

**Untersuchungen zur Funktion von Calcitonin  
im Knochen an Modellen der Maus  
(*Mus musculus* L., 1758)**

**Dissertation**

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

Dem Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und  
Naturwissenschaften an der Universität Hamburg vorgelegt von

**Antje-Kathrin Hübner**

**Hamburg 2007**

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr. med. M. AMLING  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. K. WIESE  
Tag der Disputation: 16. März 2007

Hamburg, den 02. März 2007



A handwritten signature in black ink, consisting of a large 'R' followed by a stylized 'L' and a long horizontal stroke.

Professor Dr. Reinhard Lieberei  
Leiter des Departments Biologie

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2003 bis Dezember 2006  
unter der Anleitung von Prof. Dr. med. Michael Amling  
am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
im Zentrum für Biomechanik und Skelettbiologie  
der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Wiese
2. Gutachter: Prof. Dr. med. M. Amling

---

**1 INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1 INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IV</b>
<b>2 ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>VII</b>
<b>3 EINLEITUNG .....</b>	<b>9</b>
3.1 Knochenzellen.....	10
3.2 Knochenwachstum und Knochenumbau .....	13
3.3 Endokrine Regulatoren des Knochenstoffwechsels .....	15
3.4 Calcitonin (CT) .....	15
3.5 Der Calcitoninrezeptor (CTR).....	19
3.6 Mausmodelle .....	20
<b>4 AUFGABENSTELLUNG .....</b>	<b>25</b>
<b>5 MATERIAL &amp; METHODEN .....</b>	<b>26</b>
5.1 Material .....	26
5.1.1 Chemikalien und Enzyme.....	26
5.1.2 Puffer und Lösungen .....	26
5.1.3 Bakterien.....	32
5.1.4 Plasmide .....	32
5.2 Methoden .....	33
5.2.1 Molekularbiologische Methoden .....	33
5.2.1.1 Restriktionsverdau von DNA.....	33
5.2.1.2 Modifikation von DNA-Enden.....	33
5.2.1.3 Ligation von DNA-Fragmenten.....	34
5.2.1.4 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	34
5.2.1.5 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen .....	34
5.2.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	35
5.2.1.7 Herstellung elektrokompetenter Bakterien .....	35
5.2.1.8 Transformation von Bakterien durch Elektroporation .....	35
5.2.1.9 Antibiotika-Selektion und Blau-Weiß-Selektion ausplattierter Bakterien.....	35
5.2.1.10 Präparation von Plasmid-DNA aus 4 ml Kulturen (Miniprep).....	36
5.2.1.11 Präparation von Plasmid-DNA aus 500 ml Kulturen (Maxiprep) .....	36
5.2.1.12 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwänzen .....	37
5.2.1.13 Isolierung genomischer DNA aus ES-Zellen von 96er Mikroplatten.....	38
5.2.1.14 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	38
5.2.1.15 Southern-Blot-Analyse .....	39
5.2.1.16 Genotypisierung .....	40

5.2.1.17	Sequenzierung von DNA.....	40
5.2.1.18	Isolierung von RNA aus Geweben und Organen.....	41
5.2.1.19	Reverse Transkription (cDNA-Synthese).....	41
5.2.1.20	Microarray-Genchip-Analyse.....	42
5.2.2	Kultur muriner embryonaler Stammzellen (ES-Zellen).....	42
5.2.2.1	Beschichten von Zellkulturschalen mit Gelatine.....	42
5.2.2.2	Isolierung und Kultur primärer embryonaler Fibroblasten.....	43
5.2.2.3	Mitotische Inaktivierung embryonaler Fibroblasten.....	43
5.2.2.4	Trypsinieren von Zellkulturzellen.....	43
5.2.2.5	Einfrieren von Zellkulturzellen.....	44
5.2.2.6	Revitalisierung von Zellkulturzellen.....	44
5.2.2.7	Kultur muriner embryonaler Stammzellen.....	44
5.2.2.8	Elektroporation muriner ES-Zellen.....	44
5.2.2.9	Positive Selektion der Klone auf die Integration der neo-Kassette.....	44
5.2.2.10	Vereinzelung (Picken) stabil transfizierter Klone.....	45
5.2.2.11	Einfrieren und Auftauen von 96er ES-Mikroplatten.....	45
5.2.2.12	Entfernen der Neomycin-Kassette <i>in vitro</i> durch Frt-Rekombination.....	45
5.2.2.13	Blastozysteninjektion und Reimplantation der Blastozyste.....	46
5.2.3	Serum- und Urinanalysen.....	46
5.2.3.1	Serumgewinnung und Urinentnahme.....	46
5.2.3.2	Bestimmung von Kalzium, Phosphor und Dpd im Urin.....	46
5.2.3.3	Kalzium-, Phosphor- und Hormonbestimmung im Serum.....	47
5.2.4	Histologie und Morphologie.....	47
5.2.4.1	Kontaktröntgen und $\mu$ CT.....	47
5.2.4.2	Paraffin- und Acrylat-Histologie.....	47
5.2.4.3	HE-Färbung.....	48
5.2.4.4	von Kossa-/ van Gieson-Färbung.....	48
5.2.4.5	Toluidin-Färbung.....	48
5.2.4.6	TRAP ( <i>tartrate-resistant acid phosphatase</i> )-Färbung.....	49
5.2.4.7	Immunhistologie an Gewebeschnitten.....	49
5.2.4.8	Calceinmarkierung.....	49
5.2.4.9	Histomorphometrie.....	50
5.2.5	sonstige Methoden.....	50
5.2.5.1	Maushaltung.....	50
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>51</b>
6.1	Die Defizienz des <i>Calca</i> -Gens führt zu einem ausgeprägten Knochenphänotyp, der sich deutlich von einer reinen $\alpha$ -CGRP-Defizienz unterscheidet.....	51
6.2	Der Knochenphänotyp von <i>Calca</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen ist progressiv und führt sowohl zu verstärkter Knochenformation als auch zu verstärkter Knochenresorption.....	53
6.3	Die verstärkten Knochenumbauprozesse in <i>Calca</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen führen zu hyperostotischen Läsionen.....	56

---

6.4	Es gibt keine Anzeichen, dass der Phänotyp von <i>Calca</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen auf einen sekundären Mechanismus zurückzuführen ist.....	58
6.5	Untersuchung der Genexpression im Hypothalamus von Wildtyp- und <i>Calca</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	60
6.6	Die Überproduktion von Maus- bzw. Lachs-Calcitonin hat unterschiedliche Wirkung auf den Knochen, führt aber in beiden Fällen nicht zum reversen Knochenphänotyp der <i>Calca</i> <sup>-/-</sup> -Mäuse .....	63
6.7	Generierung von konditional Calcitoninrezeptor-defizienten Mäusen.....	69
<b>7</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>78</b>
7.1	Calcitonin und $\alpha$ -CGRP haben unterschiedliche Funktionen im Knochenumbau .....	78
7.2	Säugetier-Calcitonin als Inhibitor der Knochenresorption .....	78
7.3	Säugetier-Calcitonin als Inhibitor der Knochenformation .....	79
7.4	Calcitonin als Protektor des Knochens bei „hormonellem Stress“.....	80
7.5	Fisch- und Säugetier-Calcitonin im Vergleich .....	81
7.6	$\beta$ -CGRP als potentieller Regulator der Knochenformation.....	82
7.7	Der Calcitoninrezeptor als Schlüssel zur Aufklärung der physiologischen Funktion von Calcitonin.....	83
7.8	Ausblick .....	86
<b>8</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>90</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>92</b>
9.1	Danksagung .....	92
9.3	Publikationen .....	93
<b>12</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>94</b>

## 2 ABKÜRZUNGEN

Ω:	Ohm	Frt-site:	<i>Flp(e)-recombinase targets</i> (Erkennungssequenz für die Flp(e)-Rekombinase)
Amp:	Ampicillin	HRP:	<i>horse radish peroxidase</i> (Peroxidase)
ATP:	Adenosintriphosphat	IRMA:	<i>Immunoradiometric Assay</i> (immunradiometrischer Assay)
BFR:	<i>bone formation rate</i> (Knochenformationsrate)	<i>lacZ:</i>	β-Galaktosidase Gen
bp:	Basenpaare	LB:	<i>Luria Broth</i> , Kulturmedium
BSA:	bovines Serumalbumin	LIF:	<i>leucemia inhibitory factor</i>
cDNA:	<i>complementary</i> (komple- mentäre) DNA	LoxP-site:	<i>locus of crossingover of P1</i> <i>phage</i> (Erkennungssequenz für die Cre-Rekombinase)
CGRP:	<i>calcitonin gene-related peptide</i>	MCS:	<i>multiple cloning site</i> (Klonierungsstelle in Plas- miden)
CIP:	<i>calf intestine alkaline</i> <i>phosphatase</i> (alkalische Phosphatase)	mCT:	<i>mouse</i> (Maus) Calcitonin
CT:	Calcitonin	MEF:	<i>mouse embryonic fibroblast</i> (embryonale Maus- Fibroblasten)
CTR:	Calcitoninrezeptor	min:	Minute
DEPC:	Diethylpyrokarbonat	mRNA:	<i>messenger</i> (Boten-) RNA
DMSO:	Dimethylsulfoxid	NOb/BPm:	<i>number of osteoblasts per bone</i> <i>perimeter</i> (Anzahl der Osteoblasten pro Knochen- oberfläche)
DMEM:	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium	NOc/BPm:	<i>number of osteoclasts per bone</i> <i>perimeter</i> (Anzahl der Osteoklasten pro Knochenoberfläche)
DMF:	Dimethylformamid	NTPs:	Nukleotidtriphosphate
DNA:	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)		
dNTPs:	Desoxynukleotidtriphosphate		
Dpd:	Deoxypyridinolin		
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat		
ELISA:	<i>enzyme-linked immunosorbent</i> <i>assay</i> (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)		
F:	Farad		
FCS:	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)		

---

OD:	optische Dichte	TbTh:	<i>trabecular thickness</i> (Trabekeldicke)
PBS:	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	TE:	Tris-EDTA
PCR:	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)	Tet:	Tetracyclin
PFA:	Paraformaldehyd	Tris:	Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Puffersubstanz
RNA:	Ribonukleinsäure	U:	<i>unit</i> , eine Enzymeinheit (schneidet 1 µg DNA in einer Stunde)
rpm:	=Upm, Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )	ü.N.:	über Nacht
RT:	Raumtemperatur	UV:	Ultraviolett
RT-PCR:	Reverse Transkriptase-PCR	V:	Volt
sCT:	<i>salmon</i> (Lachs) Calcitonin	v/v:	<i>volume/volume</i> (Volumen /Volumen)
SDS:	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat), Detergens	WT:	Wildtyp
TAE:	Tris-Azetat-EDTA-Puffer	w/v:	<i>weight/volume</i> (Masse/Volumen)
TbN:	<i>trabecular number</i> (Anzahl der Trabekel)		
TbSp:	<i>trabecular spacing</i> (Abstand der Trabekel)		

### 3 EINLEITUNG

Obgleich der Knochen durch die Einlagerung von Mineral ein äußerst hartes Gewebe ist und den Anschein eines starren Systems erweckt, sind die Abläufe auf zellulärer Ebene äußerst dynamisch. In einem Zeitraum von etwa 10 Jahren wird beim Menschen eine Knochenmasse durch Umbauprozesse regeneriert, die dem gesamten Skelett entspricht (Cohen, Jr., 2006). Dieser stetige Umbau (*Remodeling*) ermöglicht Wachstum und beim Erwachsenen die Anpassung der Knochensubstanz an wechselnde Belastungen. Während beim Wachstum der Knochenaufbau (Formation) überwiegt, erfordert die Aufrechterhaltung der Knochensubstanz ein sensibles Gleichgewicht von Knochenaufbau und Knochenabbau (Resorption). Häufig ist im Alter das Gleichgewicht zugunsten der Resorption gestört, so dass es zu einem Verlust an Knochenmasse kommt. Frauen sind davon häufiger betroffen als Männer. In Deutschland erleidet etwa jede dritte Frau eine Osteoporose (Pientka & Friedrich, 2000), wobei die Osteoporose nach WHO (*world health organisation*)-Kriterien als ein Knochendichteverlust von mehr als 25 % definiert ist. Die Osteoporose ist die häufigste, aber nur eine von zahlreichen Knochenerkrankungen. Knochenerkrankungen können „erworben“ sein oder auch eine genetisch bedingte Ursache haben. Zu den „erworbenen“ Ursachen gehört beispielsweise der Mangel an Vitamin D durch eine zu geringe Vitamin-D-Zufuhr oder durch mangelhafte Sonneneinstrahlung. Dies führt zur Osteomalazie, einer Knochenerweichung durch unzureichende Mineralisation. Auch ein Bewegungsmangel kann der Grund einer veränderten Knochenstruktur sein.

Bei der Aufklärung von genetisch bedingten Ursachen für skelettale Erkrankungen haben sich gentechnisch veränderte Tiere, insbesondere Mäuse, als Modell für den Menschen bewährt. Beispielsweise hat die Ausschaltung des Gens für den Chloridkanal *ClC-7* in Mäusen Einblick über seine Funktion im Knochenstoffwechsel gegeben. *ClC-7*-defiziente Mäuse haben eine schwere Form von Osteopetrose (Marmorknochenkrankheit), die auf einen Funktionsverlust der knochenresorbierenden Zellen, der Osteoklasten, zurückzuführen ist. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Chloridkanal, zusammen mit einer Protonenpumpe, wichtig ist für die Ansäuerung der Resorptionslakunen (siehe Abb. 3.1.1), ohne die Knochen nicht resorbiert werden kann (Kornak et al., 2001). Tatsächlich führte die DNA-Analyse Osteopetrose-Erkrankter zu der Entdeckung von Mutationen im humanen *CLC-7*-Gen und damit zu der Aufklärung einer Ursache für Osteopetrose beim Menschen (Cleiren et al., 2001). Ein anderes wichtiges Beispiel ist die Entdeckung des Transkriptionsfaktors *Runx2* als entscheidender Regulator der Knochenformation sowohl in der Maus als auch im Menschen. Ein völliges Fehlen von *Runx2* bewirkt ein Ausbleiben der Verknöcherung des Skeletts

(Komori et al., 1997), ein heterozygoter Funktionsverlust führt zur Cleidocranialen Dysplasie, einer Erkrankung, die aufgrund einer gestörten Verknöcherung zu Kleinwuchs führt und durch kleine oder fehlende Klavikel (Schlüsselbein) und nicht-verknöcherte Fontanellen charakterisiert ist (Mundlos et al., 1997; Otto et al., 1997). Mithilfe von Defizienz- und Überexpressions-Tiermodellen und den damit assoziierten Phänotypen konnte die physiologische Funktion vieler Proteine aufgeklärt werden. Auch die vorliegende Arbeit zur Funktion von Calcitonin im Knochenstoffwechsel basiert auf der Untersuchung gentechnisch veränderter Mäuse.

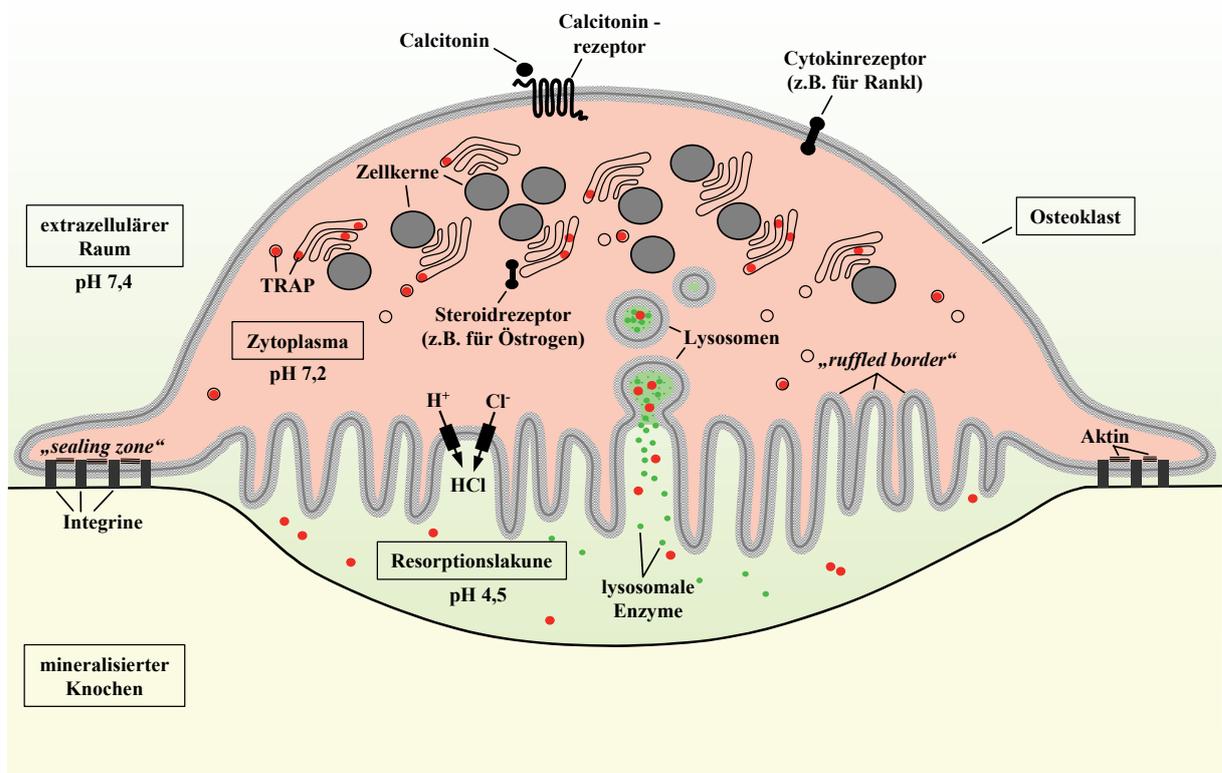
### 3.1 Knochenzellen

Der Knochen setzt sich aus vier verschiedenen Zelltypen zusammen: Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten und Knochenbelegzellen.

Osteoblasten (Abb. 3.1.2) gehen aus mesenchymalen Stammzellen hervor und sind für die Knochenbildung verantwortlich. Unter Einfluß von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wie z.B. FGFs (*fibroblast growth factors*), BMPs (*bone morphogenetic proteins*) und Runx2 (Säugetier-Ortholog zum Drosophila Transkriptionsfaktor  *runt* ) differenzieren die mesenchymalen Stammzellen zu Präosteoblasten, die dann in Gegenwart von PTH, Vitamin D, Östrogen und Zytokinen zu funktionsfähigen Osteoblasten reifen. Osteoblasten treten in Gruppen von 200 Zellen pro Formationsfeld auf und sezernieren eine extrazelluläre Matrix, die zu 95% aus Kollagen I besteht. Nicht-kollagene Bestandteile sind knocheneigene Glykoproteine wie Osteocalcin (BGP, *bone gla protein*), BSP (*bone sialoprotein*) oder Osteopontin, aber auch Serumproteine wie Fetuin. In geringeren Mengen sind Proteoglykane wie Decorin mit der Knochenmatrix assoziiert. Die frisch gebildete Knochenmatrix, das Osteoid, ist zunächst noch nicht mineralisiert. Erst etwa zwei Wochen nach der Osteoidbildung findet eine Einlagerung von Kalziumphosphat statt, wobei der genaue Mechanismus noch nicht geklärt ist.

Osteoklasten (Abb. 3.1.1 und 3.1.2) sind die Gegenspieler der knochenbildenden Osteoblasten. Es sind die einzigen Zellen im Körper, die Knochen resorbieren können. Osteoklasten sind multinukleär. Sie entstehen durch Fusion von Vorläuferzellen aus der hämatopoietischen Monozyten-Makrophagen-Linie. Für die Osteoklastogenese sind verschiedene Faktoren wie Vitamin D, PTH, Interleukine, M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) und RANKL (*receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand*) wichtig. Im Gegensatz zu Osteoblasten treten Osteoklasten vereinzelt auf und besiedeln nur etwa 1% der Knochenoberfläche. Eine Besonderheit von Osteoklasten ist die Bildung eines extrazellulären

Kompartiments (siehe Abb. 3.1.1). Reife Osteoklasten adherieren an der Knochenoberfläche und bilden apikal einen Ring aus Aktin, die sogenannte „*sealing zone*“, die in Zusammenspiel mit Integrinen eine undurchlässige Verankerung am Knochen schafft. Innerhalb des Aktinringes wird die Osteoklastenmembran durch das Verschmelzen mit lysosomalen Vesikeln, die Enzyme wie CathepsinK in den Raum unter den Osteoklasten einschleusen, zur „*ruffled border*“ aufgefaltet. Durch zusätzlich auswärtsgerichteten Protonen- und Chloridionentransport durch die „*ruffled border*“ findet eine Ansäuerung in dem extrazellulären Bereich unter dem Osteoklasten statt, so dass die Enzyme aktiviert werden und schließlich der Knochen resorbiert wird. Es bildet sich eine Resorptionslakune.



**Abb. 3.1.1: Schema eines Osteoklasten.** Osteoklasten sind mehrkernige Zellen, die mineralisierten Knochen resorbieren können. Durch die Bildung eines apikalen Ringes aus Aktin und durch die Interaktion von Integrinen mit der mineralisierten Matrix, können sich Osteoklasten fest an der Knochenoberfläche verankern. Die Verankerung („*sealing zone*“) ist für Proteine und die meisten Ionen undurchlässig, so dass ein extrazelluläres Kompartiment entsteht. In dieses Kompartiment werden lysosomale Enzyme eingeschleust. Durch das Verschmelzen mit lysosomalen Vesikeln faltet sich die apikale Zytoplasmamembran zur „*ruffled border*“ auf. Einwärtsgerichteter Protonen- und Chlorid-Ionen-Transport durch  $V^+$ -ATPasen bzw. den Chlorid-Ionenkanal CLC-7 führen zur Ansäuerung der Resorptionslakune. Dadurch werden lysosomale Enzyme aktiviert und der Knochen resorbiert. Ein osteoklastenspezifisches Enzym ist TRAP (*tartrate-resistant acid phosphatase*). Osteoklasten besitzen verschiedene Zellmembranrezeptoren, darunter auch den Calcitoninrezeptor. (modifiziert nach E. und P. Barrett, *Medical Physiology*, 2005)

Die Funktion der Osteozyten (Abb. 3.1.2) konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Osteozyten sind Zellen, die in der mineralisierten Knochenmatrix eingeschlossen sind und nur durch Zellausläufer, ähnlich denen von Neuronen, untereinander in Kontakt stehen. Sie entstehen, wenn Osteoblasten ihre Polarität verlieren und infolgedessen nicht mehr gerichtet die Knochenmatrix absondern, sondern zellumfassend, so dass sie von der eigenen Matrix umschlossen werden. Obwohl das Lakunensystem der Osteozyten etwa die zehnfache Oberfläche von dem Kapillarsystem der Lunge umfasst, was ein erhebliches metabolisches Potenzial vermuten lässt, ist nur wenig über die Funktion der Osteozyten bekannt. Es wird davon ausgegangen, dass die Osteozyten im Knochen als Mechanosensoren fungieren und mechanische Belastung in zelleigene Signale transduzieren. Eine regelmäßige mechanische Belastung von Knochen führt zu einer Verstärkung des Knochens im Bereich der Belastung (Lee et al., 2002).

Auch zu den Knochenbelegzellen ist wenig bekannt. Es sind langgestreckte Zellen, die die gesamte Knochenoberfläche besiedeln, aber metabolisch inaktiv sind. Sie bilden eine Art Schutzhülle des Knochens.

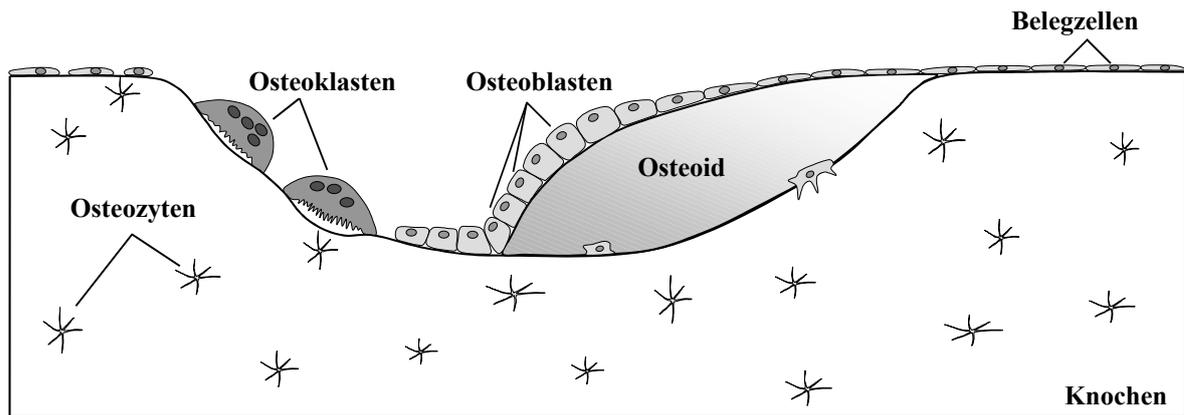


**Abb. 3.1.2: Histologische Bilder von Knochenzellen.** Links: ein Osteoklast (rot) und mehrere Osteoblasten (blau) in der TRAP-Färbung und Hämalaun-Gegenfärbung auf der Knochenoberfläche. TRAP (*tartrate-resistant acid phosphatase*) ist ein Osteoklasten-spezifisches Enzym, das bei der Umwandlung des Substrats Naphtol ASMX Phosphat in Gegenwart von *Fast Red Violet* Salz einen roten Farbstoff bildet. Rechts: Histologisches Bild eines Osteozyten in der Toluidin-Färbung. Der Zellkern ist dunkelblau gefärbt. Durch die feinen Zellausläufer, mit denen Osteozyten in Kontakt mit anderen Zellen stehen, erscheinen Osteozyten sternförmig.

### 3.2 Knochenwachstum und Knochenumbau

Knochen kann auf zwei verschiedene Weisen gebildet werden: direkt aus mesenchymalem Gewebe (desmal) oder mit Knorpelzellen als Vorstufe (enchondral). Während durch desmale Ossifikation hauptsächlich flache Knochen wie z.B. Rippen und das Schädeldach entstehen, gehen Röhrenknochen aus der enchondralen Ossifikation hervor. Solange das Wachstum andauert, bilden proliferierende Knorpelzellen in der Wachstumsfuge ein Grundgerüst, an dem sich Osteoblasten und Osteoklasten formieren. Sie wandeln die apikalen Knorpelausläufer stetig in Knochen um, zunächst in einen weniger strukturierten Geflechtknochen, der erst nach und nach in die kompakte Struktur der Kortikalis ummodelliert wird, und erwirken dadurch ein Längenwachstum.

Mit dem Ende des Knochenwachstums beginnt die Phase des Knochenumbaus (Abb. 3.2.1), des „*Remodelings*“, bei dem kontinuierlich alter Knochen durch neuen ersetzt wird. Der Knochenumbau ist nicht nur wichtig für die Aufrechterhaltung des Knochenvolumens, er ermöglicht auch eine strukturelle Anpassung an mechanische Belastung und dient der Erhaltung der Knochenqualität, da alter Knochen zunehmend spröde wird. Normalerweise agieren die verschiedenen Knochenzellen dabei in enger zeitlicher und räumlicher Abfolge und bilden sogenannte BMUs (*basic multicellular units*). Die genaue Ursache für die Bildung solcher Zellgruppierungen ist noch nicht geklärt. Eine Theorie besagt, dass die Gruppierung initial durch einen mechanischen Stimulus ausgelöst wird, der lokal zur Freisetzung eines parakrinen Faktors durch Osteozyten führt, der wiederum eine Kontraktion der Knochenbelegzellen auslöst (Turner & Forwood, 1995). Durch das dabei freigelegte Kollagen und unter Einfluß von Hormonen werden Präosteoklasten angelockt und aktiviert. Gleichzeitig werden Präosteoblasten zur Proliferation und Differenzierung angeregt. Sie formieren sich am Grund der von den Osteoklasten gebildeten Resorptionslakune und beginnen, die Lakune mit Osteoid aufzufüllen. Beim Menschen können BMUs mehrere Monate aktiv über die Knochenoberfläche wandern, wobei die einzelnen Zellen eine deutlich kürzere Lebenszeit haben. Ist das Verhältnis von Knochenformation zu -resorption ausgewogen, bleibt das Gesamtknochenvolumen erhalten. Überwiegt die Aktivität der Osteoblasten, nimmt das Volumen zu, entsprechend nimmt das Volumen ab, wenn die Resorptionsaktivität der Osteoklasten dominiert.



**Abb. 3.2.1: Schema des Knochenumbaus.** Die Knochenoberfläche, die nicht dem Umbau unterliegt, ist von flachen Belegzellen besiedelt. Durch die Resorptionsaktivität mehrkerniger Osteoklasten entsteht eine Resorptionslakune. Osteoblasten füllen die Lakune wieder mit Knochen auf, indem sie Osteoid, eine zunächst noch nicht mineralisierte Knochenmatrix, absondern. Einige Osteoblasten werden vom Osteoid eingeschlossen und entwickeln sich zu Osteozyten.

Anhand verschiedener knochenspezifischer Marker, wie z.B. Osteocalcin, das von reifen Osteoblasten produziert wird, oder auch Kollagen I-Abbauprodukten (Dipyridinoline) lassen sich Rückschlüsse auf die jeweilige Zellaktivität ziehen. Als Maß für die Formationsrate hat sich bei der Knochenanalyse eine Doppelmarkierung mit Calcein bewährt. Der grüne Fluoreszenzfarbstoff lagert sich in die frisch synthetisierte Knochenfront ein. Am Abstand der beiden Marken lässt sich bei zeitversetzter Gabe die Zuwachsrates ablesen. Das Maß des Knochenumbaus korreliert nicht zwangsläufig mit der Knochenqualität. Um die Qualität des Knochens beurteilen zu können, ist die Analyse weiterer Parameter wichtig, insbesondere des Mineralgehalts, der Bruchfestigkeit sowie der Trabekeldicke und -vernetzung (Konnektivität).

Die normalerweise enge Abfolge von Resorption und Formation und der offensichtlich bedeutende Einfluß lokaler Faktoren führten lange Zeit zu der Annahme, dass Osteoblasten und Osteoklasten funktionell gekoppelt sind. Dies wird jedoch widerlegt durch Modelle, bei denen jeweils nur eine der beiden Zellarten aktiv ist. So können beispielsweise bei Osteopetrose die Osteoblasten durchaus eine normale Aktivität haben, während die Osteoklasten inaktiv sind oder sogar fehlen. Entsprechend konnte durch zellspezifische Mutagenese im Tiermodell die Funktion von Osteoblasten ausgeschaltet werden, während die Osteoklasten ihre volle Funktion behielten (Corral et al., 1998). In diesen Fällen ist offensichtlich die systemische Regulation der lokalen übergeordnet.

### 3.3 Endokrine Regulatoren des Knochenstoffwechsels

Wie in anderen Zielorganen spielen Hormone auch im Knochen eine bedeutende regulative Rolle. Parathormon (PTH) ist essentiell zur Aufrechterhaltung der Kalziumhomeostase. Es fördert die Kalziumfreisetzung aus dem Knochen und verstärkt die Kalziumreabsorption durch die Nieren. Gleichzeitig hemmt es die Reabsorption von Phosphat (Rizzoli et al., 1992). Es aktiviert Hydroxylase, ein Enzym, das die Umwandlung von Calcidiol zu Calcitriol in der Niere ermöglicht. Dadurch hat PTH Einfluss auf ein weiteres wichtiges Hormon des Knochenstoffwechsels, das Vitamin D (Potts, 2005).  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , die aktive Form des Vitamin D, ist wichtig für die Kalziumabsorption im Darm und die Mineralisierung des Knochens. Ein Mangel führt zu Rachitis bzw. Osteomalazie (Holick, 2004). Östrogene, die ebenfalls zu den Steroidhormonen gehören, wirken über Kernrezeptoren. Östrogenrezeptoren werden sowohl in der Osteoblasten-Linie als auch in der Osteoklasten-Linie exprimiert (Eriksen et al., 1988; Oursler et al., 1991). Östrogene regulieren das Knochenwachstum und den Knochenumbau auf zellulärer Ebene sehr komplex. Ovariectomie führt zu einem Knochenverlust (Kalu, 1991; Lindsay et al., 1978; Jayo et al., 1990). In ähnlicher Weise ist die postmenopausale Osteoporose auf einen Östrogenmangel zurückzuführen.

Im Gegensatz zur Osteoporose, die auf Östrogenmangel zurückzuführen ist, gibt es auch eine Glukokortikoid-induzierte Osteoporose. Glukokortikoide in pharmakologischer Dosis hemmen die Knochenformation. Allerdings haben Glukokortikoide in geringer Konzentration den gegenteiligen Effekt, d.h. sie aktivieren indirekt die Osteoblasten-Differenzierung und die Knochenformation, indem sie andere knochenanabole Hormone stimulieren (Chen & Feldman, 1978; Rodan et al., 1984; Wong et al., 1990).

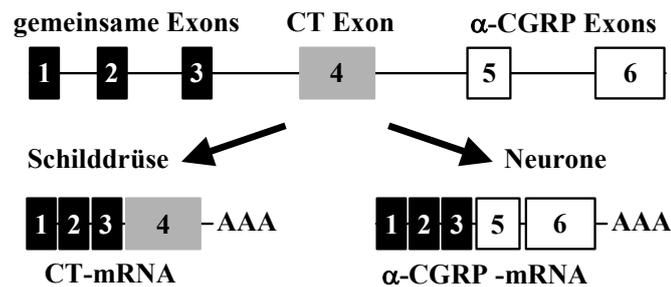
Eine Besonderheit unter den Hormonen stellt Leptin dar. Leptin wird von Zellen des weißen Fettgewebes exprimiert. Leptin- und Leptinrezeptor-defiziente Mäuse sind adipös, haben einen Hypogonadismus und eine erhöhte Knochenformationsrate. Eine intracerebroventrikuläre Infusion von Leptin bewirkt in diesen Mäusen eine starke Abnahme der Knochenmasse (Ducy et al., 2000). Diese Studie zeigte zum ersten Mal, dass die Knochenformation auch einer zentralen Regulation unterliegen kann.

