	100 mM Tris, pH 7,8 5 mM ATP 15 mM MgSO ₄ 1 mM DTT
-------------------	--

3.5 Analyse von Skeletten Fzd9-defizienter Mäuse

Um die Frage zu beantworten, ob Fzd9 in der Maus die Knochenformation reguliert, wurde eine eingehende Charakterisierung des Knochenphänotyps der Fzd9-defizienten Maus vorgenommen. Zu dieser ausführlichen Charakterisierung gehören die Kontaktradiographie, die einen groben Überblick über die Konsequenz des fehlenden Fzd9-Signals liefert, die folgende Histologie und Histomorphometrie, um eventuelle Unterschiede zu quantifizieren sowie die Evaluierung der physiologischen Relevanz des Knochenphänotyps durch biomechanische Testung des Femurs.

3.5.1 Kontaktradiographie

Die Skelette 6 Monate alter Fzd9-defizienter Weibchen wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. med. U. Francke, Genetics and Pediatrics, Stanford University, San Francisco, USA zur Verfügung gestellt. Für die dynamische Histomorphometrie war den Mäusen sieben Tage und zwei Tage vor Exitus nach einem standardisierten Protokoll für Doppelmarkierungen des Knochens Calcein in die Bauchhöhle injiziert worden (Vignery und Baron, 1980). Von den Skeletten wurde eine Kontaktradiographie (X-ray cabinet, Faxitron Corp., USA) mit 50 kV für 1 Minute angefertigt. Dazu wurden X-omat MA Filme der Firma Kodak verwendet.

3.5.2 Histologie

Das Skelett mit dem Bewegungsapparat wurde für 24 Stunden in 3,7 %-igem Formaldehyd fixiert. Jeweils die rechte Tibia und Lendenwirbelsäule wurden präpariert. Nach der folgenden Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Tibiae und Lendenwirbelsäulen in Methylmetacrylat (Merck, Darmstadt) zur Gewebeeinfiltration überführt. Nun wurden die Präparate in ein aushärtendes LPG-Benzoylperoxid-Methylmetacrylat-Gemisch eingebettet. Nach Anschleifen der Schnitte wurden 5 µm dicke Schnitte an einem Rotationsmikrotom (Cut 4060, MicroTech, München) angefertigt.

Die angefertigten Schnitte wurden zur einen Hälfte mit Toluidin-Blau (1 % Toluidin-Blau O, Merck, Darmstadt) gefärbt, zur anderen nach von Kossa versilbert und nach van Gieson gegengefärbt. Von den mit Calcein markierten Mäusen wurden nicht aufeinanderfolgende, 12 µm dicke Schnitte angefertigt, die unter UV-Licht ausgewertet und somit nicht gefärbt wurden. Die mikroskopische Auswertung der Schnitte erfolgte mit einem Axioskop II (Carl Zeiss, Jena).

Für die μ -CT-Aufnahmen wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. A. Schilling, Experimentelle Unfallchirurgie, den Mäusen der rechte Femur entfernt und vom Weichteilgewebe befreit. Der Femur wurde für 24 Stunden in 3,7 %-igem Formaldehyd fixiert und anschließend am μ -CT ausgewertet.

3.5.3 Histomorphometrie

Die quantitative Histomorphometrie wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. M. Priemel, Experimentelle Unfallchirurgie, an nicht entkalkten, Toluidin-Blau gefärbten histologischen Schnitten der Wirbelsäule und der Tibia durchgeführt. Die Analyse von Knochenvolumen (BV/TV in %), Trabekeldicke (TbTh in μ m), Osteoblastenzahl pro Knochenoberfläche (NOb/BPm pro mm) und Osteoklastenzahl pro Knochenoberfläche (Noc/BPm pro mm) wurden nach standardisierten Protokollen (Parfitt et al, 1987) mit einem Osteomeasure Histomorphic System (Osteometrix, Atlanta, Georgia, USA) durchgeführt.

3.5.4 Biomechanik

Beide Femura wurden freipräpariert, exartikuliert, vom Weichgewebe befreit und in 70 % Ethanol fixiert. 12 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Präparate in isotonische Kochsalzlösung überführt und rehydriert. 30 Minuten vor Versuchsbeginn wurden die Präparate auf 37°C erwärmt, um physiologische Verhältnisse zu simulieren (Turner u. Burr, 1993).

Es wurde ein 3-Punkt-Biegeversuch in Zusammenarbeit mit Herrn cand. med. T. Kummer, Experimentelle Unfallchirurgie, auf einer kommerziellen Hochpräzisionsmaschine (Z2.5/TN 1S Test Maschine, Zwick GmbH&Co, Ulm, Deutschland) durchgeführt. Hierbei wurden die Enden des Knochens von zwei Auflagen unterstützt, die 10 mm voneinander entfernt sind. Dem Versuchsaufbau gemäß wurden die Femura einem axialen Druck in antero-posteriorer Richtung ausgesetzt, ausgeübt über einen Stempel, der sich mit einer Geschwindigkeit von 10 mm/Minute bewegt. Hierbei wurde über einen Computer eine Kraft-Dehnungskurve aufgezeichnet. Aus dieser Kurve wurde die maximale Kraft, die auf den Knochen gewirkt hat, direkt abgelesen (Pereira et al., 1993).

4 Ergebnisse

4.1 Die Expression des Wnt-Antagonisten Dkk1 wird in der terminalen Osteoblasten-Differenzierung stark induziert

In der Experimentellen Unfallchirurgie wurde die Expression von 36 000 Genen in einer Affymetrix-Expressionsanalyse im Verlauf der Differenzierung vom nicht-mineralisierten (Tag 5) zum mineralisierten (Tag 25) Osteoblasten simultan untersucht (Schilling et al, 2005). In der Analyse dieser Daten zeigte sich unter anderem, dass im Verlauf dieser Differenzierung die Expression bestimmter Osteoblasten-spezifischer Gene wie Phex (phosphate regulating gene with homology to endopeptidases on the X-chromosome), Bone sialoprotein (Bsp) und Osteocalcin (Osc) induziert wurde (Abb. 4). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass sich der Wnt-Antagonist Dkk1 unter den 10 am stärksten induzierten Genen befand und dass seine Expression durch die Mineralisation der Kulturen genau wie die des wichtigen Osteoblasten-Markers Osteocalcin (Osc) 26-fach induziert wird (Abb. 4).

A Geninduktion Tag5 – Tag25

Gen	Induktion
1. Ptprz	119x
2. Fc Receptor Type II	79x
3. Proteoglycan Core protein	32x
4. Adipsin	30x
5. Osteocalcin	26x
6. Dkk1	26x
7. ApoE	24x
...	
10. Bone Sialoprotein	21x

B Affymetrix Signal Tag5-Tag25

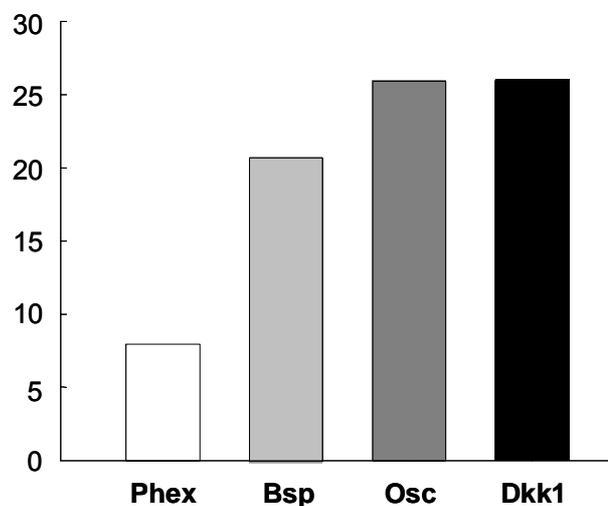


Abbildung 4: Die Expression von Dkk1 wird im Verlauf der Osteoblasten-Differenzierung deutlich gesteigert: (A) Rangliste der 10 am stärksten induzierten Gene in der Affymetrix-Expressionsanalyse (B) Die Induktion der Dkk1-Expression in mineralisierten Osteoblasten (Tag25) im Vergleich zu nicht-mineralisierten Osteoblasten (Tag5) ist vergleichbar mit der von bekannten Differenzierungsmarkern wie Phex, Bone sialoprotein (Bsp) und Osteocalcin (Osc).

4.2 Dkk1 wird Knochen-spezifisch exprimiert

Zunächst sollte das Ergebnis aus der Affymetrix-Expressionanalyse durch eine RT-PCR-Expressionsanalyse bestätigt werden. Dazu wurden erneut aus den Schädeldächern neugeborener Mäuse Primär-Kultur-Osteoblasten extrahiert und kultiviert. Es folgte die Stimulation mit Ascorbat und β -Glycerophosphat, nachdem die Zellen eine Konfluenz von 80 Prozent erreicht hatten. Nach 5 und 25 Tagen wurde aus den Kulturen RNA isoliert. Auch aus verschiedenen Geweben adulter Mäuse wurde RNA gewonnen. Die gewonnene RNA wurde anschliessend durch reverse Transkription in die cDNA umgeschrieben und mit spezifischen Primern in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Hierbei zeigte sich einerseits, dass Dkk1 in der Tat im Verlauf der Osteoblasten-Differenzierung in seiner Expression stark induziert wird, wodurch die Affymetrix-Analyse bestätigt werden konnte. Zudem zeigte sich unerwarteterweise, dass Dkk1 ausschliesslich im Knochen bzw. Schädeldach, nicht jedoch in anderen Geweben adulter Mäuse exprimiert wird (Abb. 5). Die Bedeutung dieser Gewebe-spezifischen Dkk1-Expression wird dadurch verstärkt, dass Dkk2 und Dkk3, zwei weitere Mitglieder der Dkk-Familie, zwar ebenfalls im Verlauf der Osteoblasten-Differenzierung in ihrer Expression induziert werden, allerdings nicht selektiv im Knochen exprimiert werden (Abb. 5).

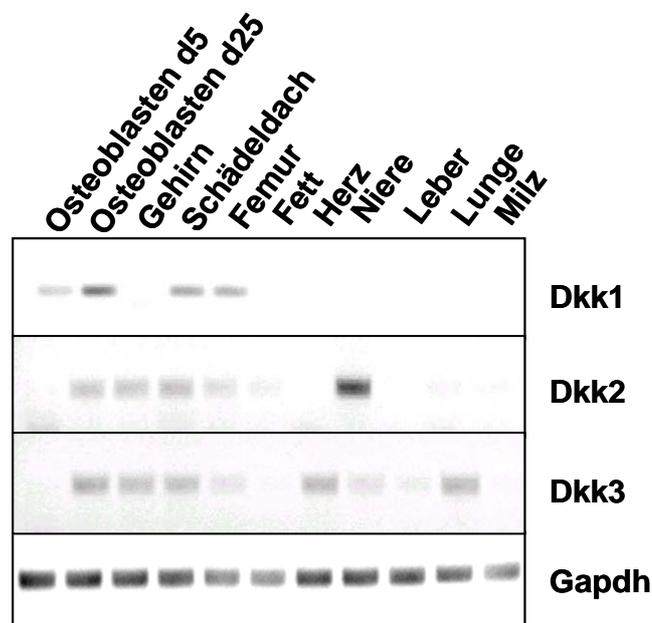


Abbildung 5: Induktion und Gewebespezifität der Dkk-Expression: Die RT-PCR-Expressionsanalyse bestätigt die Gen-Induktion von Dkk1 im Verlauf der Osteoblasten-Differenzierung und zeigt desweiteren auf, dass Dkk1, im Gegensatz zu Dkk2 und Dkk3, in adulten Mäusen Knochen-

spezifisch exprimiert wird. Die Gapdh-Expression diente als Kontrolle für die PCR-Amplifikation und cDNA-Qualität.

Um die osteoblastäre Expression auch in vivo auf Proteinebene zu demonstrieren, wurde zudem eine Immunhistochemie angefertigt. Hierbei zeigte sich nach Anfärbung von Schädeldach-Schnitten 4 Tage alter Mäuse mit einem Dkk1-Antikörper eine starke Anfärbung Knochen-bildender Osteoblasten (Abb. 6).

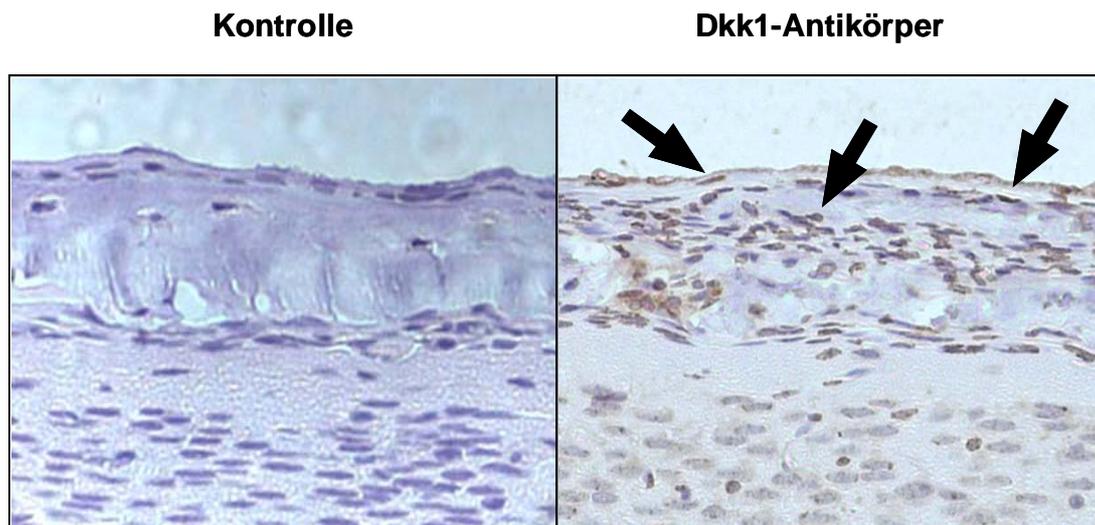


Abbildung 6: Immunhistochemie an 4 Tage alten Maus-Calvarien: In der Immunhistochemie mit einem Dkk1-Antikörper zeigt sich eine deutliche Anfärbung Dkk1-sezernierender Osteoblasten (Pfeile).