### 3.4 Calcitonin (CT)

Calcitonin wurde 1961 in der Gruppe von Copp et al. in Canada durch Transfusionsexperimente mit extrahierten Schilddrüsen von Hunden und Ratten entdeckt. Die Gruppe beschrieb Calcitonin zunächst noch als eine hypokalzämische Substanz aus der Nebenschilddrüse, die als Gegenspieler zu Parathormon den Kalziumserumspiegel senkt

(Copp & Cheney, 1962). 1964 konnte eine Gruppe aus den USA den Nachweis erbringen, dass Calcitonin nicht von der Nebenschilddrüse, sondern von der Schilddrüse exprimiert und sezerniert wird (Hirsch et al., 1964).

Calcitonin ist ein kleines, 32 Aminosäuren langes Peptidhormon der parafollikulären Zellen (C-Zellen) der Schilddrüse. Es geht durch alternatives Spleißen aus einem Vorläufermolekül hervor, aus dem noch ein zweites Protein, das Neuropeptid  $\alpha$ -CGRP ( *$\alpha$ -Calcitonin gene-related peptide*), entsteht (Amara et al., 1982).



**Abb. 3.4.1: Alternatives Spleißen des *Calca*-Gens bei der Maus.** Alternatives Spleißen am Exon 4 führt zu der Bildung von Calcitonin in den C-Zellen der Schilddrüse oder zu  $\alpha$ -CGRP in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems. (Abbildung nach Hoff et al., 2002, JCI).

Das humane wie auch das murine Calcitonin-Gen (*CALCA* bzw. *Calca*) gehört zu einer Genfamilie, aus der neben  $\alpha$ -CGRP noch weitere, sehr eng verwandte Peptidhormone hervorgehen: Amylin, Adrenomedullin (ADM), Adrenomedullin 2 (Intermedin) und  $\beta$ -CGRP. Diese sechs Peptide verbinden zwei strukturelle Gemeinsamkeiten. Sie bilden N-terminal eine Ringstruktur über eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinresten aus, und ihre C-terminal endständige Aminosäure ist amidiert (siehe Tabelle 3.4.1). Diese beiden Strukturelemente sind wichtig für die Rezeptorbindung. Im mittleren Bereich sind die Moleküle unterschiedlich stark  $\alpha$ -helikal gewunden. Die Calcitonine werden drei Gruppen zugeordnet: I: Schwein/Schaf, II: Mensch/Ratte und III: Lachs/Aal. Zu der zweiten Gruppe gehört auch die Maus. Innerhalb einer Gruppe sind die Aminosäure-Sequenzen unterschiedlicher Spezies stark konserviert, zwischen den Gruppen können sie sich stark unterscheiden, wie die nachfolgende Tabelle veranschaulicht. Es wird vermutet, dass die Calcitonin-Genfamilie durch Genduplikation entstanden ist (Lips et al., 1988).



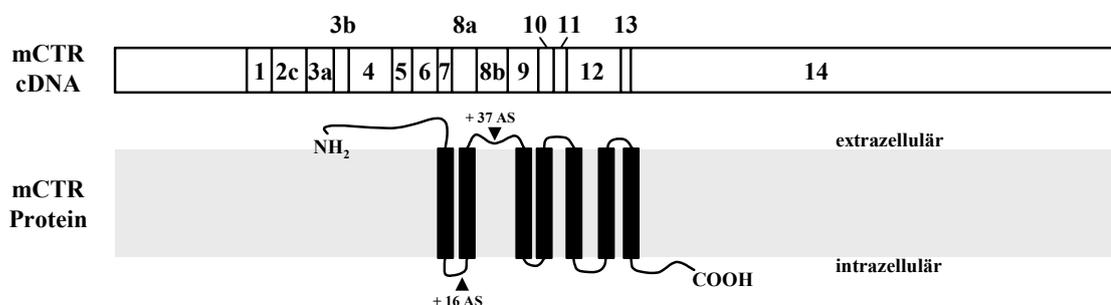
Calcitonin-Mangel, wie nach einer Schilddrüsenentfernung, Einfluß auf die Knochendichte hat (Deftos, 1997; Hirsch et al., 2001; Hirsch & Baruch, 2003). Zudem zeigte ein Mausmodell, dem Calcitonin und  $\alpha$ -CGRP fehlt, im Alter von 3 Monaten einen unerwarteten Knochenphänotyp. Die Mäuse hatten ein erhöhtes Knochenvolumen (Hoff et al., 2002). Ebenso führte der Verlust in einem Calcitoninrezeptor-defizienten Mausmodell in heterozygoten Tieren zu einem erhöhten Knochenvolumen (Dacquin et al., 2004).

Die tatsächliche physiologische Funktion von Calcitonin im Knochenstoffwechsel ist noch immer unklar. Die erzielten Effekte sind abhängig von der verwendeten Calcitonin-Spezies, von der verabreichten Dosis (oft wurden die Versuche mit supraphysiologischen Konzentrationen durchgeführt), von der Art der Verabreichung und von dem jeweiligen Knochenstatus des Patienten. Wenngleich die Calcitonin-Medikation in Patienten mit einem verstärkten Knochenumbau, wie z.B. bei der Paget-Erkrankung, in der Regel hypokalzämisch wirkt, hat Calcitonin bei gesunden Menschen normalerweise keinen Einfluß auf den Serumkalziumspiegel (Gnaedinger et al., 1989). In Osteoklastenkulturen wurde vielfach eine Hemmung von Osteoklasten durch Calcitonin beschrieben, entweder durch eine Abkugelung und Ablösung der Osteoklasten von der Knochenoberfläche (Gravel et al., 1994; Hunter et al., 1989) oder durch einen Funktionsverlust infolge der Inhibition Osteoklasten-spezifischer Proteine wie der Carboanhydrase II oder der Adhäsions-Kinase (Zheng et al., 1994; Berry et al., 1994). Es ist unwahrscheinlich, dass diese Wirkung in gleicher Stärke auch *in vivo* erzielt wird, aber dass Calcitonin einen direkten Einfluß auf Osteoklasten hat, ist anzunehmen, da Osteoklasten einen Calcitoninrezeptor exprimieren.

Die Funktion von  $\alpha$ -CGRP, das durch alternatives Spleißen aus demselben Gen wie Calcitonin hervorgeht, ist bislang ebenfalls nur teilweise geklärt. Wie das eng verwandte  $\beta$ -CGRP, das jedoch von einem anderen Gen, dem CALCB-Gen (bzw. *Calcb*-Gen bei der Maus) exprimiert wird, wird  $\alpha$ -CGRP hauptsächlich in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert (Rosenfeld et al., 1983). Beide Peptide fungieren als Neuromodulatoren und wirken vasodilatatorisch (Kawasaki et al., 1988).  $\alpha$ -CGRP scheint im Zusammenhang mit Migräne-Attacken eine Rolle zu spielen (Longoni & Ferrarese, 2006). Die Abwesenheit von  $\alpha$ -CGRP in der Maus führt zu einer Osteopenie, die auf eine reduzierte Knochenformation durch eine verminderte Osteoblastenaktivität zurückzuführen ist (Schinke et al., 2004).

### 3.5 Der Calcitoninrezeptor (CTR)

Der Calcitoninrezeptor (CTR) ist ein G-Protein-gekoppelter Zelloberflächenrezeptor der Klasse II mit sieben membrandurchspannenden Domänen (Goldring et al., 1993; Strader et al., 1995). Der erste porcine CTR wurde 1991 durch Expressionsklonierung aus der renalen Zelllinie LLC-PK1 isoliert (Lin et al., 1991). Derselben Gruppe gelang in den folgenden Jahren auch die Klonierung des ersten humanen Calcitoninrezeptors aus einer Ovarien-Zelllinie (Gorn et al., 1992) und eines Maus-Calcitoninrezeptors aus dem Gehirn (Yamin et al., 1994). Das Calcitoninrezeptor-Gen des Menschen (CALCR), wie auch das der Maus (*Calcr*), ist komplex strukturiert, umfasst ca. 70 kb und besteht aus wenigstens 14 Exons. Sowohl vom humanen, als auch vom murinen Rezeptor gibt es mehrere Spleißvarianten. Die am besten charakterisierten Varianten des humanen Rezeptors unterscheiden sich durch die Abwesenheit (CT<sub>(a)</sub>) oder das Vorhandensein (CT<sub>(b)</sub>) einer 16 Aminosäuren langen Sequenz in der ersten intrazellulären Proteindomäne (Gorn et al., 1992; Gorn et al., 1995; Kuestner et al., 1994; Nishikawa et al., 1999). Entsprechend gibt es die beiden murinen Varianten C1a, ohne, und C1b mit einem Insert von 37 Aminosäuren in der zweiten extrazellulären Domäne (Yamin et al., 1994). Die im Gewebe am breitesten exprimierte humane Isoform CT<sub>(a)</sub> ist der murinen Form C1a zu 78% homolog.



Anusaksathien et al., JBC, 2001

**Abb. 3.5.1: cDNA und putativer Calcitoninrezeptor der Maus.** Bei der Isoform C1b sind zusätzlich 37 Aminosäuren in der zweiten extrazellulären Domäne inseriert. Entsprechend hat die humane CT<sub>(b)</sub>-Variante 16 zusätzliche Aminosäuren in der ersten intrazellulären Domäne.

Per Autoradiographie und Radioligand-Bindetechnik wurden Calcitoninrezeptoren vor allem im Gehirn (Fischer et al., 1981; Goltzman & Mitchell, 1985), in der Niere (Goldring et al., 1978; Lin et al., 1991) und in Osteoklasten (Nicholson et al., 1986; Nicholson et al., 1987; Takahashi et al., 1988) nachgewiesen. Weitere Expressionsorte sind Brustdrüse, Lunge, Muskel, Ovar, Testis, Placenta und Lymphozyten (Sexton et al., 1999; Pondel, 2000). Die

Expression im Gehirn, insbesondere im Hypothalamus, deutet darauf hin, dass endogenes Calcitonin als Neuromodulator fungieren könnte (Olgiati et al., 1983; Henke et al., 1983; Christopoulos et al., 1995).

Untersuchungen mit chimären Rezeptor- und Liganden-Molekülen haben gezeigt, dass die N-terminale Ringstruktur von Calcitonin, die durch die Disulfid-Brücke gebildet wird, vermutlich mit den transmembranen Domänen des Rezeptors interagiert. Der  $\alpha$ -helikale Bereich ist offensichtlich entscheidend für die Stärke der Rezeptorbindung, und der C-Terminus des Liganden bedingt wahrscheinlich die unterschiedliche Affinität zum Rezeptor (Stroop et al., 1996; Houssami et al., 1995). Humanes Calcitonin bildet eine viel schwächere  $\alpha$ -helikale Konformation als Lachs-Calcitonin. Darin könnte eine Ursache für die etwa 50fach reduzierte Potenz von humanem Calcitonin gegenüber Lachs-Calcitonin im Zusammenwirken mit humanen Calcitoninrezeptoren liegen (Epanand et al., 1985).

Die durch Calcitonin-Bindung ausgelöste Signaltransduktion kann auf verschiedenen Wegen erfolgen: über die Adenylat-Cyclase mit cAMP als Second Messenger (Force et al., 1992), über Phosphatidylinositol, wodurch  $\text{Ca}^{2+}$  freigesetzt und die Proteinkinase C aktiviert wird (Teti et al., 1995; Chakraborty et al., 1991), oder über den Phospholipase D Weg, der ebenfalls in der Aktivierung der Proteinkinase C resultiert (Naro et al., 1998).

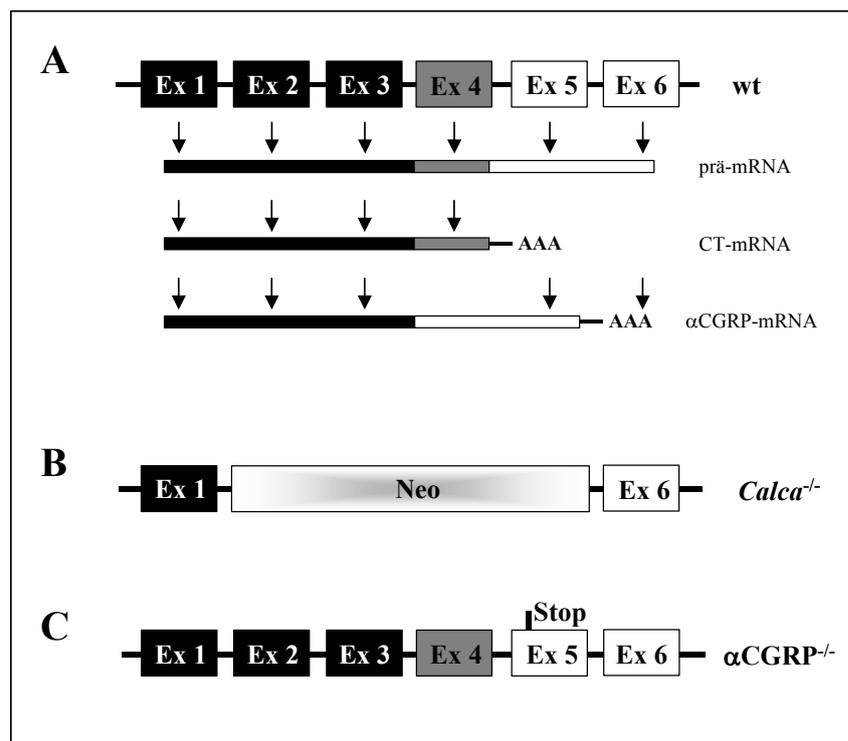
Calcitoninrezeptoren können Heterodimere mit RAMPs (*receptor activity modifying proteins*) bilden. Dadurch ändern sie ihre Affinität und können Rezeptoren für Amylin darstellen (Christopoulos et al., 1999; Muff et al., 1999). Bislang wurden drei verschiedene RAMPs (I-III) identifiziert (Sexton et al., 2001). RAMPs sind einfach membrandurchspannende Proteine, die auch mit anderen Rezeptoren komplexieren können. In Verbindung mit dem CRLR (*calcitonin receptor-like receptor*) bilden sie Rezeptoren für CGRP und ADM (McLatchie et al., 1998). Für Calcitonin haben die RAMPs in Verbindung mit dem Calcitoninrezeptor keinen Bindungs-fördernden Effekt.

### 3.6 Mausmodelle

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Mausmodelle verwendet, die hier, zusammen mit den Modellen für eine Calcitoninrezeptor-Defizienz, kurz vorgestellt werden sollen. Bei den Defizienz-Modellen geben die Bezeichnungen +/+, +/- und -/- nach der Abkürzung für ein Gen an, ob dieses Gen bei einem Tier auf keinem (Wildtyp), auf einem (heterozygot), oder auf beiden Allelen (homozygot) deletiert wurde.

### Defizienz-Modelle zum *Calca*-Gen

Das *Calca*-Gen kodiert sowohl für Calcitonin als auch für das Neuropeptid  $\alpha$ -CGRP (*calcitonin gene-related peptide*). Es umfasst sechs Exons, aus denen zunächst ein gemeinsames Primärtranskript beider Peptide gebildet wird. Durch alternatives Spleißen entstehen mRNAs für Calcitonin, basierend auf den Exons 1-4, und  $\alpha$ -CGRP, ausgehend von den Exons 1-3, 5 und 6 (Abb.3.6.1 A). Zwei verschiedene Defizienz-Modelle zum *Calca*-Gen wurden untersucht: *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse aus der Gruppe von Professor Gagel (Hoff et al., 2002) und  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäuse aus der Gruppe von Professor Emeson (Lu et al., 1999). Bei den *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden die Exons 2 bis 5 des *Calca*-Gens durch eine Neomycin-Kassette ersetzt, was in dem Verlust beider Proteine, Calcitonin und  $\alpha$ -CGRP, resultiert (Abb. 3.6.1 B). Bei den  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäusen führt hingegen ein zusätzlich eingefügtes Stop-Codon in Exon 5 zu einem vorzeitigen Transkriptionsende, sodass nur die Expression von  $\alpha$ -CGRP unterbunden wird, während Calcitonin unverändert exprimiert werden kann (Abb.3.6.1 C).



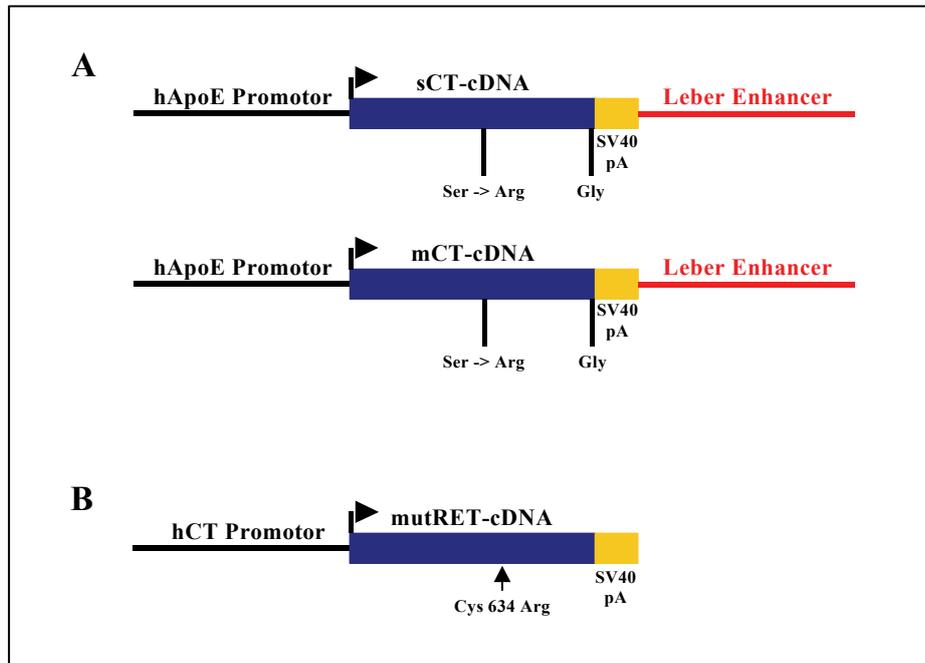
**Abb. 3.6.1: Mutationen des *Calca*-Gens in verschiedenen Mausmodellen.** A: Die mRNAs für Calcitonin (CT) und  $\alpha$ -CGRP entstehen aus einem gemeinsamen Vorläufermolekül durch alternatives Spleißen. B: *Calca*<sup>-/-</sup>-Mausmodell nach Gagel et al.. In diesem Modell wurden die Exons 2-5 des *Calca*-Gens durch eine Neomycin-Kassette ausgetauscht. Es können weder Calcitonin noch  $\alpha$ -CGRP gebildet werden. C:  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mausmodell nach Emeson et al.. Durch das Einfügen eines Stop-Codons in Exon 5 wird die Expression von  $\alpha$ -CGRP unterbunden, während Calcitonin normal exprimiert werden kann.

Im Alter von 3 Monaten haben *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse, entgegen der Erwartung von der pharmakologischen Wirkung her, ein signifikant erhöhtes Knochenvolumen, das auf eine erhöhte Knochenbildung zurückzuführen ist. Die Zahl der Osteoblasten und der Osteoklasten ist zu diesem Zeitpunkt normal, ebenso wie die Serumwerte für Kalzium und Phosphat (Hoff et al., 2002).  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäuse entwickeln hingegen eine Osteopenie, die durch eine verminderte Aktivität der Osteoblasten zu erklären ist. Auch bei diesen Mäusen liegen die Serumwerte für Kalzium und Phosphat im Normalbereich (Schinke et al., 2004).

### **Modelle zur Überexpression von Maus- und Lachs-Calcitonin**

In unserer Arbeitsgruppe wurden transgene Mäuse generiert, die Maus- bzw. Lachs-Calcitonin unter dem leberspezifischen ApoE-Promotor exprimieren. Diese Mäuse standen für die Untersuchungen zur Verfügung. Die Konstrukte wurden nach einer Methode von Takahashi et al. (Takahashi et al., 1997) generiert. Damit Calcitonin korrekt prozessiert wird, wird nach dieser Methode eine Base am 3'-Ende der für das Propeptid kodierenden Sequenz ausgetauscht, sodass die Translation zu Arginin statt zu Serin führt. Dadurch entsteht das proteolytische Spaltungsmotiv Arg-Pro-Arg-Ser-Lys-Arg, das von dem Enzym Furin erkannt wird. Außerdem wird die Sequenz für das C-terminale Extensionspeptid weggelassen und statt dessen ein Basentriplett für ein endständiges Glyzin eingefügt, damit die C-terminale Aminosäure direkt durch das Enzym PAM (peptidyl-glycine  $\alpha$ -amidating mono-oxygenase) amidiert werden kann (Abb.3.6.2 A).

Ein weiteres transgenes Mausmodell wurde aus der Arbeitsgruppe von Frau Professorin Pützer aus Rostock bezogen (Linie MEN2A-B6-2). Diese transgenen Mäuse exprimieren ein mutiertes RET-Onkogen unter dem humanen Calcitonin-Promotor (Abb. 3.6.2 B) und entwickeln ein medulläres Schilddrüsen-Karzinom (C-Zell-Karzinom), verbunden mit stark erhöhten Calcitonin-Serumkonzentrationen. Die Mäuse werden normal alt und haben, abgesehen von der Schilddrüse, einen normalen Phänotyp (Reynolds et al., 2001).

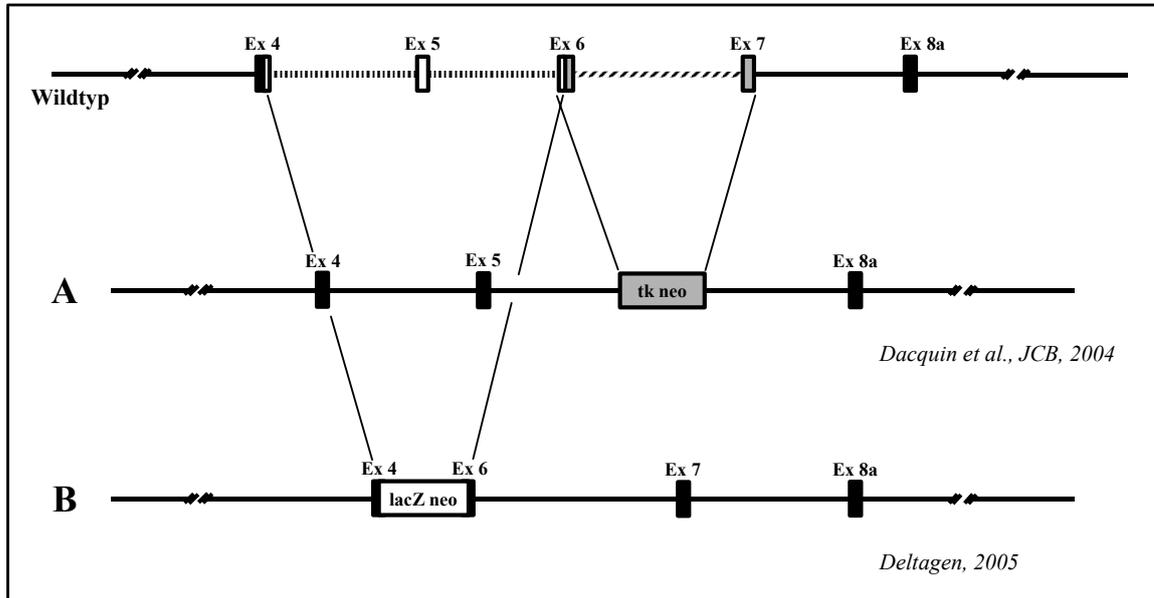


**Abb. 3.6.2: Konstrukte für die Generierung transgener Mäuse, die Maus- bzw. Lachs-Calcitonin überexprimieren.** A: Konstrukte zur Überexpression von Lachs- bzw. Maus-Calcitonin unter dem leberspezifischen ApoE-Promotor. Für die korrekte Prozessierung sind zwei Mutationen eingeführt worden. Durch den Austausch von Serin gegen Arginin entsteht eine Erkennungssequenz für die proteolytische Spaltung durch Furin. Ein endständiges Glyzin dient der C-terminalen Amidierung durch das Enzym PAM (peptidyl-glycine  $\alpha$ -amidating mono-oxygenase). B: Konstrukt zur Überexpression eines mutierten RET-Onkogens (kodiert für eine Rezeptor-Tyrosinkinase; RET: „rearranged during transfection“) unter dem humanen Calcitonin-Promotor.

### Calcitoninrezeptor-defiziente Mäuse

Zu Beginn der Arbeit gab es nur ein Calcitoninrezeptor-Defizienzmodell in der Maus, bei dem die Exons 6 und 7 des CTR-Gens (*Calcr*) durch eine Neomycin-Kassette ausgetauscht worden sind (Abb. 3.6.3 A). Für die heterozygoten Tiere (*Calcr*<sup>+/-</sup>) wurde, entsprechend den *Calca*-defizienten-Mäusen, eine gesteigerte Knochenformationsrate beschrieben. Die homozygot Calcitoninrezeptor-defizienten Mäuse dieser Linie versterben während der Embryonalentwicklung, weshalb postuliert wurde, dass der Calcitoninrezeptor eine essentielle Rolle in der embryonalen Morphogenese unabhängig von Calcitonin als Ligand hat (Dacquin et al., 2004). Mittlerweile existiert ein weiteres Modell der Firma Deltagen, dessen *Calcr*<sup>-/-</sup>-Tiere nicht embryonal letal sind (Deltagen, 2005). Für die Generierung dieser Mäuse wurde eine ähnliche Strategie gewählt, und zwar wurde anstelle der Sequenz um Exon das bakterielle Reportergen „*lacZ*“ inseriert (Abb.3.6.3 B). Das *lacZ*-Gen kodiert für  $\beta$ -Galaktosidase, ein Enzym, das normalerweise Laktose in Galaktose und Glukose spaltet. Mit X-Gal als Substrat entsteht bei der enzymatischen Reaktion ein blauer Farbstoff. Dadurch ist

es möglich, die Orte, an denen sonst der Calcitoninrezeptor exprimiert werden würde, im Gewebe zu markieren. Der Phänotyp dieser Mäuse wurde bislang als normal beschrieben (Deltagen, 2005).



**Abb. 3.6.3: Strategien zur Generierung von konstitutiv Calcitoninrezeptor-defizienten Mäusen.** **A:** In dem Modell von Dacquin et al. wurden die Exons 6 und 7 des *Calcr*-Gens durch eine Neomycin-Kassette ersetzt. Für homozygote *Calcr*-Defizienz dieser Linie wurde eine embryonale Letalität beschrieben. **B:** In dem Modell der Firma Deltagen wurden Exon 5 und Teile von Exon 4 und 6 durch das Reportergergen „*lacZ*“ ausgetauscht. Die homozygot *Calcr*-defizienten Tiere dieser Linie versterben nicht während der Embryonalentwicklung.

#### 4 AUFGABENSTELLUNG

Es besteht eine Diskrepanz zwischen der Knochenresorptions-hemmenden pharmakologischen Wirkung von Calcitonin und dem Ausbleiben eines Knochenphänotyps bei einem Überangebot oder Mangel von endogenem Calcitonin beim Menschen (Deftos, 1997; Hirsch et al., 2001; Hirsch & Baruch, 2003). Ebenso steht die pharmakologische Wirkung von Calcitonin im Widerspruch zur erhöhten Knochenmasse sowohl bei Calcitonin- als auch bei Calcitoninrezeptor-Defizienz in der Maus. (Hoff et al., 2002; Dacquin et al., 2004). Daher ist die physiologische Funktion von Calcitonin noch immer unklar.

Mithilfe verschiedener Mausmodelle (siehe Einleitung 3.6) sollte in dieser Doktorarbeit versucht werden, die Funktion von Calcitonin im Knochen näher zu charakterisieren. Dazu sollten die Knochenphänotypen von *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen, denen Calcitonin und  $\alpha$ -CGRP fehlt, und  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäusen, die nur für  $\alpha$ -CGRP defizient sind, bei fortschreitendem Alter miteinander verglichen werden. Außerdem sollte bei transgenen ApoE-mCT- und ApoE-sCT-Mäusen untersucht werden, wie sich ein Überangebot von Maus- bzw. Lachs-Calcitonin auf den Knochen auswirkt.

Eine weitere Aufgabe bestand darin, konditional Calcitoninrezeptor-defiziente Mäuse zu generieren, da zu Beginn der Arbeit nur ein konstitutives Calcitoninrezeptor-Defizienz-Mausmodell existierte, für das eine embryonale Letalität bei kompletter Deletion des Calcitoninrezeptors beschrieben worden ist (Dacquin et al., 2004). Durch die Strategie des „Cre/loxP“-Systems (Gu et al., 1994) sollte die Erzeugung konditional Calcitoninrezeptor-defizienter Mäuse ermöglicht werden, die den Calcitoninrezeptor selektiv nicht in Osteoklasten, Osteoblasten, bzw. in Neuronen des Hypothalamus exprimieren. Mit der Möglichkeit einer zellspezifischen Deletion des Calcitoninrezeptors sollte ein Zugang zum Mechanismus von Calcitonin im Knochen geschaffen werden.

## 5 MATERIAL & METHODEN

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von den Firmen BIO-RAD (München), MERCK (Darmstadt), ROCHE (Mannheim), CARL ROTH GMBH (Karlsruhe), GIBCO (Karlsruhe) und SIGMA-ALDRICH (Steinheim) verwendet.

Die Enzyme wurden von den Firmen NEW ENGLAND BIOLABS (Frankfurt am Main) und ROCHE (Mannheim) bezogen.

#### 5.1.2 Puffer und Lösungen

<u>Chromalaunlösung:</u>	4 g Kaliumchrom-3-sulfat 100 ml dest. Wasser, filtrieren, bei 4°C aufbewahren
<u>Citratpuffer (Immunhisto):</u>	9 ml 0,1 M Zitronensäure (Stammlösung A) 41 ml 0,1 M Na-Citrat (Stammlösung B) ad 500 ml dest. Wasser, pH 6,0
<u>DEPC-H<sub>2</sub>O:</u>	1000 µl Diethylpyrokarbonat ad 500 ml H <sub>2</sub> O, ü.N. bei 37°C inkubieren, autoklavieren
<u>10 x DNA-Gel-Ladepuffer:</u>	50 % Glyzerin 0,1 % Xylencyanol 0,1 % Bromphenolblau in TE
<u>10 % EDTA (Entkalkung v. Knochen)</u>	100g Titriplex III (MERCK #108418) ad 1000 ml H <sub>2</sub> O, mit konz. NaOH lösen und auf pH 7,2 einstellen
<u>1 x Einfriermedium (f. MEF):</u>	50 % FCS (GIBCO #10270106) 40% MEF-Medium 10% DMSO

---

<u>2 x Einfriermedium</u> (f. ES-Zellen):	80 % FCS (GIBCO #10270106) 20% DMSO
<u>Eosin-Lösung</u> (HE-Färbung):	0,25 g Eosin G (MERCK #115935) 250 ml dest. Wasser 5 Tropfen Eisessig
<u>ES-Medium</u> :	500 ml DMEM (GIBCO #42430025) 92 ml FCS (GIBCO #10270106) 6,2 ml Glutamin (GIBCO #25030024) 6,2 ml MEM (GIBCO #11140035) 6,2 ml Pen/Strep (5000 IU Pen, 5000 µg Strep/ml, GIBCO #15070022) 6,2 ml Nukleosidmix (100x) 6,2 ml Natrium-Pyruvat (GIBCO #11360039) 1,24 ml 2-Mercaptoethanol, 50 mM, (GIBCO #42430025) 62 µl LIF, 107 U/ml (CHEMICON INTERNATIONAL #ESG1107)
<u>G-418 (Geneticin)</u> :	GIBCO #10131019
<u>0,1 % Gelatine</u> :	SIGMA-ALDRICH #G-1890
<u>Gelatinelösung</u> (Beschichtung der Objektträger für Acrylathistologie)	0,5 g Gelatine in 50 ml dest. Wasser (< 60°C) lösen, 2 ml Chromalaunlösung zugeben
<u>Gießlösung (Acrylat-Histo)</u> :	1000 ml Methylmethacrylat (MERCK #8.00590), entstabilisiert 3,3 g Benzoylperoxid (MERCK #801641), getrocknet 100 ml LPG (Nonyl-Phenol, SIGMA-ALDRICH #74430)

---

	direkt vor dem Gießen 500 µl N,N Dimethyl-p-Toluidin/100 ml Gießlösung hinzufügen
<u>van Gieson-Lösung:</u>	2,5 g Säurefuchsin (MERCK #105231) 900 ml gesättigte Pikrinsäure (SIGMA-A. #80456) 100 ml Glycerin 5 ml konz. Salpetersäure
<u>Hybridisierungspuffer (Southern):</u>	330 mM Natriumphosphat 6,6 % SDS 100 µg/ml Heringssperma-DNA (ROCHE #1467140)
<u>Infiltrationslösung I (Acrylat-Histo):</u>	1000 ml Methylnmethacrylat (MERCK #8.00590), entstabilisiert 3,3 g Benzoylperoxid (MERCK #801641), getrocknet
<u>Infiltrationslösung II (Acrylat-Histo):</u>	1000 ml Methylnmethacrylat (Merck #8.00590), entstabilisiert 3,3 g Benzoylperoxid (MERCK #801641), getrocknet 100 ml LPG (Nonyl-Phenol, SIGMA-ALDRICH #74430)
<u>von Kossa-Lösung:</u>	3 g Silbernitrat (MERCK #1.01512.0100) auf 100 ml dest. Wasser
<u>LB/Amp-Medium:</u>	LB-Medium 100 µg/ml Ampicillin
<u>LB-Medium:</u>	INVITROGEN, Karlsruhe #12780-052
<u>LB-Agar:</u>	INVITROGEN, Karlsruhe #22700-025
<u>Lysis-Puffer (ES-Zellen)</u>	10 mM Tris, pH 7,5

---

	10 mM EDTA, pH 7,5
	10 mM NaCl
	0,5% SDS
<u>Mausschwanz-Lysis-Puffer:</u>	50 mM Tris, pH 8,0
	100 mM EDTA, pH 8,0
	100 mM NaCl
	1% SDS
<u>MEF-Medium:</u>	500 ml DMEM (GIBCO #61965026)
	50 ml FCS (GIBCO #10270106)
	5,5 ml MEM (GIBCO #11140035)
	5,5 ml Pen/Strep (5000 IU Pen, 5000 µg Strep/ml, GIBCO #15070022)
<u>Mineralöl:</u>	SIGMA-ALDRICH #M-8410
<u>Mitomycin C</u> (f. ES-Zellkultur):	2 mg, lyophilisiert (SIGMA-ALDRICH #M-0503) in 2 ml PBS resuspendieren, zu 150 µl aliquotieren, bei -70°C lichtgeschützt aufbewahren
<u>Narkosemittel:</u>	1,2 ml Ketamin-Lösung, 100mg Ketamin/ml (GRÄUB-AG, Bern)
	0,8 ml Rompun-Injektionslösung, 2% (BAYER, Leverkusen)
	8 ml 0,9%ige NaCl-Lösung (BRAUN, Melsungen)
<u>5% Natriumthiosulfatlösung:</u>	5 g Natriumthiosulfat auf 100 ml dest. Wasser
<u>100 x Nukleosidmix</u> (f. ES-Zellkultur):	80 mg Adenosin (SIGMA-ALDRICH #A-4036)
	85 mg Guanosin (SIGMA-ALDRICH #G-6264)
	73 mg Cytidin (SIGMA-ALDRICH #C-4654)
	73 mg Uridin (SIGMA-ALDRICH #U-3003)
	24 mg Thymidin (SIGMA-ALDRICH #T-1895)

bei 37°C in 100 ml PBS lösen, sterilfiltrieren,  
aliquotiert bei -20°C lagern

1 x PBS:

137 mM NaCl  
10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
2,7 mM KCl  
2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4

PBS für Zellkultur:

1 Tablette in 500 ml Aqua bidest. lösen, auto-  
klavieren (GIBCO #18912014)

PBS/EDTA (ES-Zellkultur):

1 Tablette (GIBCO #18912014) in 500 ml Aqua  
bidest. lösen  
+ 0,1 g Na-EDTA

4 %ige PFA-Lösung:

20 g PFA in 455 ml H<sub>2</sub>O geben,  
100 µl 1 M NaOH zugeben und bei 70°C lösen,  
40 ml 10 x PBS zugeben  
pH 7,4, filtrieren

Proteinase K-Lösung:

10 mg/ml, -20°C

Salzsäure-Ethanol (HE-Färbung):

5 ml 25% HCl  
95 ml 96% Ethanol

20 % SDS:

200 g SDS in 900 ml H<sub>2</sub>O auf 68 °C erhitzen,  
auf pH 7,2 mit HCl einstellen, ad 1 l H<sub>2</sub>O

3% Silbernitratlösung:

3 g Silbernitrat auf 100 ml dest. Wasser

Sodaformollösung:

12,5 g Natriumkarbonat  
187 ml dest. Wasser  
62,5 ml 37%ige Formalinlösung

---

<u>20 x SSC:</u>	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0, autoklavieren
<u>50 x TAE-Puffer:</u>	2 M Tris-Azetat 50 mM EDTA, pH 7,8 mit Essigsäure einstellen
<u>10 x TE-Puffer:</u>	0,1 M Tris/HCl 10 mM EDTA, pH 7,5
<u>low TE:</u>	10 mM Tris, pH 8,0 0,1 mM EDTA, autoklavieren
<u>Toluidinlösung:</u>	1 g Toluidinblau O 100 ml dest. Wasser pH 4,5
<u>TRAP-Lösung:</u>	5 mg Naphtol ASMX Phosphat in 500 µl N,N Dimethylformamid lösen und mit 50 ml TRAP-Puffer mischen; 30 mg Fast Red Violet LB Salt darin lösen und sofort für die Färbung verwenden
<u>TRAP-Puffer:</u>	40 mM Azetat 10 mM Natriumtartrat, pH 5,0, bei 4°C aufbewahren
<u>1 M Tris-HCl:</u>	21,1 g Tris gewünschten pH mit HCl einstellen
<u>Trypsin-EDTA-Lösung</u> (f. MEF):	GIBCO #25300054
<u>Trypsin-EDTA-Lösung</u> (f. ES-Zellen):	GIBCO #25200056
<u>Waschlösung 1</u> (Southern):	2 x SSC

---

	0,1% SDS
<u>Waschlösung 2</u> (Southern):	0,2 x SSC 0,1% SDS
<u>X-Gal</u>	40mg/ml in DMF, bei -20°C dunkel lagern

### 5.1.3 Bakterien

Zur Amplifikation von DNA im prokaryotischen System wurden Gene Hogs<sup>®</sup> Cells (INVITROGEN, Karlsruhe, #C8080) verwendet, die vom *E.coli* K12-Stamm DH10B<sup>™</sup> abstammen.

### 5.1.4 Plasmide

pCR-TOPO II:	Dieser Vektor (INVITROGEN, Karlsruhe, #45-0640) wurde zum Klonieren von PCR-Produkten verwendet.
pBluescript II KS+:	Das Plasmid (STRATAGENE La Jolla, CA, USA) wurde zur Subklonierung von DNA-Fragmenten verwendet.

Die folgenden Plasmide wurden für die Generierung des Calcitoninrezeptor-Defizienz-Konstrukts verwendet.

pKO SelectDT V840:	Lexicon, The Woodlands (USA)
pKO Scrambler V901:	Lexicon, The Woodlands (USA)
ploxPfrtPGKtkneofrt und PKaX1	Diese Vektoren wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Schütz (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) zur Verfügung gestellt
pCAGGS-Flpe:	Dieses Plasmid trägt das Gen der Flpe-Rekombinase.

## 5.2 Methoden

Die zur Anfertigung der vorliegenden Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden von der Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales genehmigt.

### 5.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 5.2.1.1 Restriktionsverdau von DNA

Es wurde die gewünschte Menge an DNA (2-4 µg) mit der erforderlichen Menge an Restriktionsenzym (10-20 U) 1-2 h unter den gemäß Herstellerangaben für das Enzym optimalen Bedingungen (Puffer, Temperatur, BSA-Zusatz) inkubiert. Der Restriktionsansatz wurde entweder durch Hitzeinaktivierung (75°C, 10 min) oder durch Zugabe von DNA-Probenpuffer mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung gestoppt. Bei gleichzeitigem Verdau mit mehreren Enzymen wurden die dafür angepassten Enzymmengen und Reaktionsbedingungen verwendet. War ein Parallelverdau aufgrund der empfohlenen Pufferbedingungen nicht möglich, wurde sequenziell verdaut.

#### 5.2.1.2 Modifikation von DNA-Enden

Um nicht-kompatible DNA-Fragmente ligationsfähig zu machen, wurden ihre Enden vorweg entsprechend modifiziert.

Auffüllreaktion überhängender 5'-Enden für eine Ligation mit glatten Fragmentenden (*blunt-end ligation*):

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung eines Restriktionsansatzes (Kapitel 5.2.1.4) und anschließender Isolierung der Fragmente aus dem Gel (Kapitel 5.2.1.5) wurden die DNA-Fragmente mit dNTPs (100 µM) in T4-Polymerase-Puffer 20 min bei 12°C inkubiert. Pro 1 µg aufzufüllender DNA wurde 1 U T4-DNA-Polymerase zugesetzt. Es folgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms (10 min, 75°C) vor der Verwendung der DNA in der Ligrationsreaktion.

Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten:

Die zu dephosphorylierende DNA wurde mit alkalischer Phosphatase (CIP, 1 U pro pmol 5'-Enden) in mitgeliefertem Puffer 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend durch Gelelektrophorese oder an Säulen des *High Pure PCR Product Purification Kit* (ROCHE, Mannheim) aufgereinigt.

### 5.2.1.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von PCR-Produkten, die mit der Taq-Polymerase amplifiziert wurden, wurde der pCR-TOPO II Vektor (INVITROGEN, Karlsruhe, #45-0640) verwendet.

Die Taq-Polymerase produziert durch ihre terminale Transferaseaktivität 3'-A-Überhänge, die im Gegensatz zu anderen Polymerasen nicht wieder entfernt werden, weil sie keine 3'-5'-Exonucleaseaktivität besitzt. Der Vektor wird linearisiert geliefert. Er besitzt 3'-T-Überhänge und daran kovalent gebundene Topoisomerase I, so dass ein PCR-Produkt mit 3'-A-Überhängen direkt binden und im gleichen Schritt durch die Ligaseaktivität der Topoisomerase mit dem Vektor ligieren kann.

Bei Ligationen von Vektor und Insert, die zuvor mit Restriktionsenzymen geschnitten worden sind, wurden Insert- und Vektorfragment in einem molaren Verhältnis von 3:1 in der Ligation eingesetzt. In einem Gesamtvolumen von 10-20 µl wurden die Fragmente mit 2-4 µl 5 x Ligasepuffer und 1-2 µl T4-Ligase gemischt und ü.N. bei 17°C ligiert.

### 5.2.1.4 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

DNA- und RNA-Fragmente wurden mit 1/10 Volumen DNA-Auftragspuffer versetzt und abhängig von der Fragmentgröße in 0,8 bis 2 %igen Agarosengelen in 1 x TAE Puffer bei 60 bis 110 Volt in horizontalen Gelkammern (BIO-RAD, München) elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Anfärbung der DNA-Fragmente wurde das Gel vor dem Gießen mit 0,05 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Anschließend wurden die Agarosegele auf einem UV-Transilluminator fotografiert. Als DNA-Größenstandard diente die 1kb-Leiter von INVITROGEN (#15615-024).

### 5.2.1.5 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agaroseblöckchen nach Elektrophorese erfolgte mit dem QIAEX® II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, #20051) entsprechend den Angaben des Herstellers.

Das Funktionsprinzip ist die spezifische Bindung von Nucleinsäuren mit einer Mindestlänge von 40 bp an eine Silica-Gel-Matrix bei hohen Salzkonzentrationen. Dann erfolgen Reinigungsschritte bei denen u.a. Oligonukleotide entfernt werden. Anschließend wird die gereinigte DNA bei einer geringen Salzkonzentration von den Partikeln eluiert.

### 5.2.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration wässriger Lösungen von Nukleinsäuren wurden photometrisch bei 260 nm im Ultrospec 2100 pro Photometer von BIOCHROM (Cambridge) bestimmt.

### 5.2.1.7 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Transformationskompetente Bakterien des *E.coli*-Stammes DH10B™ wurden nach einer Methode von Ausubel (Ausubel et al., 1991) hergestellt:

Eine stationäre Übernachtskultur des Bakterienstammes in LB-Medium wurde 1:60 in frisches LB-Medium überimpft und bis zu einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 0,5 - 0,6 (log-Phase) kultiviert. Nach dem Sedimentieren (20 min, 4200 Upm, 4°C, Sorvall® Evolution, Rotor SLC-6000) wurde zweimal mit eiskaltem, sterilem entionisiertem Wasser gewaschen. Dann wurden die Zellen mit eiskaltem 10%igem Glycerin resuspendiert und bei 4°C, 2.000 rpm und 30 min erneut sedimentiert. Das Pellet wurde zuletzt im vierfachen Volumen 10 %igen Glycerins aufgenommen und in Aliquots à 50 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### 5.2.1.8 Transformation von Bakterien durch Elektroporation

Das Einbringen von Plasmid-DNA in transformationskompetente Bakterien des *E.coli*-Stammes DH10B™ erfolgte nach dem Elektroporationsverfahren.

Zur Transformation wurde 50 µl frisch auf Eis aufgetaute Bakteriensuspension mit 1 µl des Ligationsansatzes versetzt und im Gene Pulser Xcell™ (BIO-RAD, Hercules, USA) bei 1350 kV, 600 Ω und 10 µF elektroporiert. Anschließend wurden die Bakterien in 500 µl LB-Medium aufgenommen, für 20 bis 45 min bei 37°C geschüttelt, dann auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht erneut bei 37°C kultiviert. Abhängig von der Plasmidresistenz wurden die LB-Agarplatten zuvor mit entsprechenden Antibiotika behandelt. Außerdem wurden die Platten mit X-Gal bestrichen, wenn aufgrund des verwendeten Plasmids eine Blau-Weiß-Selektion möglich war. Wichtig für das Gelingen der Elektroporation ist ein sehr geringer Salzgehalt sowohl der kompetenten Zellen als auch der zu transformierenden DNA.

### 5.2.1.9 Antibiotika-Selektion und Blau-Weiß-Selektion ausplattierter Bakterien

Entsprechend den Resistenzgenen auf den Plasmiden wurden die LB-Agarplatten zur Selektion mit Antibiotika vorbehandelt:

<b>Antibiotikum</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Endkonzentration in LB</b>
Tetracyclin	20 mg/ml	3µg/ml
Chloramphenicol	20 mg/ml	15µg/ml
Ampicillin	100 mg/ml	100µg/ml
Kanamycin	100 mg/ml	15µg/ml
Streptomycin	100 mg/ml	100µg/ml

Beim dem Plasmid pCR-TOPO II und auch bei pBluescript II KS+ liegt die „*Multiple Cloning Site*“ (MCS) innerhalb des *lacZ*- Gens, das für die  $\beta$ -Galaktosidase kodiert.  $\beta$ -Galaktosidase setzt X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid) enzymatisch in den blauen Farbstoff 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol um. Wird ein DNA-Fragment in die MCS eingebaut, wird das Leseraster des *lacZ*-Gens zerstört, so daß keine  $\beta$ -Galaktosidase mehr gebildet werden kann, und folglich auch kein blauer Farbstoff. Vor dem Ausplattieren der Bakterien, die mit pCR-TOPO II oder pBluescript II KS+ transformiert wurden, wurden die Agarplatten (20ml) mit 40 µl X-Gal (40mg/ml in DMF) bestrichen. Die Farbe der gewachsenen Kolonien zeigte, ob die Plasmide das DNA-Fragment aufgenommen hatten (weiß) oder nicht (blau).

#### **5.2.1.10 Präparation von Plasmid-DNA aus 4 ml Kulturen (Miniprep)**

Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979) mit dem QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden, #27106) durchgeführt. Die Anzucht der plasmidtragenden Bakterienstämme erfolgte in LB-Medium, versetzt mit Antibiotika (Konzentrationen siehe 5.2.2.0). Dazu wurde eine Einzelkolonie von einer Anzuchtplatte in 4 ml des Flüssigmediums überführt und über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Nach erfolgreichem Wachstum wurden 1,5 ml der Kultur in ein Reaktionsgefäß überführt und für 2 min bei 7.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Aus dem Bakterienpellet wurde entsprechend den Angaben des Herstellers die DNA gewonnen. Diese wurde in 50 µl Aqua dest. aufgenommen.

#### **5.2.1.11 Präparation von Plasmid-DNA aus 500 ml Kulturen (Maxiprep)**

Für einen 500 ml-Kulturansatz wurde das LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) mit einem Milliliter Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden sedimentiert (Sorvall®Evolution<sub>RC</sub> Superspeed Centrifuge, Rotor SLC-6000, 10 min, 5000 Upm, 4°C) und in 16 ml GTE (50mM Glucose; 25 mM Tris,

pH 8; 10 mM EDTA, sterilfiltriert) auf Eis resuspendiert. Dann wurden 32 ml frisch angesetzte 0.2 N NaOH/1 % SDS-Lösung zugesetzt und vorsichtig gemischt. Nach 5 Minuten Inkubation wurden 24 ml Kaliumacetat (294 g Kaliumacetat; 115 ml Essigsäure in 1 l H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert) zugefügt, gemischt und für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lösung zentrifugiert (15 min, 4°C, 5000 Upm) und der Überstand filtriert. Das Filtrat wurde mit 36 ml Isopropanol versetzt und vorsichtig vermischt, bevor es erneut für 15 min bei 4°C und 5000 Upm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für ca. 20 Minuten getrocknet. Anschließend wurde es in 6 ml TE aufgenommen. Die RNA wurde präzipitiert, indem das halbe Volumen (3 ml) 7.5M Ammoniumazetat-Lösung (sterilfiltriert) zugefügt wurde und der Ansatz für 15 min auf Eis inkubiert wurde. Nach einer weiteren Zentrifugation (15 min, 4°C und 4000 Upm) wurde der Überstand dekantiert, mit dem zweifachen Volumen Ethanol (absolut) vorsichtig vermischt und für 5 min die DNA bei -80°C gefällt. Es folgte eine weitere Zentrifugation (15 min, 4°C und 4000 Upm). Das entstandene Pellet wurde für etwa 15 Minuten getrocknet und in 800 µl TE aufgenommen. Nach Zugabe von 100 µg/ml RNase wurde die Lösung für mindestens eine Stunde bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion im gleichen Volumen und anschließend eine Chloroform-Extraktion im doppelten Volumen, bevor die DNA mit dem halben Volumen Ammoniumazetat-Lösung (7.5M) und dem doppelten Volumen Ethanol (absolut) gefällt wurde. Das Präzipitat wurde zentrifugiert (15 min, 4°C und 13.000 Upm), das Pellet getrocknet und dann über Nacht in 500 µl TE gelöst.

#### **5.2.1.12 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwänzen**

Zu einem ca. 0,5 mm langen Stück Mausschwanz wurden 700 µl Mausschwanz-Lysis-Puffer und 50 µl Proteinase K Lösung (10 mg/ml) gegeben und über Nacht bei 55°C inkubiert. Dann wurde der Ansatz mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (ROTH, Karlsruhe, #A156.2) ausgeschüttelt und für 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Vorgang zweimal wiederholt, wobei beim zweiten Mal nur mit Chloroform ausgeschüttelt wurde. Anschließend wurde zu der oberen Phase Isopropanol im gleichen Volumen zugefügt und beides vorsichtig miteinander vermischt. Das Gemisch wurde für 10 Minuten (13.000 rpm) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit 70% kaltem Ethanol gewaschen. Nach einer kurzen Trocknungsphase wurde das Pellet in 50 µl TE aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur gelöst.

### 5.2.1.13 Isolierung genomischer DNA aus ES-Zellen von 96er Mikroplatten

Das Medium der Platte wurde entfernt und die Platte mit PBS gewaschen. Pro Vertiefung wurde 100 µl Lysis-Puffer gegeben und die Platte bei 55°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 10 µl 8 M LiCl und 100 µl Isopropanol pro Vertiefung zugefügt und die Platte über Nacht in einer feuchten Kammer auf einer Schüttelplatte inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Platte für 30 min bei 3800 Upm zentrifugiert, der Überstand entfernt und mit 70% Ethanol gewaschen (10 min, 3800 Upm). Der Überstand wurde verworfen, die Platte getrocknet und die DNA in 100 µl low TE/Vertiefung über Nacht in einer feuchten Kammer gelöst.

### 5.2.1.14 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine *in vitro*-Methode zur enzymatischen Synthese definierter DNA-Sequenzen. Hierzu wird eine doppelsträngige DNA (Matrize) denaturiert und die entstehenden komplementären DNA-Einzelstränge mit zwei Oligonukleotid-Primern, welche die zu amplifizierende Region (Ziel-DNA) flankieren, hybridisiert. Mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase werden, ausgehend von den entsprechenden Oligonukleotid-Primern, die jeweiligen komplementären DNA-Stränge synthetisiert. Eine repetitive Folge von Template-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Verlängerung der Primer durch die thermostabile DNA-Polymerase führt zu einer exponentiellen Anreicherung des DNA-Abschnitts, dessen Enden durch die Primer festgelegt sind. Spezifische Primer wurden mit dem Computerprogramm MacVektor<sup>TM</sup> 7.1 ausgewählt.

Für alle PCR-Anwendungen wurde die thermostabile Taq-DNA-Polymerase ROCHE (Mannheim) verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden in einer PCR-Maschine von BIOMETRA (T3 Thermocycler, Göttingen) bzw. im iCycler von BIO-RAD (München) durchgeführt.

Es wurde folgender Standardansatz mit 50 µl Gesamtvolumen verwendet:

5 µl 10x Taq-Polymerasepuffer

2 µl dNTP-Mix (2,5 mM)

1 µl Hinprimer (10µM)

1 µl Rückprimer (10µM)

100 ng Matrizen-DNA

1 µl Taq-Polymerase

ad 50 µl H<sub>2</sub>O

Ein typisches Temperaturprogramm verlief wie folgt:

Reaktion	Zeit	Temperatur	Schleife
Primärdenaturierung	5 min	94°C	
Denaturierung	30 s	94°C	} x 35
Hybridisierung	30 s	55°C	
Synthese	1 min/1kb	72°C	
Endsynthese	5 min	72°C	
Aufbewahrung	∞	4°C	

Nach Ablauf der Reaktion wurden die Ansätze mit 1/10 Vol. DNA-Auftragspuffer versetzt und die Produkte über ein Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetrennt (Kapitel 5.2.1.4).

Wenn nötig wurde das PCR-Programm entsprechend der optimalen Annealingtemperatur der jeweiligen Primer abgewandelt, dem Ansatz 2,5 µl DMSO zugefügt oder auch ein kleineres Gesamtvolumen genommen.

#### 5.2.1.15 Southern-Blot-Analyse

Es wurden 8-10 µg der zu analysierenden DNA mit 20 U Enzym und 1 µl RNase (10 mg/ml) in entsprechendem Puffer und in einem Volumen von 50 µl über Nacht verdaut. Der Ansatz wurde am nächsten Tag in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel für ca. 15 Minuten in 0,25 M HCl inkubiert, mehrfach kurz mit Wasser gespült und dann in 0,4 M NaOH für weitere 15 Minuten equilibriert. Die DNA wurde mit 0,4 M NaOH durch Kapillartransfer über Nacht auf die Membran (Hybond-N<sup>+</sup>, AMERSHAM) überführt. Nach dem Transfer wurde die Membran für 15 Minuten in 2 x SSC gewaschen und anschließend getrocknet.

Für die radioaktive Markierung der DNA wurde jeweils die entsprechende DNA-Sonde mit dem rediprime<sup>TM</sup>II-Kit (AMERSHAM, #1634) hergestellt. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran 30 min bei 68°C in Hybridisierungspuffer (330 mM Natriumphosphat, 6,6 % SDS, 1 x Heringssperma-DNA) vorhybridisiert. Die Hybridisierung mit der denaturierten Sonde erfolgte in einem Rotationsofen (Hybrilinker HL-2000, UVP, INC., Upland, CA, USA) bei 68°C über Nacht. Unspezifisch gebundene Sonde wurde durch mehrfaches Waschen mit Waschlösung 1 und 2 entfernt. Die Membranen wurden, je nach Signalstärke, für 2 Stunden bis 1 Woche auf „Imaging“-Platten (FUJI Imaging Plate) oder auf

Röntgenfilmen (Kodak X-OMAT AR Film, EASTMAN KODAK COMPANY, Rochester, New York, USA) exponiert. Die Platten wurden im Phosphoimager (FUJI/RAYTEST) entwickelt, die Filme in der Röntgenentwickler-Maschine (OPTIMAX, PROTEC, Oberstenfeld).

#### 5.2.1.16 Genotypisierung

Die DNA wurde aus Schwanzspitzen der Mäuse isoliert (siehe 5.2.1.12) und für die Genotypisierung per Southern-Blot-Analyse oder per PCR verwendet. Die Mäuse der *Calca*-Kolonie wurden wie zuvor bei Hoff et al. beschrieben per PCR genotypisiert (Hoff et al., 2002). Als Vorwärtsprimer wurde der Primer (5'-CAG GAT CAA GAG TCA CCG CT-3') verwendet. Wildtypmäuse wurden mit dem Rückprimer (5'-GGA GCC TGC GCT CCA GCG AA-3') identifiziert (~300 bp), *Calca*-defiziente-Tiere mit dem Rückprimer (5'-GGT GGA TGT GGA ATG TGT GC-3') (~200 bp). Die Mäuse aus den Kolonien mit „gefloxtem“ Calcitoninrezeptor (KD-CTR-F6 bzw. -G2) wurden per PCR unter Standardbedingungen genotypisiert. Mit den Primern (5'-GGT AGA TGT GTT TGG GGA TTT CTC C-3') und (5'-AAG ACA GAT GGT GAG GGC TGA CTG-3') wurde die Sequenz an Stelle der „loxP-site“ zwischen Exon 5 und 6 amplifiziert, mit den Primern (5'-TCC TGG GCT GCT GAG AAA GTA TC-3') und (5'-ATG TGA TTG GCT GGG CAC TG-3') erfolgte die Amplifikation an Stelle der „loxP-site“ zwischen Exon 7 und 8. Die erwarteten Bandengrößen waren 249 bp (WT) und 347 bp (KD-KO) bzw. 259 bp (WT) und 357 bp (KD-KO). Die Genotypisierung der MEN CT-2A-Mäuse erfolgte durch PCR wie bei Reynolds et al. beschrieben (Reynolds et al., 2001). Als Primer wurden (5'-GCG ATG TTG TGG AGA CCC AAG-3') und (5'-AGC ACC GAG ACG ATG AAG GAG-3') verwendet. Die Bande für das Tansgen hatte eine Größe von 202 bp. Die ApoE-sCT- bzw. mCT-Mäuse wurden per Southern-Blot genotypisiert.

#### 5.2.1.17 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen von DNA wurden nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger (Sanger et al., 1977) in der zentralen Sequenzier-Einrichtung des UKE durchgeführt. Für die PCR wurde folgender Ansatz gewählt:

500 ng DNA (bei einem PCR-Produkt 50-100 ng) in Aqua dest. gelöst

15 pM Primer

2 µl Big Dye

6 µl 2,5x Puffer

ad 20 µl Aqua dest.

PCR-Programm:

Reaktion	Zeit	Temperatur	Schleife
Primärdenaturierung	2 min	96°C	
Denaturierung	10 s	96°C	} x 25
Hybridisierung	5 s	50°C bei M13	
Synthese	4 min	60°C	
Endsynthese	5 min	60°C	
Aufbewahrung	∞	4°C	

Im Anschluß an die PCR wurde die DNA durch Zugabe von 80 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl 3 M Natriumazetat, pH 6,0, und 300 µl absolutem Ethanol gefällt. Nach anschließender Zentrifugation (15 min, 15.000 rpm, RT) wurde das Pellet getrocknet und sequenziert.

#### 5.2.1.18 Isolierung von RNA aus Geweben und Organen

Für die Isolierung von RNA wurden frisch isolierte Gewebestücke (bis ca. 500µg) in 1 ml Trizol (INVITROGEN #15596-018) mit einem Ultra-Turrax (T25 basic, IKA-WERKE, Staufen) homogenisiert. Das Homogenat wurde für 5 min bei RT inkubiert und dann mit 200 µl Chloroform ausgeschüttelt. Die Probe wurde anschließend bei 11.000 x g 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die obere Phase wurde mit 500 µl Isopropanol gemischt, für 10 min bei RT inkubiert und dann 10 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit kaltem, 70% Ethanol (in DEPC-H<sub>2</sub>O) gewaschen (5 min, 7.000 x g, 4°C), getrocknet und in 25 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst.

Zwischen den verschiedenen Proben wurde der Ultra-Turrax mit 1% SDS in DEPC-H<sub>2</sub>O gereinigt und ausgiebig mit DEPC-H<sub>2</sub>O gespült.

#### 5.2.1.19 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem Cloned AMV First-Strand Synthesis Kit von INVITROGEN (#12328-040, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers. Für eine anschließende PCR wurde im Regelfall folgender Ansatz verwendet:

---

2,5 µl 10x Taq-Puffer  
1 µl dNTP-Mix (2,5 mM)  
1 µl Hinprimer (10µM)  
1 µl Rückprimer (10µM)  
1 µl cDNA  
0.3 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM)  
0,5 µl Taq-Polymerase  
ad 25 µl H<sub>2</sub>O

Um die Expressionsstärke der untersuchten Gene unabhängig von methodischen Schwankungen vergleichen zu können, wurde jeweils unter gleichen Bedingungen ein PCR-Ansatz mit Primern für das „Haushaltsgen“ GAPDH (Glyzerinaldehyd-6-Phosphat-Dehydrogenase) durchgeführt.

#### **5.2.1.20 Microarray-Genchip-Analyse**

Die Microarray-Genchip-Analyse ermöglicht eine vergleichende Expressionsanalyse aller Gene zwischen zwei oder mehr Proben. In dieser Arbeit wurde die Microarray-Genchip-Analyse angewendet, um die Genexpression im Hypothalamus zwischen verschiedenen Mausmodellen zu vergleichen. Dazu wurden die Hypothalami der Mäuse präpariert, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mit der cDNA wurden die Genchips hybridisiert. Auf den Genchips sind nahezu alle der etwa 30.000 Gene einer Maus mehrfach räpräsentiert. Bei erfolgter Hybridisierung entstehen Signale, die mit spezieller Software von Affymetrix in die Expressionsstärke des jeweiligen Gens umgerechnet werden können. Die Hybridisierung und die Auswertung der Genchips wurde in der Klinischen Chemie des UKEs in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Streichert durchgeführt.

#### **5.2.2 Kultur muriner embryonaler Stammzellen (ES-Zellen)**

Die ES-Zellkultur wurde am Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr.Hermans-Borgmeyer und Tina Mordhorst durchgeführt.

##### **5.2.2.1 Beschichten von Zellkulturschalen mit Gelatine**

Die Zellkulturschalen wurden an der Sterilbank 3-5 min mit einer 0,1%igen Gelatinelösung inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt, die Schalen getrocknet und bei 4°C gelagert.

### **5.2.2.2 Isolierung und Kultur primärer embryonaler Fibroblasten**

Murine embryonale Stammzellen benötigen für ein optimales Wachstum gelatinisierte Zellkulturschalen mit einem einschichtigen Zellrasen von inaktivierten, primären embryonalen Fibroblasten, sogenannten Feederzellen. Die Isolierung dieser Fibroblasten erfolgte durch Frau PD Dr. Hermans-Borgmeyer und Tina Mordhorst. Die isolierten, tiefgefrorenen Zellen wurden revitalisiert und mit einer ungefähren Dichte von  $5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in gelatinisierte 15 cm (Ø)-Kulturschalen mit 25 ml MEF-Medium ausgesät. Dann wurden sie für 2-3 Tage bis zur Konfluenz im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, wasserdampfgesättigte Atmosphäre) inkubiert. Anschließend wurden die Fibroblasten trypsinisiert, im Verhältnis 1:3 bis 1:4 „gesplittet“ und erneut bis zur Konfluenz kultiviert, um sie dann für die ES-Zellkultur zu inaktivieren.

### **5.2.2.3 Mitotische Inaktivierung embryonaler Fibroblasten**

Die mitotische Inaktivierung der embryonalen Fibroblasten erfolgte mit Mitomycin C. Mitomycin C vernetzt den DNA-Doppelstrang und blockiert den weiteren Zellzyklus. Auf den konfluent bewachsenen 15 cm (Ø)-Schalen wurde das MEF-Medium abgesaugt und 15 ml frisches Medium hinzugegeben. Auf jede Platte wurden 150 µl Mitomycin C (10 µg/ml) geträufelt und mit dem Medium gemischt, dann wurden die Platten für weitere 2-3 Stunden im Zellkulturschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert, die Zellzahl bestimmt und entweder in geeigneten Aliquots eingefroren oder für die Kultivierung der ES-Zellen verwendet. Für die Kultivierung der ES-Zellen wurden die inaktivierten Feederzellen in einer Dichte von  $5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät.

### **5.2.2.4 Trypsinieren von Zellkulturzellen**

Um inhibierende Einflüsse von Serumbestandteilen auf die Trypsin-Aktivität zu verhindern wurde der Zellrasen vor der Trypsin-Behandlung zweimal mit PBS gespült. Nach dem Absaugen des PBS wurden die Zellen für 3-5 min mit Trypsin/EDTA (GIBCO #25300054) bei 37°C inkubiert (mikroskopische Kontrolle). Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe von mindestens der doppelten Menge serumhaltigen Mediums gestoppt, die Zellen durch mehrfaches Aufsaugen mit der Pipette vereinzelt und in der gewünschten Verdünnung ausgesät.

#### **5.2.2.5 Einfrieren von Zellkulturzellen**

Die Zellen wurden trypsiniert, in Medium aufgenommen und die Suspension sedimentiert (3 min, 200 x g). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml Einfriermedium aufgenommen, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und am folgenden Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

#### **5.2.2.6 Revitalisierung von Zellkulturzellen**

Der Vorgang des Auftauens sollte schnell erfolgen, um die zellschädigende Wirkung des Einfriermediums gering zu halten. Nach der Entnahme aus dem Stickstofftank wurden die Zellen im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut. Die Zellsuspension wurde entnommen, in 5 ml vorgewärmtes Medium überführt und sedimentiert (5 min, 200 x g). Das Medium wurde abgesaugt, das Zellpellet in Medium resuspendiert und in eine Zellkulturschale überführt.

#### **5.2.2.7 Kultur muriner embryonaler Stammzellen**

Die murinen ES-Zellen (Linie R1) wurden revitalisiert und in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  auf gelatinisierten Zellkulturschalen mit einem einschichtigen Zellrasen von inaktivierten Feederzellen ausgesät. Das ES-Medium wurde täglich gewechselt. Etwa alle zwei Tage, bevor die Zellen konfluieren, wurden sie 1:4 bis 1:6 „gesplittet“.