4.3 Dkk1-Überexpression in Osteoblasten führt zu verringerter Mineralisation

Da die Knochen-spezifische Expression von Dkk1 auf eine physiologische Rolle bei der Knochenformation hindeutete, sollte zunächst der Einfluss von Dkk1 auf die Osteoblasten-Differenzierung in vitro untersucht werden. Um dies zu erreichen sollten Osteoblasten der MC3T3-Zelllinie stabil mit einem Plasmid transfiziert werden, in dem Dkk1 unter dem Einfluß eines CMV-Promoters steht, was zu einer Überexpression von Dkk1 führen sollte. Zur Herstellung dieses Expressionsplasmids wurde die für Dkk1 kodierende cDNA mittels RT-PCR amplifiziert und zunächst in den Klonierungsvektor pCRII-TOPO eingesetzt (Abb. 7A). Unter Zuhilfenahme der Restriktionsenzyme Not I und Hind III wurde die Dkk1-cDNA anschließend in das Expressionsplasmid pCMV-Tag4 überführt. Das resultierende Plasmid pCMV-Tag4-Dkk1 wurde durch eine Restriktionsanalyse mit Not I und Hind III überprüft und in ausreichender Menge zur Transfektion von MC3T3-Zellen aufgereinigt (Abb. 7B).

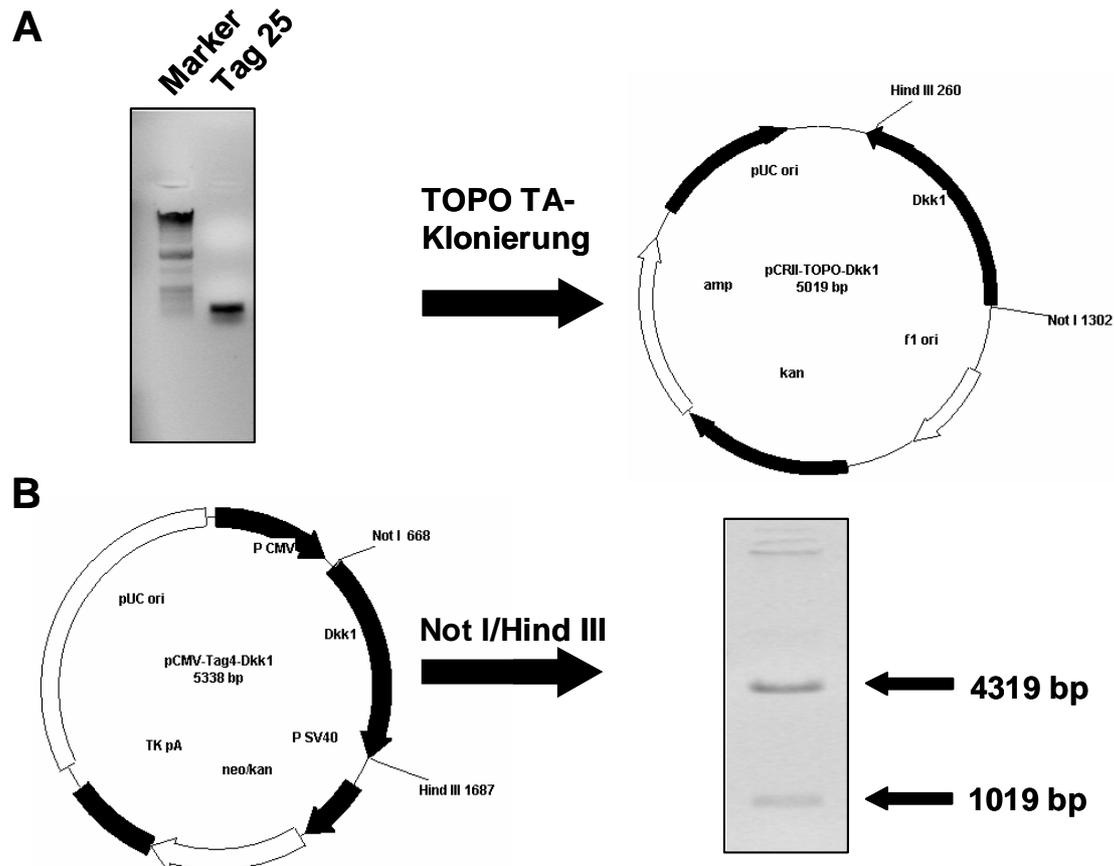


Abbildung 7: Herstellung eines Dkk1-Expressions-Plasmids: (A) Aus cDNA mineralisierter Osteoblasten (Tag 25) wurde durch PCR die Dkk1-cDNA mit spezifischen Primern amplifiziert. Nach Auftrennung durch Gelelektrophorese wurde die 1 kb große Bande aus dem Gel extrahiert und per TOPO TA-Klonierung in das pCRII-TOPO-Plasmid eingebracht. (B) Durch gerichtete Restriktion mit Not I und Hind III wurde die Dkk1-cDNA anschließend aus dem pCRII-TOPO-Dkk1-Plasmid herausgeschnitten und mit dem pCMV-Tag4-Plasmid ligiert. Die gelungene Ligation wurde durch eine Kontrollrestriktion mit Not I und Hind III bestätigt. Deutlich sind eine größere Bande mit 4319 bp, die das aufgeschnittene Plasmid darstellt, sowie eine kleinere Bande mit 1019 bp zu sehen, bei der es sich um das Dkk1-Insert handelt.

Mit diesem pCMV-Tag4-Dkk1-Plasmid wurden nun MC3T3-Osteoblasten durch Lipofektion transfiziert. Da im Dkk1-Expressionsplasmid auch ein Neomycin-Resistenz-Gen enthalten war, konnten einzelne Klone durch G418-Selektion isoliert werden. Um den Erfolg dieser Transfektion zu überprüfen, wurde RNA aus den CMV-Dkk1-transfizierten Osteoblasten extrahiert und mit einer radioaktiv-markierten Dkk1-Sonde in einem Northern Blot hybridisiert (Abb. 8A). In zwei Klone (Klon 1 und 3) zeigten sich deutliche Hybridisierungsbänder, so dass man bei diesen beiden Klone von einer erfolgten Integration des CMV-Dkk1-Plasmids ins Genom ausgehen konnte.

Dkk1-exprimierende Klone wurden anschließend im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen durch Zugabe von Ascorbat und β -Glycerophosphat differenziert und 20 Tage später durch eine Silbernitratfärbung nach von Kossa auf Mineralisation untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Dkk1-überexprimierenden Klone 1 und 3 im Vergleich zu Klon 2 und nicht transfizierten MC3T3-Kulturen eine stark verringerte Mineralisation aufwiesen (Abb. 8B), wodurch demonstriert werden konnte, dass eine frühzeitige und erhöhte Expression von Dkk1 die Differenzierung von Osteoblasten inhibiert.

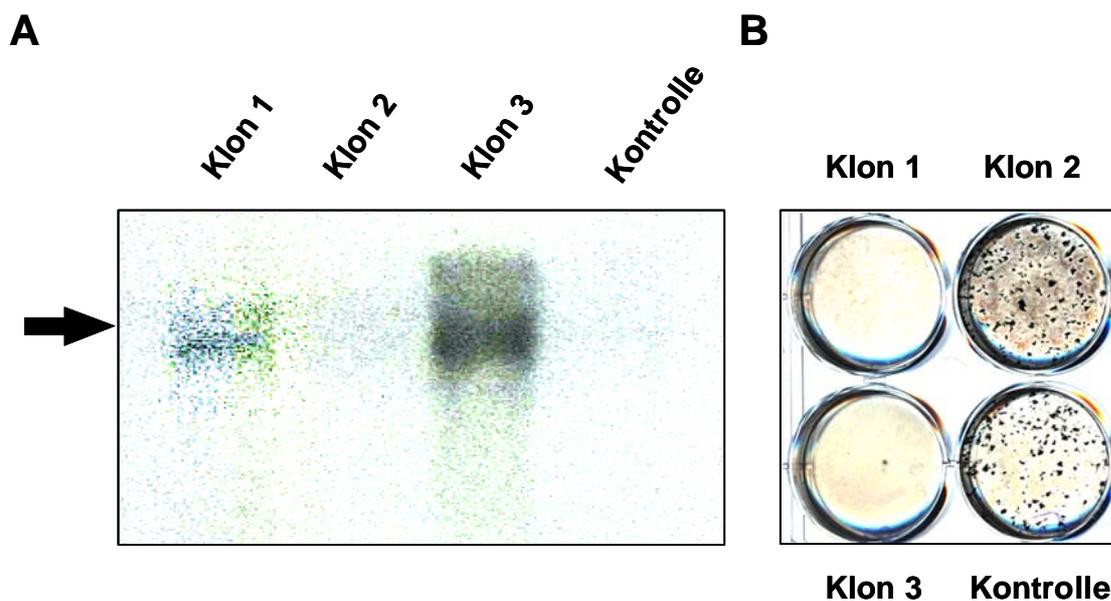


Abbildung 8: Einfluss von Dkk1 auf die Mineralisation von MC3T3-Osteoblasten: (A) RNA aus undifferenzierten stabil transfizierten MC3T3-Osteoblasten wurde mittels Northern Blot auf die Expression von Dkk1 untersucht. Bei den Klonen 1 und 3 zeigte sich im Gegensatz zu Klon 2 und den Kontroll-transfizierten Zellen eine starke Dkk1-Expression (Pfeil). (B) In der Silbernitratfärbung nach von Kossa zeigte sich, dass Dkk1-exprimierende Kulturen (Klone 1 und 3) im Gegensatz zu den Kontrollen nicht mineralisiert sind.

4.4 Dkk1-Überexpression in vivo: Col1a1-Dkk1

Um diese Ergebnisse langfristig auch in vivo bestätigen zu können, sollte zudem ein transgenes Mausmodell mit Osteoblasten-spezifischer Überexpression von Dkk1 hergestellt werden. Um dies zu erreichen sollte die Dkk1-cDNA in einem Plasmid unter die Kontrolle eines Osteoblasten-spezifischen Promotor-Fragments des Col1a1-Gens gebracht werden (Abb. 9A) (Rossert et al., 1995). Hierzu wurde die Dkk1-cDNA aus dem Plasmid pCRII-TOPO-Dkk1 (Abb. 7A) mit dem Restriktionsenzym EcoR I herausgeschnitten und in das zur Verfügung gestellte

Plasmid pCol1a1-globin eingesetzt. Die Ligation wurde durch Kontrollrestriktion mit dem Restriktionsenzym Sma I überprüft (Abb. 9B).

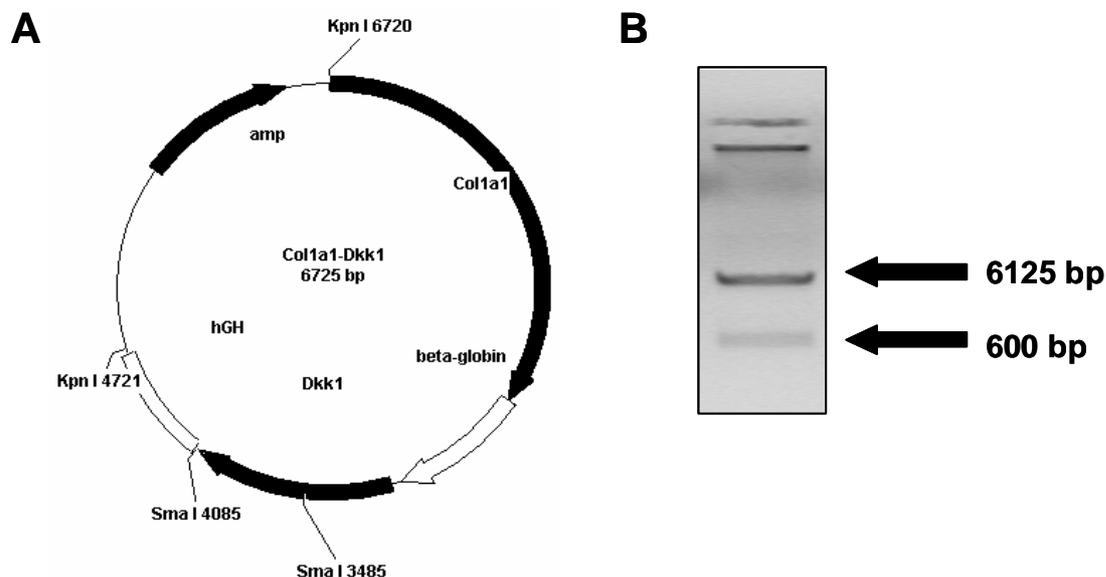


Abbildung 9: Herstellung eines DNA-Konstrukts zur Osteoblasten-spezifischen Überexpression von Dkk1 in transgenen Mäusen: (A) Das Col1a1-Dkk1-Plasmid enthält ein Osteoblasten-spezifisches Promotor-Fragment des Col1a1-Gens, das erste Intron des beta-Globin-Gens, die Dkk1-cDNA und das 3'-Ende des hGH-Gens mit Polyadenylierungssignal. Die Lage der Schnittstellen des Restriktionsenzym Sma I ist eingezeichnet. (B) Um die korrekte Orientierung der Dkk1-cDNA zu überprüfen, wurde eine Kontrollrestriktion mit dem Restriktionsenzym Sma I durchgeführt. In der Gelelektrophorese zeigte sich die erwartete Bande bei 600 bp.

4.5 PCR-Genotypisierung der Col1a1-Dkk1-Mäuse

Das Col1a1-Dkk1-Transgen wurde nach Restriktion mit Kpn I und anschließender Gelelektrophorese vom restlichen Plasmid getrennt. Das aufgereinigte DNA-Fragment wurde in Zusammenarbeit mit dem ZMNH in Maus-Zygoten injiziert, wodurch es in einigen Zellen zu einer stabilen genomischen Integration des Transgens kommen sollte. Die injizierten Zygoten wurden anschließend in scheinchwangere Mäuse implantiert. Von der Nachkommenschaft dieser Mäuse wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien gewonnen, die durch eine Transgen-spezifische PCR-Reaktion analysiert wurde. Dies führte zur Identifizierung von bisher 6 sogenannten Founder-Mäusen, die im Anschluss für die weitere Verpaarung genutzt werden konnten (Abb. 10).

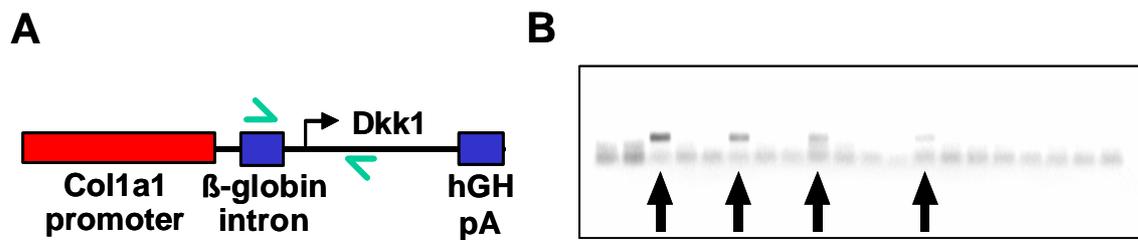


Abbildung 10: Herstellung Col1a1-Dkk1-transgener Mäuse: (A) Schematische Darstellung des Col1a1-Dkk1-Transgens. Die Lage der Primer für die PCR-Genotypisierung ist durch grüne Pfeile gekennzeichnet. (B) PCR-Genotypisierung der Col1a1-Dkk1-Mäuse. Exemplarisch sind hier die PCR-Reaktionen von 20 Mäusen gezeigt, von denen 4 als transgen identifiziert werden konnten (Pfeile).