#### **5.2.2.8 Elektroporation muriner ES-Zellen**

Pro Elektroporationsansatz wurden  $1 \times 10^7$  Zellen benötigt. Zwei Stunden vor der Elektroporation wurde das ES-Medium gewechselt. Dann wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, trypsiniert, resuspendiert und sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml PBS resuspendiert, erneut sedimentiert und dann in 800  $\mu\text{l}$  PBS gelöst. Die Lösung wurde in eine Elektroporationsküvette überführt, die linearisierte DNA des Konstrukts KD-CTR hinzugegeben (60  $\mu\text{g}$ ) und der Ansatz elektroporiert (BIORAD-Elektroporator: 240 V, 500  $\mu\text{F}$ ). Anschließend wurde der Ansatz 10 min inkubiert, bevor die Zellen in 10 ml Medium überführt wurden. Der 10 ml-Ansatz wurde gleichmäßig auf fünf 10 cm ( $\varnothing$ )-Schalen verteilt und die Schalen kultiviert.

#### **5.2.2.9 Positive Selektion der Klone auf die Integration der neo-Kassette**

Etwa 24 Stunden nach der Elektroporation wurde mit der Selektion begonnen. Dazu wurde dem Medium beim täglichen Wechsel 150-300  $\mu\text{g/ml}$  Geneticin (G-418, GIBCO #10131019) zugesetzt. Nach 2-3 Tagen begannen diejenigen Zellen abzusterben, die nicht das Konstrukt

mit der Neomycin-Kassette in ihr Genom integriert hatten und somit nicht resistent waren gegen Geneticin, einem Neomycin-Analogon.

#### **5.2.2.10 Vereinzlung (Picken) stabil transfizierter Klone**

Nach einer Woche Selektion wurden Zellkolonien mit glatter Oberfläche und scharf begrenztem Rand zur Vereinzlung auf 96er Mikroplatten überführt. Dazu wurden die Ausgangsplatten zweimal mit PBS gespült und die ausgesuchten Kolonien unter dem Binokular mit einer Pipette aufgenommen und jeweils in ein well pipettiert, in das 40µl Trypsin vorgelegt waren. Auf diese Weise wurden jeweils drei Reihen der 96er Mikroplatte befüllt, dann wurde die Platte für 3-5 min bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit wurde auf einer weiteren mit Feederzellen vorbereiteten 96er Mikroplatte das MEF-Medium gegen ES-Medium ausgetauscht (200µl pro Vertiefung). Dann wurden die ES-Zellen durch vorsichtiges auf- und abpipettieren zunächst im Trypsin und dann unter Zugabe von 100 µl ES-Medium vereinzelt (mikroskopische Kontrolle) und auf die Feederplatte ausgesät. Entsprechend wurde mit den restlichen Vertiefungen verfahren, dann wurde die Platte kultiviert. Bevor die Zellen konfluieren wurden sie 1:4 auf neue 96er Mikroplatten umgesetzt. Je zwei Platten wurden nach erneuter Konfluenz eingefroren, die anderen beiden Platten (nur gelatinebeschichtet, ohne Feederzellen) wurden für die DNA-Isolierung noch zwei Tage länger kultiviert.

#### **5.2.2.11 Einfrieren und Auftauen von 96er ES-Mikroplatten**

Zwei Stunden vor dem Einfrieren der 96er ES-Mikroplatte wurde nochmals das Medium gewechselt. Die Zellen wurden mit 200 µl PBS/EDTA pro Vertiefung gewaschen. Dann wurden sie trypsiniert (40µl Trypsin/Vertiefung) und die Reaktion mit 60 µl ES-Medium/Vertiefung abgestoppt. Die Platte wurde auf Eis gestellt, es wurde 100µl Einfriermedium (80% FCS, 20% DMSO) pro Vertiefung dazugegeben, und die Zellen wurden darin resuspendiert. Anschließend wurde jede Vertiefung mit 50 µl Mineralöl beschichtet, die Platte mit Klebeband umwickelt und bei -80°C „langsam“ in einer Styroporbox weggefroren.

Das Auftauen der ES-Zellen erfolgte schnell in der 96er Mikroplatte im Wasserbad bei 37°C. Nach dem Auftauen wurden die Zellen direkt in eine Zellkulturschale überführt.

#### **5.2.2.12 Entfernen der Neomycin-Kassette *in vitro* durch Frt-Rekombination**

Um später bei den genetisch veränderten Mäusen einen störenden Einfluß der Neomycin-Kassette im Genom zu verhindern, wurde das Neomycin-Gen, das von zwei Frt-Sequenzen

eingerahmt war, durch Flpe-Rekombination wieder entfernt. Dazu wurden zwei Klone, bei denen gemäß Southernblot eine homologe Rekombination mit dem Konstrukt KD-CTR stattgefunden hatte, revitalisiert. Entsprechend dem Einbringen des Konstrukts wurden die Zellen kultiviert, mit dem linearisierten Plasmid pCAGGS-Flpe elektroporiert, kultiviert und anschließend auf Neomycin selektiert. Ein Teil der Platten wurde eingefroren, der andere für die Analyse der DNA auf eine erfolgreiche Rekombination verwendet.

#### **5.2.2.13 Blastozysteninjektion und Reimplantation der Blastozyste**

Für die Erzeugung genetisch veränderter Mäuse wurden zwei verschiedene ES-Zellklone ausgesucht, bei denen das Konstrukt KD-CTR (Ergebnisse Abb. 6.7.6) durch homologe Rekombination stabil ins Genom integriert worden war. Die Injektion der ES-Zellen in Blastozysten und die anschließende Reimplantation der Blastozysten in scheinchwangere Mäuse wurde von Frau PD Dr.Hermans-Borgmeyer und Tina Mordhorst am ZMNH durchgeführt.

### **5.2.3 Serum- und Urinanalysen**

#### **5.2.3.1 Serumgewinnung und Urinentnahme**

Die Mäuse wurden mit Ether betäubt und getötet, und das Blut wurde sofort aus dem Herz entnommen. Nachdem es bei Raumtemperatur geronnen war, wurde es zweimal für 10 Minuten bei 3.600 rpm zentrifugiert und das Serum bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Für die Urinuntersuchungen wurde entweder Spontanurin der Mäuse verwendet, oder der Urin wurde nach Tötung durch Blasenpunktion gewonnen.

#### **5.2.3.2 Bestimmung von Kalzium, Phosphor und Dpd im Urin**

Die Konzentration von Kalzium und anorganischem Phosphor im Urin wurde photometrisch mit Reagenzien von SIGMA DIAGNOSTICS (#587-A bzw. #360-3) bestimmt, die auf der Bildung von kolorimetrischen Farbkomplexen basieren. Als Maß für die osteoklastäre Knochenresorption wurde freies Deoxypyridinolin (Dpd), ein Kollagen-I-Abbauprodukt, mit einem Enzymimmunoassay von METRA BIOSYSTEMS INC., Mountain View, California,USA, #08007, bestimmt. Die Konzentrationen von Kalzium, anorganischem Phosphor und Dpd wurden auf den Gehalt von Kreatinin bezogen. Kreatinin wurde ebenfalls mit einem ELISA von METRA BIOSYSTEMS INC (#08009) bestimmt.

### **5.2.3.3 Kalzium-, Phosphor- und Hormonbestimmung im Serum**

Kalzium und anorganischer Phosphor wurden nach der selben Methode wie im Urin bestimmt (siehe 5.2.3.2). Hormone im Serum wurden mit Enzymimmunoassays quantifiziert: PTH, Osteocalcin und Ratten-Calcitonin mit ELISAs bzw. IRMAs von IMMUTOPICS, INC., California, USA, #60-2300 bzw. #50-1300 und #50-5000; Lachs-Calcitonin mit einem ELISA von DSL INC., Texas, USA, #10-3600; OPG und RANK-L mit ELISAs von R&D SYSTEMS, INC., Minnesota, USA, #MOP00 und #MTR00; Leptin mit einem ELISA von CRYSTAL CHEM INC., Illinois, USA, #90030.

Serumkonzentrationen von Vitamin D<sub>3</sub>, T4 und Östrogen wurden im Zentrallabor der klinischen Chemie des Universitätsklinikums Eppendorf bestimmt.

## **5.2.4 Histologie und Morphologie**

### **5.2.4.1 Kontaktröntgen und $\mu$ CT**

Die fixierten Skelette der Mäuse wurden im Kontakt-Röntgenapparat (Faxitron Xray, FAXITRON XRAY CORP., Wheeling Illinois, USA; Filme: Mamoray HDR PQ, AGFA, Mechelen, Belgien) für 2 Sekunden bei 35 kV geröntgt.

Für die dreidimensionale Darstellung wurde der Lendenwirbelkörper L6 in einem  $\mu$ CT 40 (SCANCO MEDICAL, Basserdorf, Schweiz) mit einer Auflösung von 12  $\mu$ m gescannt (40 kV/114  $\mu$ A).

### **5.2.4.2 Paraffin- und Acrylat-Histologie**

Von allen Mäusen wurde jeweils die rechte Tibia und die oberen vier Lendenwirbel histologisch untersucht. Darüber hinaus wurden von einigen Mäusen auch histologisch Organe untersucht.

Die Tiere wurden getötet, enthäutet und der Bauchraum eröffnet. Die Skelette wurden gestreckt auf einer Korkplatte für ein bis zwei Tage in frischem 3,7 % gepuffertem Formaldehyd fixiert und dann in 80% Ethanol überführt.

Anschließend wurden die Wirbelkörper und die Tibia oder auch Organe herauspräpariert und über Nacht im Autotechnikon entwässert (für Paraffineinbettung: 2 x 60 min 70% EtOH, 60 min 80% EtOH, 2 x 60 min 96% EtOH, 2 x 60 min EtOH absolut, 2 x 60 min Xylol, 3 x 60 min Paraffin 60°C; für Acrylateinbettung 2 x 60 min 70% EtOH, 3 x 60 min 80% EtOH, 3 x 60 min 96% EtOH, 4 x 60 min EtOH absolut). Knochenpräparate für die Paraffineinbettung wurden zuvor über Nacht bei 37°C je nach Alter und Verkalkungsgrad in 10-20% EDTA entkalkt.

Entkalkte Knochen und Organe wurden in Paraffin eingebettet. Von den Präparaten wurden am Schlittenmikrotom 3 µm dicke Schnitte angefertigt.

Nicht entkalkter Knochen wurde nach der Entwässerung für je einen Tag bei 4°C mit Infiltrationslösung I und II infiltriert und dann in Gießlösung in Glasgefäßen eingebettet. Die Polymerisation erfolgte über Nacht bei 4°C im Wasserbad. 3 und 12µm dicke Schnitte wurden am Rotationsmikrotom (MICROTEC CUT 4060E) angefertigt und auf Gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen (Gelatinelösung siehe Puffer und Lösungen). Zum Strecken der Schnitte wurde 80% Isopropanol, versetzt mit einem Tropfen Butylether, verwendet.

#### **5.2.4.3 HE-Färbung**

Die Paraffinschnitte wurden für 30 min in den Wärmeschrank (60°C) gestellt. Anschließend wurden sie in Xylol (2 x 5 min) entparaffiniert und in der absteigenden Alkoholreihe entwässert. Dann wurden sie für 10 min in Mayers Hämalaunlösung (MERCK #109249) gestellt, kurz in Salzsäure-Ethanol getaucht, in Leitungswasser gespült und zum Bläuen für 10 min in Leitungswasser gestellt. Danach wurden die Schnitte für 2 min in Eosin-Lösung gefärbt. Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe. Nach 3 x 5 min Xylol wurden die Schnittpräparate mit DPX (SIGMA-ALDRICH #44581) eingedeckt.

#### **5.2.4.4 von Kossa-/ van Gieson-Färbung**

Der Kunststoff wurde mit 2-(Methoxyethyl)-acetat (Merck #806061) aus den Schnitten gelöst (3 x 10 min). Dann wurden die Schnittpräparate in der absteigenden Alkoholreihe bewässert. Die Färbung war wie folgt: 5 min 3%ige Silbernitratlösung, 10 min entionisiertes Wasser, 5 min Sodaformollösung, 10 min fließendes Leitungswasser, 5 min 5%ige Natriumthiosulfatlösung, 10 min fließendes Leitungswasser, 20 min van Gieson-Lösung. Danach wurden die Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in Xylol überführt (3 x 5 min) und mit DPX (SIGMA-ALDRICH #44581) eingedeckt.

#### **5.2.4.5 Toluidin-Färbung**

Die Vor- und Nachbehandlung der Schnitte verlief wie bei der von Kossa-Färbung (siehe 5.2.4.4). Für die Färbung selbst wurden die Schnitte für 30 min in die Toluidinlösung gestellt.

#### 5.2.4.6 TRAP (*tartrate-resistant acid phosphatase*)-Färbung

TRAP ist ein spezifischer Marker für aktive Osteoklasten. Die Färbung erfolgte an entkalkten Paraffinschnitten. Die Schnitte wurden in Xylol entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe entwässert. Danach wurden sie für eine Stunde in TRAP-Puffer inkubiert und anschließend in TRAP-Lösung für etwa 30 min gefärbt. Die gefärbten Schnitte wurden kurz in dest. Wasser gespült, mit Mayers Hämalaun gegengefärbt (10-60 Sek.) und für 10 min fließend gewässert. Die fertigen Schnittpräparate wurden in wässrigem Eindeckmedium (Faramount Mounting Medium, Aqueous, DAKO # S3025) eingedeckt.

#### 5.2.4.7 Immunhistologie an Gewebeschnitten

Für die Immunhistologie wurden die Gewebeschnitte auf SuperFrost®Plus Objektträger (MENZEL-GLÄSER #041300) aufgezogen, bei Raumtemperatur getrocknet und vor der Immunhistologie für eine Stunde auf 60°C erhitzt. Anschließend wurden sie in Xylol entparaffiniert (2 x 5 min) und in der absteigenden Alkoholreihe entwässert. Danach wurden sie in der Mikrowelle für 20 min in Citratpuffer gekocht und dann zum langsamen Abkühlen stehen gelassen. Die nachfolgende Inkubation mit spezifischen Antikörpern war wie folgt:

##### Anti-Calcitonin-Immunhistologie

Die Schnitte wurden in PBS gewaschen, 5 min mit Peroxidase-Block (DAKOCYTOMATION #S2001) inkubiert, wieder mit PBS gewaschen und dann mit dem Erstantikörper (Polyclonal Rabbit Anti-Human Calcitonin, DAKOCYTOMATION #A0576) 1:200 in PBS/1% BSA über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Präparate in PBS gewaschen und dann mit dem HRP-gekoppelten Zweitantikörper (Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP, DAKOCYTOMATION #P0448) 1:200 in PBS/1% BSA für 30 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Schnitte mit dem Diaminobenzidin-Färbereagenz von DAKOCYTOMATION (#K3467) nach Angaben des Herstellers gefärbt und anschließend mit Mayer's Hämalaun gegengefärbt. Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe und danach 3 x 5 min Xylol, bevor die Schnittpräparate mit DPX (SIGMA-ALDRICH #44581) eingedeckt wurden.

#### 5.2.4.8 Calceinmarkierung

Calcein ist ein flurochromer Farbstoff, der sich an die mineralisierende Matrix anlagert. Um die Zuwachsrate an Knochen histologisch darstellen zu können, wurden die Mäuse zweimal im Abstand von 5 Tagen (2 bzw. 7 Tage vor der Präparation) mit Calcein markiert (je 100 µl

Injektionslösung: 0.15M NaCl; 2 % NaHCO<sub>3</sub>; 1% Calcein [w/v]). Am Abstand der zwei grün-fluoreszierenden Calcein-Markierungen in der Tibia konnte die Knochenzuwachsrate berechnet werden.

#### **5.2.4.9 Histomorphometrie**

Die Knochenformationsrate (BFR, bone formation rate) wurde an 12 µm dicken, ungefärbten Acrylatschnitten von Calcein-markierten Mäusen bestimmt. Die Quantifizierung von Knochenvolumen (BV/TV, bone volume per tissue volume), Anzahl der Trabekel (TbN, trabecular number), Abstand der Trabekel (TbSp, trabecular spacing), Trabekeldicke (TbTh, trabecular thickness) und Osteoblasten- und Osteoklastenzahl (NOb bzw. NOc/BPm, number of osteoblasts bzw. osteoclasts per bone parameter) wurde nach standardisierten Protokollen mit dem OsteoMeasure Histomorphometrie-System (OSTEOMETRICS INC., Atlanta, Georgia, USA) an Toluidin-gefärbten Acrylatschnitten durchgeführt.

#### **5.2.5 sonstige Methoden**

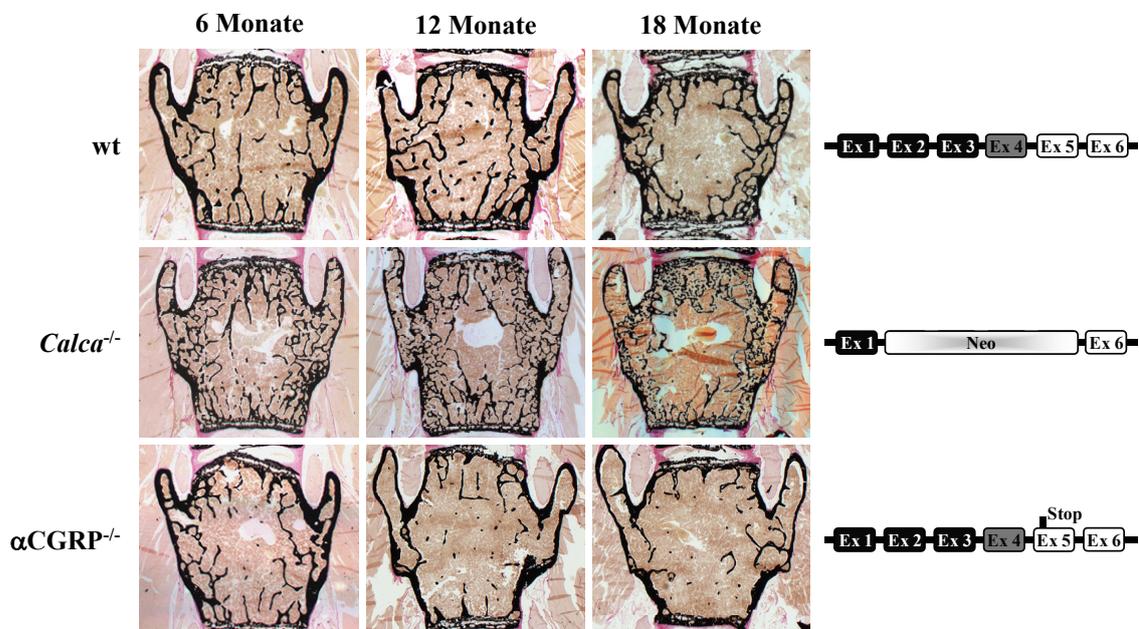
##### **5.2.5.1 Maushaltung**

Alle Mäuse wurden in der Tierhaltung des Universitätsklinikums Eppendorf gehalten. Die Tiere wurden unter einem normalen Tag-Nacht-Zyklus mit einem Standard-Futter und Wasser *ad libitum* ernährt.

## 6 ERGEBNISSE

### 6.1 Die Defizienz des *Calca*-Gens führt zu einem ausgeprägten Knochenphänotyp, der sich deutlich von einer reinen $\alpha$ -CGRP-Defizienz unterscheidet

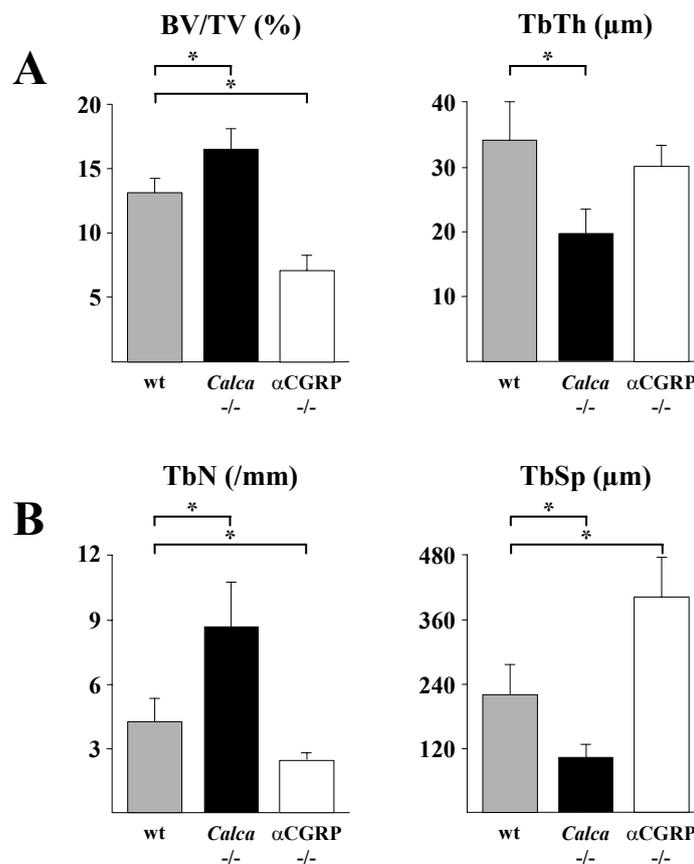
Der Verlust des *Calca*-Gens auf beiden Allelen (*Calca*<sup>-/-</sup>), und somit die Abwesenheit von sowohl Calcitonin als auch  $\alpha$ -CGRP, führt in der Maus zu einem markanten Knochenphänotyp. An nicht-dekalzifizierten histologischen Schnitten von Lendenwirbelkörpern zeigte sich in der von-Kossa-Färbung, dass *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Alter von 6, 12 und 18 Monaten eine deutlich andere Trabekelstruktur haben als die Wildtyp-Kontrollen (Abb. 6.1.1, mittlere und obere Reihe).  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäuse, denen nur  $\alpha$ -CGRP, nicht aber Calcitonin fehlt, entwickeln hingegen eine Osteopenie (Abb. 6.1.1, untere Reihe).



**Abb. 6.1.1:** Nicht-dekalzifizierte Schnitte von Lendenwirbelkörpern aus Wildtyp-, *Calca*-defizienten und  $\alpha$ -CGRP-defizienten Mäusen im Alter von 6, 12 und 18 Monaten in der von-Kossa-Färbung. Mineralisierter Knochen erscheint schwarz. Die Trabekel der *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse sind in allen Alterstufen feiner strukturiert als die der Wildtyp-Mäuse. Die  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäuse entwickeln in den Lendenwirbelkörpern eine Osteopenie. Neben den Bildern ist ein Schema des dem Genotyp entsprechenden *Calca*-Gens dargestellt.

Die Wirbelkörper dieser beiden Mausmodelle (siehe auch Einleitung 3.6) wurden zum Zeitpunkt von 12 Monaten histomorphometrisch vermessen und die strukturellen Knochenparameter quantifiziert. Es zeigten sich deutlich gegenläufige Tendenzen der beiden Modelle. Wie schon im Alter von 3 Monaten (Hoff et al., 2002), haben *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse auch im Alter von 12 Monaten signifikant mehr Knochenmasse (BV/TV) als Kontrolltiere, obwohl,

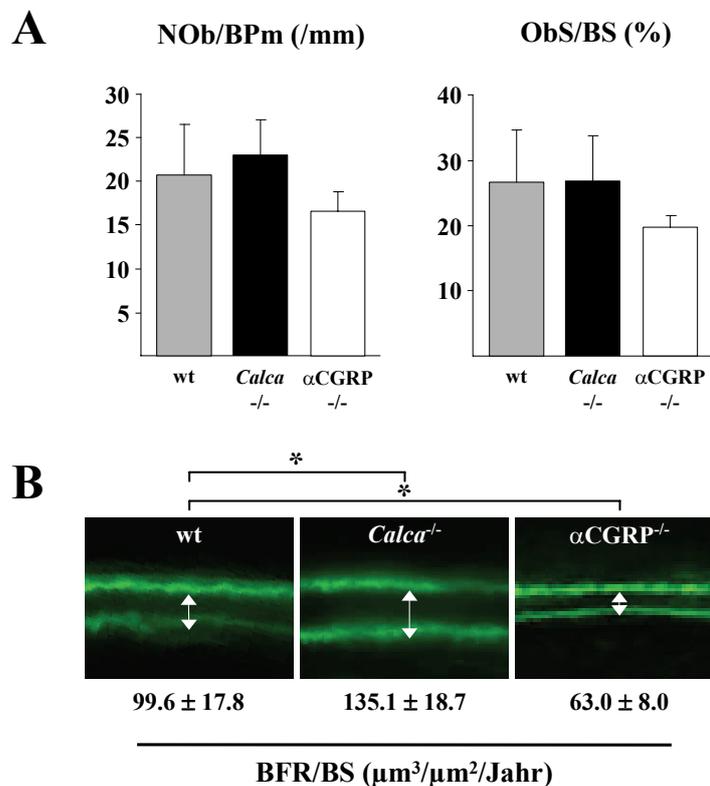
anders als im Alter von drei Monaten, ihre Trabekeldicke (TbTh) signifikant reduziert ist (Abb. 6.1.2 A).  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäuse haben hingegen eine signifikant reduzierte Knochenmasse gegenüber den Wildtyp-Kontrollen bei nur leicht erniedrigter Trabekeldicke. Die erhöhte Knochenmasse in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen ist durch einen signifikanten Anstieg in der Trabekelanzahl (TbN) gegenüber den Wildtyp-Mäusen bei gleichzeitig verringertem Trabekelabstand (TbSp) zu erklären. Im Gegensatz dazu haben  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäuse signifikant weniger Trabekel mit einem größeren Abstand zueinander (Abb. 6.1.2 B).



**Abb. 6.1.2: Strukturelle Knochenparameter von Wildtyp-, *Calca*<sup>-/-</sup>- und  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäusen im Alter von 12 Monaten.** **A:** Knochenvolumen pro Gewebvolumen (BV/TV, *bone volume/tissue volume*) und Trabekeldicke (TbTh, *trabecular thickness*). **B:** Anzahl der Trabekel (TbN, *trabecular number*) und Abstand der Trabekel (TbSp, *trabecular spacing*). Die Knochenphänotypen der beiden Mausmodelle sind konträr zueinander. Mit Ausnahme der Trabekeldicke bei  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäusen unterscheiden sich alle Parameter signifikant zum Wildtyp. (\* bedeutet  $p < 0,05$  im t-Test;  $n > 5$ )

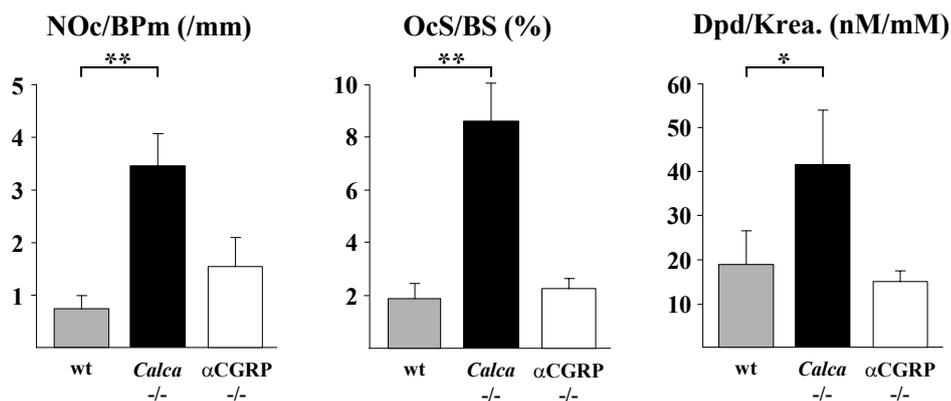
## 6.2 Der Knochenphänotyp von *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen ist progressiv und führt sowohl zu verstärkter Knochenformation als auch zu verstärkter Knochenresorption

Für 3 Monate alte *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurde eine erhöhte Knochenformationsrate publiziert (Hoff et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die Knochenformationsrate von *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen auch noch im Alter von 12 Monaten signifikant erhöht ist, während sie bei  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant erniedrigt ist im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen (WT:  $99,6 \pm 17,8$  vs *Calca*<sup>-/-</sup>:  $135,1 \pm 18,7$  vs  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>:  $63,0 \pm 8,0$   $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{Jahr}$ ). Die unterschiedliche Knochenzuwachsrate zeigt sich im Abstand der Calceinmarkierung (Abb. 6.2.1 B). Da in beiden Mausmodellen die Anzahl der Osteoblasten nur leicht verändert ist (Abb. 6.2.1 A), ist die unterschiedliche Geschwindigkeit der Knochenbildung auf die Aktivität der Osteoblasten zurückzuführen.



**Abb. 6.2.1: Knochenformation in WT-, *Calca*<sup>-/-</sup>- und  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäusen im Alter von 12 Monaten. A:** Anzahl der Osteoblasten pro Knochenoberfläche (NOb/BPm, *number of osteoblasts per bone perimeter*) und Osteoblastenoberfläche pro Knochenoberfläche (ObS/BS, *osteoblast surface per bone surface*). **B:** Die Calceinmarkierung zeigt die unterschiedlichen Knochenzuwachsrate bezogen auf die Knochenoberfläche (BFR/BS, *bone formation rate per bone surface*). Die Knochenzuwachsrate ist in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant erhöht und in  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant erniedrigt, obwohl die Anzahl der Osteoblasten in beiden Modellen unverändert ist gegenüber dem Wildtyp. (\* bedeutet  $p < 0,05$  im t-Test;  $n > 5$ )

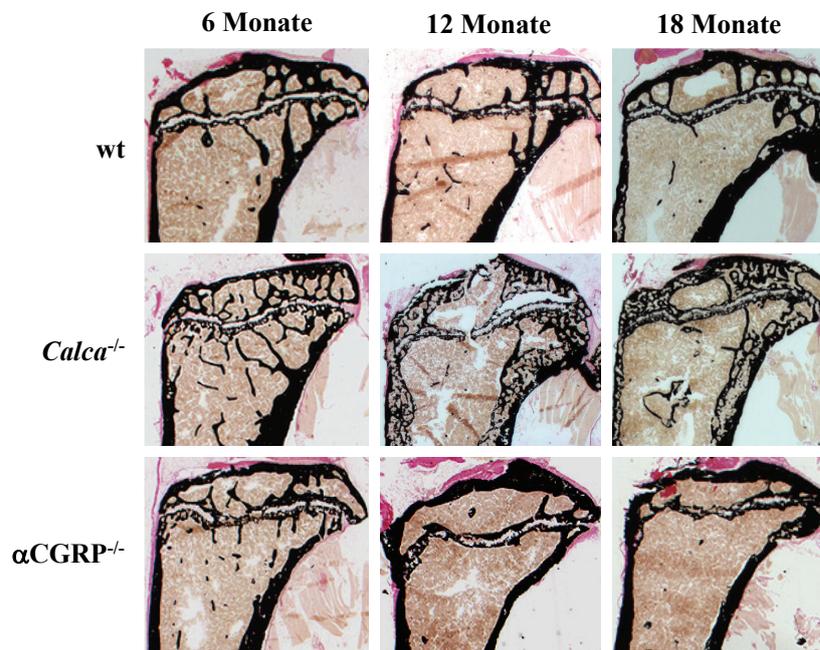
Im Alter von 12 Monaten zeigte sich bei *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen durch einen 4-fachen Anstieg der Osteoklastenzahl (Abb. 6.2.2, li) zum ersten Mal ein deutlicher Einfluß der *Calca*<sup>-/-</sup>-Defizienz auch auf die Knochenresorption. Ein gleichzeitiger Anstieg von Kollagenabbauprodukten im Urin (Dpd/Kreatinin: 41,7 ± 12,4 vs 18,9 ± 7,7 nM/mM) belegt, dass die Osteoklasten nicht nur in ihrer Anzahl vermehrt sind, sondern dass sie auch aktiv sind (Abb. 6.2.2, re). Ausgehend von einer Osteoklasten-hemmenden Funktion von Calcitonin, wäre eine verstärkte Resorption bei Abwesenheit von Calcitonin zu erwarten. Die stark erhöhte Resorptionsaktivität ist jedoch auch überraschend, da im Alter von 3 Monaten kein Einfluß der *Calca*<sup>-/-</sup>-Defizienz auf die Knochenresorption beschrieben wurde (Hoff et al., 2002) und zudem die Knochenbildung bei unveränderter Osteoblastenzahl trotzdem zu einem erhöhten Knochenvolumen führt. Die Knochenresorption von  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäusen ist unverändert gegenüber den Wildtyp-Kontrollen.



**Abb. 6.2.2: Knochenresorption in WT-, *Calca*<sup>-/-</sup>- und  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäusen im Alter von 12 Monaten.** Anzahl der Osteoklasten pro Knochenoberfläche (NOc/BPm, *number of osteoclasts per bone perimeter*) und Osteoklastenoberfläche pro Knochenoberfläche (OcS/BS, *osteoclast surface per bone surface*). Die Desoxypyridinoline (Kollagenabbauprodukte) im Urin bezogen auf Kreatinin (Dpd/Krea.) sind ein Maß für die Knochenresorption. Die Anzahl der Osteoklasten ist in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen, bezogen auf die Knochenoberfläche, um das 4-fache erhöht. Die Zunahme der Osteoklastenzahl spiegelt sich in einer signifikant erhöhten Resorption, gemessen an den Kollagenabbauprodukten, wider.  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäuse haben hingegen eine normale Osteoklastenzahl mit einer normalen Resorptionsaktivität. (\* bedeutet p < 0,05 im t-Test, \*\* bedeutet p < 0,005 im t-Test; n > 5)

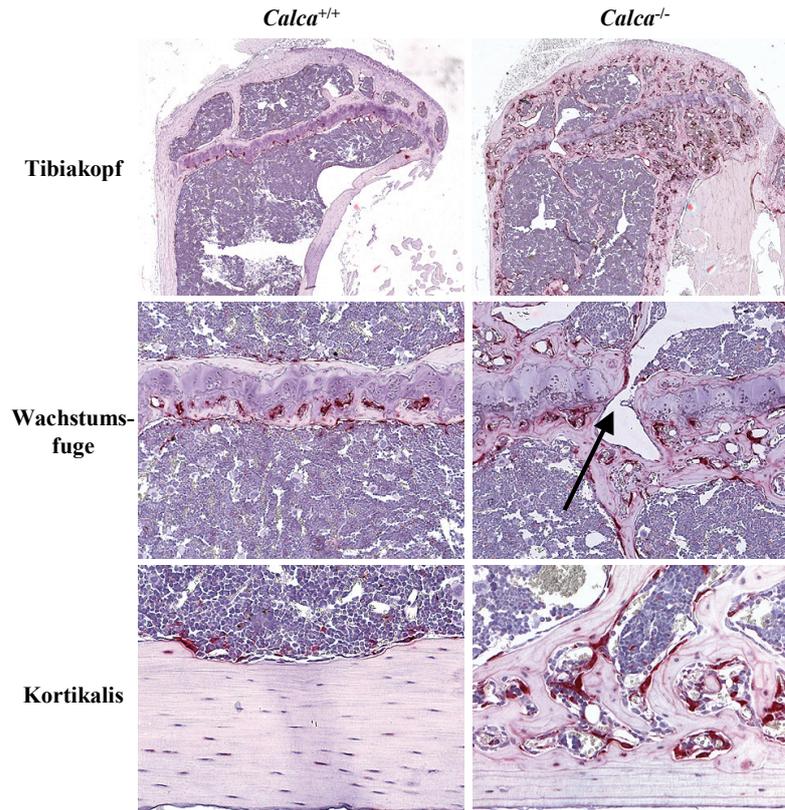
Als weiterer Knochen wurde die Tibia der Mäuse untersucht. Die Osteopenie der  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäuse stellte sich ähnlich wie in den Lendenwirbelkörpern dar (Abb. 6.2.3, untere Reihe). In *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigte sich neben den strukturellen Veränderungen des trabekulären Knochens auch ein starker Effekt auf den kortikalen Knochen, sodass die Kortikalis zum

Zeitpunkt von 12 und 18 Monaten in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen stark porös erscheint (Abb. 6.2.3, mittlere Reihe).



**Abb. 6.2.3:** Nicht-dekalzifizierte Schnitte von Tibiae aus Wildtyp-, *Calca*<sup>-/-</sup> und  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäusen im Alter von 6, 12 und 18 Monaten in der von-Kossa-Färbung. Im Alter von 12 und 18 Monaten erscheint die Kortikalis der *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse stark porös, was auf eine verstärkte Resorption hindeutet. Wie in den Lendenwirbelkörpern, ist auch in der Tibia von  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäusen eine leichte Osteopenie zu sehen.

Die Vermutung, dass die Porosität der Kortikalis, deren Auftreten mit dem starken Anstieg der Osteoklastenzahl in den Lendenwirbeln zusammenfällt, ebenfalls auf eine erhöhte Resorptionsaktivität von Osteoklasten zurückzuführen ist, wurde in der TRAP-Färbung bestätigt (Abb. 6.2.4). Deutlich zu erkennen ist die Überzahl der Osteoklasten (rot gefärbt) in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen gegenüber Wildtyp-Kontrollen. Im Tibiakopf sind deutlich mehr Trabekel. In der Wachstumsfuge führt der beschleunigte Knochenumbau zu einem Durchbruch der Wachstumsfuge (Pfeil), und die Kortikalis verliert die kompakte, geordnete Schichtung.



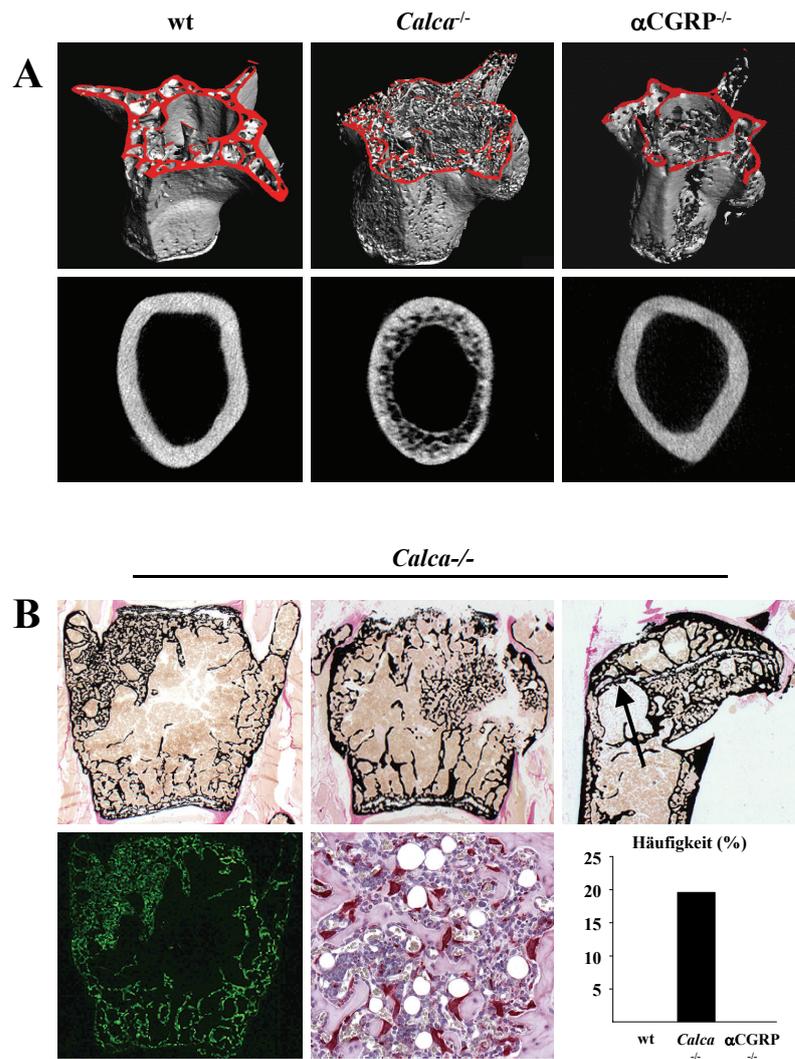
**Abb. 6.2.4: TRAP-Färbung der Tibia von 12 Monate alten Wildtyp- und  $Calca^{-/-}$ -Mäusen.** Die Anzahl der Osteoklasten (rot gefärbt) ist in  $Calca^{-/-}$ -Mäusen deutlich erhöht gegenüber  $Calca^{+/+}$ -Mäusen. Die starke Zunahme der Osteoklasten führt, in Verbindung mit der erhöhten Knochenformation, zu großen strukturellen Veränderungen der Tibia, die besonders gut in der Kortikalis sichtbar werden. Der Pfeil im mittleren rechten Bild markiert einen Durchbruch der Wachstumsfuge.

Somit führt das Fehlen von Calcitonin und  $\alpha$ -CGRP in der Maus zu einem progressiven Knochenumbauphänotyp, der zunächst nur zu einer verstärkten Knochenbildung führt und ab einem Alter von 6 Monaten zusätzlich auch durch verstärkte Resorption gekennzeichnet ist.

### 6.3 Die verstärkten Knochenumbauprozesse in $Calca^{-/-}$ -Mäusen führen zu hyperostotischen Läsionen

In den  $\mu$ CT-Aufnahmen von Lendenwirbelkörpern sind die strukturellen Anomalitäten der  $Calca^{-/-}$ -Mäuse und der  $\alpha$ -CGRP $^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle offensichtlich (Abb. 6.3.1 A, obere Reihe). Im Querschnitt der Tibia von  $Calca^{-/-}$ -Mäusen ist die schon in der Histologie beobachtete Porosität der Kortikalis gut zu erkennen (Abb. 6.3.1 A, untere Reihe). Die gesteigerten Knochenumbauprozesse führen in knapp 20% der 12 Monate alten und älteren  $Calca^{-/-}$ -Mäuse zu hyperostotischen Läsionen (Abb.6.3.1 B). Diese Läsionen führen teilweise zu erheblichen morphologischen Veränderungen bis hin zu

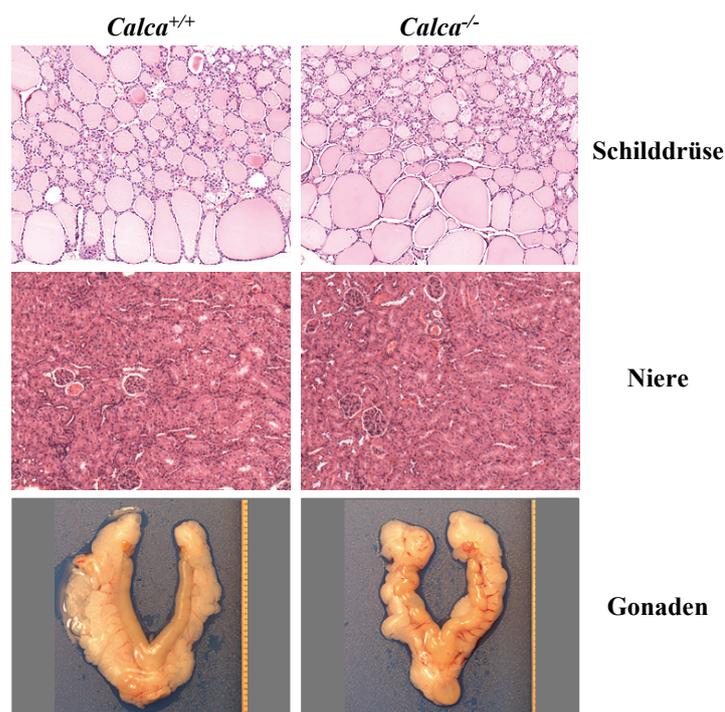
Wachstumsfugendurchbrüchen (Abb. 6.3.1 B, Pfeil und auch Abb 6.2.4). In einem Fall wurde sogar die Verschmelzung zweier Wirbelkörper beobachtet (nicht gezeigt). Wie die Calceinmarkierung und die TRAP-Färbung veranschaulichen (Abb. 6.3.1 B, untere Reihe), sind in diesen Läsionen sowohl die Knochenformation als auch die -resorption lokal gesteigert.



**Abb. 6.3.1: Der gesteigerte Knochenumbau führt zu hyperostotischen Läsionen in *Calca*-defizienten Mäusen.** A:  $\mu$ CT-Aufnahme jeweils eines Lendenwirbelkörpers L5 (oben) und einer Tibia (unten) im diaphysären Querschnitt von Wildtyp-, *Calca*<sup>-/-</sup>- und  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäusen. B: obere Reihe: von-Kossa-Färbung hyperostotischer Läsionen in Schnitten von Wirbelkörpern und einer Tibia von *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen, die ein Jahr oder älter sind. Untere Reihe von li. nach re.: Calceinmarkierung des darüber abgebildeten Wirbelkörpers; Ausschnitt einer hyperostotischen Läsion in der TRAP-Färbung (die Osteoklasten sind rot gefärbt); Häufigkeit des Vorkommens hyperostotischer Läsionen in Mäusen, die 12 Monate oder älter sind. Die starke Fluoreszenz des Wirbelkörpers nach der Calceinmarkierung zeigt die gesteigerte Knochenformation. Gleichzeitig weisen die ungewöhnlich vielen Osteoklasten auch auf eine stark erhöhte Knochenresorption hin.

#### 6.4 Es gibt keine Anzeichen, dass der Phänotyp von *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen auf einen sekundären Mechanismus zurückzuführen ist

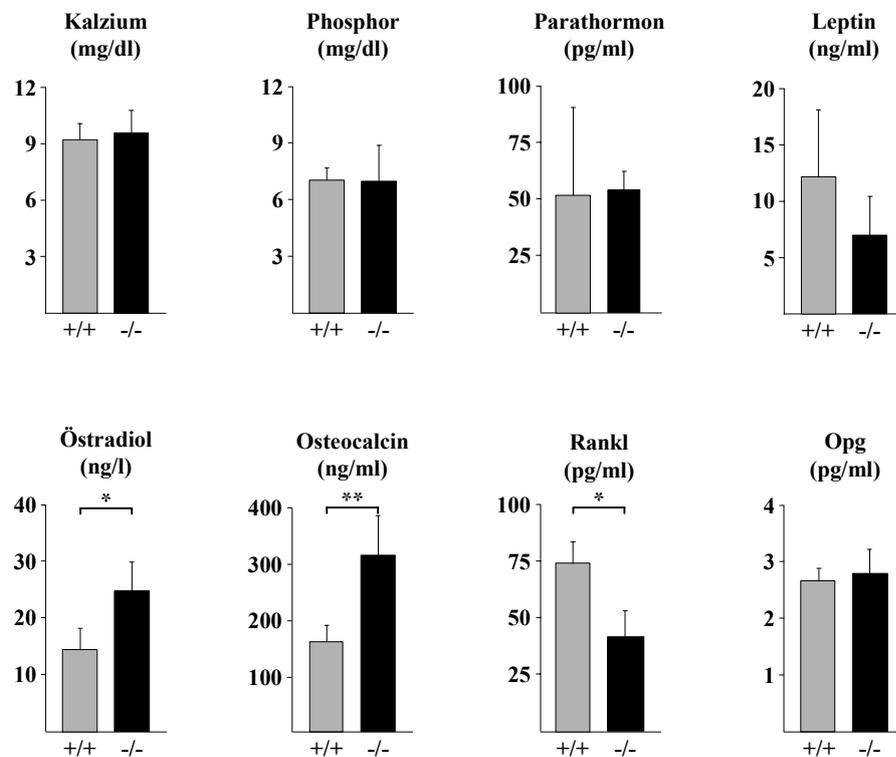
Die histologische Untersuchung der Organe von *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen gab keinen Hinweis auf morphologische Veränderungen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Von den HE-gefärbten Schnittpräparaten sind hier nur die Schilddrüse als hauptsächliches Expressionsorgan für Calcitonin und die Niere als Expressionsorgan des Calcitoninrezeptors (Abb. 6.4.1, oben und Mitte) gezeigt. Ein verstärkter Knochenumbau kann mit einem Hypogonadismus assoziiert sein, der wiederum durch einen makroskopisch sichtbar dünneren Uterus charakterisiert ist (Syed & Khosla, 2005; Tsilchorozidou & Conway, 2004; Pask et al., 2005). Die Uteri der *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse sind jedoch makroskopisch unauffällig (Abb. 6.4.1, unten). Damit ist ein Sekundäreffekt auf den Knochen, bedingt durch eine veränderte Gonadenfunktion, unwahrscheinlich.



**Abb. 6.4.1: Organanalyse 12 Monate alter *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen.** In keinem Organ konnten in der HE-Färbung morphologische Unterschiede zwischen Wildtyp- und *Calca*<sup>-/-</sup>-Tieren festgestellt werden. Gezeigt sind hier Ausschnitte der Schilddrüse und der Niere als Expressionsorte von Calcitonin bzw. des Calcitoninrezeptors. Darunter sind Uteri der Mäuse abgebildet. Makroskopisch weisen die *Calca*<sup>-/-</sup>-Uteri keine Anzeichen eines Hypogonadismus auf.

Um zu prüfen, ob der beschleunigte Knochenumbau in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen indirekt durch veränderte Serumspiegel anderer Hormone gesteuert wird, wurde zunächst die Konzentration

von Kalzium, anorganischem Phosphor und Parathormon im Serum bestimmt. Diese Parameter sind jedoch, genauso wie Leptin, nicht verändert (Abb. 6.4.2, obere Reihe). Die zu diesem Zeitpunkt erhöhten Östrogenspiegel geben keine Erklärung für die verstärkte Resorption, zumal die Werte im Alter von 6 und 18 Monaten den Kontrolltieren entsprechen (nicht gezeigt). Auch die Werte der Osteoklasten-Differenzierungsfaktoren Osteoprotegerin und RANK-Ligand geben keine Erklärung für die erhöhte Osteoklastenzahl. Die erniedrigte RANK-Ligand-Konzentration würde eher mit einer erniedrigten Osteoklastenzahl korrelieren. Allerdings wirken diese beiden Faktoren lokal, und damit ist eine Aussage über die lokale Wirkung anhand ihrer Serumkonzentration nicht vorhersagbar. Die 2fach erhöhte Serumkonzentration für den Osteoblastenfaktor Osteocalcin reflektiert hingegen die erhöhte Knochenformationsrate (Abb 6.4.2, untere Reihe).



**Abb. 6.4.2: Serumanalyse 12 Monate alter *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen.** Die Serumspiegel von *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen für Kalzium, Phosphor, Parathormon und Leptin entsprechen denen der Wildtyp-Kontrollen. Die Östradiolkonzentration der *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse ist im Serum erhöht. Die signifikant erhöhte Serumkonzentration des Osteoblastenfaktors Osteocalcin korreliert mit der signifikant erhöhten Knochenformation. Hingegen deutet die Abnahme des Osteoklasten-Differenzierungsfaktors Rankl (receptor activator of NF-κB ligand) eher auf eine Abnahme der Osteoklastenzahl hin. Allerdings wirkt Rankl, ebenso wie sein Gegenspieler Opg (Osteoprotegerin), dessen Serumkonzentration der von Wildtypmäusen entspricht, lokal. Somit ist eine Wirkung vor Ort bei Abnahme der systemischen Konzentration von Rankl nicht vorhersagbar. (\* bedeutet  $p < 0,05$  im t-Test, \*\* bedeutet  $p < 0,005$  im t-Test;  $n > 5$ )

Somit geben weder die Ergebnisse der Serumanalyse noch die Untersuchungen der Organe Hinweise auf einen sekundären Mechanismus als Erklärung für den Knochenphänotyp der *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse. Der Phänotyp scheint knochenspezifisch zu sein und ist offenbar direkt auf das Fehlen von Calcitonin zurückzuführen. Besonders interessant ist der fehlende Einfluß der *Calca*-Defizienz auf die Kalzium- und Phosphat-Homöostase, sowie der Befund, dass der deutlich gesteigerte Knochenumsatz *Calca*-defizienter Mäuse nicht mit erhöhten PTH-Konzentrationen im Serum assoziiert ist.

### **6.5 Untersuchung der Genexpression im Hypothalamus von Wildtyp- und *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen**

Die Tatsache, dass die Abwesenheit von Calcitonin in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht nur zu einer verstärkten Knochenresorption, sondern vorerst zu einer gesteigerten Knochenformation führt, warf die Frage auf, wie diese beschleunigte Knochenneubildung reguliert ist, da für Osteoblasten bislang kein Calcitoninrezeptor nachgewiesen worden ist (Lee et al., 1995; Inoue et al., 1999). Vor wenigen Jahren konnte durch eine Studie an Leptin-defizienten (*ob/ob*) Mäusen gezeigt werden, dass die Knochenbildung auch zentral, d.h. durch Bindung des Hormons Leptin an Rezeptoren im Hypothalamus, reguliert werden kann (Ducy et al., 2000). Da auch der Calcitoninrezeptor im Hypothalamus stark exprimiert wird, ist eine zentrale Regulation durchaus auch für Calcitonin denkbar.

Um diesen möglichen Regulationsweg zu untersuchen, wurde eine Microarray-Genchip-Analyse durchgeführt, die es ermöglicht, die Expression nahezu aller Gene der Maus (etwa 30.000) in verschiedenen Proben zu vergleichen. Für die Analyse wurde cDNA aus den Hypothalami von 3 Monate alten Wildtyp- und *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen hergestellt. Als Kontrolle wurden Hypothalami Leptin-defizienter Mäuse verwendet, deren Expressionsmuster bereits gut charakterisiert ist. Leptin hat, neben der Funktion bei der Knochenbildung, auch eine wichtige Funktion bei der Steuerung des Appetitverhaltens. Im Hypothalamus unterliegen „orexigene“ (die Nahrungsaufnahme stimulierende) und „anorexigene“ (die Nahrungsaufnahme hemmende) Faktoren der Regulation durch Leptin. Die Transkription der orexigenen Neuropeptide *Agrp* (*agouti-related peptide*) und *Npy* (*neuropeptide Y*) wird durch Leptin inhibiert. Entsprechend ist die Anzahl der Gen-Transkripte dieser beiden Peptide in Leptin-defizienten Mäusen erhöht (Shutter et al., 1997; Wilding et al., 1993). In unserer Genchip-Analyse sind *Agrp* und *Npy* an Position 2 und 27 auf der Liste der am stärksten induzierten Gene im Hypothalamus von *ob/ob*-Mäusen (Tabelle 6.5.1, li Spalte). Damit bestätigt sich zum einen, dass *Agrp* und *Npy* in Abwesenheit von Leptin verstärkt exprimiert

werden, und zum anderen, dass die Genchip-Analyse funktioniert hat und somit auch für die Genexpression in den Hypothalami der *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse Aussagekraft hat. Bei den *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte zwar keine Induktion der *Agrp*- und *Npy*-Expression nachgewiesen werden, allerdings war an sechster Stelle der am stärksten induzierten Gene das *Calcb*-Gen (Tabelle 6.5.1, rechte Spalte). Dieses Gen erschien uns besonders interessant, weil es zur Calcitonin-Familie gehört und das dazugehörige Protein,  $\beta$ -CGRP, möglicherweise die Funktion des fehlenden  $\alpha$ -CGRP übernehmen könnte, da es sich nur in drei Aminosäuren von  $\alpha$ -CGRP unterscheidet (siehe Einleitung Tabelle 3.4.1).

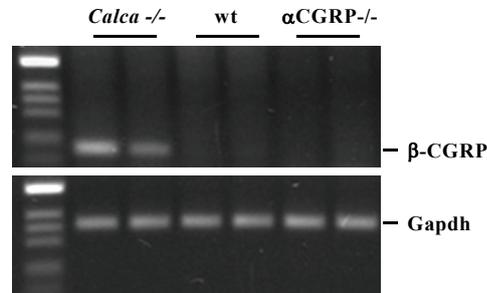
**Tabelle 6.5.1: Microarray-Analyse des Hypothalamus aus Leptin-defizienten (*ob/ob*) Mäusen und *Calca*<sup>-/-</sup>- Mäusen**

	<i>signal log ratio</i>	WT	<i>ob/ob</i>	Gen		<i>signal log ratio</i>	WT	<i>Calca</i> <sup>-/-</sup>	Gen
1	4,4	4,6	65,6	<i>Ttr</i>	1	5	3,9	151,1	<i>Paip1</i>
2	<b>2,9</b>	<b>72,5</b>	<b>597,3</b>	<b><i>Agrp</i></b>	2	4,6	8,6	282,6	<i>1110015E22R</i>
3	1,7	734,6	2177,2	<i>Erdr1</i>	3	3,5	10,7	81,3	<i>EST</i>
4	1,7	95,5	180,1	<i>Sult1a1</i>	4	3,5	7,8	56,2	<i>Ccl25</i>
5	1,6	100,6	330,8	<i>Fos</i>	5	3,4	4,4	50,4	<i>Sdf4</i>
.	.	.	.	.	6	<b>3,1</b>	<b>32,8</b>	<b>345</b>	<b><i>Calcb</i></b>
.	.	.	.	.	7	2,6	27,4	186,4	<i>Plvab</i>
.	.	.	.	.	8	2,3	127,1	430,2	<i>Pam</i>
.	.	.	.	.	9	2,3	70,1	393,5	<i>Cap1</i>
27	<b>1</b>	<b>416,4</b>	<b>844,4</b>	<b><i>Npy</i></b>	10	2,2	3,8	28,1	<i>EST</i>

In der Tabelle sind die am stärksten induzierten Gene im Hypothalamus von *ob/ob*-Mäusen (linke Spalte) und *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen (rechte Spalte) im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen gezeigt. Die Reihenfolge der Gene ergibt sich in der Auswertung mit spezieller Software von Affymetrix aus der „*signal log ratio*“ und korreliert nicht notwendigerweise mit der  $x$ -fachen Expression. Der Vergleich mit den *ob/ob*-Mäusen diente als Kontrolle. Von den Genen *Agrp* (*agouti related protein*) an Position 2 und *Npy* (*neuropeptide Y*) an Position 27 ist bekannt, dass ihre Transkriptzahl im Hypothalamus in *ob/ob*-Mäusen erhöht ist. Ein interessanter Befund der *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse war die 10-fache Induktion des *Calcb*-Gens (an Position 6), dass für  $\beta$ -CGRP kodiert und aufgrund des Fehlens von  $\alpha$ -CGRP bzw. der  $\alpha$ -CGRP-mRNA kompensatorisch reguliert sein könnte.

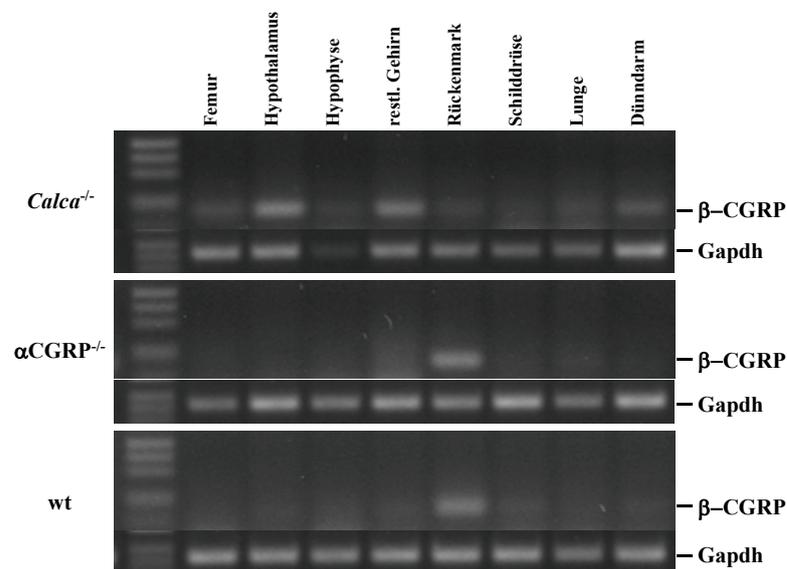
Um diesen Befund aus dem Microarray zu verifizieren, wurde eine semiquantitative RT-PCR mit Hypothalamus-RNA von Wildtyp- und *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen durchgeführt. Auch hier zeigte sich, dass  $\beta$ -CGRP in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen stark exprimiert war, während in den Wildtyp-Kontrollen keine  $\beta$ -CGRP-Expression nachgewiesen werden konnte (Abb. 6.5.1). Die

Annahme, dass  $\beta$ -CGRP möglicherweise auch in  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäusen stärker exprimiert wird, um den Mangel an  $\alpha$ -CGRP zu kompensieren, bestätigte sich nicht. In  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte ebenfalls keine  $\beta$ -CGRP-Expression nachgewiesen werden (Abb. 6.5.1).



**Abb. 6.5.1: RT-PCR von Hypothalamus-cDNA von *Calca*<sup>-/-</sup>, Wildtyp- und  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Oben:  $\beta$ -CGRP ist nur in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen stark exprimiert, aber nicht in Wildtyp- und  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäusen. Unten: Die Gapdh-Kontrolle ist in allen PCR-Ansätzen gleich stark exprimiert.

In der RT-PCR anderer Gewebe zeigte sich, dass  $\beta$ -CGRP nicht nur spezifisch im Hypothalamus von *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen verstärkt exprimiert wird, sondern auch in anderen Organen (Abb. 6.5.2). Bei der vergleichenden PCR von  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen ist hingegen ausschließlich im Rückenmark eine deutliche Bande für die  $\beta$ -CGRP-Expression zu erkennen.

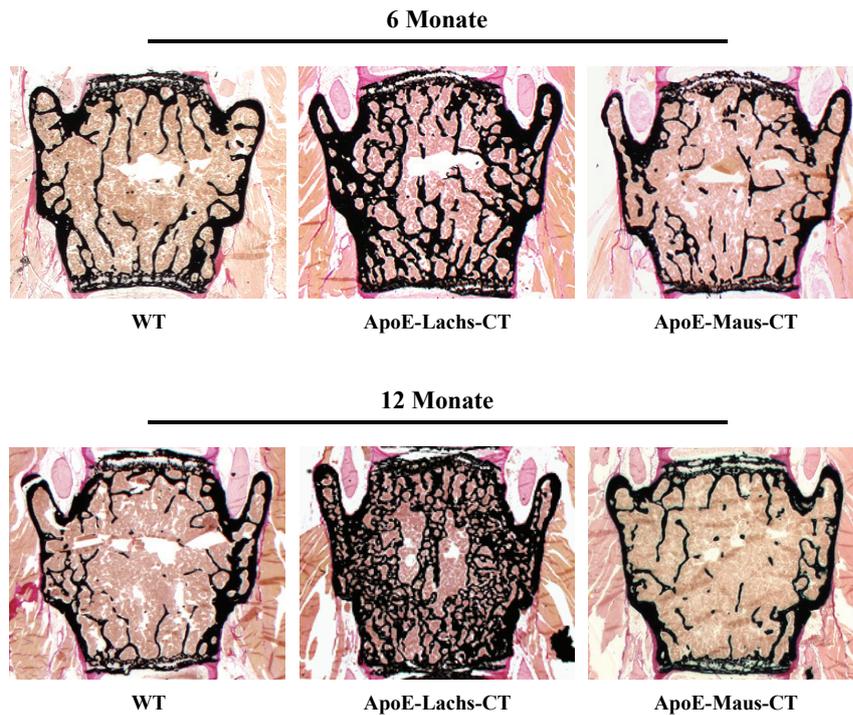


**Abb. 6.5.2: RT-PCR für  $\beta$ -CGRP mit cDNA aus verschiedenen Organen von *Calca*<sup>-/-</sup>,  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen.** Die Expression von  $\beta$ CGRP ist in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht spezifisch im Hypothalamus induziert, sondern auch in verschiedenen anderen Geweben. In Wildtyp- und  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäusen ist bei gleicher PCR-Zyklenzahl hingegen nur eine deutliche Expression im Rückenmark zu erkennen. Die etwa gleich starke Expression der Kontrolle Gapdh in den verschiedenen Geweben zeigt, dass die Ausgangskonzentration der cDNA vergleichbar war.

Die spezifische Induktion der  $\beta$ -CGRP-Expression in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen, nicht jedoch in  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäusen, ist interessant, da sie eine mögliche Erklärung für die erhöhte Knochenformation von *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen liefern könnte. Sollte  $\beta$ -CGRP, ähnlich wie  $\alpha$ -CGRP, einen positiven Einfluß auf die Knochenbildung ausüben, könnte eine systemische Erhöhung von  $\beta$ -CGRP zu einer Calcitonin-unabhängigen Steigerung der Knochenbildung führen.

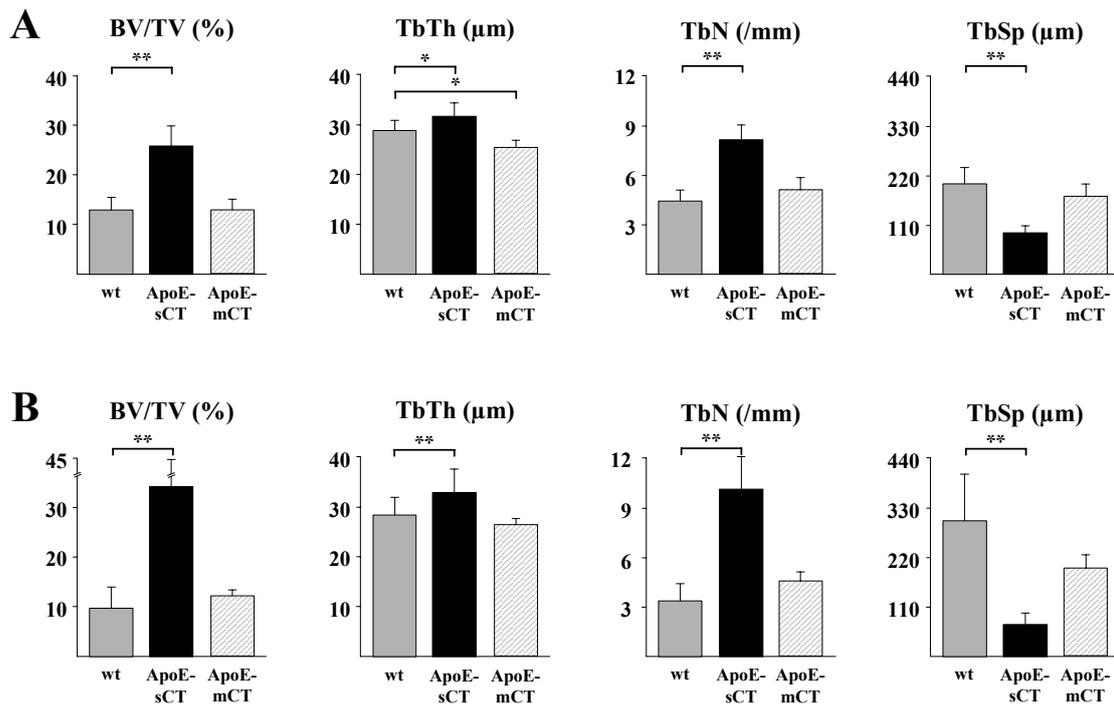
### **6.6 Die Überproduktion von Maus- bzw. Lachs-Calcitonin hat unterschiedliche Wirkung auf den Knochen, führt aber in beiden Fällen nicht zum reversen Knochenphänotyp der *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse**

Um zu überprüfen, ob Calcitonin einen Einfluß auf die Knochenformation ausübt, sollte nicht nur die Mangelsituation charakterisiert werden, sondern auch der Zustand des Überangebotes von Calcitonin. Dies wurde parallel für Säugetier- (Maus) und Fisch- (Lachs) Calcitonin durchgeführt, da letzteres klinisch zur Behandlung von Knochenmasseverlust eingesetzt wird. Um das Problem der unterschiedlichen Stabilität von Säugetier- und Fisch-Calcitonin zu umgehen, wurden in unserer Gruppe transgene Mäuse generiert, die Lachs- bzw. Maus-Calcitonin (sCT, s = *salmon*, Lachs, bzw mCT, m =Maus) unter dem leberspezifischen ApoE-Promotor exprimieren (siehe Einleitung 3.6). Die Mäuse wurden im Alter von 6 und 12 Monaten untersucht. Zum Zeitpunkt von 6 Monaten war die Serum-Konzentration von Calcitonin (Maus bzw. Lachs-CT) in beiden transgenen Linien etwa 8fach höher als in den Wildtyp-Kontrollen (WT:  $104 \pm 29$ , ApoE-mCT:  $774 \pm 125$ , ApoE-sCT:  $776 \pm 95$ , (s. Abb. 6.6.3). Zu diesem Zeitpunkt, wie auch im Alter von 12 Monaten, liegt die Serum-Konzentration für endogenes Calcitonin in den Lachs-Calcitonin-überexprimierenden Mäusen im physiologischen Bereich (nicht gezeigt). Trotz vergleichbar hoher, vom Transgen exprimierten, Calcitonin-Serumkonzentrationen, zeigte bereits die Betrachtung der histologisch aufgearbeiteten Lendenwirbel unerwartet starke Unterschiede zwischen der Wirkung von Lachs- und Maus-Calcitonin. ApoE-sCT-Mäuse haben schon im Alter von 6 Monaten ein sichtbar erhöhtes Knochenvolumen gegenüber Wildtyp-Tieren (Abb 6.6.1, obere Reihe, Mitte). Die anhaltend hohe Konzentration von Lachs-Calcitonin im Serum führt jedoch noch zu einem weiteren Anstieg des Knochenvolumens bis zum Alter von 12 Monaten (Abb 6.6.1, untere Reihe, Mitte). Maus-Calcitonin hat hingegen weder im Alter von 6 Monaten noch zum Zeitpunkt von 12 Monaten sichtbaren Einfluß auf den Knochen (Abb. 6.6.1 obere und Reihe, re).