4.6 Krm2 wird Knochen-spezifisch exprimiert

Auch wenn die phänotypische Analyse der Col1a1-Dkk1-transgenen Mäuse noch aussteht, sollte in einem weiteren Schritt zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Dkk1 die Expression von Kremen-Rezeptoren im Verlauf der Osteoblasten-Differenzierung untersucht werden. Da beide Krm-Gene nicht als Oligonukleotide auf den Affymetrix-Chips repräsentiert waren, wurde die Expression von Krm1 und Krm2 mittels RT-PCR analysiert. Wiederum wurde hierzu cDNA aus Osteoblasten an Tag 5 und 25 der Differenzierung, sowie aus verschiedenen Geweben adulter Mäuse als Matrize eingesetzt. Hierbei zeigte sich zum einen, dass Krm2, im Gegensatz zu Krm1, in adulten Mäusen ein Knochen-spezifisches Expressionsmuster aufweist (Abb. 11). Desweiteren fiel auf, dass Krm2 im Verlauf der Osteoblasten-Differenzierung in seiner Expression nicht induziert, sondern abgeschaltet wird. Diese Ergebnisse weisen einerseits auf eine physiologische Funktion von Krm2 im Knochenstoffwechsel hin. Andererseits ist es fraglich, ob Dkk1 und Krm2 die Wnt-Signalkaskade auch im Osteoblasten synergistisch antagonisieren, da sie offensichtlich gegenläufig reguliert werden.

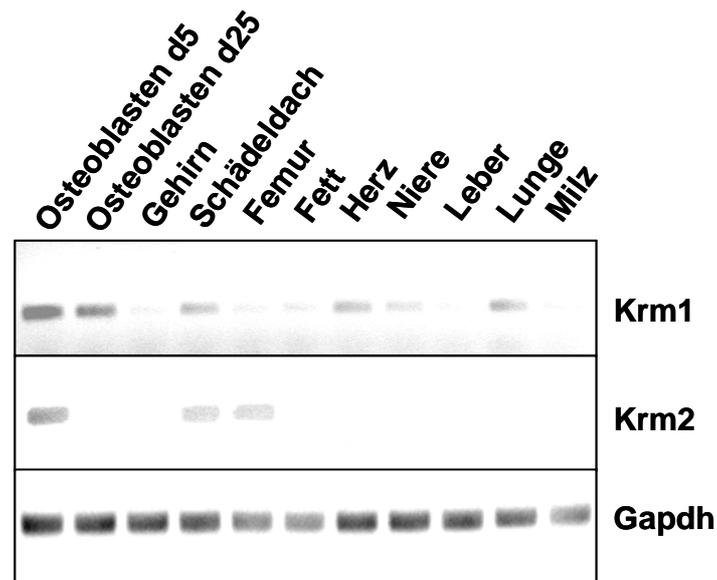


Abbildung 11: Untersuchung des Expressionsmusters von Krm-Genen: Durch RT-PCR-Expressionsanalyse zeigte sich, dass Krm2, im Gegensatz zu Krm1, in adulten Mäusen Knochen-spezifisch exprimiert wird. Im Gegensatz zu Dkk1 wird die Expression von Krm2 jedoch durch die Mineralisation primärer Osteoblasten abgeschaltet. Die Gapdh-Expression diente als Kontrolle für die PCR-Amplifikation und cDNA-Qualität.

4.7 Untersuchung der Interaktion von Dkk1 und Krm2

Um zu überprüfen, ob Dkk1 und Krm2 auch in Osteoblasten synergistisch die Wnt-Signalkaskade antagonisieren, wurden transiente Transfektionsexperimente an MC3T3-Zellen durchgeführt. Als Reporter diente hierbei das Plasmid pTOPflash, in dem ein Luziferase-Gen unter der Kontrolle mehrerer Bindungsstellen für LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren steht (Hsu et al., 1998; Li et al., 1999). Durch die Stimulierung der Wnt-Signalkaskade werden diese Transkriptionsfaktoren aktiviert und besetzen somit die Bindungsstellen am pTOPflash-Plasmid. Dies führt zur Expression der Luziferase, deren Aktivität durch Umsetzung von Luziferin mit einem Luminometer quantifiziert werden kann. Alle hierdurch erzielten Werte wurden in Relation zur Expression der β -Galaktosidase gesetzt, die nach gleichzeitiger Transfektion eines betreffenden Expressionsplasmids (pCMV-LacZ) ein Maß für die Transfektionseffizienz darstellt. Desweiteren wurden die Zellen mit den Wnt-Expressionsplasmiden pLNC-Wnt1, pLNC-Wnt2 oder pLNC-Wnt3 transfiziert, bzw. mit den Expressionsplasmiden pCMV-Dkk1 und/oder pCS-Krm2.

Die erste Serie von Transfektionen wurde mit dem Expressionsplasmid pLNC-Wnt1 durchgeführt, das zu einer 7-fachen Aktivierung der Luziferase-Expression führte

(Abb. 12). Während Dkk1 und Krm2 alleine nur zu einer geringfügigen Reduktion dieser Induktion führten, war bei gleichzeitiger Anwesenheit aller Expressionsplasmide die Wnt1-abhängige Aktivierung der Luziferase-Expression signifikant reduziert, was auf einen synergistischen Effekt von Dkk1 und Krm2 hindeutete.

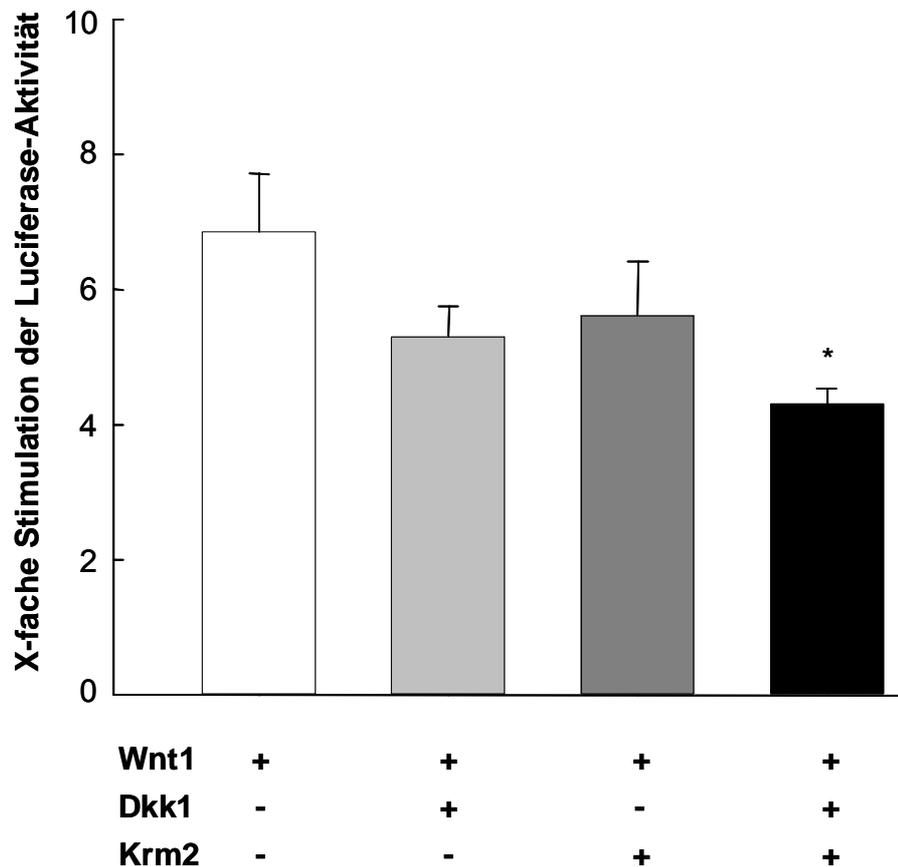


Abbildung 12: Wnt1-vermittelte Signaltransduktion in MC3T3-Osteoblasten durch Messung der Luciferase-Aktivität: Durch Transfektion mit dem pLNC-Wnt1-Expressionsplasmid wird die Luziferase-Aktivität 7-fach erhöht. Durch Kotransfektion mit pCMV-Dkk1 und pCS-Krm2 wird diese Induktion signifikant inhibiert. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung dar (n=3). Der Stern kennzeichnet einen signifikanten Unterschied ($p < 0.05$).

Ein komplett anderes Bild ergab sich bei den Transfektionen mit dem Expressionsplasmid pLNC-Wnt2. Die nur 2.5-fache Aktivierung der Luziferase-Expression durch Wnt2 wurde nicht durch die gleichzeitige Anwesenheit von Dkk1 und Krm2 inhibiert (Abb. 13). Im Gegenteil, die Kotransfektion mit Krm2 alleine führte sogar zu einer signifikanten Verstärkung der Wnt2-Wirkung, was darauf hindeutet, dass die funktionellen Eigenschaften von Dkk1 und Krm2 abhängig vom Wnt-Liganden sind.

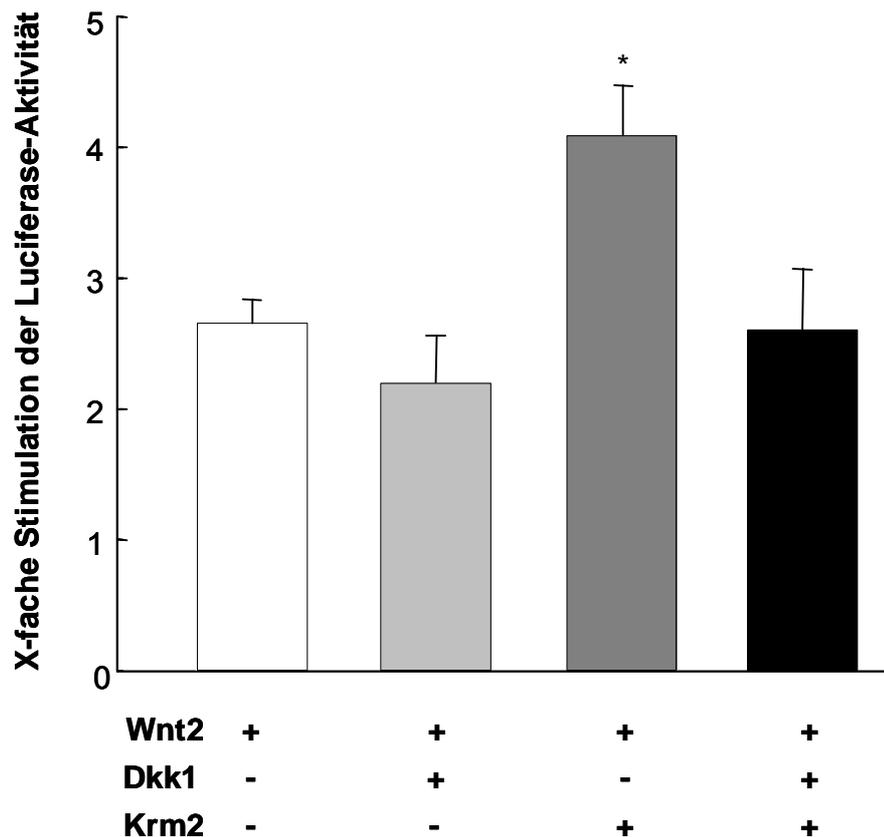


Abbildung 13: Wnt2-vermittelte Signaltransduktion in MC3T3-Osteoblasten durch Messung der Luciferase-Aktivität: Durch Transfektion mit dem pLNC-Wnt2-Expressionsplasmid wird die Luziferase-Aktivität 2.5-fach erhöht. Durch Kotransfektion mit pCS-Krm2 wird diese Induktion signifikant verstärkt. Die gleichzeitige Anwesenheit von Dkk1 und Krm2 hat keinen Einfluss auf die Wnt2-vermittelte Signaltransduktion. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung dar (n=3). Der Stern kennzeichnet einen signifikanten Unterschied ($p < 0.05$).

Die letzte Serie von Transfektionen wurde mit dem Expressionsplasmid pLNC-Wnt3 durchgeführt, das zu einer 18-fachen Aktivierung der Luziferase-Expression führte (Abb. 14). Auch wenn die alleinige Anwesenheit von Krm2 bereits zu einer signifikanten Reduktion dieser Aktivierung führte, zeigte sich ein maximal antagonistischer Effekt erst bei gleichzeitiger Anwesenheit von Dkk1 und Krm2. Dementsprechend ist der Synergismus dieser beiden Moleküle bei Stimulation mit Wnt1 oder Wnt3 eindeutig nachweisbar, nicht jedoch bei Stimulation mit Wnt2. Diese Ergebnisse zeigen somit auf, wie wichtig es ist, in zukünftigen Untersuchungen herauszufinden, welche Mitglieder der Wnt-Familie in der Knochenformation eine physiologische Rolle spielen.