**Abb. 6.6.1: Vergleichende Knochenhistologie von Lendenwirbelkörpern aus transgenen Mäusen, die Lachs- (ApoE-Lachs-CT) oder Maus- (ApoE-Maus-CT) Calcitonin unter einem leberspezifischen Promotor exprimieren im Alter von 6 und 12 Monaten.** Schon im Alter von 6 Monaten führt die hohe Serumkonzentration von Lachs-Calcitonin (sCT, *s = salmon*, Lachs) in den ApoE-sCT-Mäusen zu einem sichtbar erhöhten Knochenvolumen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen (obere Reihe, Mitte und links). Bis zum Alter von 12 Monaten nimmt das Knochenvolumen von ApoE-sCT-Mäuse nochmals deutlich zu (untere Reihe, Mitte und links). Im Gegensatz dazu hat die erhöhte Serumkonzentration von Maus-Calcitonin zu keinem Zeitpunkt einen erkennbaren Einfluss auf den Knochen (obere und untere Reihe, rechts).

Die morphologischen Unterschiede zwischen Wildtyp- und ApoE-sCT-Mäusen sind zu beiden Zeitpunkten für alle untersuchten, strukturellen Knochenparameter signifikant (Abb. 6.6.2). Im Gegensatz dazu gibt es keine Unterschiede zwischen ApoE-mCT-Mäusen und deren Kontrollen.

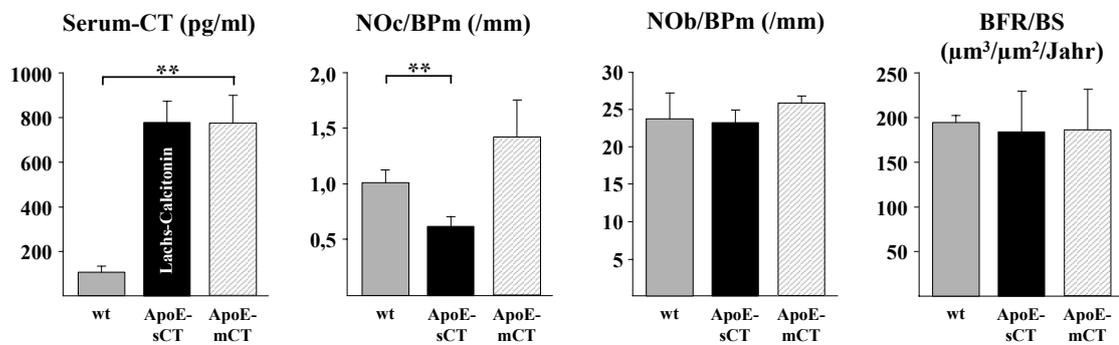


**Abb. 6.6.2: Histomorphometrie statischer Knochenparameter im Alter von 6 Monaten und 12 Monaten bei ApoE-Maus-CT- und ApoE-Lachs-CT-Mäusen.** (A) Die Überproduktion von Lachs-Calcitonin führt im Alter von 6 Monaten zu einem signifikanten Anstieg des Knochenvolumens durch eine Zunahme der Trabekeldicke und -zahl. Dadurch verringert sich der durchschnittliche Abstand der Trabekel zueinander. (B) Mit 12 Monaten nehmen die Unterschiede zu den Wildtypkontrollen noch deutlich zu. Die Überproduktion von Maus-Calcitonin hingegen hat weder im Alter von 6 Monaten noch im Alter von 12 Monaten einen entscheidenden Einfluß auf die strukturellen Knochenparameter. Bis auf die Trabekeldicke, die bei 6 Monaten erniedrigt ist, entsprechen alle Parameter denen der Wildtypkontrollen (mCT = Maus-Calcitonin; sCT = Lachs-Calcitonin; \*\* bedeutet  $p < 0,005$  im t-Test,  $n > 5$ )

Wie von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Cornish et al., 2001; Galvin et al., 1998), wirkt das Lachs-Calcitonin auch in den transgenen ApoEsCT-Mäusen selektiv auf Osteoklasten und führt zu einem Rückgang der Osteoklastenzahl um 40% (Abb 6.6.3), worauf die starke Zunahme des Knochenvolumens zurückgeführt werden kann. Die Anzahl der Osteoblasten entspricht denen von Wildtyp-Kontrollen (Abb. 6.6.3) und korreliert mit normalen Serumwerten für den Osteoblastenmarker Osteocalcin (nicht gezeigt). Ebenso ist die Knochenformationsrate als Maß für die Aktivität der Osteoblasten normal.

Angesichts der ausgeprägten Knochenphänotypen bei Lachs-Calcitonin-Überproduktion und bei *Calca*-Defizienz überrascht es, dass 8-fach erhöhte Serum-Konzentrationen von Maus-Calcitonin offensichtlich keinen Effekt auf den Knochen haben. In den Maus-Calcitonin-überexprimierenden Mäusen ist weder die Anzahl der Osteoklasten noch die Zahl der

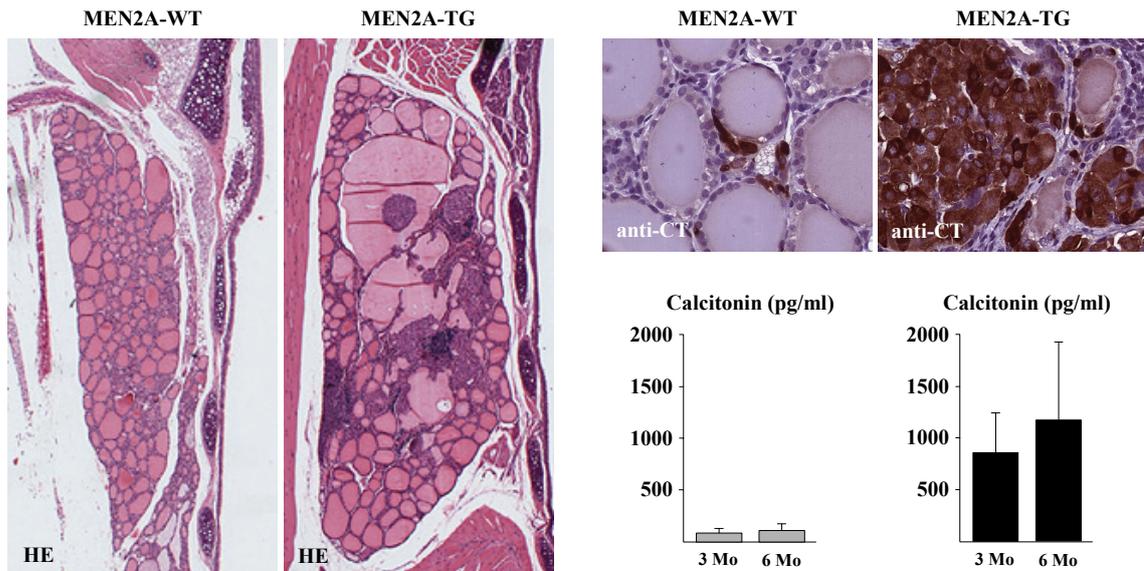
Osteoblasten signifikant verändert gegenüber den Wildtyp-Tieren (Abb. 6.6.3). Genauso wenig ist die Knochenformationsrate, die in den *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen stark erhöht ist (siehe Ergebnisse Abb. 6.2.1), durch das Überangebot von Maus-Calcitonin beeinflusst.



**Abb. 6.6.3: Osteoklastenzahl, Osteoblastenzahl und Knochenformationsrate von Maus- und Lachs-CT-überexprimierenden Mäusen im Alter von 6 Monaten.** Die Serumkonzentration von Lachs- bzw. Maus-Calcitonin ist in ApoE-sCT- und ApoE-mCT-Mäusen im Alter von 6 Monaten 8-fach erhöht gegenüber der endogenen Calcitonin-Konzentration in Wildtyp-Tieren. In ApoE-sCT-Mäusen führt das zu einem Rückgang der Osteoklasten um etwa 40% (NOc/BPm), wodurch das erhöhte Knochenvolumen dieser Tiere erklärt werden kann. Die leicht erhöhte Osteoklastenzahl in ApoE-mCT-Mäusen ist nicht signifikant zum Wildtyp. Die Osteoblastenzahl (NOb/BPm), wie auch die Knochenformationsrate (BFR/BS), ist in beiden Modellen unverändert zum Wildtyp. (\*\* bedeutet  $p < 0,005$  im t-Test;  $n \geq 5$ )

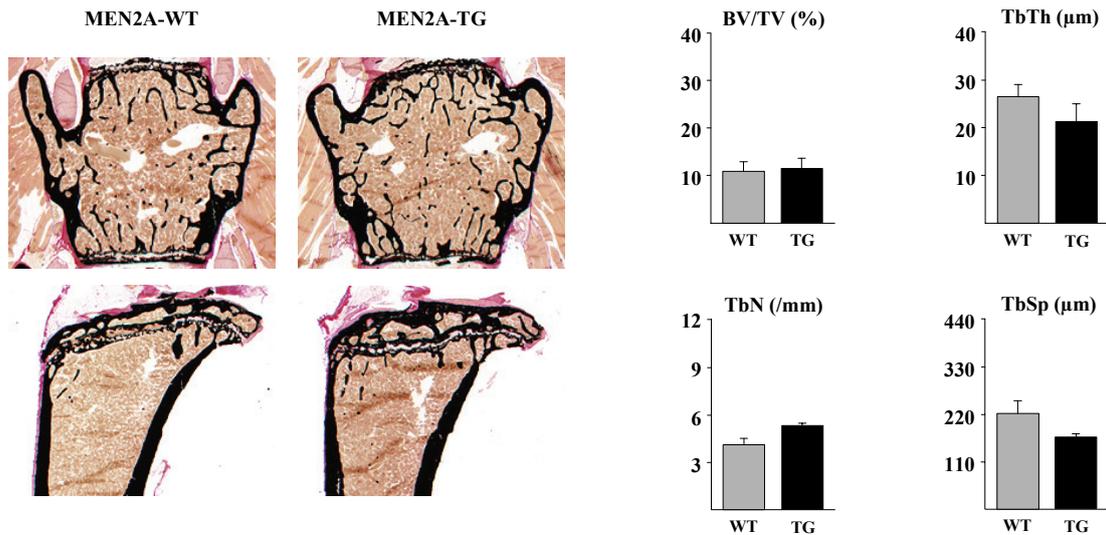
Um sicherzustellen, dass stark erhöhte Serum-Konzentrationen von Maus-Calcitonin tatsächlich keinen Effekt auf den Knochen haben, und um auszuschließen, dass das Ausbleiben eines Knochenphänotyps in der transgenen ApoE-mCT-Linie auf methodische Schwierigkeiten zurückzuführen ist, wurde ein weiteres transgenes Mausmodell aus der Arbeitsgruppe von Professorin Pützer aus Rostock hinzugezogen (Linie MEN2A-B6-2). Diese Mäuse exprimieren ein mutiertes RET-Onkogen unter dem humanen Calcitonin-Promotor (s. Einleitung 3.6) und entwickeln ein medulläres Schilddrüsen-Karzinom (C-Zell-Karzinom), verbunden mit stark erhöhten Calcitonin-Serumkonzentrationen (Reynolds et al., 2001).

Die histologische Untersuchung von Schilddrüsen transgener Mäuse mit medullärem Schilddrüsen-Karzinom (MEN2A-TG) zeigt, dass die Zahl der Calcitonin-produzierenden C-Zellen in der Tat stark erhöht ist im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen (MEN2A-WT, Abb. 6.6.4). Im Serum spiegelt sich diese Zunahme an parafollikulären Zellen durch signifikant erhöhte Calcitoninspiegel wider (Abb. 6.6.4, rechts oben).



**Abb. 6.6.4: Histologie von Schilddrüsen und Calcitonin-Serumkonzentrationen von 3 bzw. 6 Monate alten Wildtyp- und transgenen MEN2A-Mäusen.** Links: HE-Färbung frontaler Schnitte von Schilddrüsen 6 Monate alter Wildtyp- und MEN2A-Mäuse. In den transgenen Tieren sind zwischen dem hell-gefärbten Colloid große Areale zellulärer Ansammlungen (violett-gefärbt). Rechts unten: anti-CT Immunhistologie. Gezeigt ist jeweils ein Ausschnitt der Schilddrüse in 400facher Vergrößerung. Die zellulären Bereiche in den transgenen Tieren bestehen fast ausschließlich aus parafollikulären (C-) Zellen (braun gefärbt). Sie sind in den Tieren mit medullärem Schilddrüsen-Karzinom stark vermehrt. Die Zunahme der C-Zellen korreliert mit dem starken Anstieg der Serum-Calcitoninkonzentration (rechts oben).

Wie bei den ApoE-mCT-Mäusen, konnten auch in diesem zweiten Modell für stark erhöhte Serum-Maus-Calcitoninkonzentrationen keine strukturellen Veränderungen des Knochens nachgewiesen werden, weder histologisch noch in der histomorphometrischen Auswertung (Abb. 6.6.5).



**Abb. 6.6.5: Knochenhistologie und Histomorphometrie struktureller Knochenparameter von 6 Monate alten MEN2A-Wildtypmäusen und transgenen MEN2A-Mäusen.** In der von-Kossa-Färbung von Wirbelkörpern und Tibiae sind keine Unterschiede zwischen transgenen MEN2A-Mäusen und Wildtyp-Kontrollen zu sehen. Auch in der histomorphometrischen Auswertung gibt es keine signifikanten Unterschiede.

Das Fehlen eines Knochenphänotyps in den MEN2A-Mäusen zeigt, dass das Ausbleiben eines Knochenphänotyps bei den ApoE-mCT-Mäusen nicht auf methodische Schwierigkeiten zurückzuführen ist. Der in unserer Arbeitsgruppe gewählte transgene Ansatz stellt somit offensichtlich eine geeignete Methode dar, immunreaktives Calcitonin verschiedener Spezies zu produzieren und zeigt zum ersten Mal die unterschiedlichen Effekte von Maus- und Lachs-Calcitonin in vergleichbar hoher Konzentration auf den Knochen *in vivo*, unabhängig von Protein-Stabilitäts-Problemen, wie sie bei peripherer Applikation entstehen.

Die Ergebnisse bestätigen die widersprüchlichen Beobachtungen einerseits der knochenanabolen Wirkung von Lachs-Calcitonin (Chesnut, III et al., 2005; Plosker & McTavish, 1996; Overgaard et al., 1992) und andererseits dem Ausbleiben eines Knochenphänotyps bei Patienten mit einem Überangebot an Calcitonin, verursacht durch ein medulläres Schilddrüsen-Karzinom (Wuster et al., 1992; Hurley et al., 1987). Da Maus-Calcitonin selbst in supraphysiologischen Konzentrationen keinen nachweisbaren Einfluß auf die Knochenformation hat, ist eine knochenanabole Funktion von Säugetier-Calcitonin unter normalen physiologischen Bedingungen, wie sie aufgrund des Phänotyps der *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse postuliert werden musste, in Frage zu stellen.

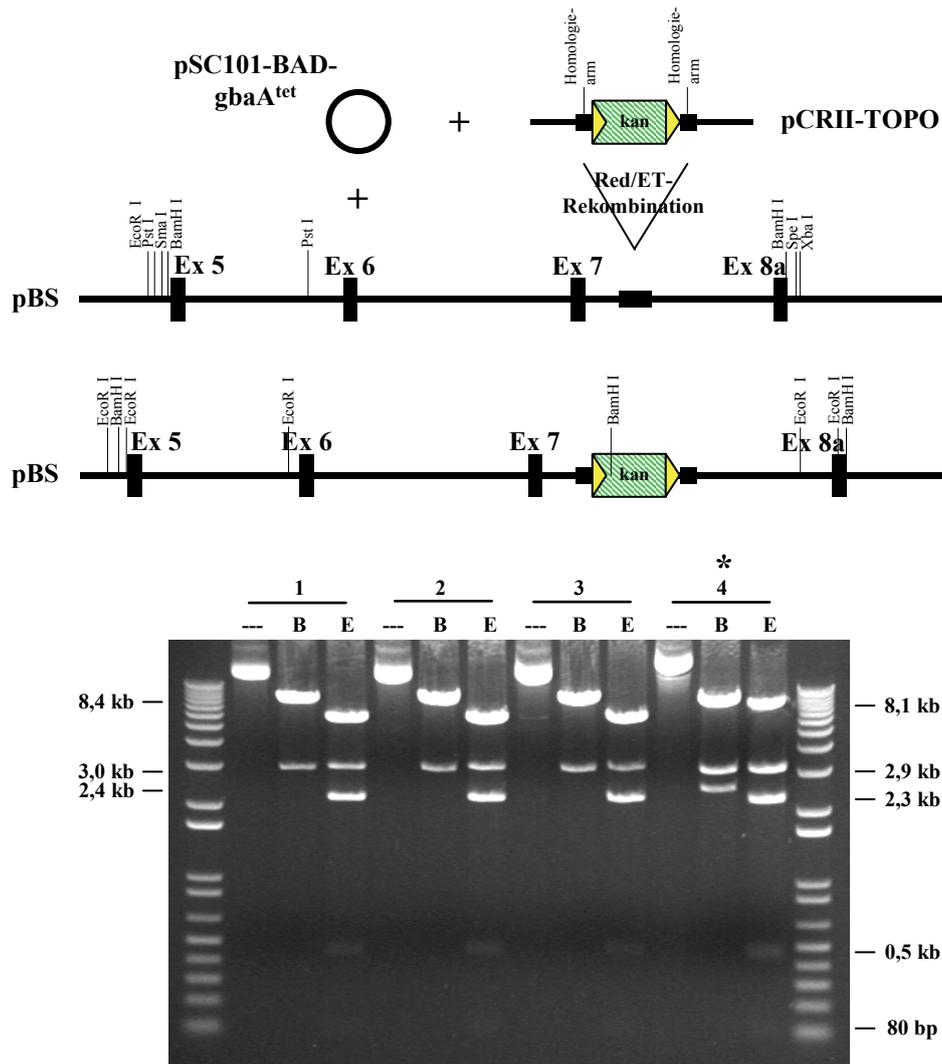
## 6.7 Generierung von konditional Calcitoninrezeptor-defizienten Mäusen

Mit den bisher untersuchten Mausmodellen konnte die Frage nach der physiologischen Funktion von Calcitonin nicht hinreichend geklärt werden. Um einen Zugang zu dem Wirkmechanismus von Calcitonin zu bekommen und um die Möglichkeit einer zentralen Regulation weitergehend zu überprüfen, sollte ein Defizienz-Modell für den Calcitoninrezeptor generiert werden. Da die komplette Deletion des Calcitoninrezeptors zu embryonaler Letalität führt (Dacquin et al., 2004), wurde die Strategie des „Cre/LoxP-Systems“ (Gu et al., 1994) gewählt, um die Expression des Calcitoninrezeptors nur zellspezifisch zu unterbinden. Insbesondere sollte geprüft werden, ob eine zentrale Regulation über den Hypothalamus erfolgt, da der Rezeptor dort stark exprimiert wird.

Unter Anwendung der im Abschnitt 5 beschriebenen Methoden wurde das Konstrukt für die Generierung konditional Calcitoninrezeptor-defizienter Mäuse hergestellt. In der Arbeitsgruppe existierte bereits das Plasmid pBS, in das das genomische Fragment der Exons 5 bis 8a des murinen Calcitoninrezeptors über BamH I-Enzymschnittstellen eingefügt worden war. Das DNA-Fragment stammte ursprünglich aus dem BAC (*bacterial artificial chromosome*) RP24-370 P17 mit der vollständigen genomischen Sequenz des murinen Calcitoninrezeptors.

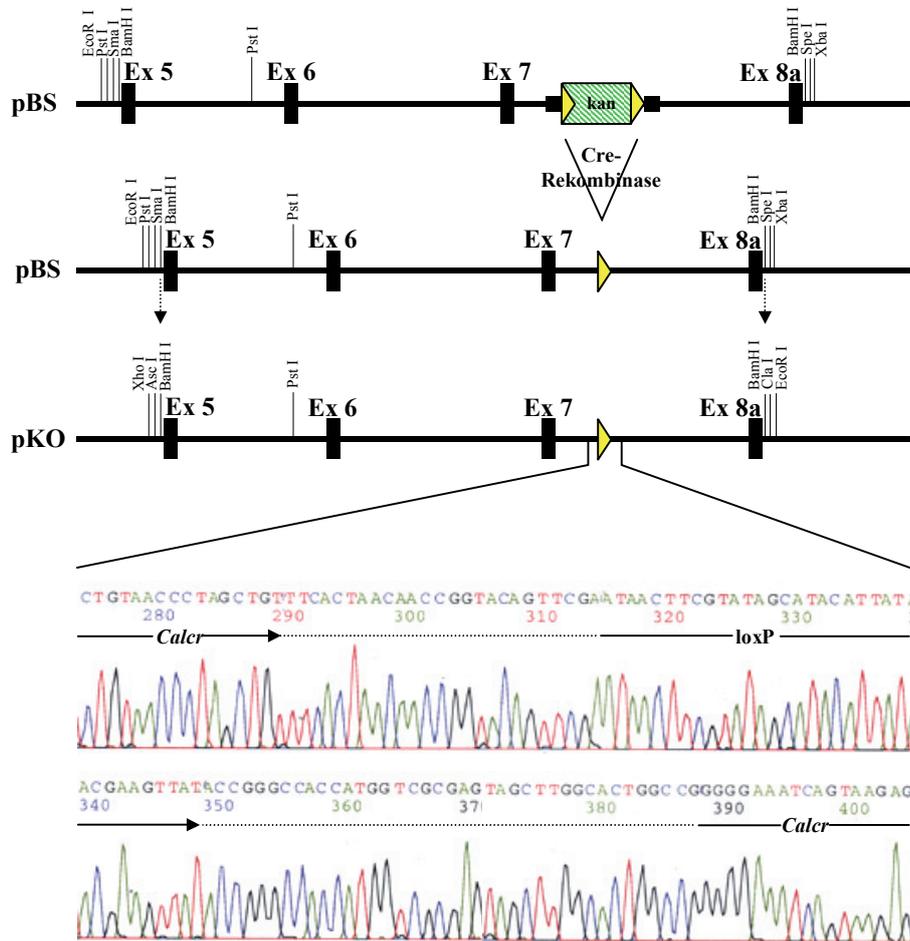
Als weiteres Plasmid existierte bereits ein Abkömmling von pCRII-TOPO mit einer von zwei „loxP-sites“ flankierten („geflochten“) Kanamycin-Kassette aus dem Plasmid pKaX1, flankiert von homologen Sequenzen zu Intron 7 des Calcitoninrezeptor-Gens (Abb.6.7.1, oben re).

Diese beiden Plasmide wurden zusammen mit dem Plasmid pSC101-BAD-gbaA<sup>tet</sup> in *E.coli* (Gene Hogs<sup>®</sup> Cells, INVITROGEN #C8080) kotransfiziert, um durch Red<sup>®</sup>/ET<sup>®</sup> Rekombination (ZHANG ET AL., 1998) (GENE BRIDGES) die geflochte Kanamycin-Kassette zwischen die Exons 7 und 8a des Calcitoninrezeptor-Gens einzufügen (Abb. 6.7.1).



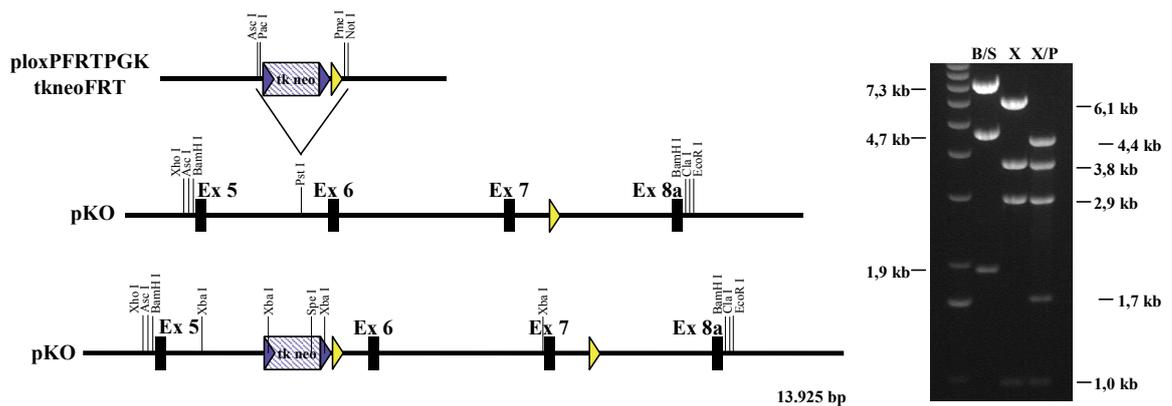
**Abb. 6.7.1: Klonierung des Konstrukts zur Generierung konditional Calcitoninrezeptor-defizienter Mäuse.** Insertion einer von „loxP sites“ flankierten (geflochten) Kanamycin-Kassette zwischen Exon 7 und Exon 8 des Calcitoninrezeptors durch Red/ET-Rekombination. Über homologe Sequenzen (Homologiearme) und mithilfe des pSC101-BAD-gbaA<sup>tet</sup>-Plasmids kann die geflochte Kanamycin-Kassette in die Rezeptor-DNA integriert werden. Die Integration in die Rezeptor-DNA in dem Plasmid pBS wurde durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen BamHI und EcoRI überprüft. Links neben den verdauten Plasmiden wurde jeweils das unverdaute Plasmid aufgetragen. Nur die Bandengröße der Plasmid-DNA Nr.4 entspricht der erwarteten Bandengröße nach Insertion der Kanamycin-Kassette für beide Restriktionsenzyme (\*).

Anschließend wurde durch Cre-Rekombination die Kanamycin-Kassette wieder ausgeschnitten, so dass nur noch eine „LoxP-site“ zwischen den Exons verblieb (Abb. 6.7.2). Im nächsten Schritt wurde das gesamte Konstrukt mit dem Enzym BamH I ausgeschnitten und in den Vektor pKO kloniert (Abb. 6.7.2).



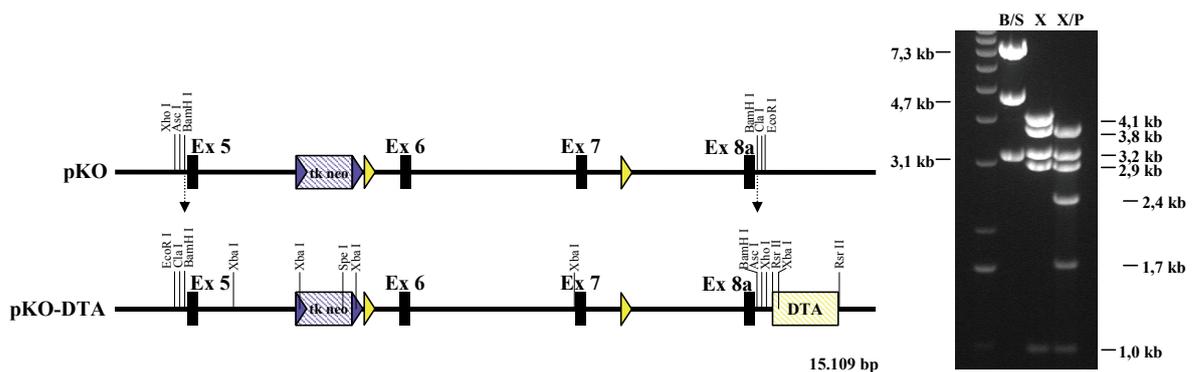
**Abb. 6.7.2: Klonierung des Konstrukts zur Generierung konditional Calcitoninrezeptor-defizienter Mäuse.** Exzision der Kanamycin-Kassette zwischen Exon 7 und Exon 8 der *Calcr*-DNA durch Cre-Rekombination. Die Cre-Rekombinase fügt die Sequenzen zweier „loxP-sites“ so zusammen, dass eine neue „loxP-site“ entsteht. Dadurch wird die Sequenz zwischen den ursprünglichen „loxP-sites“, in diesem Fall die Kanamycin-Kassette, exzidiert. Nach der Cre-Rekombination wurde das BamH I-Fragment aus dem Plasmid pBS in den Vektor pKO umklontiert. Unter dem Schema ist die Sequenz nach Cre-Rekombination abgebildet. Die beiden unbeschrifteten Sequenzabschnitte stammen aus dem ursprünglichen Plasmid der Kanamycin-Kassette pKAX.

Die zweite „LoxP-site“ und eine von „Frt-sites“ flankierte Neomycinkassette stammten aus dem Plasmid ploxPFRTPGKtkneoFRT, das uns freundlicherweise von Herrn Prof. Schütz (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurde. Sie wurden mit den Enzymen Not I und Asc I ausgeschnitten und „blunt-end“ in eine native Pst-Schnittstelle zwischen Exon 5 und Exon 6 des Konstruktes eingefügt (Abb. 6.7.3).



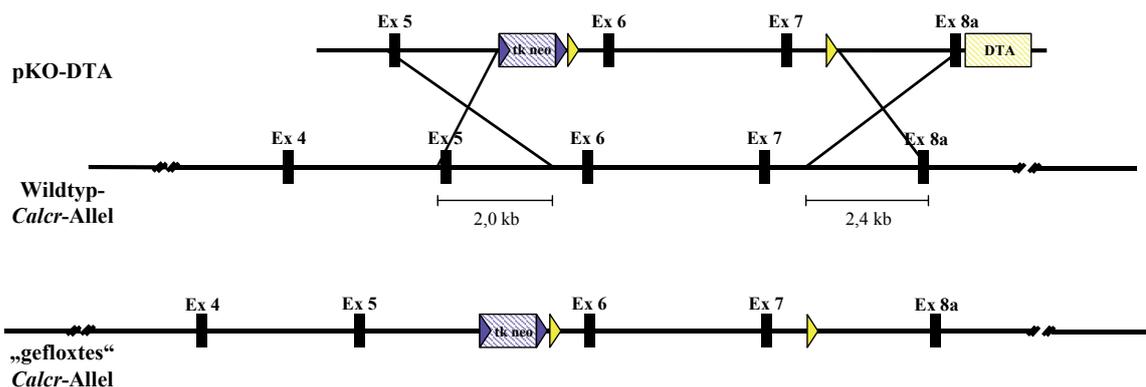
**Abb. 6.7.3: Klonierung des Konstrukts zur Generierung konditional Calcitoninrezeptor-defizienter Mäuse.** Einfügen einer von “frit-sites” flankierten Neomycin-Kassette und einer assoziierten “loxP-site” zwischen Exon 5 und Exon 6. Die Neomycin-Kassette wurde aus dem Plasmid ploxPFRTPGKtkneoFRT mit den Restriktionsenzymen AscI und NotI ausgeschnitten. Die Enden des Fragments wurden geglättet und “blunt-end” in das Konstrukt an der PstI-Schnittstelle zwischen Exon 5 und Exon 6 eingefügt. Neben dem Schema ist der Verdau nach Insertion der Neomycin-Kassette gezeigt. Die Bandengrößen links neben dem Bild entsprechen der Größe nach einem Doppelverdau mit BamHI und SpeI (B/S). Die Größenangaben rechts neben dem Bild geben die erwarteten Bandengrößen nach Verdau mit XbaI (X) bzw. XbaI und PstI (X/P) wieder.

Im letzten Schritt wurde das Konstrukt mit BamHI aus dem Plasmid pKO ausgeschnitten und in den eukaryotischen Expressionsvektor pKO-DTA eingefügt, dessen DTA-Kassette für das Diphtherietoxin A kodiert (Abb. 6.7.4).



**Abb. 6.7.4: Klonierung des Konstrukts zur Generierung konditional Calcitoninrezeptor-defizienter Mäuse.** Exzision des gesamten Konstrukts mit dem Restriktionsenzym BamHI aus dem Vektor pKO und Insertion in den Vektor pKO-DTA. Rechts ist ein Verdau nach Klonierung des Konstrukts in den Vektor pKO-DTA gezeigt. Die Bandengrößen links neben dem Bild entsprechen der Größe nach einem Doppelverdau mit BamHI und SpeI (B/S). Die Größenangaben rechts neben dem Bild geben die erwarteten Bandengrößen nach Verdau mit XbaI (X) bzw. XbaI und PstI (X/P) wieder. Zur Generierung konditional Calcitoninrezeptor-defizienter Mäuse wurde das Konstrukt mit PvuII linearisiert und in ES-Zellen eingebracht.

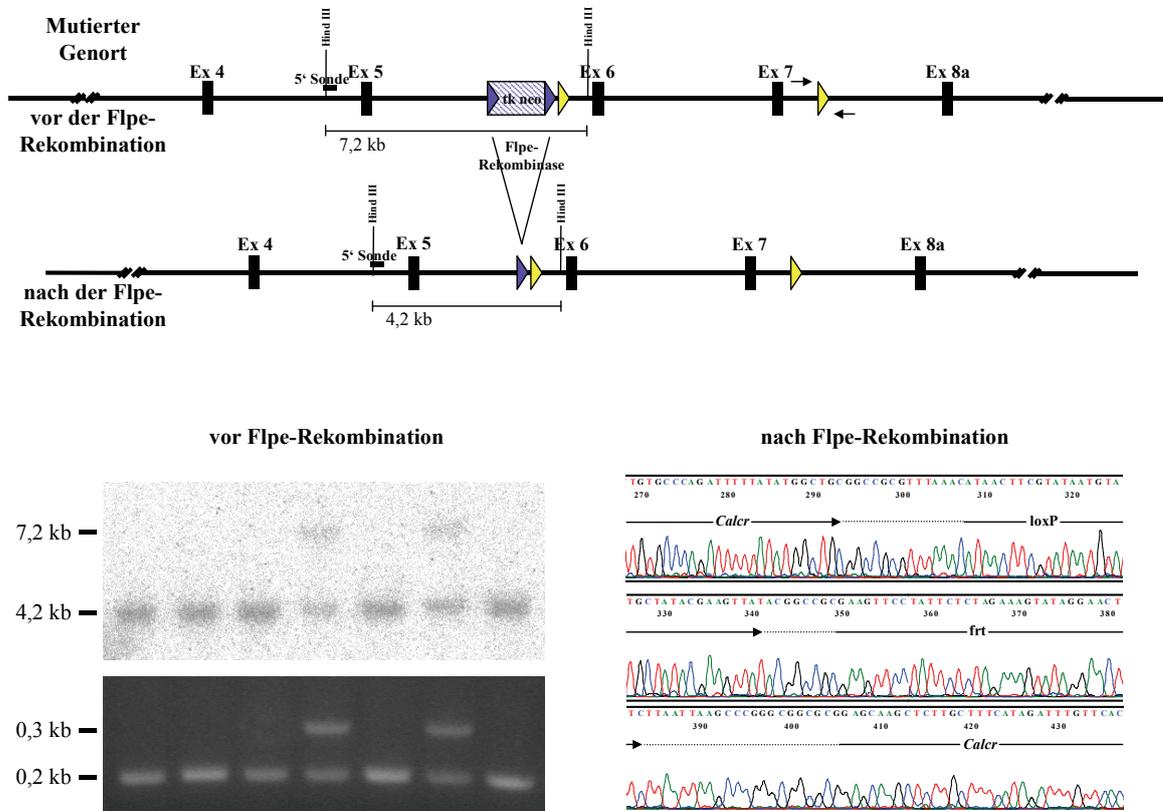
Das fertige Konstrukt (Abb. 6.7.5, oben) wurde durch Elektroporation in ES-Zellen der Mauslinie 129 SvJ eingebracht und enthielt als Selektionsmarker eine Neomycin- und eine DTA-Kassette. Durch Antibiotikum-Selektion konnten diejenigen Zellklone mit erfolgter Integration des Konstruktes in das Genom (mit der Neomycin-Kassette *tkneo*) von denjenigen unterschieden werden, bei denen keine Integration stattgefunden hat (ohne *tkneo*). Das Gen für das Diphterietoxin A befindet sich außerhalb der Region, in der eine homologe Rekombination stattfinden kann. Seine Expression führt zum Zelltod und ermöglicht so, Zellklone, bei denen das Konstrukt durch homologe Rekombination in das Genom integriert wurde von jenen zu unterscheiden, bei denen das Konstrukt auf andere Weise ins Genom integriert worden ist. Nach homologer Rekombination in den beiden homologen Sequenzbereichen von 2,0 und 2,4 kb Länge sollten letztlich am mutierten Genort die Exons 6 und 7 von „loxP-sites“ flankiert sein (Abb. 6.7.5, unten).



**Abb. 6.7.5:** Schema für die homologe Rekombination des Konstrukts mit dem Wildtyp-Allel für die Generierung konditional Calcitoninrezeptor-defizienter Mäuse. Die Bereiche, in denen eine homologe Rekombination stattfinden kann, sind mit Kreuzen gekennzeichnet. Unten ist der mutierte Genort nach erfolgter homologer Rekombination dargestellt. Blaue Dreiecke kennzeichnen „frt-sites“, gelbe Dreiecke „loxP-sites“.

Per Southernblot-Analyse und PCR wurden anschließend die Zellklone identifiziert, bei denen eine Integration des Konstrukts durch homologe Rekombination erfolgt war (Abb. 6.7.6, unten links). Bevor diese Zellklone in Blastozysten injiziert wurden, wurde die Neomycin-Kassette, die von zwei „frt-sites“ flankiert war (Abb. 6.7.6, blaue Dreiecke), mit Hilfe der Flpe-Rekombinase (Rodriguez et al., 2000) wieder aus dem Sequenzabschnitt entfernt. Dazu mussten die ES-Zellen erneut elektroporiert werden, um das Gen für die Flpe-Rekombinase (Plasmid pCAGGS-Flpe) in die Zellen einzuschleusen. Die Klone, bei denen das Neomycin-Resistenz-Gen durch Flpe-Rekombination entfernt worden war, wurden

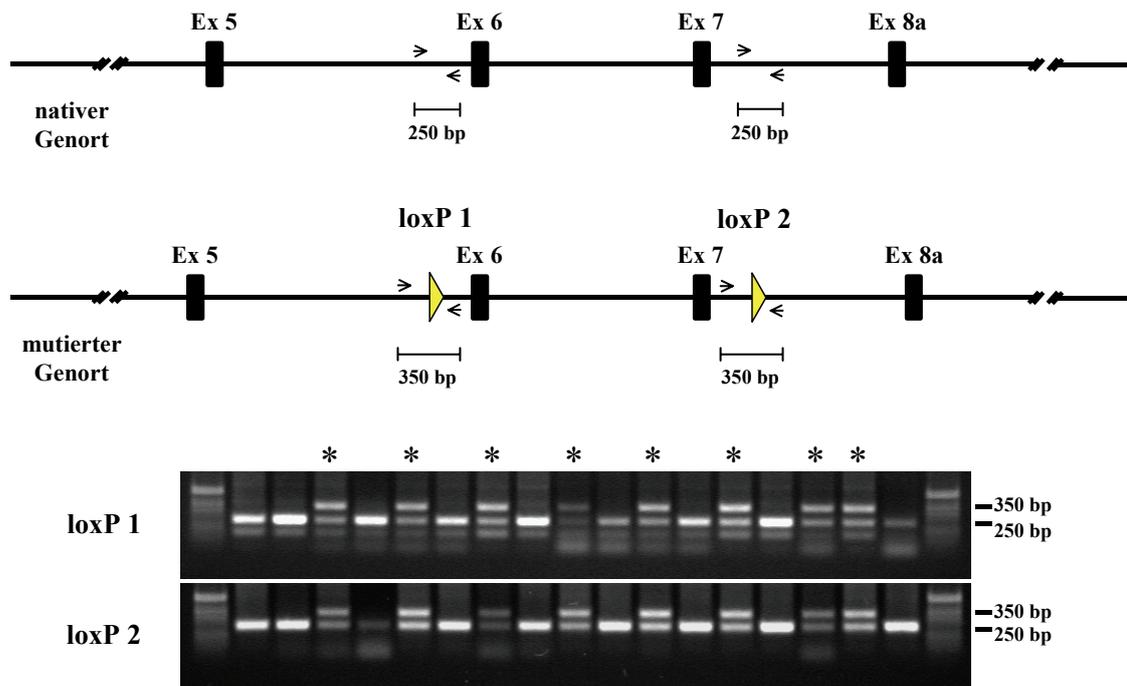
wiederum per Southernblot-Analyse identifiziert und die Rekombination durch Sequenz-Analyse überprüft (Abb. 6.7.6, unten rechts).



**Abb. 6.7.6: Generierung konditional Calcitoninrezeptor-defizienter Mäuse.** Das obere Schema zeigt den mutierten Genort nach homologer Rekombination mit dem Konstrukt. Die ES-Zellklone, bei denen eine homologe Rekombination stattgefunden hat, wurden per Southernblot und per PCR ermittelt (links unten). Beim Southern-Blot ergeben sich Bandengrößen von 4,2 kb (Wildtyp-Allel) und 7,2 kb (mutierter Genort) nach HindIII-Restriktion. Die Primer für die PCR sind so gewählt, dass sie 5' und 3' der "loxP-site" zwischen Exon 7 und 8 binden (Pfeile). Daraus ergeben sich Bandengrößen von 0,2 kb für das Wildtyp-Allel bzw. 0,3 kb für den mutierten Genort. Bei den Klonen mit einer Doppelbande hat eine Integration des Konstrukts durch homologe Rekombination stattgefunden. In einem nächsten Schritt sollte bei diesen Klonen die Kanamycin-Kassette durch Flpe-Rekombination entfernt werden. Die Klone mit erfolgter Flpe-Rekombination wurden wiederum per Southern-Blot identifiziert. Außerdem wurde die Entfernung der Kanamycin-Kassette durch eine Sequenzierung des DNA-Abschnitts bestätigt (Abb. unten rechts in reverser Orientierung). Die unbeschrifteten DNA-Abschnitte stammen aus dem Ursprungs-Vektor der geflochtenen Kanamycin-Kassette p37. Die so identifizierten Klone wurden für die Blastozysten-Injektion verwendet.

Zwei der so ermittelten Zellklone wurden in Blastozysten injiziert, und diese wurden in „scheinschwangere Leihmütter“ reimplantiert. Die Injektion und Reimplantation wurde am ZMNH von Frau Dr. PD Hermans-Borgmeyer und Tina Mordhorst durchgeführt. Von den

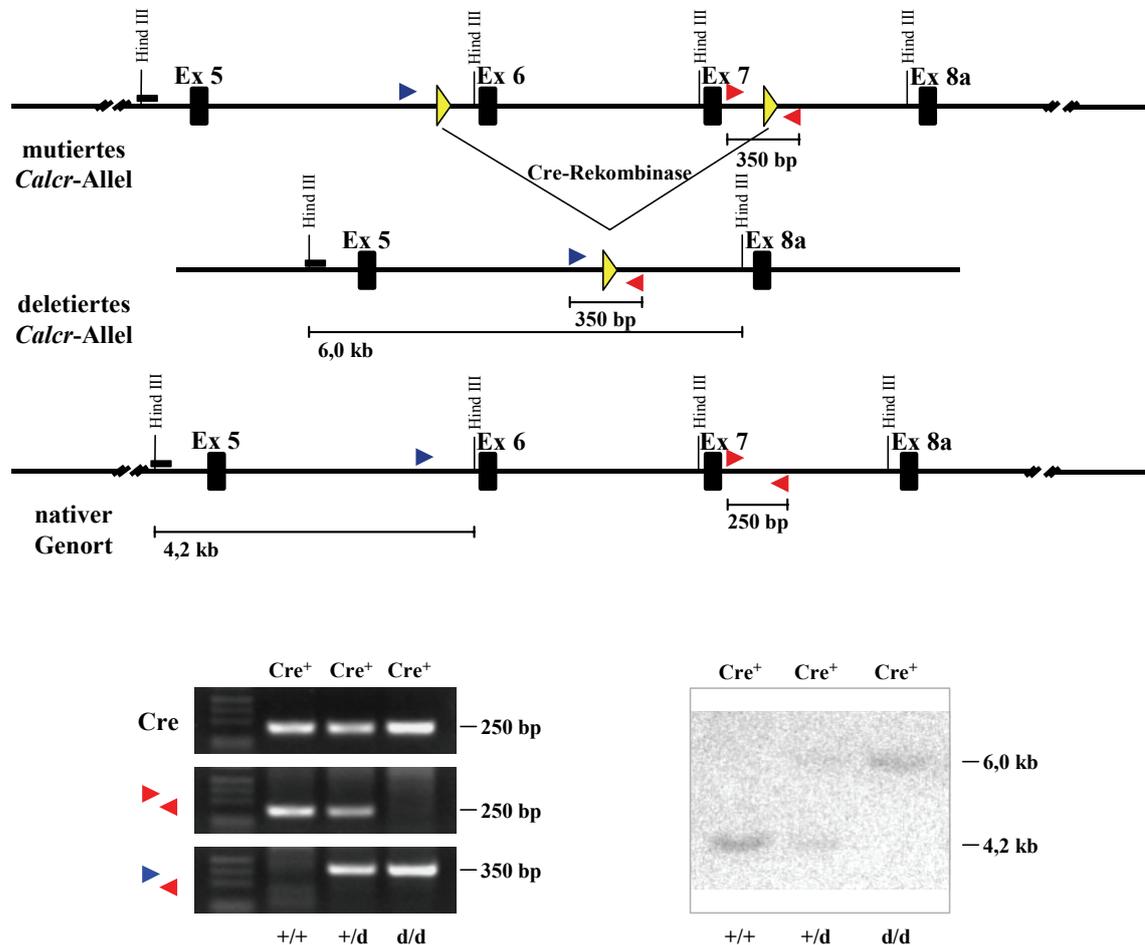
Nachkommen der beiden Mütter wurden jeweils die 80-90% chimären männlichen Nachkommen mit Wildtyp-Weibchen der Linie C57BL/6 verpaart und die Nachkommen auf Keimbahntransmission getestet. Dazu wurden zwei PCRs mit Primern jeweils 5' und 3' der „loxP-sites“ durchgeführt. Heterozygote Nachkommen mit einem genetisch veränderten Allel zeigten eine Doppelbande in der PCR (Abb. 6.7.7, \*).



**Abb. 6.7.7: Identifizierung heterozygoter Nachkommen mit einem Wildtyp-*Calcr*-Allel und einem „gefloxt“ *Calcr*-Allel.** 80-90% chimäre Männchen, die aus der Blastozysten-Injektion und -Reimplantation hervorgegangen sind, wurden mit Wildtyp-Weibchen verpaart. Bei einer Keimbahntransmission werden in der F1-Generation sowohl Wildtyp-Tiere als auch heterozygote Nachkommen erzeugt. Die Genotypisierung erfolgte per PCR. **Oben:** Nativer und mutierter Genort. Beim mutierten Genort sind die Exons 6 und 7 von „loxP-sites“ flankiert. Die Pfeile markieren die Primer. **Unten:** PCR über die „loxP-site1“ bzw. „loxP-site2“. Die Sterne zeigen heterozygote Nachkommen, die sowohl eine PCR-Bande für das Wildtyp-Allel haben (250 bp) als auch eine für das genetisch veränderte (350 bp).

Es konnten zwei Mauslinien, KD-CTR-G2 und KD-CTR-F6, etabliert werden, bei denen eine Keimbahntransmission erfolgt ist. Um den Erfolg dieser Strategie zu überprüfen, wurden Mäuse beider Linien zunächst mit Mäusen verpaart, die die Cre-Rekombinase ubiquitär, d.h. in allen Zellen exprimieren. Unsere Erwartung war, dass in der Generation F2 keine lebenden, *Calcr*-defizienten Nachkommen nachweisbar sein sollten, da für die komplette Deletion des Calcitoninrezeptors zuvor embryonale Letalität beschrieben worden war. Unerwarteterweise konnten bei der Genotypisierung jedoch auch  $Cre^{ubi}/Calcr^{flox/flox}$  Mäuse identifiziert werden,

bei denen in allen Geweben eine Deletion des Calcitoninrezeptors erfolgt sein sollte (Abb. 6.7.8 unten, jeweils ganz rechts in der PCR, bzw. im Southern-Blot)



**Abb. 6.7.8: Genotypisierung von Nachkommen aus der Verpaarung von Mäusen mit „gefloxten“ *Calcr*-Allelen mit Mäusen, die die Cre-Rekombinase ubiquitär exprimieren. Oben:** Schema der möglichen Genorte. Die blauen und roten Dreiecke markieren drei verschiedene Primer für die PCR. Nur, wenn die Exons 6 und 7 durch Cre-Rekombination aus dem CTR-Gen entfernt wurden, kann mit dem vorwärts gerichteten blauen Primer und dem rückwärts gerichteten roten Primer ein 350 bp großes DNA-Fragment amplifiziert werden. Mit der Deletion der Exons 6 und 7 werden auch zwei Schnittstellen für das Restriktionsenzym Hind III aus dem CTR-Gen entfernt. Dadurch verlängert sich das DNA-Fragment, an das die Southern-Blot Sonde bindet (kleiner schwarzer Balken) von 4,2 kb auf 6,0 kb. **Unten:** links ist eine PCR für ubiquitär Cre-exprimierende Mäuse mit dem Genotyp +/+, +/d und d/d gezeigt, rechts ist der Southern-Blot der entsprechenden Mäuse dargestellt.

Die  $Cre^{ubi}/Calcr^{flox/flox}$ -Mäuse (Abb. 6.7.9, oben) sind äußerlich und in ihrem Verhalten nicht von ihren Geschwistertieren zu unterscheiden. Erste Knochenhistologien im Alter von 3 Monaten deuten darauf hin, dass die Abwesenheit des Calcitoninrezeptors, entsprechend dem Fehlen von Calcitonin, zu einem erhöhten Knochenvolumen führt (Abb. 6.7.9, unten). Ob der

Unterschied signifikant zum Wildtyp ist, konnte wegen der geringen Tierzahl bisher noch nicht geklärt werden.



**Abb. 6.7.9:** Calcitoninrezeptor-defiziente Maus mit einem Wildtyp-Geschwistertier im Alter von 2 Wochen und unentkalkte Schnitte von Lendenwirbelkörpern entsprechender Mäuse im Alter von 3 Monaten. **Oben:** Anders, als zuvor beschrieben, führt die komplette Deletion des Calcitoninrezeptors bei unserem Modell nicht zu einer embryonalen Letalität. Calcitoninrezeptor-defiziente Mäuse (*Cre<sup>ubi</sup>/Calcr<sup>flx/flx</sup>*) sind im Alter von 2 Wochen (Abb. re), wie auch mit 3 Monaten, nicht von Wildtyp-Geschwistertieren zu unterscheiden. **Unten:** In der unentkalkten Histologie von Lendenwirbeln erscheint das Knochenvolumen *Calcr*-defizienter Mäuse tendenziell größer als das der Wildtyp-Kontrollen. Aufgrund der geringen Tierzahl kann jedoch keine Aussage gemacht werden, ob der Unterschied statistisch signifikant ist.

Bestätigt sich die Tendenz eines erhöhten Knochenvolumens in Calcitoninrezeptor-defizienten Mäusen, wäre dies ein weiterer Hinweis auf einen direkten Einfluß von Calcitonin auch auf die Knochenformation.

## 7 DISKUSSION

### 7.1 Calcitonin und $\alpha$ -CGRP haben unterschiedliche Funktionen im Knochenumbau

Die beiden Peptide Calcitonin und  $\alpha$ -CGRP sind alternative Produkte des *Calca*-Gens. Sie werden gewebespezifisch exprimiert (Amara et al., 1982; Rosenfeld et al., 1983). Calcitonin wird hauptsächlich von den C-Zellen der Schilddrüse gebildet und wurde lange als hypokalzämisches Hormon beschrieben, das die osteoklastäre Knochenresorption hemmt (Sexton et al., 1999).  $\alpha$ -CGRP wird in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert und gilt als vasodilatatorisch (Kawasaki et al., 1988). Ob diese Funktionen tatsächlich eine physiologische Relevanz haben, ist umstritten, zumal das Fehlen der Peptide im Mausmodell nicht zu den erwarteten Phänotypen führt. *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse, denen sowohl Calcitonin als auch  $\alpha$ -CGRP fehlt, zeigen bis zum Alter von 6 Monaten keinen Knochenresorptions-Phänotyp. Stattdessen haben diese Mäuse eine erhöhte Knochenbildung (Hoff et al., 2002).  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäuse, denen nur  $\alpha$ -CGRP fehlt, haben ebenfalls nicht den erwarteten vaskulären Phänotyp (Lu et al., 1999).

Zusammenfassend zeigte ein direkter Vergleich des Knochenphänotyps beider Mausmodelle zu den drei Zeitpunkten von 6, 12 und 18 Monaten spezifische, aber unterschiedliche Funktionen der beiden Peptide für den Knochenumbau auf. *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse entwickeln einen progressiven Knochenumbau-Phänotyp, der zu allen Zeitpunkten durch eine erhöhte Knochenmasse gekennzeichnet ist, auch, nachdem im Alter zwischen 6 und 12 Monaten zusätzlich eine verstärkte Knochenresorption einsetzt. Hingegen entwickeln  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäuse eine Osteopenie. Somit hat Calcitonin vermutlich eine doppelte Funktion sowohl als Regulator der Knochenformation als auch der Knochenresorption, während  $\alpha$ -CGRP nur die Knochenformation reguliert. Die Funktion der beiden Peptide für den Knochenumbau scheint spezifisch und somit, zumindest in der Maus, physiologisch relevant zu sein.

### 7.2 Säugetier-Calcitonin als Inhibitor der Knochenresorption

In *in vivo*-Studien konnte unter Verwendung pharmakologischer Dosen von Calcitonin wiederholt gezeigt werden, dass die Bindung von Calcitonin an seinen osteoklastären Rezeptor eine Signalkaskade auslöst, die zu einer Inhibition der Resorptionsaktivität von Osteoklasten führt (Nicholson et al., 1986; Su et al., 1992). Bislang gab es jedoch keinen Hinweis, dass dieser Mechanismus auch unter normalen physiologischen Bedingungen von Bedeutung ist. Es ist überraschend, dass stark veränderte Konzentrationen von endogenem Calcitonin, wie nach der Entfernung der Schilddrüse oder beim medullären Schilddrüsenkarzinom, keinen Einfluss auf die Knochendichte beim Menschen haben (Wuster

et al., 1992; Hurley et al., 1987). Ebenso unklar ist, warum Calcitonin zwar bei Patienten mit einem verstärkten Knochenumbau, wie z.B. bei der Paget-Erkrankung, meistens hypokalzämisch wirkt, aber bei gesunden Menschen in der Regel keinen Einfluß auf den Serumkalziumspiegel hat (Gnaedinger et al., 1989). Diese Beobachtungen haben einige Forscher sogar zu der Spekulation veranlasst, dass Calcitonin möglicherweise gar keine physiologische Funktion hat (Deftos, 1997; Hirsch et al., 2001; Hirsch & Baruch, 2003; Hoff et al., 2002).

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Abwesenheit von Calcitonin in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen doch, aber erst in einem Alter zwischen 6 und 12 Monaten, zu der erwarteten, verstärkten Knochenresorption führt. Somit scheint Calcitonin in der Tat ein Inhibitor der osteoklastären Knochenresorption, zumindest in der Maus, zu sein. Obwohl die verstärkte Resorption erst im Alter zwischen 6 und 12 Monaten auftritt, gibt es keine Hinweise, dass die Resorption auf einen sekundären Mechanismus, wie z.B. erhöhte PTH-Spiegel, zurückzuführen ist. Auch durch die leicht erhöhten Östradiol-Serumkonzentration und die erniedrigten Serumspiegel für RANKL im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren kann die erhöhte Knochenresorption nicht erklärt werden. Die histologische Untersuchung anderer Organe ergab ebenfalls keine auffallenden Befunde. Die erhöhte Anzahl und Leistung der Osteoklasten in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen ist somit vermutlich auf einen direkten Mechanismus zurückzuführen. Da in den  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäusen die Osteoklastendifferenzierung und -funktion normal ist, kann ein Effekt auf die Knochenresorption durch das Fehlen von  $\alpha$ -CGRP ebenfalls ausgeschlossen werden.

### 7.3 Säugetier-Calcitonin als Inhibitor der Knochenformation

Eine weitere Funktion von Calcitonin in der Maus scheint die Inhibition der Knochenformation zu sein. Obwohl in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen die Osteoblastenzahl nicht verändert ist, ist die Knochenformation zu allen untersuchten Zeitpunkten signifikant erhöht. Schon im Alter von drei Monaten, wenn die Knochenresorption noch unverändert ist, ist die Knochenformation gesteigert (Hoff et al., 2002). Erstaunlich ist, dass der Einfluß der erhöhten Knochenformation auf die Knochendichte auch noch im Alter von 12 Monaten überwiegt, obwohl zu diesem Zeitpunkt die Anzahl der Osteoklasten viermal höher ist als in den Wildtyp-Kontrolltieren und obwohl diesen Mäusen auch  $\alpha$ -CGRP fehlt, was zu einer erniedrigten Knochenbildung führen sollte.

Dies spricht für eine entscheidende physiologische Rolle von Calcitonin als Regulator der Knochenformation. Allerdings ist diese Funktion auf molekularer Ebene nicht einfach

nachzuvollziehen, da die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, wie auch unsere eigenen Ergebnisse (nicht gezeigt) keine Expression eines Calcitoninrezeptors in Osteoblasten nachweisen konnten, was auf einen indirekten Mechanismus hindeutet. Möglicherweise ist in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen ein anderes, bislang nicht identifiziertes Gen, differenziell exprimiert und verursacht die erhöhte Knochenformation. Dieses Gen könnte das für  $\beta$ -CGRP kodierende *Calcb*-Gen sein (siehe Ergebnisse 6.5). Vorstellbar wäre aber auch ein sekundärer Mechanismus über andere Organe, in denen der Calcitoninrezeptor exprimiert wird. Besonders interessant erscheint in diesem Zusammenhang der Hypothalamus, da der Rezeptor dort stark exprimiert wird und da nachgewiesen werden konnte, dass mehrere Kerne des Hypothalamus in eine zentrale Regulation der Knochenformation involviert sind (Ducy et al., 2000). Auszuschließen ist aber auch nicht, dass Calcitonin in Osteoblasten an einen noch nicht identifizierten Rezeptor bindet und die Knochenformation direkt moduliert.

Diese Fragen lassen sich am besten durch die zelltypspezifische Inaktivierung des Calcitoninrezeptors beantworten, die durch die Herstellung eines Mausmodells mit „geflochten“ *Calcr*-Allelen ermöglicht wurde (siehe Ergebnisse 6.7).

#### **7.4 Calcitonin als Protektor des Knochens bei „hormonellem Stress“**

Unklar ist noch, weshalb bei *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen die verstärkte Knochenresorption zeitlich versetzt zu der erhöhten Knochenformation einsetzt. Während die Knochenformation schon im Alter von drei Monaten signifikant erhöht ist, tritt die verstärkte Knochenresorption erst im Alter zwischen 6 und 12 Monaten auf. Da der Zeitpunkt mit dem Einsetzen des Klimakteriums der Maus korreliert, könnte die damit einhergehende hormonelle Veränderung möglicherweise initialer Auslöser für die erhöhte Osteoklastenaktivität sein. Durch Hormonkonzentrationsbestimmungen im Serum, wie in der vorliegenden Arbeit, ist eine Konzentrationsänderung im zeitlichen Verlauf als Auslöser schwer zu erfassen, da die Wildtyp-Tiere gleichermaßen betroffen sind. Die Kopplung einer Calcitonin-abhängigen Knochenresorption an menopausale Hormonkonzentrationschwankungen, wie z.B. von Östrogen oder FSH, würde zu der Beobachtung passen, dass der *Calca*<sup>-/-</sup>-Phänotyp bei Männchen deutlich schwächer ausgeprägt ist.

Zwei weitere Untersuchungsergebnisse in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen deuten darauf hin, dass Calcitonin insbesondere bei starken hormonellen Schwankungen eine wichtige Funktion im Knochen hat: 1.) PTH-Administration führt in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen zu einem vorübergehenden Anstieg der Serumkalzium-Konzentration durch verstärkte Knochenresorption, während eine vergleichbare PTH-Administration bei Wildtyptieren keinen Einfluß auf die Serumkalzium-

Konzentration hat (Hoff et al., 2002). Der Effekt kann durch gleichzeitige Gabe von Calcitonin aufgehoben werden. 2.) Calcitonin soll eine entscheidende knochenprotektive Funktion bei der Laktation haben. Laut einer Studie von Woodrow et al. verlieren *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse während der Säugephase, in der der vermehrte Calciumbedarf vorübergehend durch verstärkte Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung aus dem Knochen gedeckt wird, doppelt so viel Knochenmineral wie die Geschwistertiere (Woodrow et al., 2006).

Diese Beobachtungen sprechen für eine protektive Rolle von Calcitonin für das Skelett insbesondere bei „hormonellem Stress“ und möglicherweise doch für einen sekundären Mechanismus als Auslöser für die verstärkte Knochenresorption in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen.

### 7.5 Fisch- und Säugetier-Calcitonin im Vergleich

Der Knochenphänotyp transgener ApoE-sCT-Mäuse entspricht dem erwarteten Effekt von Lachs-Calcitonin. Lachs-Calcitonin hemmt im Säugetier, wie auch in unserem Mausmodell, nur die Knochenresorption, aber nicht die Knochenformation und wirkt deshalb knochenanabol. Im Alter von 6 Monaten ist die Anzahl der Osteoklasten bezogen auf die Knochenoberfläche in transgenen ApoE-sCT-Mäusen um 40% niedriger als in den Wildtyp-Geschwistertieren. Ähnlich wie Lachs-Calcitonin auf Osteoklasten *in vitro* inhibitorisch wirkt (Hunter et al., 1989; Gravel et al., 1994; Zheng et al., 1994; Berry et al., 1994), führt Lachs-Calcitonin vermutlich auch in diesem Mausmodell zu einem partiellen Funktionsverlust der Osteoklasten. Möglicherweise wird dadurch vorzeitig eine Apoptose der Osteoklasten ausgelöst, sodass nicht nur ihre Resorptionsleistung, sondern auch ihre Anzahl reduziert ist. Auf die Funktion und Zahl der Osteoblasten hat Lachs-Calcitonin hingegen keinen Einfluß.

Das Ausbleiben morphologischer Veränderungen im Knochen transgener Mäuse, die Maus-Calcitonin überexprimieren war hingegen nicht zu erwarten. Ausgehend von dem schweren Knochenphänotyp der *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse, der unabhängig vom Fehlen von  $\alpha$ -CGRP ist, hätte eine Überexpression von Maus-Calcitonin zu einem verminderten Knochenumbau mit einem geringeren Knochenvolumen führen sollen. Das Ausbleiben eines Knochenphänotyps sowohl bei den transgenen ApoE-mCT-Mäusen als auch bei den transgenen RET-MEN2A-Mäusen entspricht jedoch der klinischen Beobachtung, dass auch beim Menschen ein Überschuß an Calcitonin, wie bei einem medullären Schilddrüsenkarzinom, nicht unbedingt in einer veränderten Knochendichte resultiert.

Die unterschiedlichen Effekte der beiden Calcitonin-Spezies lassen sich nicht allein durch die mehrfach beschriebene unterschiedliche Stabilität und Potenz der beiden Peptide erklären (Houssami et al., 1995; Hilton et al., 2000). Lachs-Calcitonin ist murinem und auch humanem

Calcitonin auf Aminosäuren-Ebene nur zu 50 % homolog (siehe Einleitung, Tabelle 3.4.1). Somit ist es nicht überraschend, dass offensichtlich auch ihre Funktion unterschiedlich ist, zumal vermutet wird, dass Lachs-Calcitonin eine wichtige Funktion bei der Anpassung von Süß- zu Salzwasser hat, wenn die Fische nach Verlassen der Laichplätze von den Flüssen in das Meer ziehen. Eine solche Funktion erscheint bei einem Land-Säugetier fraglich. Als Erklärung für das Ausbleiben einer Wirkung von Säugetier-Calcitonin wird manchmal das „*Escape phenomenon*“, der Rückgang der Calcitoninrezeptoren bei Langzeitbehandlung mit Calcitonin, genannt (Ikegame et al., 1996). Diesen Effekt haben wir bei unseren transgenen Mausmodellen nicht untersucht, und er ist somit nicht ausgeschlossen, allerdings spricht der mit dem Alter zunehmende Phänotyp transgener ApoE-sCT-Mäuse gegen ein solches Phänomen. Denkbar wäre vielmehr, dass Calcitonin im Säugetier nur unter besonderen Umständen, wie bei einem gestörten Gleichgewicht von Knochenauf- und -abbau wie bei der Paget-Erkrankung oder bei „hormonellem Stress“ (siehe Diskussion 7.4) physiologisch bedeutend ist. Es ist erstaunlich, dass die Aktivität beider Peptide oftmals gleichgesetzt wurde, sodass in den Lehrbüchern sehr lange als physiologische Funktion von Säugetier-Calcitonin eine von der pharmakologischen Wirkung von Fisch-Calcitonin abgeleitete hypothetische Funktion beschrieben wurde. Während die Funktion von Calcitonin in vielen Lehrbüchern inzwischen kritisch behandelt wird „*Calcitonin inhibits osteoclasts, but it does not appear to be physiologically important in humans*“ (W.F. Boron, E.L. Boulpaep, *Medical Physiology*, updated edition, 2005), wird Calcitonin in anderen Lehrbüchern immer noch als wichtigster Gegenspieler zu Parathormon beschrieben „Der Knochenaufbau wird durch Calcitonin gehemmt, das die Osteoklasten dezimiert und deren Aktivität hemmt.“ (R.F. Schmidt, F. Lang, G. Thews, *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*, 29. Auflage, 2005). Die Mausmodelle zur Überexpression von Calcitonin haben anschaulich gezeigt, dass die Gleichsetzung der beiden Peptide Maus- und Lachs-Calcitonin nicht zulässig ist und eine physiologische Funktion von humanem Calcitonin unter normalen Umständen tatsächlich fraglich ist.