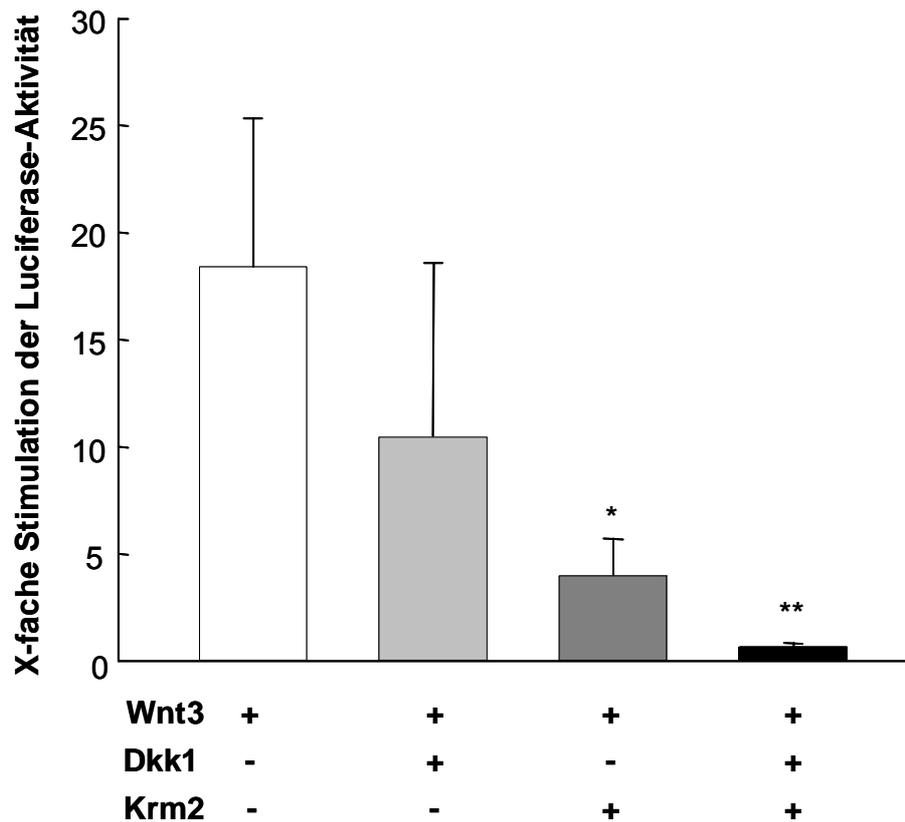


Abbildung 14: Wnt3-vermittelte Signaltransduktion in MC3T3-Osteoblasten durch Messung der Luciferase-Aktivität: Durch Transfektion mit dem pLNC-Wnt3-Expressionsplasmid wird die Luziferase-Aktivität 18-fach erhöht. Durch Kotransfektion mit pCMV-Dkk1 und pCS-Krm2 wird diese Induktion vollständig antagonisiert. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung dar (n=3). Die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede (*:p<0.05; **:p<0.005).

4.8 Analyse der Fzd-Expression in der frühen Phase der Osteoblasten-Differenzierung

Zusätzlich zur Affymetrix-Analyse der späten Phase der Osteoblasten-Differenzierung wurde in der Experimentellen Unfallchirurgie auch eine gleichartige Analyse der frühen Differenzierung (Tag 5 im Vergleich zu Tag 2 nach Zugabe von Ascorbat und β -Glycerophosphat) durchgeführt. In diesem Zeitraum gehen die Zellen von einem proliferativen Stadium in die Differenzierungsphase über, was sich durch das Abschalten der Proliferations-assoziierten Gene Jun und Fos und die gleichzeitige Erhöhung der Expression von Runx2 in der Affymetrix-Analyse widerspiegelt (Abb. 15A). Die Analyse dieser Daten im Hinblick auf potentielle Wnt-Rezeptoren ergab, dass nur Fzd9 zwischen Tag 2 und Tag 5 eine deutliche Induktion der Gen-Expression aufwies, während andere Fzd-Gene entweder nicht exprimiert oder nicht-reguliert exprimiert wurden (Abb. 15B).

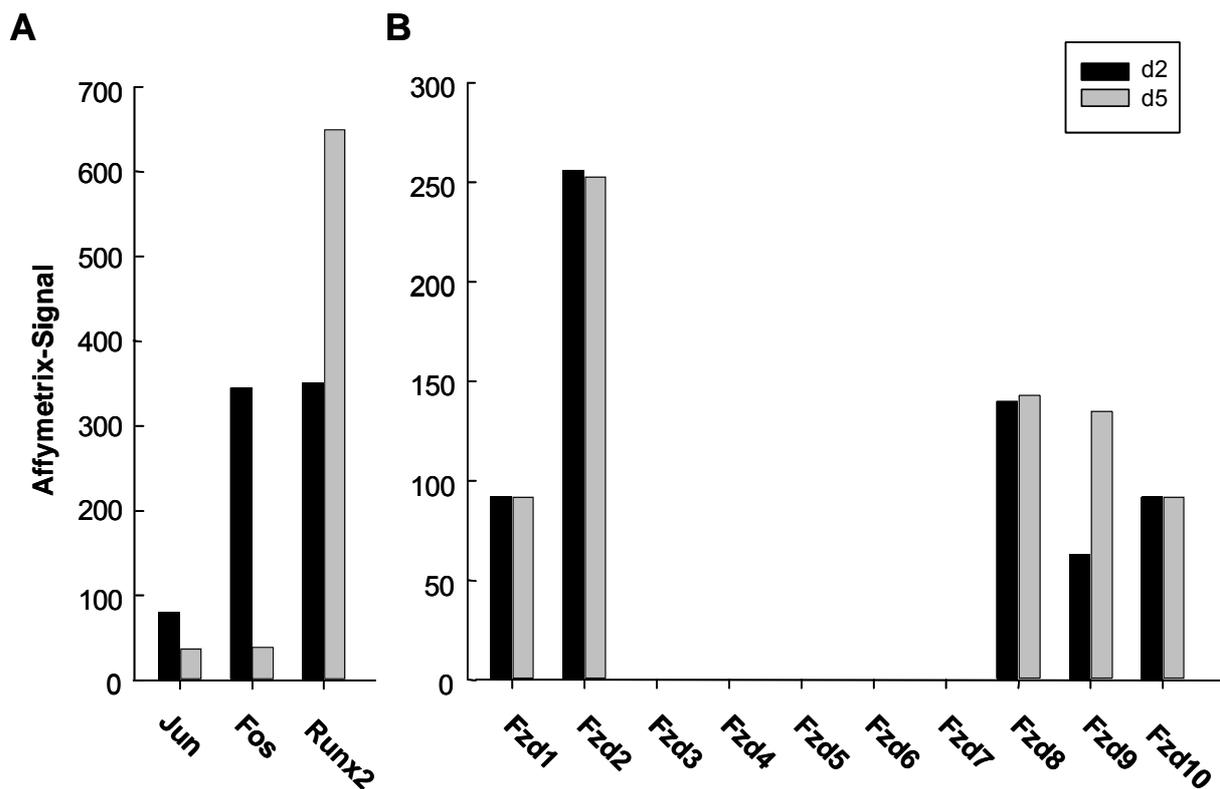


Abbildung 15: Fzd-Expression im Verlauf der frühen Osteoblasten-Differenzierung: (A) Die Herabregulation der beiden Proliferationsmarker Jun und Fos markiert den Übergang in die Differenzierungsphase, die durch die Induktion des Transkriptionsfaktors Runx2 charakterisiert ist. (B) Fzd-9 zeigt als einziges Gen der Fzd-Familie zwischen Tag 2 und Tag 5 der osteoblastären Differenzierung einen deutlichen Anstieg seiner Expression (2.5-fach), während andere Fzd-Gene entweder nicht exprimiert oder nicht in ihrer Expression reguliert werden.

4.9 Analyse Fzd9-defizienter Mäuse

Um zu untersuchen, ob Fzd9 eine physiologische Funktion bei der Regulation der Knochenformation spielt, wurden Skelette 6 Monate alter Fzd9-defizienter Mäuse radiologisch und histologisch untersucht, die freundlicherweise von Dr. Uta Francke aus San Francisco zur Verfügung gestellt wurden. Um einen ersten Eindruck vom Knochenphänotyp der Fzd9-defizienten Maus zu erhalten, wurde eine Röntgenuntersuchung durchgeführt. Trotz der geringen Sensitivität dieser Methode zeigte sich schon in der Kontaktradiographie bei den Fzd9-defizienten Mäusen eine geringere Röntgendichte als in den Wildtyp-Kontrolltieren (Abb. 16).

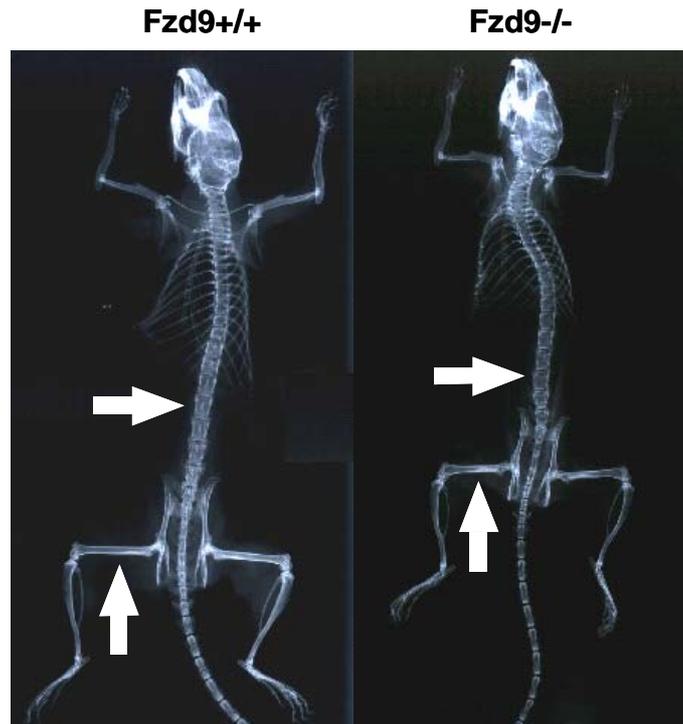


Abbildung 16: Kontaktradiographie der Fzd9-defizienten Maus: Es zeigt sich eine deutlich erniedrigte Röntgendichte in der Gesamtkörperaufnahme 6 Monate alter weiblicher Fzd9-defizienter Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen (Pfeile).

Als nächstes wurde der Knochenphänotyp auf histologischer Ebene untersucht. Hierzu wurden Lendenwirbelkörper und Tibiae präpariert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Methylmetacrylat infiltriert. Nach Einbettung in ein aushärtendes LPG-Benzoylperoxid-Methylmetacrylat-Gemisch wurden 5 μm dicke Schnitte angefertigt und die nicht-dekalzifizierten Schnitte nach von Kossa gefärbt. Hierbei färben sich mineralisierte Strukturen schwarz an. Es zeigte sich, dass Fzd9-defiziente Mäuse, sowohl in der Wirbelsäule, als auch in der Tibia, im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren ein erniedrigtes trabekuläres Knochenvolumen aufweisen (Abb.17). Im nächsten Schritt wurden die angefertigten Schnitte histomorphometrisch ausgewertet. Hierbei zeigte sich, dass das trabekuläre Knochenvolumen und die trabekuläre Dicke in den Fzd9-defizienten Mäusen signifikant erniedrigt war (Abb. 17). Während die Anzahl der Osteoblasten in den Fzd9-defizienten Mäusen zumindest tendenziell erniedrigt war, zeigte sich kein auffälliger Unterschied in der Anzahl der Knochen-resorbierenden Osteoklasten (Abb. 17).

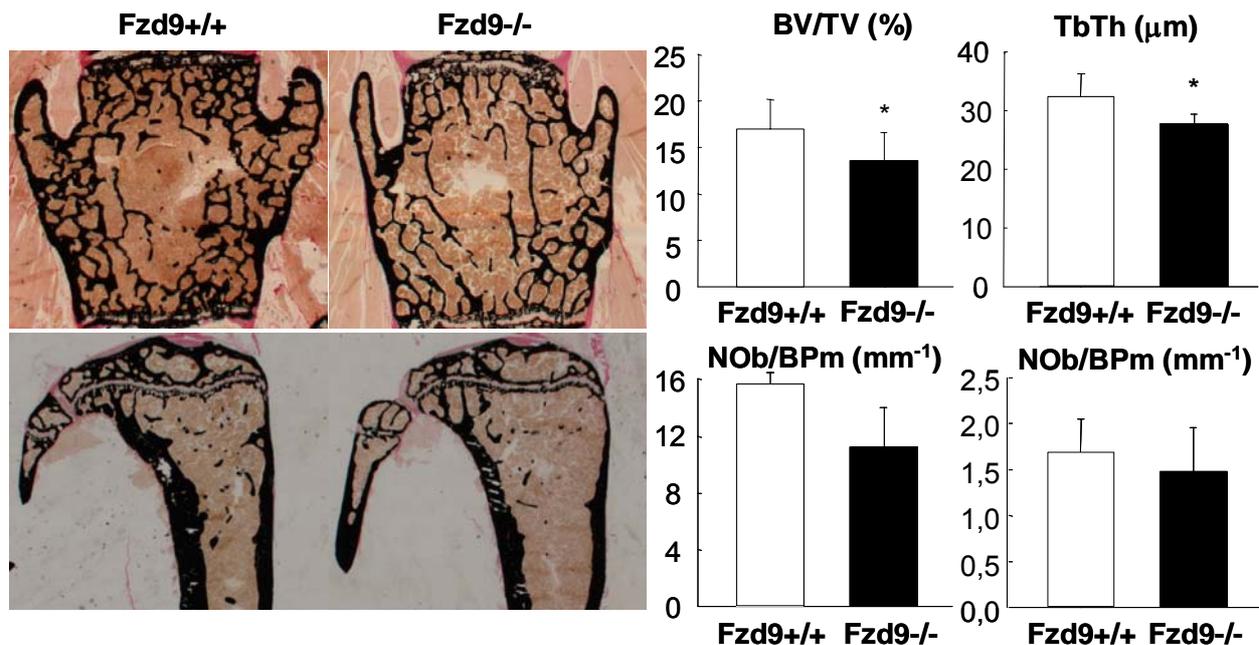


Abbildung 17: Histologische Untersuchung Fzd9-defizienter Mäuse: In der von Kossa-Färbung nicht-dekalzifizierter Wirbelkörper- und Tibia-Schnitte zeigt sich eine erniedrigte trabekuläre Knochendichte 6 Monate alter weiblicher Fzd9-defizienter Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen. In der histomorphometrischen Analyse sind sowohl das trabekuläre Knochenvolumen (BV/TV, bone volume per total volume), als auch die Dicke der Trabekel (TbTh, trabecular thickness) in den Fzd9-defizienten Mäusen signifikant erniedrigt. Die Anzahl der Osteoblasten (NOb/BPm, number of osteoblasts per bone perimeter) ist bei den Fzd9-defizienten Mäusen leicht, aber nicht signifikant erniedrigt, während sich in der Zahl der Osteoklasten (NOc/BPm, number of osteoclasts per bone perimeter) nur ein minimaler Unterschied zeigt. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung dar (n=4). Die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede (p<0.05).

Um zu untersuchen, ob der Grund für die verminderte Knochendichte Fzd9-defizienter Mäuse in einer verringerten Knochenformation liegt, wurde die Knochenformationsrate durch dynamische Histomorphometrie bestimmt. Hierzu wurde den Mäusen sieben Tage und zwei Tage vor Exitus Calcein injiziert (Li et al., 1998), welches sich im Knochen einlagert, so dass an Schnitten fluoreszenzmikroskopisch der Abstand der Banden als Parameter der Knochenformationsrate gemessen werden kann. Bereits in der Gesamtübersicht zeigte sich hierbei, dass in den Fzd9-defizienten Knochen wesentlich weniger Calcein eingelagert wurde (Abb. 18). Die anschließende histomorphometrische Auswertung ergab, dass die Knochenformationsrate in den Fzd9-defizienten Mäusen in der Tat signifikant erniedrigt war (Abb. 18). Dieser Befund, der auch für LRP5-defiziente Mäuse beschrieben wurde (Kato et al., 2002), liefert somit eine Erklärung für die erniedrigte Knochendichte der Fzd9-defizienten Mäuse.

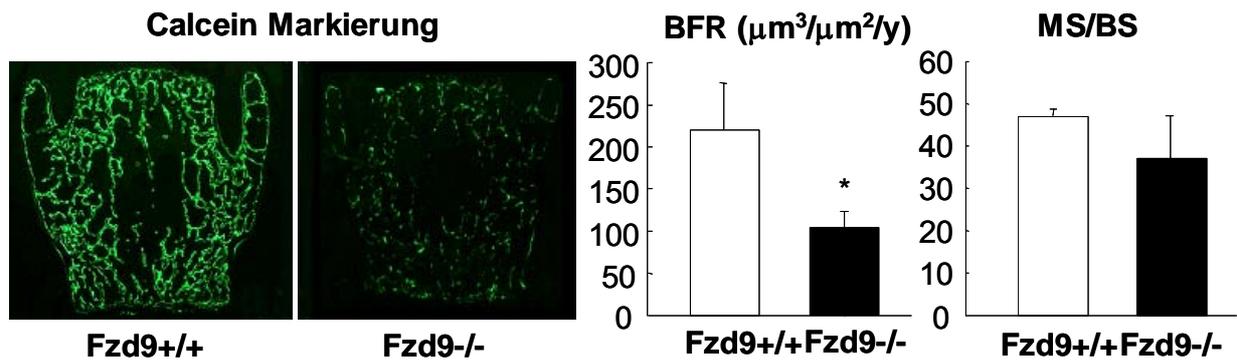


Abbildung 18: Verringerte Knochenformation in Fzd9-defizienten Mäusen: Durch Calcein-Injektion 2 und 7 Tage vor Exitus lässt sich anhand des Bandenabstands und der geringeren Einlagerung des Calceins eine verringerte Knochenformation (BFR, bone formation rate) nachweisen. In der quantitativen Auswertung zeigt sich eine signifikante Erniedrigung der Knochenformationsrate. Die Mineralisierung pro Knochenoberfläche (MS/BS) ist aber nicht signifikant verringert. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung dar (n=4). Der Stern kennzeichnet einen signifikanten Unterschied ($p < 0.05$).

Im letzten Schritt der Charakterisierung Fzd9-defizienter Knochen wurde die biomechanische Stabilität an Femora untersucht. Zunächst wurden Micro-CT-Aufnahmen dieser Femora angefertigt, in denen eine geringere kortikale Dicke der Fzd9-defizienten Knochen nachgewiesen werden konnte (Abb. 20A). Anschließend wurden die Femora in einem 3-Punkt-Biegetest untersucht, um eine Vorstellung von der physiologischen Konsequenz der verringerten Knochenmasse zu bekommen. Der bestimmte Parameter, die Brechkraft (F) steht für die Kraft (angegeben in N), welche aufgewendet werden muß, um den Knochen zu brechen. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse spiegeln die histomorphometrisch ermittelten Unterschiede zwischen den Wildtyp- und Fzd9-defizienten Mäusen wider, da die Bruchkraft bei den Fzd9-defizienten Femora gegenüber den Wildtyp-Kontrollen signifikant vermindert war (Abb. 20b).

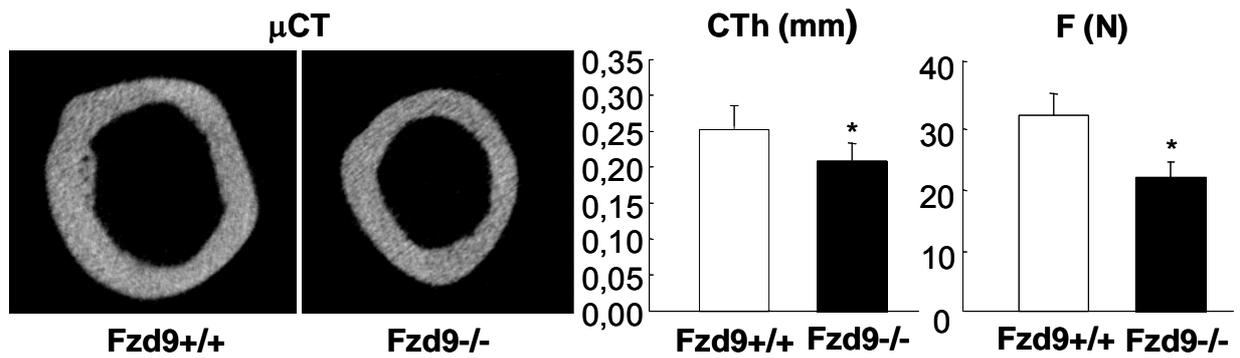


Abbildung 20: Biomechanische Stabilität der Femora Fzd9-defizienter Mäuse: In der μ CT-Aufnahme wird deutlich, dass die kortikale Dicke (CTh, cortical thickness) der Fzd9-defizienten Femora signifikant vermindert ist, was sich auch in der statistischen Auswertung zeigt. Im Drei-Punkt-Biegetest zeigte sich eine signifikant verminderte Bruchkraft (F) bei den Fzd9-defizienten Femora. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung dar (n=8). Die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0.05$).

5 Diskussion

Durch die Entdeckung der Wichtigkeit der Rolle von LRP5 als Knochendichte-regulierendes Gen in der Knochenformation und aufgrund der Fülle von Familienmitgliedern in der Wnt-Signalkaskade stellte sich die Frage, welche Interaktionspartner LRP5 im Knochen hat. Von den drei außer LRP5 beteiligten Proteinfamilien im Säugetier-Genom umfasst die Dkk-Familie 3, die Krm-Familie 2 und die Gruppe der Fzd-Rezeptoren mindestens 10 Mitglieder. Durch die Durchführung der Micro-Array-Analyse in der Experimentellen Unfallchirurgie und der anschließenden RT-PCR-Expressionsanalyse drängten sich einige Mitglieder dieser Familien als potentielle Kandidatengene auf, deren Funktion in dieser Dissertation untersucht werden sollte.

5.1 Dkk1

Dickkopf-Proteine sind sezernierte Moleküle, die verschiedene Entwicklungsprozesse regulieren. Ihre beiden Cystein-reichen Domänen sind bei allen Mitgliedern der Dkk-Familie konserviert. Im besonderen weisen Dkk1 und Dkk2 eine 50 %-ige Übereinstimmung in ihrer N-terminalen Cystein-reichen Region, sowie eine 70 %-ige Übereinstimmung in ihrer C-terminalen Region auf (Brott u. Sokol, 2002). Die Struktur der C-terminalen Domäne besitzt eine schwache Ähnlichkeit mit der von Kolipasen (Aravind u. Koonin, 1998; Krupnik et al., 1999). Kolipasen sind essentiell für die Hydrolyse von Lipiden durch pankreatische Lipasen und interagieren mit Lipid-Micellen (van Tilbeurgh et al., 1999). Es ist nicht bekannt, ob die strukturelle Ähnlichkeit zwischen Kolipasen und Dkk-Mitgliedern eine gemeinsame Funktion wie Lipid-Interaktion impliziert (Kawano u. Kypta, 2003).

Die Mitglieder der Dkk-Familie werden während der Entwicklung in einer Gewebe- und Stadien-restriktiven Weise exprimiert. Ihre Expression konnte in Gehirn, Herz, Lunge, Extremitäten und anderen Geweben, in denen epitheliale-mesenchymale Interaktionen stattfinden, nachgewiesen werden (Krupnik et al., 1998; Grotewold et al., 1999; Monaghan et al., 1999), was darauf schließen lässt, dass diese Proteine wichtige Entwicklungsprozesse modulieren. Dkk1, das am meisten untersuchte Mitglied der Dickkopf-Familie, ist ein potenter Wnt-Antagonist (Glinka et al., 1998; Krupnik et al., 1999).

Dkk1 ist involviert in der Ausbildung des Kopfes während der Entwicklung (Glinka et al., 1998; Hashimoto et al., 2000; Kazanskaya et al., 2000; Mukhopadhyay et al., 2001; Shinya et al., 2000), ein Prozeß, in dem die Inhibierung der Wnt-Signalkaskade eine Rolle spielen soll (Glinka et al., 2000; Itoh et al., 1995). *Xenopus*-Embryonen, die Dkk1 überexprimieren, entwickeln vergrößerte Köpfe, woher auch der Name der Protein-Familie rührt (Dkk=Dickkopf), als auch verkürzte Schwänze, während die Injektion eines anti-Dkk1-Antikörpers Mikrozephalie hervorruft (Glinka et al., 1998). Dkk1-defiziente Mäusen sind embryonal letal und es fehlen ihnen anteriore neurale Strukturen wie Telencephalon, Diencephalon und Teile des Mittelhirns (Mukhopadhyay et al., 2001), aber auch die meisten Strukturen, die vor den Augenbläschen liegen, wie Augen, Riechplakoden, Stirnnasenwulst und die Mandibular-Processus (Mukhopadhyay et al., 2001), was darauf hindeutet, dass Dkk1 essentiell für die Kopfentwicklung ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Dkk1 in *Xenopus*-Embryonen Herzgewebe induziert (Marvin et al., 2001; Schneider u. Mercola, 2001). Mukhopadhyay et al. implizierten für Dkk1 eine Rolle in der Regulation von Zellproliferation und programmiertem Zelltod in den Interdigitalräumen (Mukhopadhyay et al., 2001).

Dkk1 verhindert die Aktivierung der Wnt-Signalkaskade durch Bindung an den Korezeptor LRP5/6 und nicht durch die Bindung an Wnt-Proteine (Bafico et al., 2001; Mao et al., 2001; Semenov et al., 2001). Brott und Sokol konnten in ihren Arbeiten zeigen, dass die C-terminale Domäne notwendig und ausreichend für die Wnt-Inhibierung ist, während die N-terminale Domäne eine regulative Rolle in dieser Interaktion zu spielen scheint (Brott u. Sokol, 2002). Gleichzeitig interagiert Dkk1 zumindest in menschlichen Fibroblasten (293T Zellen) und *Drosophila*-Zellen mit den Transmembranproteinen Kremen1 (Krm1) und Kremen2 (Krm2) (Mao et al., 2002). Krm, Dkk1 und LRP5/6 bilden einen ternären Komplex, der die Wnt/LRP5/6-Signalkaskade unterbricht, indem LRP5/6 per Endozytose von der Zellmembran entfernt wird (Mao et al., 2002).

Obwohl der genaue molekulare Mechanismus, wie der Krm-Dkk1-LRP5/6-Komplex die Wnt-Signalkaskade inhibiert, unklar erscheint, so gibt es doch einige Hinweise. Eine Schlüsselkomponente ist dabei Axin, das die Wnt-Signalkaskade in negativer Hinsicht reguliert, indem es die Phosphorylierung von β -Catenin ermöglicht, womit es für die proteosomale Degradierung gekennzeichnet wird (Kawano u. Kypta, 2003). Wnt-aktiviertes LRP5 rekrutiert Axin an die Zellmembran und fördert seine

Degradation, wodurch β -Catenin stabilisiert wird (Mao et al., 2001). Durch Förderung der Internalisierung von LRP5/6 durch Krm könnte Dkk1 die Rekrutierung von Axin an die Zellmembran hemmen (Kawano u. Kypta, 2003).

Vor diesem Hintergrund sollte nun die Funktion von Dkk1 im Osteoblasten untersucht werden. Dkk1 zeigte in der Micro-Array-Analyse, in der das Expressionsprofil von Osteoblastenkulturen in verschiedenen Differenzierungsstadien untersucht wurde, eine 26-fache Induktion seiner Genexpression im Verlauf der terminalen Differenzierung. In der RT-PCR-Expressionsanalyse konnte diese Induktion bestätigt werden. Auch in der Immunhistochemie fand sich eine starke Anfärbung von Osteoblasten mit einem anti-Dkk1-Antikörper. Gleichzeitig zeigte sich für Dkk1 aber auch eine Knochen-spezifische Genexpression, im Gegensatz zu den Familienmitgliedern Dkk2 und Dkk3. Gerade diese Knochen-spezifische Genexpression in adulten Mäusen lässt stark vermuten, dass Dkk1 eine physiologische Rolle im Knochen spielt.

Um eine solche Funktion von Dkk1 weiter zu charakterisieren, wurden zunächst Osteoblasten der MC3T3-Zelllinie mit einem Expressionsplasmid stabil transfiziert, in dem Dkk1 unter der Kontrolle des CMV-Promoters steht. Nach Kultivierung der stabil transfizierten Zellen zeigte sich, dass eine frühzeitige und erhöhte Expression von Dkk1 die Differenzierung und somit die Mineralisierung von Osteoblasten im Vergleich zu Kontrollzellen inhibiert. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Rawadi et al. führten ebenfalls Studien an MC3T3-Osteoblasten durch, in denen sie das Mineralisationsverhalten ohne und mit Zugabe von BMP2 (Bone Morphogenetic Protein 2), das die Mineralisierung in MC3T3-Osteoblasten induziert (Spinella-Jaegle et al., 2001), verglichen. Während ohne BMP2-Zugabe nach 13 Tagen keine Mineralisierung extrazellulärer Matrix stattfand, ergaben sich durch Zugabe von BMP2 kleine Mineralisationsherde. Die transiente Transfektion mit Dkk1 reduzierte diese durch BMP2 hervorgerufene Mineralisation signifikant. Weiterhin zeigte sich eine signifikant reduzierte Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP), einem Marker der Osteoblastendifferenzierung (Rawadi et al., 2003).

Ähnliches berichteten auch Tian et al., die beschreiben, dass in in vitro-Experimenten die Zugabe von rekombinantem menschlichen Dkk1 in Osteoblasten die Synthese von alkalischer Phosphatase hemmt. Dieser in vitro-Effekt auf die Synthese der alkalischen Phosphatase konnte durch die Zugabe eines polyklonalen anti-Dkk1-

Antikörper neutralisiert werden, aber nicht durch die Zugabe eines nicht-spezifischen polyklonalen Ziegen-IgG (Tian et al., 2003). Laut Zhang et al. inhibiert Dkk1, welches von Osteozyten produziert wird, die Osteoblastendifferenzierung und reguliert über eine negative Feedback-Kontrolle die Osteoblastenaktivität und so die Regulation des Knochenremodelings (Zhang et al, 2004).

Um die mögliche Rolle von Dkk1 im Knochen-Remodeling auch in vivo zu bestätigen, wurden in der vorliegenden Dissertation außerdem transgene Mäuse generiert, die Dkk1 unter der Kontrolle eines Col1a1-Promotor-Fragments in Osteoblasten überexprimieren. Durch Verpaarung dieser sogenannten Founder-Mäuse sollte es in relativ kurzer Zeit möglich sein, den Knochenphänotyp der Col1a1-Dkk1-transgenen Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Geschwister-Tieren zu untersuchen. Sollte hierbei eine Osteopenie nachweisbar sein, wäre dies sicherlich ein weiterer wichtiger Schritt zu einem besseren Verständnis der Regulation der Knochenformation durch die Wnt-vermittelte Signaltransduktion.

5.2 Krm2

Krm2 gehört zu einer Familie von Transmembranproteinen, die bisher nur aus zwei Mitgliedern besteht. Kremen-Proteine besitzen extrazellulär eine Kringel-, eine WSC- und eine CUB-Domäne und bestehen aus 473 (Krm1) bzw. 461 (Krm2) Aminosäuren. Im Mausembryo werden Kremen-Gene während der Entwicklung im apikalen Anteil des Extremitäten-Ektoderms, in den Myotomen und den Sinnesorganen exprimiert. In der erwachsenen Maus finden sie sich in verschiedenen Geweben mit einer relativ ausgeprägten Expression in Lunge, Herz und Skelettmuskulatur. Neben dem von Mao et al. beschriebenen Synergismus mit Dkk1 bei der Inhibierung der Wnt-Signalkaskade sowohl in 293T als auch in Drosophila-Zellen (Mao et al., 2002), interagiert Krm2 mit Dkk1 auch in Xenopus-Embryos bei der Ausbildung der vorderen Anteile des ZNS durch Inhibierung der Wnt-Signalkaskade (Davidson et al., 2002).

Die Untersuchung der Genexpression beider Kremen-Gene zeigte in der RT-PCR für Krm2 eine erstaunliche und rein Knochen-spezifische Expression in adulten Mäusen. Weiterhin überraschte, dass Krm2 im Verlauf der Osteoblasten-Differenzierung nicht wie Dkk1 in seiner Expression eine Induktion erfährt, sondern in seiner Expression herabreguliert wird. Dieses Ergebnis widerspricht zwar in erster Hinsicht dem in früheren Experimenten beobachteten Synergismus zwischen Dkk1 und Krm2 (Mao et

al., 2002), da es keine Interaktion geben kann, wenn nicht beide Moleküle gleichzeitig exprimiert werden. Allerdings wurden diese Experimente ausschließlich mit dem Liganden Wnt1 durchgeführt, weshalb sich die berechtigte Frage stellt, ob der Synergismus zwischen Dkk1 und Krm2 auch zwangsläufig für die Wnt-vermittelte Signaltransduktion im Osteoblasten gelten muss.

Interessante Ergebnisse ergaben in diesem Zusammenhang die in-vitro-Experimente bei der Untersuchung der Wnt-Signaltransduktion in MC3T3-Osteoblasten. Hierbei zeigte sich zwar bei den Transfektionen mit den Expressionsplasmiden für Wnt1, Wnt2 und Wnt3 allgemein eine Erhöhung der LEF1-Aktivität, allerdings wurde nur für Wnt1 und Wnt3 eine synergistische Antagonisierung dieses Signals durch Dkk1 und Krm2 nachgewiesen. Im Gegensatz dazu führte die gleichzeitige Transfektion von Krm2 sogar zu einer Steigerung der durch Wnt2 ausgelösten LEF1-Aktivierung, was aufzeigt, dass die modulierende Aktivität von Krm2 abhängig von der Art des Wnt-Liganden ist.

In diesem Zusammenhang ist die Frage wichtig, welches der 19 Mitglieder der Wnt-Familie im Knochen eine physiologische Rolle spielt. Hier zeigte die Auswertung der Affymetrix-Daten, dass kein Mitglied der Wnt-Familie im Verlauf der Osteoblasten-Differenzierung exprimiert wird (nicht gezeigt). Dies heißt jedoch keineswegs, dass die Wnt-Signalkaskade im Osteoblasten keine Rolle spielt, sondern deutet vielmehr darauf hin, dass die aktivierenden Liganden der Wnt-Familie von anderen Zellen sezerniert werden und somit eine parakrine Wirkung auf Osteoblasten ausüben. Aus diesem Grund erscheint es sinnvoll, in der Zukunft auch ein Col1a1-Krm2-transgenes Mausmodell zu generieren, um zu untersuchen, ob die Über-Expression von Krm2 in Osteoblasten zu den gleichen oder zu entgegengesetzten Ergebnissen führt, wie die Über-Expression von Dkk1.

5.3 Fzd9

Die Mitglieder der Fzd-Familie sind Wnt-Rezeptoren mit einer N-terminalen extrazellulären Cystein-reichen Domäne, sieben Transmembran-Domänen und einem kurzen Zytoplasmaanteil, der sehr variabel ist (Vinson et al., 1989; Chan et al., 1992; Wang et al., 1996; Perrimon, 1996, Bhanot et al., 1996). Frizzled-Rezeptoren sind notwendig für die Wnt-Signalkaskade in vivo, da die Deletion der beiden Drosophila-Gene Frizzled 1 und 2 (Dfz1 und Dfz2) in Phänotypen resultiert, die einer Wnt-Defizienz ähneln (Bhanot et al., 1999; Bhat, 1998; Chen u. Struhl, 1999).

Studien an Säugetier-Zellen haben gezeigt, dass menschliches Frizzled1 (Hfz1) von verschiedenen homologen Wnt-Molekülen in TCF-Reporter-Gen-Assays aktiviert wird (Gazit et al., 1999). Die direkte Interaktion zwischen Wnt und Säugetier-Frizzled konnten Hsieh et al. durch den Nachweis einer Bindung von *Drosophila wingless* (Wg), dem *Drosophila* Wnt-Homolog, und *Xenopus* Wnt8 (Xwnt8) an mehrere murine Frizzled-Moleküle in 293 und COS Zellen demonstrieren (Hsieh et al., 1999).

Das Frizzled9-Gen (Fzd9) kodiert für ein 592 Aminosäuren-Protein und wird im Verlauf der Entwicklung im Neuralrohr, den Myotomen, den Extremitätenanlagen, der kraniofazialen Region und in den Nierenanlagen exprimiert. In der adulten Maus findet es sich sehr stark im Herzen, Gehirn, Hoden, den Nieren und der Skelettmuskulatur ausgeprägt (Wang et al., 1999). Fzd9 wurde identifiziert bei der Analyse von deletierten Genen in Patienten, die am Williams-Beuren-Syndrom (WBS, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) 194050) leiden. Dieses Krankheitsbild manifestiert sich in einer Entwicklungsstörung. Die Symptome beinhalten Elfen-gleiches Aussehen, kardiovaskuläre Stenosen, Bindegewebsabnormalitäten, Kleinwuchs, Skoliose, transiente Hypercalcämie, Zahnschmelzhypoplasie, mentale Retardierung und Probleme mit räumlichen Sehen (Wang et al., 1999). Andere charakteristische Züge sind Hyperreflexie, Hyperakusis und Extrovertiertheit (Morris et al., 1988; Bellugi et al., 1990).

Das Williams-Beuren-Syndrom tritt mit einer Inzidenz von 1 zu 20 000 auf und rührt meist von de novo Mutationen her (Grimm u. Wesselhoeft, 1980). Das Syndrom ist assoziiert mit einer 1,5- bis 2 MB Mikrodeletion auf dem Chromosomenband 7q11.23. Es wird vermutet, dass der komplexe Phänotyp von der Haploinsuffizienz zahlreicher Gene herrührt, wie ELN (Ewart et al., 1993; Tassabehji et al., 1997a; Li et al., 1997), RFC2 (Peoples et al., 1996), LIM kinase-1 (Frangiskakis et al., 1996; Tassabehji et al., 1996), STX1A (Osborne et al., 1997), GTF2I (Pérez-Jurado et al., 1998), WBSCR9 (Peoples et al., 1998), CPETR1 und 2 (Paperna et al., 1998) und FZD9 (vorher unter der Bezeichnung FZD3 bekannt) (Wang et al., 1997). Wang et al. spekulieren, dass die muskuloskeletalen Merkmale ihre Ursache in der Fzd9-Haploinsuffizienz haben (Wang et al., 1997).

Das Fzd9-Gen zeigte im Vergleich zu seinen 9 anderen Familienmitgliedern in der frühen Phase der Osteoblasten-Differenzierung (Tag 2 auf Tag 5) eine deutliche Gen-Induktion, die darauf hindeutet, dass Fzd9 eine wichtige Rolle in der Regulation der Knochenformation spielen könnte. Um dies zu untersuchen, wurden die Skelette

Fzd9-defizienter Mäuse radiologisch und histologisch analysiert. Bei der vergleichenden Betrachtung der Röntgenbilder zeigte sich bereits ein sichtbarer Unterschied der Knochendichte, die bei den Fzd9-defizienten-Mäusen geringer war. Dies wurde durch die histologische Aufarbeitung bestätigt. Durch histomorphometrische Auswertung der angefertigten Schnitte konnte zudem ein signifikant erniedrigtes trabekuläres Knochenvolumen der Fzd9-defizienten Mäuse nachgewiesen werden, was auf eine deutlich verringerte Knochenformationsrate zurückgeführt werden konnte. Zuletzt wurde auch eine geringere biomechanische Kompetenz Fzd9-defizienter Femora im 3-Punkt-Biegeversuch nachgewiesen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Fzd9-defiziente Mäuse im Alter von 6 Monaten den gleichen Phänotyp aufweisen, wie die zuvor beschriebenen LRP5-defizienten Mäuse (Kato et al., 2002). Dementsprechend könnte auch Fzd9 ein gutes Zielmolekül sein, um in Zukunft durch spezifische Agonisten eine Steigerung der Knochenformation in Osteoporose-Patienten zu erzielen. Desweiteren es ist in diesem Zusammenhang von großer Wichtigkeit, dass Fzd9 durch Wnt2 wesentlich stärker aktiviert wird, als durch Wnt1 und Wnt3 (Karasawa et al., 2002). Somit könnte entweder Wnt2, oder ein Wnt2-ähnlicher Ligand bei der Regulation der Knochenformation eine entscheidende Rolle spielen, was die in dieser Dissertation nachgewiesene Aktivierung der Wnt2-vermittelten Signaltransduktion durch Krm2 noch relevanter erscheinen lässt.

5.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit verleiht der Hypothese, dass die Wnt-Signaltransduktion im Knochen-bildenden Osteoblasten eine wichtige Rolle spielt, zusätzliche Bedeutung. Es wurden potentielle Kandidaten der Wnt-Signalübertragung im Knochen untersucht. Mit den Ergebnissen, die allesamt andeuten, dass Dkk1, Krm2 und Fzd9 im Knochen wichtige Funktionen innehaben und Teil der Wnt-Signalkaskade sind, ist die Plattform für weitere, spezifischere Untersuchungen der jeweiligen Gene geschaffen. Die dringlichste Aufgabe ist es nun, die Funktionen der untersuchten Kandidatengene weiter zu charakterisieren. Bis auf Fzd9, dessen Funktion schon in vivo durch die Auswertung einiger Fzd9-defizienter Mäuse näher charakterisiert werden konnte, beruhen die Ergebnisse über Dkk1 und Krm2 bisher nur auf molekularbiologischen Auswertungen und in vitro-Experimenten.

Um die physiologische Funktion von Dkk1 und Krm2 näher zu charakterisieren, bietet es sich zunächst an, transgene Mausmodelle zu generieren und im Hinblick auf ihren Knochenphänotyp zu untersuchen. Für Dkk1 wurde ein solches Mausmodell bereits hergestellt, in dem Dkk1 unter der Kontrolle eines Osteoblasten-spezifischen Col1a1-Promotor-Fragments steht. Die histologische Untersuchung des Knochenphänotyps dieser Mäuse ist somit eines der wichtigsten Ziele für die nähere Zukunft. Desweiteren erscheint es sinnvoll, über den gleichen Ansatz auch ein Col1a1-Krm2-transgenes Mausmodell zu generieren, um die funktionellen Eigenschaften von Dkk1 und Krm2 im korrekten physiologischen Kontext miteinander zu vergleichen und somit der Frage nach der synergistischen Wirkung als Wnt-Antagonisten in vivo nachzugehen, langfristig auch durch Verpaarung der beiden Mauslinien.

Im Hinblick auf Fzd9 ist sicherlich die weitere Charakterisierung Fzd9-defizienter Mäuse in verschiedenen Altersstadien von großer Wichtigkeit. Diese Untersuchungen sollten auch ex vivo-Kulturen von Wildtyp- und Fzd9-defizienten Osteoblasten beinhalten, um die zellulären Defekte mechanistisch aufklären zu können. Sollte in solchen Experimenten eine funktionelle Interaktion von Fzd9 und LRP5 im Osteoblasten nachgewiesen werden können, wäre Fzd9 als potentiell Zielmolekül zur therapeutischen Stimulation der Knochenformation sicherlich von ähnlicher Bedeutung wie LRP5.

6 Zusammenfassung

Die Therapie der Osteoporose beschränkt sich derzeit auf die Substitution von Calcium und Vitamin D sowie die Gabe antiresorptiver Substanzen, wodurch eine bereits bestehende Osteoporose nur am Fortschreiten gehindert werden kann. Bislang fehlt jedoch ein effektiver therapeutischer Ansatz zur Stimulierung der Knochenformation, um bereits verloren gegangene Knochensubstanz zurückzubilden. Einen möglichen Ansatzpunkt zur therapeutischen Stimulation der Knochenformation bildete die Entdeckung einer aktivierenden Mutation im Gen für Low-density lipoprotein (LDL)-receptor-related protein 5 (LRP5). Diese aktivierende Mutation führt zu einer gesteigerten osteoblastären Knochenformation und geht mit einer stark erhöhten Knochendichte einher.

Da LRP5 ein Co-Rezeptor für Signalmoleküle der Wnt-Familie ist, war das Ziel der vorliegenden Dissertation die Untersuchung der Wnt-vermittelten Signaltransduktion in Knochen-bildenden Osteoblasten. Grundlage hierzu war eine Micro-Array-Analyse, in der das Expressionsprofil von Osteoblastenkulturen in verschiedenen Differenzierungsstadien untersucht wurde. Die Auswertung der hierdurch erzielten Daten im Hinblick auf Wnt-Rezeptoren und Antagonisten führte zur Identifizierung dreier Kandidatengene, Dkk1, Krm2 und Fzd9, deren weiterführende funktionelle Untersuchung im Mittelpunkt dieser Dissertation stand.

Hierbei konnte einerseits gezeigt werden, dass die Wnt-Antagonisten Dkk1 und Krm2, im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der betreffenden Protein-Familien, in adulten Mäusen Knochen-spezifisch exprimiert werden, was auf eine physiologische Funktion beider Proteine bei der Regulation der Knochendichte hindeutet. Durch eine stabile Transfektion von MC3T3-Osteoblasten konnte zudem gezeigt werden, dass Dkk1 in vitro die Mineralisation dieser Zellen inhibiert, was durch die Herstellung eines transgenes Mausmodells nun auch in vivo bestätigt werden soll. Desweiteren konnte durch transiente Transfektionsexperimente mit einem Wnt-responsiven Reporter gen gezeigt werden, dass die für Dkk1 und Krm2 beschriebene synergistische Wirkung bei der Antagonisierung der Wnt-Signaltransduktion in Osteoblasten nicht zwangsläufig besteht und abhängig vom eingesetzten Wnt-Liganden ist. Die nachgewiesene gegenläufige Regulation der Expression beider Gene im Verlauf der Osteoblasten-Differenzierung unterstützt

diese Befunde und soll in weiterführenden Experimenten ebenfalls in vivo untersucht werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Dissertation wurde die Rolle des Wnt-Rezeptors Fzd9 untersucht, der als einziges der bekannten Fzd-Proteine eine Gen-Induktion in der frühen Differenzierungs-Phase Knochen-bildender Osteoblasten erfährt. Die Knochen-spezifische Untersuchung Fzd9-defizienter Mäuse ergab, dass die Abwesenheit von Fzd9 zu einer signifikant erniedrigten Knochenmasse führt, bedingt durch eine stark erniedrigte Knochenformationsrate. Da dieser Phänotyp dem der LRP5-defizienten Mäuse entspricht, könnte Fzd9 in der Tat ein wichtiger Bestandteil der Wnt-vermittelten Signaltransduktion im Osteoblasten sein.

7 Literaturverzeichnis

Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ (1994) Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* 55:287-299

Adler CP (2000) *Knochenkrankheiten*. Springer Verlag Berlin

Amling M, Grote HJ, Pösl M, Hahn M, Delling G (1994) Polyostotic heterogeneity of the spine in osteoporosis. Quantitative analysis and three-dimensional morphology. *J Bone Miner*. 27:193-208

Amling M, Herden S, Pösl M, Hahn M, Ritzel H, Delling G (1996a) Heterogeneity of the skeleton: comparison of the trabecular microarchitecture of the spine, the iliac crest, the femur, and the calcaneus. *Bone Miner Res*. 11:36-45

Amling M, Pösl M, Ritzel H, Hahn M, Vogel M, Wening VJ, Delling G (1996b) Architecture and distribution of cancellous bone yield vertebral fracture clues. A histomorphometric analysis of the complete spinal column from 40 autopsy specimens. *Arch Orthop Trauma Surg*. 115:262-269

Amling M, Takeda S, Karsenty G (2000) A neuro (endo)crine regulation of bone remodeling. *Bioessays* 22:970-975

Aravind L, Koonin EV (1998) A colipase fold in the carboxy-terminal domain of the Wnt antagonists--the Dickkops. *Curr Biol*. 8:477-478

Babij P, Zhao W, Small C, Kharode Y, Yaworsky PJ, Bouxsein ML, Reddy PS, Bodine PV, Robinson JA, Bhat B, Marzolf J, Moran RA, Bex F (2003) High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene. *J Bone Miner Res*.18:960-974

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

Bain G, Muller T, Wang X, Papkoff J (2003) Activated beta-catenin induces osteoblast differentiation of C3H10T1/2 cells and participates in BMP2 mediated signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun.* 301:84-91

Baran D (2001) Osteoporosis. Efficacy and safety of a bisphosphonate dosed once weekly. *Geriatrics* 56:28-32

Bartl R (2001) Osteoporose: Prävention, Diagnostik, Therapie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Bellugi U, Bihle A, Jernigan T, Trauner D, Doherty S (1990) Neuropsychological, neurological, and neuroanatomical profile of Williams syndrome. *Am J Med Genet Suppl.* 6:115-125

Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R (1996) A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 382:225-230

Bhanot P, Fish M, Jemison JA, Nusse R, Nathans J, Cadigan KM (1999) Frizzled and Dfrizzled-2 function as redundant receptors for Wingless during *Drosophila* embryonic development. *Development* 126:4175-4186

Bhat KM (1998) Frizzled and Frizzled 2 play a partially redundant role in wingless signaling and have similar requirements to wingless in neurogenesis. *Cell* 95:1027-1036

Böcker W, Denk W, Heitz U (2001) Pathologie. Urban und Fischer Verlag, München

Boonekamp PM, van der Wee-Pals LJ, van Wijk-van Lennep MM, Thesing CW, Bijvoet OL (1986) Two modes of action of bisphosphonates on osteoclastic resorption of mineralized matrix. *Bone Miner.* 1:27-39

Boonekamp PM, Lowik CW, van der Wee-Pals LJ, van Wijk-van Lennep ML, Bijvoet OL (1987) Enhancement of the inhibitory action of APD on the transformation of

osteoclast precursors into resorbing cells after dimethylation of the amino group. *Bone Miner.* 2:29-42

Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP (2002) High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med.* 346:1513-1521

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423:337-342

Brott BK, Sokol SY (2002) Regulation of Wnt/LRP signaling by distinct domains of Dickkopf proteins. *Mol Cell Biol.* 22:6100-6110

Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS (1998) Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 12:1260-1268

Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, Kelley M, Hsu H, Boyle WJ, Dunstan CR, Hu S, Lacey DL (1999) The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol.* 145:527-538

Center JR, Nguyen TV, Schneider D, Sambrook PN, Eisman JA (1999) Mortality after all major types of osteoporotic fracture in men and women: an observational study. *Lancet* 353:878-882

Chambers TJ (2000) Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *J Pathol.* 192:4-13

Chan SD, Karpf DB, Fowlkes ME, Hooks M, Bradley MS, Vuong V, Bambino T, Liu MY, Arnaud CD, Strewler GJ (1992) Two homologs of the *Drosophila* polarity gene frizzled (*fz*) are widely expressed in mammalian tissues. *J Biol Chem.* 267:25202-25207

Chen CM, Struhl G (1999) Wingless transduction by the Frizzled and Frizzled2 proteins of *Drosophila*. *Development* 126:5441-5452

Colucci S, Minielli V, Zambonin G, Cirulli N, Mori G, Serra M, Patella V, Zambonin Zallone A, Grano M (1998) Alendronate reduces adhesion of human osteoclast-like cells to bone and bone protein-coated surfaces. *Calcif Tissue Int.* 63:230-235

Cooper C, Aihie A (1995) Osteoporosis. *Baillieres Clin Rheumatol.* 9:555-564

Cranney A, Guyatt G, Griffith L, Wells G, Tugwell P, Rosen C; Osteoporosis Methodology Group and The Osteoporosis Research Advisory Group (2002) Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. IX: Summary of meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. *Endocr Rev.* 23:570-578

Dale TC (1998) Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J.* 329:209–223

Daragon A, Pouplin S (2004) Potential benefits of intermittent bisphosphonate therapy in osteoporosis. *Joint Bone Spine* 71:2-3

Darnay BG, Haridas V, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB (1998) Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappab and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem.* 273:20551-20555

David P, Nguyen H, Barbier A, Baron R (1996) The bisphosphonate tiludronate is a potent inhibitor of the osteoclast vacuolar H(+)-ATPase. *J Bone Miner Res.* 11:1498-1507

Davidson G, Mao B, del Barco Barrantes I, Niehrs C (2002) Kremen proteins interact with Dickkopf1 to regulate anteroposterior CNS patterning. *Development* 129:5587-5596

Delmas PD (2002) Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 359:2018-2026

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997) *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89:747-754

Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, Amling M, Karsenty G (1999) A *Cbfa1*-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev.* 13:1025-1036

Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G (2000) Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 100:197-207

Ewart AK, Morris CA, Atkinson D, Jin W, Sternes K, Spallone P, Stock AD, Leppert M, Keating MT (1993) Hemizygoty at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nat Genet.* 5:11-16

Fisher JE, Rogers MJ, Halasy JM, Luckman SP, Hughes DE, Masarachia PJ, Wesolowski G, Russell RG, Rodan GA, Reszka AA (1999) Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:133-138

Fleisch H, Russell RG, Francis MD (1969) Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. *Science* 165:1262-1264

Frangiskakis JM, Ewart AK, Morris CA, Mervis CB, Bertrand J, Robinson BF, Klein BP, Ensing GJ, Everett LA, Green ED, Proschel C, Gutowski NJ, Noble M, Atkinson DL, Odelberg SJ, Keating MT (1996) LIM-kinase1 hemizygoty implicated in impaired visuospatial constructive cognition. *Cell* 86:59-69

Gazit A, Yaniv A, Bafico A, Pramila T, Igarashi M, Kitajewski J, Aaronson SA (1999) Human frizzled 1 interacts with transforming Wnts to transduce a TCF dependent transcriptional response. *Oncogene* 18:5959-5966

Geoffroy V, Kneissel M, Fournier B, Boyde A, Matthias P (2002) High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing cbfa1/runx2 in cells of the osteoblastic lineage. *Mol Cell Biol.* 22:6222-6233

Glinka A, Wu W, Onichtchouk D, Blumenstock C, Niehrs C (1997) Head induction by simultaneous repression of Bmp and Wnt signalling in *Xenopus*. *Nature* 389:517-519

Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C (1998) Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391:357-362

Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Juppner H, Kim CA, Keppler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML; Osteoporosis-Pseudoglioma Syndrome Collaborative Group (2001) LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 107:513-523

Gowen M, Lazner F, Dodds R, Kapadia R, Feild J, Tavarria M, Bertoncello I, Drake F, Zavarselk S, Tellis I, Hertzog P, Debouck C, Kola I (1999) Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization. *J Bone Miner Res.* 14:1654-1663

Grimm T, Wesselhoeft H (1980) Zur Genetik des Williams-Beuren-Syndroms und der isolierten Form der supraaortalen Aortenstenose (Untersuchungen von 128 Familien). *Z Kardiol.* 69:168-172

Grotewold L, Theil T, Ruther U (1999) Expression pattern of Dkk-1 during mouse limb development. *Mech Dev.* 89:151-153

Gumbiner BM (1998) Propagation and localization of Wnt signaling. *Curr Opin. Genet Dev.* 8:430-435

Harris ST (2001) Bisphosphonates for the treatment of postmenopausal osteoporosis: clinical studies of etidronate and alendronate. *Osteoporos Int.* 3:11-16

Hashimoto H, Itoh M, Yamanaka Y, Yamashita S, Shimizu T, Solnica-Krezel L, Hibi M, Hirano T (2002) Zebrafish Dkk1 functions in forebrain specification and axial mesendoderm formation. *Dev Biol.* 217:138-152

Herzlinger D, Qiao J, Cohen D, Ramakrishna N, Brown AMC (1994) Induction of kidney epithelial morphogenesis by cells expressing Wnt-1. *Dev Biol.* 166:815-818

Hofbauer LC, Heufelder AE (1999) Osteopetrosis in cathepsin K-deficient mice. *Eur J Endocrinol.* 140:376-377

Hsieh JC, Rattner A, Smallwood PM, Nathans J (1999) Biochemical characterization of Wnt-frizzled interactions using a soluble, biologically active vertebrate Wnt protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3546-3551

Hsu SC, Galceran J, Grosschedl R (1998) Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with beta-catenin. *Mol Cell Biol.* 18:4807-4818

Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ (1999) Tumor necrosis factor receptor

family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3540-3545

Hughes DE, MacDonald BR, Russell RG, Gowen M (1989) Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in long-term cultures of human bone marrow. *J Clin Invest.* 83:1930-1935

Hughes DE, Wright KR, Uy HL, Sasaki A, Yoneda T, Roodman GD, Mundy GR, Boyce BF (1995) Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res.* 10:1478-1487

Itoh K, Tang TL, Neel BG, Sokol SY (1995) Specific modulation of ectodermal cell fates in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase. *Development.* 121:3979-3988

Jilka RL (2003) Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Med Pediatr Oncol.* 41:182-185

Karasawa T, Yokokura H, Kitajewski J, Lombroso PJ (2002) Frizzled-9 is activated by Wnt-2 and functions in Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem.* 277:37479-37486

Karsenty G, Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Geoffroy V, Amling M (1999) *Cbfa1* as a regulator of osteoblast differentiation and function. *Bone* 25:107-108

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

Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH, Glass DA 2nd, Hartmann C, Li L, Hwang TH, Brayton CF, Lang RA, Karsenty G, Chan L (2002) *Cbfa1*-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in *Lrp5*, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol* 157:303-314

Kawano Y, Kypta R (2003) Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Science* 116:2627-2634

Kazanskaya O, Glinka A, Niehrs C (2000) The role of *Xenopus dickkopf1* in prechordal plate specification and neural patterning. *Development* 127:4981-4992

Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW (2004) The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol.* 36:1-8

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T (1997) Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89:755-764

Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveiras-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM (1999) OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397:315-323

Kornak U, Kasper D, Bösl MR, Kaiser E, Schweizer M, Schulz A, Friedrich W, Delling G, Jentsch TJ (2001) Loss of the CLC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* 104:205-215

Krupnik VE, Sharp JD, Jiang C, Robison K, Chickering TW, Amaravadi L, Brown DE, Guyot D, Mays G, Leiby K, Chang B, Duong T, Goodearl AD, Gearing DP, Sokol SY, McCarthy SA (1999) Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene* 238:301-313

Li DY, Toland AE, Boak BB, Atkinson DL, Ensing GJ, Morris CA, Keating MT (1997) Elastin point mutations cause an obstructive vascular disease, supravalvular aortic stenosis. *Hum Mol Genet.* 6:1021-1028

Li YC, Amling M, Pirro AE, Priemel M, Meuse J, Baron R, Delling G, Demay MB (1998) Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D-receptor-ablated mice. *Endocrinology* 139:4391-4396

Li L, Yuan H, Xie W, Mao J, Caruso AM, McMahon A, Sussman DJ, Wu D (1999a) Dishevelled proteins lead to two signaling pathways. Regulation of LEF-1 and c-Jun N-terminal kinase in mammalian cells. *J Biol Chem.* 274:129-134

Li YP, Chen W, Liang Y, Li E, Stashenko P (1999b) Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. *Nat Genet.* 23:447-451

Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, Dupuis J, Osborne M, Folz C, Manning SP, Swain PM, Zhao SC, Eustace B, Lappe MM, Spitzer L, Zweier S, Braunschweiger K, Benchekroun Y, Hu X, Adair R, Chee L, FitzGerald MG, Tulig C, Caruso A, Tzellas N, Bawa A, Franklin B, McGuire S, Nogues X, Gong G, Allen KM, Anisowicz A, Morales AJ, Lomedico PT, Recker SM, Van Eerdewegh P, Recker RR, Johnson ML (2002) A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet.* 70:11-19

Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Himeno M, Narai S, Yamaguchi A, Komori T (2001) Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J Cell Biol.* 155:157-166

Luckman SP, Coxon FP, Ebetino FH, Russell RG, Rogers MJ (1998) Heterocycle-containing bisphosphonates cause apoptosis and inhibit bone resorption by preventing protein prenylation: evidence from structure-activity relationships in J774 macrophages. *J Bone Miner Res.* 13:1668-1678

Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ (1998) Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res.* 13:581-589

Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH 3rd, Flynn C, Yuan H, Takada S, Kimelman D, Li L, Wu D (2001a) Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell.* 7:801-809

Mao B, Wu W, Hoppe D, Stanne P, Glinka, Niehrs C (2001b) LDL-receptor related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 411:321-325

Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stannek P, Walter C, Glinka A, Niehrs C (2002) Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* 417:664-667

Marcus R, Feldman D, Kelsey J (2001) Osteoporosis. Academic Press Inc., San Diego, USA

Marks SC Jr, Hermey DC (1996) The structure and development of bone. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (Hrsg). Principles of bone biology. Academic Press, San Diego, 3–14

Marvin MJ, Di Rocco G, Gardiner A, Bush SM, Lassar AB (2001) Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev.* 15:316-327

Meunier PJ, Roux C, Seeman E, Ortolani S, Badurski JE, Spector TD, Cannata J, Balogh A, Lemmel EM, Pors-Nielsen S, Rizzoli R, Genant HK, Reginster JY (2004) The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med.* 350:459-468

Miyakoshi N (2004) Effects of parathyroid hormone on cancellous bone mass and structure in osteoporosis. *Curr Pharm Des.* 10:2615-2627

Monaghan AP, Kioschis P, Wu W, Zuniga A, Bock D, Poustka A, Delius H, Niehrs C (1999) Dickkopf genes are co-ordinately expressed in mesodermal lineages. *Mech Dev.* 87:45-56

Morris CA, Demsey SA, Leonard CO, Dilts C, Blackburn BL (1988) Natural history of Williams syndrome: physical characteristics. *J Pediatr.* 113:318-326

Mukhopadhyay M, Shtrom S, Rodriguez-Esteban C, Chen L, Tsukui T, Gomer L, Dorward DW, Glinka A, Grinberg A, Huang SP, Niehrs C, Belmonte JC, Westphal H (2001) Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev Cell.* 1:423-434

Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR (1997) Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89:773-779

Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108:17-29

Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsman AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK, Wang O, Mitlak BH (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

Oberender PO, Fritschi DA (2003) Disease Management und Osteoporose: Versorgungsmängel bei einer relevanten Frauenkrankheit. *Deutsches Ärzteblatt* 100:25:1728-1731

Osborne LR, Soder S, Shi XM, Pober B, Costa T, Scherer SW, Tsui LC (1997) Hemizygous deletion of the syntaxin 1A gene in individuals with Williams syndrome. *Am J Hum Genet.* 61:449-452

Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ (1997) Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89:765-771

Paperna T, Peoples R, Wang YK, Kaplan P, Francke U (1998) Genes for the CPE receptor (CPETR1) and the human homolog of RVP1 (CPETR2) are localized within the Williams-Beuren syndrome deletion. *Genomics* 54:453-459

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR (1987) Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 2:595-610

Parr BA, McMahon AP (1995) Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes in mouse limb. *Nature* 374:350-353

Parr BA, McMahon AP (1999) Wnt genes and vertebrate development. *Curr. Opin. Genet Dev.* 4:523-528

Peoples R, Perez-Jurado L, Wang YK, Kaplan P, Francke U (1996) The gene for replication factor C subunit 2 (RFC2) is within the 7q11.23 Williams syndrome deletion. *Am J Hum Genet.* 58:1370-1373

Peoples RJ, Cisco MJ, Kaplan P, Francke U (1998) Identification of the WBSCR9 gene, encoding a novel transcriptional regulator, in the Williams-Beuren syndrome deletion at 7q11.23. *Cytogenet Cell Genet.* 82:238-246

Perez Jurado LA, Wang YK, Peoples R, Coloma A, Cruces J, Francke U (1998) A duplicated gene in the breakpoint regions of the 7q11.23 Williams-Beuren syndrome deletion encodes the initiator binding protein TFII-I and BAP-135, a phosphorylation target of BTK. *Hum Mol Genet.* 7:325-334

Perrimon N (1994) The genetic basis of patterned baldness in *Drosophila*. *Cell* 76:781-784

Perrimon N (1996) Serpentine proteins slither into the wingless and hedgehog fields. *Cell* 86:513-516

Perreira R, Khillan JS, Helminen HJ, Hume EL, Prockop DJ (1993) Transgenic mice expressing a partially deleted gene for type I procollagen (COL1A1). A breeding line with an phenotype of spontaneous fractures and decreased bone collagen and mineral. *J Clin Invest* 91:709-716

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

Rawadi G, Vayssiere B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S (2003) BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res.* 18:1842-1853

Riddle RD, Ensini M, Nelson C, Tsuchida T, Jessell TM, Tabin C (1995) Induction of the LIM homeobox gene *Lmx1* by *WNT7a* establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell* 83:631-640

Riggs BL, Khosla S, Melton LJ 3rd (2002) Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev.* 23:279-302

Ringe JD (1997) Osteoporose: Differentialdiagnose und Differentialtherapie. George Thieme Verlag, Stuttgart

Rocheleau CE, Downs WD, Lin R, Wittmann C, Bei Y, Cha YH, Ali M, Priess JR, Mello CC (1997) Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos. *Cell* 90:707-716

Rodan GA (1997) Bone mass homeostasis and bisphosphonate action. *Bone* 20:1-4

Rodan GA, Martin TJ (2000) Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 289:1508-1524

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

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J, Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288:321-333

Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, Moritz JD, Schu P, von Figura K (1998) Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13453-13458

Schilling AF, Schinke T, Münch C, Gebauer M, Niemeier A, Priemel M, Streichert T, Rueger JM, Amling M (2005) Increased bone formation in mice lacking apolipoprotein E. *J Bone Miner Res.* 20:274-282

Schneider VA, Mercola M (2001) Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes Dev.* 15:304-315

Seeman E (1995) The dilemma of osteoporosis in men. *Am J Med* 98:75-87

Seeman E, Delmas PD (2001) Reconstructing the skeleton with intermittent parathyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab.* 12:281-283

Seeman E, Eisman JA (2004) Treatment of osteoporosis: why, whom, when and how to treat. The single most important consideration is the individual's absolute risk of fracture. *Med J Aust.* 180:298-303

Semenov M, Tamai K, Brott BK, Kuhl M, Sokol S, He X (2001) Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt co-receptor LRP6. *Curr Biol.* 11:951-961

Shinya M, Eschbach C, Clark M, Lehrach H, Furutani-Seiki M (2000) Zebrafish Dkk1, induced by the pre-MBT Wnt signaling, is secreted from the prechordal plate and patterns the anterior neural plate. *Mech Dev.* 98:3-17

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309-319

Smit TH, Burger EH (2000) Is BMU-coupling a strain-regulated phenomenon? A finite element analysis. *J Bone Miner Res.* 15:301-307

Spinella-Jaegle S, Roman-Roman S, Faucheu C, Dunn FW, Kawai S, Gallea S, Stiot V, Blanchet AM, Courtois B, Baron R, Rawadi G (2001) Opposite effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta1 on osteoblast differentiation. *Bone* 29:323-330

Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP (1994) Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* 372:679-683

Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G (2002) Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 111:305-317

Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X (2000) LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407:530–535

Tassabehji M, Metcalfe K, Fergusson WD, Carette MJ, Dore JK, Donnai D, Read AP, Proschel C, Gutowski NJ, Mao X, Sheer D (1996) LIM-kinase deleted in Williams syndrome. *Nat Genet.* 13:272-273

Tassabehji M, Metcalfe K, Donnai D, Hurst J, Reardon W, Burch M, Read AP (1997) Elastin: genomic structure and point mutations in patients with supravalvular aortic stenosis. *Hum Mol Genet.* 6:1029-1036

Tayyar S, Weinhold PS, Butler RA, Woodard JC, Zardiackas LD, St John KR, Bledsoe JM, Gilbert JA (1999) Computer simulation of trabecular remodeling using a simplified structural model. *Bone* 25:733-739

Thorpe CJ, Schlesinger A, Carter JC, Bowerman B (1997) Wnt signaling polarizes an early *C. elegans* blastomere to distinguish endoderm from mesoderm. *Cell* 90:695-705

Tian E, Zhan F, Walker R, Rasmussen E, Ma Y, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr (2003) The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med.* 349:2483-2494

Turner CH, Burr DB (1993) Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 14:595-608

Van Tilbeurgh H, Bezzine S, Cambillau C, Verger R, Carriere F (1999) Colipase: structure and interaction with pancreatic lipase. *Biochim Biophys Acta* 1441:173-184

Van Wesenbeeck L, Cleiren E, Gram J, Beals RK, Benichou O, Scopelliti D, Key L, Renton T, Bartels C, Gong Y, Warman ML, De Vernejoul MC, Bollerslev J, Van Hul W (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

Vignery A, Baron R (1980) Dynamic histomorphometry of alveolar bone remodeling in the adult rat. *Anat Rec.* 196:191-200

Vinson CR, Conover S, Adler PN (1989) A *Drosophila* tissue polarity locus encodes a protein containing seven potential transmembrane domains. *Nature* 338:263-264

Vrotsos Y, Miller SC, Marks SC Jr (2003) Prostaglandin E--a powerful anabolic agent for generalized or site-specific bone formation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 13:255-263

Wang Y, Macke JP, Abella BS, Andreasson K, Worley P, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Nathans J (1996) A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the *Drosophila* tissue polarity gene *frizzled*. *J Biol Chem.* 271:4468-4476

Wang YK, Samos CH, Peoples R, Perez-Jurado LA, Nüsse R, Francke U (1997) A novel human homologue of the *Drosophila* *frizzled* wnt receptor gene binds wingless protein and is in the Williams syndrome deletion at 7q11.23. *Hum Mol Genet.* 6:465-472

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

Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, O'Keefe L, Schwartz S, Vaizel-Ohayon D, Schejter E, Tomlinson A, DiNardo S (2000) Arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* 407:527-530

Wodarz A, Nüsse R (1998) Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 14:59-88

Yang Y, Niswander L (1995) Interaction between the signalling molecules WNT7A and SHH during vertebrate limb development: dorsal signals regulate anteroposterior patterning. *Cell* 80:939-947

Yoshida K, Oida H, Kobayashi T, Maruyama T, Tanaka M, Katayama T, Yamaguchi K, Segi E, Tsuboyama T, Matsushita M, Ito K, Ito Y, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ohuchida S, Kondo K, Nakamura T, Narumiya S (2002) Stimulation of bone formation and prevention of bone loss by prostaglandin E EP4 receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4580-4585

Zhang Y, Wang Y, Li X, Zhang J, Mao J, Li Z, Zheng J, Li L, Harris S, Wu D (2004) The LRP5 high-bone-mass G171V mutation disrupts LRP5 interaction with Mesd. *Mol Cell Biol.* 24:4677-4684

Zimolo Z, Wesolowski G, Rodan GA (1995) Acid extrusion is induced by osteoclast attachment to bone. Inhibition by alendronate and calcitonin. *J Clin Invest.* 96:2277-2283

Zorn AM (2001) Wnt signalling: antagonistic Dickkopfs. *Curr Biol.* 11:592-595

8 Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an alle, die in irgendeiner Art und Weise zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. med. Johannes M. Rueger, Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, für die Möglichkeit, in der Experimentellen Unfallchirurgie arbeiten zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. med. Michael Amling möchte ich für die Überlassung des Themas danken und dafür, dass er mich ins wissenschaftliche Arbeiten mit allen seinen Facetten eingeführt hat und mir immer mit seiner Unterstützung zur Seite stand.

Ganz besonders möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Thorsten Schinke danken. Mit seiner Geduld, seiner intensiven Betreuung, unermüdlichen Hilfe, seinem Wissen und seiner Begeisterung für die Wissenschaft hat er mein Interesse für die Wissenschaft weiter verstärkt und wesentlich zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen.

Herrn Dr. med. Arndt Schilling, Herrn Dr. med. Mathias Priemel, Herrn Dr. med. Matthias Gebauer, Frau Cordula Müldner, Herrn Tilmann Linn, Frau Antje Voss, Frau Sarah Liese und Tobias Kummer danke ich für die Hilfe bei der Durchführung des Projektes.

Mein besonderer Dank geht an meine Freundin Anne, meine Schwester Katharina sowie meine Eltern für ihren Rückhalt während des Studiums und der Doktorarbeit.

9 Lebenslauf

- 09.03.1977 geboren in Hamburg als Sohn von Dr. med. Volker Friedrich und Monika Friedrich-Wussow
- 1984-1988 Grundschule Alsterdorfer Strasse, Hamburg
- 1988-1994 Wilhelm-Gymnasium, Hamburg
- 1994-1995 South Kent School, Connecticut, USA
- 1995-1997 Wilhelm-Gymnasium, Hamburg
- 1997-1998 Zivildienst im Marienkrankenhaus, Hamburg
- 1998-1999 Studium der Humanmedizin, Albrecht-Ludwig-Universität, Freiburg
- 1999-2001 Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg
- 2000 Ärztliche Vorprüfung (Herbst 2000)
- 2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Herbst 2001)
- 2001-2002 Studium der Humanmedizin, Università di Padova, Italien
- 2002-2004 Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg
- 2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Frühjahr 2004)
- 2004-2005 Praktisches Jahr
-
1. Tertial: Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie (Direktor: Prof. Dr. med. Ch. Müller), Marienkrankenhaus, Hamburg; Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie (Direktor: Prof. Dr. med. J.M. Rueger, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf)
-
2. Tertial: Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie (Direktorin: Frau Prof. Dr. med. I. Moll), Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
-
3. Tertial: Gastroenterology Division (Direktor: Dr. J.J. Connon, MD); Cardiac Prevention and Rehabilitation Centre (Direktor: R. Chisholm, MD), St. Michael's Hospital, University of Toronto, Kanada; Klinik und Poliklinik für Kardiologie/Angiologie (Direktor: Prof. Dr. med. T. Meinertz, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf)

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, 28.11.2005

Felix Friedrich