## 7.6 $\beta$ -CGRP als potentieller Regulator der Knochenformation

Würde die erhöhte Knochenformation in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen tatsächlich durch ein anderes differenziell exprimiertes Gen verursacht werden (siehe Diskussion 7.3), könnte nicht von dem Calcitonin-Defizienz-Phänotyp auf einen entgegengesetzten Phänotyp bei Calcitonin-Überexpression geschlossen werden. Wie die Microarray-Analyse vom Hypothalamus von Wildtyp- und *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen ergeben hat (Ergebnisse 6.5), wird das *Calcb*-Gen, das für  $\beta$ -

CGRP kodiert, spezifisch in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen in verschiedenen Geweben verstärkt exprimiert. Die zunächst angenommene Vermutung, dass  $\beta$ -CGRP infolge eines kompensatorischen Mechanismus auf Proteinebene anstelle von  $\alpha$ -CGRP gebildet wird, stellte sich als falsch heraus, da  $\beta$ -CGRP in  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäusen auf Wildtyp-Niveau exprimiert wird. Das Ausbleiben einer verstärkten Expression von  $\beta$ -CGRP in  $\alpha$ -CGRP<sup>-/-</sup>-Mäusen kann vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass in diesem Mausmodell die Synthese der  $\alpha$ -CGRP-mRNA normal erfolgt und nur die Translation von  $\alpha$ -CGRP spezifisch blockiert wird, während in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen schon die mRNA-Synthese von  $\alpha$ -CGRP unterbunden ist. Somit könnte die verstärkte  $\beta$ -CGRP-Expression in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen ein Weg sein, spezifisch den Mangel an  $\alpha$ -CGRP-mRNA zu kompensieren.

Über die Funktion von  $\beta$ -CGRP ist bislang wenig bekannt. Es ist nicht auszuschließen, dass der beobachtete Knochenphänotyp der *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse zumindest teilweise auf die verstärkte Expression von  $\beta$ -CGRP zurückzuführen ist, zumal der Array schon im Alter von 3 Monaten durchgeführt wurde, wo die Knochenresorption noch unbeeinflusst ist. Deshalb soll nun der Phänotyp  $\beta$ -CGRP-defizienter Mäuse untersucht werden, die uns bereits von Prof. Dr. Emeson zur Verfügung gestellt wurden.

### **7.7 Der Calcitoninrezeptor als Schlüssel zur Aufklärung der physiologischen Funktion von Calcitonin**

Um die physiologische Funktion eines Proteins zu identifizieren, besteht eine Möglichkeit in der Ausschaltung des Proteins selbst, um dann anhand von Mangelsymptomen auf die eigentliche Funktion zu schließen. Handelt es sich bei dem Protein um einen Liganden für einen Rezeptor, wie bei Calcitonin, ist eine andere Möglichkeit die Ausschaltung seines Rezeptors. Zu Beginn der Arbeit gab es bereits ein Maus-Defizienzmodell für den Calcitoninrezeptor. Tatsächlich haben heterozygote Tiere dieser Linie, übereinstimmend mit dem Knochenphänotyp von *Calca*-defizienten Mäusen, eine gesteigerte Knochenformationsrate. Die homozygoten Tiere versterben jedoch während der Embryonalentwicklung, weshalb postuliert wurde, dass der Calcitoninrezeptor aufgrund seiner offensichtlich essentiellen Rolle in der frühen Embryogenese neben Calcitonin noch andere bedeutende, bisher nicht identifizierte, Liganden hat (Dacquin et al., 2004).

Um die frühe Letalität der homozygot konstitutiv Calcitoninrezeptor-defizienten Mäuse zu umgehen, aber trotzdem über den Rezeptor einen Zugang zu dem knochenspezifischen Wirkmechanismus von Calcitonin zu bekommen, haben wir uns deshalb entschlossen, ein

Mausmodell mit „geflochten“ Calcitoninrezeptor-Allelen zu generieren, wodurch ermöglicht werden sollte, die Expression des Calcitoninrezeptors zellspezifisch zu unterbinden.

Bei der Generierung dieses Mausmodells wurden die „loxP-sites“, entsprechend dem konstitutiven Modell von Dacquin et al., so in das Konstrukt eingefügt, dass sie nach erfolgter homologer Rekombination am gentechnisch veränderten Genort die Exons 6 und 7 flankieren. In dem von der mRNA abgeleiteten Protein sollte dies zur Deletion der Region zwischen extrazellulärem N-Terminus und erster Transmembran-Domäne führen (siehe Einleitung Abb. 3.5.1). Mit dieser sehr weit aminoterminal im Protein gelegenen Exzision sollte zum einen verhindert werden, dass noch Teile des Rezeptors exprimiert werden, die eine Restaktivität verursachen können, zum anderen sollten mit dieser Strategie auch die Spleißvarianten des Rezeptors ausgeschaltet werden.

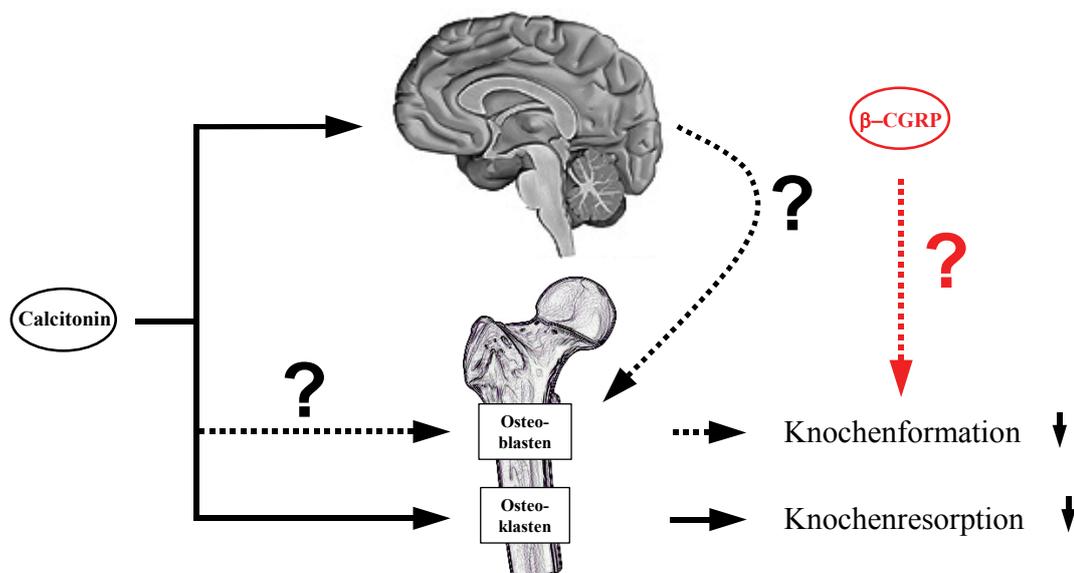
Zwei Linien (KD-CTR-F6 und -G2) konnten etabliert werden, bei denen die Exons 6 und 7 des Calcitoninrezeptors „geflocht“ vorliegen (*Calcr*<sup>flox/flox</sup>). Für diese Linien wurde nachgewiesen, dass die eingefügten „loxP-sites“ im Alter von 6 und 12 Monaten keinen Einfluss auf den Knochen haben (nicht gezeigt). Als Kontrolle unserer Generierungsstrategie wurden Mäuse beider Linien zunächst mit Mäusen verpaart, die die Cre-Rekombinase ubiquitär exprimieren. Unerwarteterweise konnten bei der Genotypisierung der Nachkommen in der F2-Generation Cre-positive Mäuse mit deletiertem Calcitoninrezeptor (*Cre*<sup>ubi</sup>/*Calcr*<sup>del/del</sup>) identifiziert werden, die dem als embryonal letal publizierten konstitutiven *Calcr*-Defizienz-Modell (Dacquin et al., 2004) entsprechen. Ebenso gibt es Cre-negative Tiere mit deletiertem Calcitoninrezeptor auf beiden Allelen (*Cre*<sup>-</sup>/*Calcr*<sup>del/del</sup>). Bei diesen Mäusen muß bei den Elterntieren die Cre-Exzision in der Keimbahn stattgefunden haben. Wäre der Cre-Promotor nicht 100%ig ubiquitär, wäre nicht auszuschließen, dass bei den *Cre*<sup>ubi</sup>/*Calcr*<sup>del/del</sup>-Mäusen vereinzelte Zellen noch den Calcitoninrezeptor exprimieren. Diese hypothetische Restexpression könnte möglicherweise erklären, weshalb die homozygoten Tiere unserer Linie nicht embryonal letal sind. Bei den *Cre*<sup>-</sup>/*Calcr*<sup>del/del</sup>-Tieren kann es diese Restexpression jedoch nicht geben. Da bewusst die gleichen Exons im *Calcr*-Gen ausgeschaltet worden sind, wie bei der Methode nach Daquin et al., lassen sich die Unterschiede in der Letalität schwer erklären. Möglicherweise ist die frühe Letalität auf die eingefügte Neomycin-Kassette zurückzuführen. Denkbar wäre es auch, dass die bei Daquin et al. zur Reimplantation verwendete ES-Zelle einen von der Klonierung unabhängigen Gen- oder Chromosomendefekt aufwies. Zumindest geht aus der Publikation nicht hervor, dass der Phänotyp in mehreren Mauslinien unabhängiger Zellklone zur Ausprägung kam. Dass die komplette Deletion des Calcitoninrezeptors nicht notwendigerweise zu einer embryonalen

---

Letalität führen muß, zeigt nun auch ein *Calcr*-Defizienz-Modell der Firma Deltagen (siehe Einleitung 3.6), das kürzlich veröffentlicht wurde. Der Phänotyp 7 Wochen alter *Calcr*-defizienter Tieren wird bislang als normal beschrieben. Unsere *Cre<sup>ubi</sup>/Calcr<sup>del/del</sup>*-Mäuse haben im Alter von 3 Monaten tendenziell ein erhöhtes trabekuläres Knochenvolumen, was allerdings mit einer größeren Anzahl von Mäusen bestätigt werden muß.

## 7.8 Ausblick

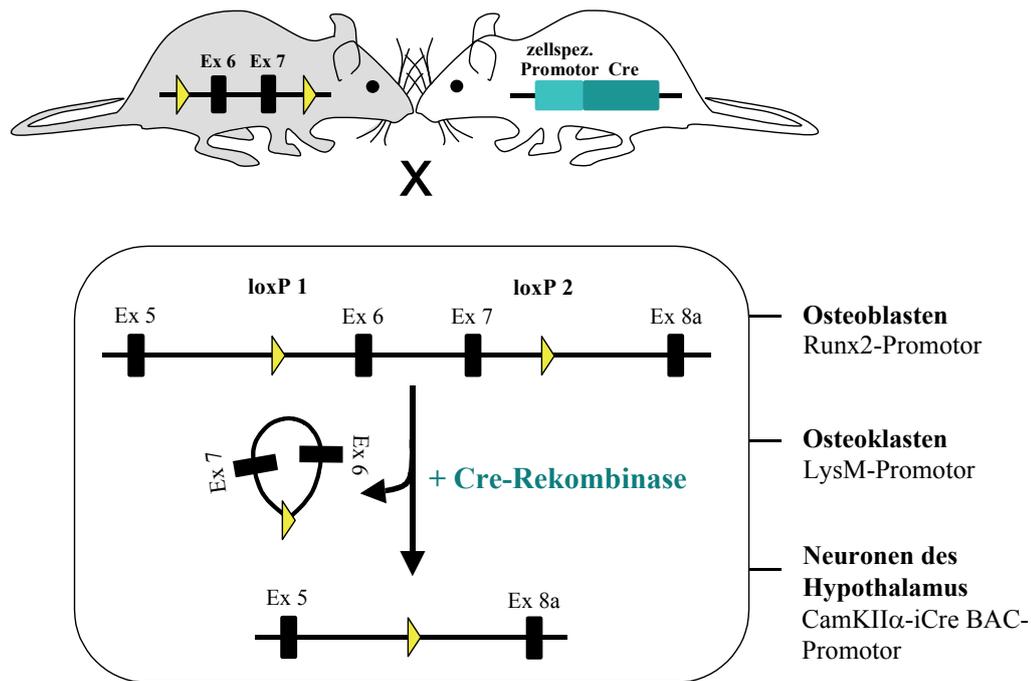
Aus den Ergebnissen der bisherigen Untersuchungen ergeben sich mehrere mögliche Wege, wie Calcitonin Einfluß auf den Knochenumbau nehmen kann. Dass Calcitonin die Knochenresorption direkt über Bindung an Calcitoninrezeptoren in der Osteoklastenmembran hemmen kann, ist unumstritten, wengleich die Umstände, unter denen dieser Mechanismus beim Menschen physiologisch relevant ist, noch nicht vollständig geklärt sind. Wie Calcitonin Einfluss auf die Knochenbildung nimmt, ist hingegen noch unklar. Calcitonin könnte seine Wirkung indirekt über Rezeptoren im Hypothalamus vermitteln, oder direkt über Rezeptoren in Osteoblasten, wobei osteoblastäre Calcitoninrezeptoren bislang nicht nachgewiesen werden konnten und dieser Weg somit unwahrscheinlich ist. Sollte die starke Zunahme der Knochenformation in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht auf das Fehlen von Calcitonin zurückzuführen sein, wäre auch eine Calcitonin-unabhängige Regulation möglich, wie beispielsweise über  $\beta$ -CGRP, dessen Expression spezifisch in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen induziert ist (Abb. 7.8.1).



**Abb. 7.8.1: Schema der von den Mausmodellen abgeleiteten physiologischen Funktionen von Calcitonin bzw.  $\beta$ -CGRP im Knochen.** Über osteoklastäre Calcitoninrezeptoren wirkt Calcitonin hemmend auf die Knochenresorption. Dieser pharmakologische Effekt scheint unter besonderen Umständen auch physiologisch relevant zu sein. Der *Calca*<sup>-/-</sup>-Phänotyp spricht auch für eine entscheidende Rolle von Calcitonin in der Knochenformation. Die Hemmung der Knochenformation könnte indirekt über Calcitoninrezeptoren im Hypothalamus erfolgen. Unwahrscheinlicher ist eine direkte Regulation über einen osteoblastären Rezeptor, da bislang kein Calcitoninrezeptor auf Osteoblasten nachgewiesen werden konnte. Denkbar ist auch eine Calcitonin-unabhängige Regulation der Knochenformation durch  $\beta$ -CGRP, dessen Expression in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen induziert ist.

Die hier aufgezeigten möglichen Regulationswege der Knochenresorption und vor allem der Knochenformation über Calcitonin bzw.  $\beta$ -CGRP sollen in Folgeprojekten durch zelltypspezifische Inaktivierung des Calcitoninrezeptors bzw. durch die Untersuchung  $\beta$ -CGRP-defizienter Mäuse untersucht werden. Da die publizierte embryonale Letalität homozygot Calcitoninrezeptor-defizienter Mäuse überraschenderweise in unserem Modell nicht zu beobachten war, sollen primär die konstitutiv Calcitoninrezeptor-defizienten Mäuse ( $Cre^{-}/Calcr^{del/del}$ ) analysiert werden. Ein wichtiger Schritt für die weitere Analyse der  $Calcr$ -defizienten Mäuse ist der Nachweis des Fehlens des Calcitoninrezeptors auch auf Proteinebene. Neben dem immunhistologischen Nachweis, der die Herstellung eines geeigneten spezifischen Antikörpers voraussetzt, werden wir versuchen, den funktionellen Verlust des Rezeptors darzustellen, indem wir transgene Mäuse der Linie ApoE-sCT mit  $Cre^{-}/Calcr^{del/del}$ -Mäusen verpaaren. Das Lachs-Calcitonin im Serum der Nachkommen sollte keine knochenanabole Wirkung zeigen. Parallel dazu könnte man an Osteoklastenkulturen von  $Cre^{-}/Calcr^{del/del}$ -Mäusen Calcitoninrezeptor-Bindungsassays mit  $^{125}I$ -markiertem Calcitonin durchführen. Ebenso ließe sich über cAMP-Bildung nach Rezeptorstimulation mit Lachs-Calcitonin zeigen, ob die erwarteten Unterschiede zwischen Wildtyp-Osteoklasten und  $Calcr$ -defizienten Osteoklasten bestehen.

Desweiteren wurden  $Calcr^{flox/flox}$ -Mäuse mit Mäusen verpaart, die Cre-Rekombinase unter einem Osteoblasten-spezifischen Promotor ( $Cre^{Runx2}$ ), unter einem Osteoklasten-spezifischen Promotor ( $Cre^{LysM}$ ) (Clausen et al., 1999) oder unter einem Hypothalamus-spezifischen Promotor ( $Cre^{CamK2a}$ ) (Casanova et al., 2001) exprimieren, um Nachkommen zu erhalten, deren Calcitoninrezeptor-Expression spezifisch in diesen Zellen unterbunden ist (Abb. 7.8.2). Osteoklasten exprimieren Calcitoninrezeptoren. Wenn eine entscheidende physiologische Funktion von Calcitonin direkt über den osteoklastären Rezeptor auf den Knochen ausgeübt wird, würde sich das anhand der  $Cre^{LysM}/Calcr^{flox/flox}$ -Mäuse möglicherweise darstellen lassen. Die  $Cre^{Runx2}/Calcr^{flox/flox}$ -Linie sollte hingegen keinen Phänotyp aufzeigen, wenn es stimmen sollte, dass Osteoblasten keinen Calcitoninrezeptor exprimieren. Trotzdem bleibt die Frage bestehen, wodurch die dominierende Knochenbildung in  $Calca^{-/-}$ -Mäusen herrührt. Deshalb halten wir es für sinnvoll, auch diese Maus-Linie zu analysieren. Neben dem Ausschalten des Rezeptors in Knochenzellen, soll mit der Linie  $Cre^{CamK2a}/Calcr^{flox/flox}$  geprüft werden, ob der Calcitoninrezeptor im Hypothalamus möglicherweise in ähnlicher Weise wie der Leptinrezeptor (Ducy et al., 2000) in eine zentrale Regulation des Knochenstoffwechsels involviert ist.



**Abb. 7.8.2: Schema für die Verpaarung von Mäusen mit „geflochten“ *Calcr*-Allelen mit Mäusen, die Cre-Rekombinase unter einem zellspezifischen Promotor exprimieren.** Die Cre-Rekombinase kombiniert die Sequenzen der beiden „loxP-sites“ neu, sodass die von „loxP-sites“ flankierten Exons 6 und 7 des CTR exzidiert werden. Werden Mäuse mit „geflochten“ *Calcr*-Gen mit Mäusen verpaart, die Cre-Rekombinase unter einem zellspezifischen Promotor exprimieren (z.B. ist der Promotor für Runx2 nur in Osteoblasten aktiv), entstehen Nachkommen, bei denen die Expression des Calcitoninrezeptors spezifisch in den Zellen mit Cre-Rekombinase-Aktivität unterbunden sein sollte.

Um den Einfluss von  $\beta$ -CGRP auf den Knochen zu prüfen, wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. Emeson ein bislang noch nicht publiziertes Mausmodell für die  $\beta$ -CGRP-Defizienz zur Verfügung gestellt. Da Verdacht besteht, dass  $\beta$ -CGRP an dem osteoblastären *Calca*<sup>-/-</sup>-Phänotyp partizipiert, wäre ein Doppel-Defizienzmodell für das *Calca*- und das *Calcb*-Gen von Interesse. Möglicherweise wäre die Knochenbildung in diesen Mäusen normal. Theoretisch ließe sich die Ausschaltung beider Gene durch die Verpaarung von *Calca*<sup>-/-</sup>- mit *Calcb*<sup>-/-</sup>-Mäusen erzeugen. Da diese beiden Gene in der Maus jedoch direkt hintereinander auf Chromosom 7 liegen, ist die Wahrscheinlichkeit für einen Chromatidaustausch durch „crossing over“ zwischen den beiden Genen während der Meiose, und somit auch die Erzeugung eines Doppel-Defizienzmodells, äußerst gering. Deshalb werden wir diesen Weg nicht verfolgen. Ein Konstrukt für die Generierung transgener Mäuse, die  $\beta$ -CGRP überexprimieren, klonieren wir momentan nach dem gleichen Prinzip wie für die ApoE-Maus- und -Lachs-CT-Mäuse (siehe Einleitung, Abb. 3.6.2). Neben der Generierung dieser transgenen Mäuse soll das Konstrukt darüber hinaus auch für die Transfektion von

Zellkulturzellen eingesetzt werden. So ließe sich beispielsweise ein direkter Effekt von  $\beta$ -CGRP auf primäre Osteoblasten anhand der Mineralisationsstärke darstellen. Diese Methode wäre, anders als eine direkte Zugabe von  $\beta$ -CGRP zur Zellkultur, unabhängig von der Proteinstabilität. Ob andere Faktoren als Calcitonin, bzw. die Abwesenheit von Calcitonin, an der verstärkten Knochenbildung in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen beteiligt sind, soll auch durch die Verpaarung transgener ApoE-mCT mit *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen geprüft werden. Sollten *Calca*<sup>-/-</sup>/ApoE-CT-Mäuse eine normale Knochenbildung aufweisen, wäre davon auszugehen, dass tatsächlich Calcitonin ein direkter oder indirekter Regulator der Knochenformation ist. Leider waren die Nachkommen der Verpaarungen beim Abschluss der Arbeit noch zu jung für eine aussagekräftige Analyse.

Falls die Ergebnisse der geplanten Untersuchungen zeigen, dass der Calcitoninrezeptor,  $\beta$ -CGRP, oder womöglich das Zusammenspiel beider Proteine tatsächlich entscheidend für den Knochen- und vor allem -aufbau ist, könnte dies langfristig ein Ansatzpunkt für eine Osteoporose-Therapie sein. Von besonderem Interesse sind immer noch Medikamente, die nicht nur den weiteren Knochenverlust hemmen wie Bisphosphonate, sondern die Osteoblasten stimulieren, neuen Knochen kontrolliert, d.h. ohne zu einem erhöhten Knochentumor-Risiko zu führen, zu bilden. Für eine Arzneimittel-Behandlung sind Zelloberflächenrezeptoren besonders geeignet, da sie für Medikamente relativ leicht zugänglich sind. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren nehmen eine besondere Rolle unter den Wirkorten ein. Unter allen verschreibungspflichtigen Arzneimitteln wirken mehr als 30% über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wie beispielsweise auch Betablocker oder Opiode (Hill, 2006). Insofern ist der Calcitoninrezeptor von besonderem Interesse für eine mögliche therapeutische Behandlung von Knochen.

## 8 ZUSAMMENFASSUNG

Obwohl das Schilddrüsenhormon Calcitonin (CT) seit über vierzig Jahren bekannt ist und seine hemmende Wirkung auf Osteoklasten *in vitro* gut charakterisiert ist, ist seine physiologische Funktion immer noch unklar. Bislang gibt es keine Erklärung, weshalb stark veränderte Konzentrationen von endogenem CT im Regelfall keinen Einfluß auf die Knochendichte haben.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CT-defiziente Mäuse (*Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse) sowohl eine erhöhte Knochenformation, als auch eine gesteigerte Knochenresorption entwickeln. Der beschleunigte Knochenumbau führt in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen zu erheblichen morphologischen Veränderungen des trabekulären und kortikalen Knochens. Die erhöhte Osteoblasten-Aktivität und die gesteigerte Osteoklastenzahl in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen sprechen für eine duale Funktion von CT als Inhibitor der Knochenformation und der Knochenresorption. Dies könnte möglicherweise erklären, weshalb Konzentrationsänderungen von Serum-CT beim Menschen nicht unbedingt in größeren Veränderungen der Knochendichte resultieren.

Die Untersuchung von transgenen Mäusen, die Maus- bzw. Lachs-CT (das klinisch eingesetzt wird) exprimieren, zeigte, dass die beiden CT-Spezies deutlich unterschiedlich auf den Knochen wirken. Wie erwartet hemmt Lachs-CT in hohen Serumkonzentrationen spezifisch Osteoklasten und wirkt deshalb im transgenen Mausmodell knochenanabol. Dagegen haben hohe Serumkonzentrationen von Maus-CT, entsprechend der klinischen Beobachtung, keinen nachweisbaren Einfluß auf den Knochenumbau, was auch wegen des Phänotyps der *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäuse überraschend ist.

Deshalb stellte sich die Frage, ob CT möglicherweise über einen zentralen Mechanismus Einfluß auf den Knochenumbau nimmt. Um einen möglichen Regulationsweg über CT-Rezeptoren im Gehirn zu untersuchen, wurden Genexpressionsanalysen vom Hypothalamus von Wildtyp- und *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen durchgeführt. Die Analysen führten zu dem Befund, dass das *Calcb*-Gen, das für  $\beta$ -CGRP kodiert, spezifisch in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen induziert ist.  $\beta$ -CGRP ist ein Mitglied der Calcitonin-Familie. Es ist möglich, dass seine verstärkte Expression unabhängig von CT zu einer gesteigerten Knochenbildung in *Calca*<sup>-/-</sup>-Mäusen führt.

Um die Wirkmechanismen von CT zelltypspezifisch untersuchen zu können, wurde ein *Calcr*-Defizienz-Modell nach dem „Cre/loxP-System“ generiert, das es ermöglicht, den CT-Rezeptor ubiquitär oder zellspezifisch zu deletieren. Das komplette Ausschalten des CT-Rezeptors führt in unserem Mausmodell bis zu einem Alter von 3 Monaten weder zu Verhaltensauffälligkeiten noch zu äußerlich sichtbaren Unterschieden gegenüber den Wildtyp-Geschwistertieren. Im Alter von 3 Monaten haben die *Calcr*<sup>-/-</sup>- Mäuse tendenziell ein

---

größeres trabekuläres Knochenvolumen, was mit dem *Calca*<sup>-/-</sup>-Phänotyp korreliert, und somit ein weiterer Hinweis auf eine physiologisch wichtige Funktion von CT im Säugetierknochen sein könnte.

## 9 ANHANG

### 9.1 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben. Herrn Professor Michael Amling möchte ich für die Überlassung des Themas und für die unkomplizierte und uneingeschränkte Unterstützung meiner Arbeit, wie z.B. durch die Ermöglichung zur Teilnahme an internationalen Kongressen danken. Ebenso möchte ich dem Leiter der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Herrn Professor Rüger, danken, dass ich die Arbeit in seiner Abteilung anfertigen durfte. Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. Thorsten Schinke für die viele Hilfe und die guten Anregungen bei der Versuchsplanung und der täglichen Laborarbeit bedanken. Es wird mir immer ein Rätsel bleiben, weshalb Thorsten neben den vielen anderen Projekten auch beim Calcitonin-Projekt nie den Überblick verloren hat.

Den Gutachtern danke ich für die Mühe, sich in die Thematik einzuarbeiten, und Herrn Professor Wiese danke ich für die Betreuung der Arbeit im Fachbereich Biologie.

Natürlich hat die gesamte Arbeitsgruppe direkt oder indirekt Spuren in der Arbeit hinterlassen. Sarah, die zuvor das Calcitonin-Projekt bearbeitet hat, Arndt, der die  $\mu$ CT-Aufnahmen gemacht hat, Philip und Matthias, die mir bei der Histomorphometrie geholfen haben, Cordula, Olga und Frau Dietzmann, die mich in die Knochenhistologie eingearbeitet haben und Sandra, die für Hilfe jeder Art da war, Tilman, mein Zimmerkollege, der mit großem Engagement auch nicht-wissenschaftliche Projekte verfolgt und mir so den Labortag versüßt hat, sowie der restliche „harte Kern“ Claudia, Anke, Sebastian, Regina, Michael und Björn. Ich möchte der gesamten Arbeitsgruppe, insbesondere auch den „Zeitarbeitern“, die uns ab und zu mit Kuchen und dergleichen versorgt haben, für die nette Atmosphäre danken.

Auch außerhalb der Arbeitsgruppe gab es jede Menge Helfer, wie Irm und Tina bei der ES-Zellkultur, und die Pfleger, die sich der vielen Mäuse angenommen haben, und natürlich auch die ganz privaten.

Herzlichen Dank!

---

### 9.3 Publikationen

Huebner,A.K., Schinke,T., Priemel,M., Schilling,S., Schilling,A.F., Emeson,R.B, Rueger,J.M. and Michael Amling (2006). Calcitonin deficiency in mice progressively results in high bone turnover. *JBMR*, 21(12), 1924-34.

---

## 12 LITERATURVERZEICHNIS

### Literatur

Amara,S.G., Jonas,V., Rosenfeld,M.G., Ong,E.S., & Evans,R.M. (1982). Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature*, 298(5871), 240-244.

Ausubel,F.M., Brent,R., Kingston,R.E., Moore,D.D., Seidman, J. & Smith,J.A. (1991). *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing and Wiley Interscience, New York.

Berry,V., Rathod,H., Pulman,L.B., & Datta,H.K. (1994). Immunofluorescent evidence for the abundance of focal adhesion kinase in the human and avian osteoclasts and its down regulation by calcitonin. *J.Endocrinol.*, 141(2), R11-R15.

Birnboim,H.C. & Doly,J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7(6), 1513-1523.

Casanova,E., Fehsenfeld,S., Mantamadiotis,T., Lemberger,T., Greiner,E., Stewart,A.F., & Schutz,G. (2001). A CamKIIalpha iCre BAC allows brain-specific gene inactivation. *Genesis.*, 31(1), 37-42.

Chakraborty,M., Chatterjee,D., Kellokumpu,S., Rasmussen,H., & Baron,R. (1991). Cell cycle-dependent coupling of the calcitonin receptor to different G proteins. *Science*, 251(4997), 1078-1082.

Chambers,T.J. & Moore,A. (1983). The sensitivity of isolated osteoclasts to morphological transformation by calcitonin. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 57(4), 819-824.

Chen,T.L. & Feldman,D. (1978). Glucocorticoid potentiation of the adenosin 3',5'-monophosphate response to parathyroid hormone in cultured rat bone cells. *Endocrinology*, 102(2), 589-596.

Chesnut,C.H., III, Majumdar,S., Newitt,D.C., Shields,A., Van Pelt,J., Laschansky,E., Azria,M., Kriegman,A., Olson,M., Eriksen,E.F., & Mindeholm,L. (2005). Effects of salmon calcitonin on trabecular microarchitecture as determined by magnetic resonance imaging: results from the QUEST study. *J.Bone Miner.Res.*, 20(9), 1548-1561.

- Christopoulos,G., Paxinos,G., Huang,X.F., Beaumont,K., Toga,A.W., & Sexton,P.M. (1995). Comparative distribution of receptors for amylin and the related peptides calcitonin gene related peptide and calcitonin in rat and monkey brain. *Can.J.Physiol Pharmacol.*, 73(7), 1037-1041.
- Christopoulos,G., Perry,K.J., Morfis,M., Tilakaratne,N., Gao,Y., Fraser,N.J., Main,M.J., Foord,S.M., & Sexton,P.M. (1999). Multiple amylin receptors arise from receptor activity-modifying protein interaction with the calcitonin receptor gene product. *Mol.Pharmacol.*, 56(1), 235-242.
- Clausen,B.E., Burkhardt,C., Reith,W., Renkawitz,R., & Forster,I. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res.*, 8(4), 265-277.
- Cleiren,E., Benichou,O., Van Hul,E., Gram,J., Bollerslev,J., Singer,F.R., Beaverson,K., Aledo,A., Whyte,M.P., Yoneyama,T., deVernejoul,M.C., & Van Hul,W. (2001). Albers-Schonberg disease (autosomal dominant osteopetrosis, type II) results from mutations in the CICN7 chloride channel gene. *Hum.Mol.Genet.*, 10(25), 2861-2867.
- Cohen,M.M., Jr. (2006). The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am.J.Med.Genet.A*, 140(23), 2646-2706.
- Copp,D.H. & Cheney,B. (1962). Calcitonin-a hormone from the parathyroid which lowers the calcium-level of the blood. *Nature*, 193, 381-382.
- Cornish,J., Callon,K.E., Bava,U., Kamona,S.A., Cooper,G.J., & Reid,I.R. (2001). Effects of calcitonin, amylin, and calcitonin gene-related peptide on osteoclast development. *Bone*, 29(2), 162-168.
- Corral,D.A., Amling,M., Priemel,M., Loyer,E., Fuchs,S., Ducy,P., Baron,R., & Karsenty,G. (1998). Dissociation between bone resorption and bone formation in osteopenic transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 95(23), 13835-13840.
- Dacquin,R., Davey,R.A., Laplace,C., Levasseur,R., Morris,H.A., Goldring,S.R., Gebre-Medhin,S., Galson,D.L., Zajac,J.D., & Karsenty,G. (2004). Amylin inhibits bone resorption while the calcitonin receptor controls bone formation in vivo. *J.Cell Biol.*, 164(4), 509-514.

- Deftos,L.J. (1997). There's something fishy and perhaps even fowl about the mammalian calcitonin receptor and its ligand. *Endocrinology*, 138(2), 519-520.
- Ducy,P., Amling,M., Takeda,S., Priemel,M., Schilling,A.F., Beil,F.T., Shen,J., Vinson,C., Rueger,J.M., & Karsenty,G. (2000). Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*, 100(2), 197-207.
- Epand,R.M., Epand,R.F., & Orłowski,R.C. (1985). Presence of an amphipathic helical segment and its relationship to biological potency of calcitonin analogs. *Int.J.Pept.Protein Res.*, 25(1), 105-111.
- Eriksen,E.F., Colvard,D.S., Berg,N.J., Graham,M.L., Mann,K.G., Spelsberg,T.C., & Riggs,B.L. (1988). Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science*, 241(4861), 84-86.
- Fischer,J.A., Tobler,P.H., Kaufmann,M., Born,W., Henke,H., Cooper,P.E., Sagar,S.M., & Martin,J.B. (1981). Calcitonin: regional distribution of the hormone and its binding sites in the human brain and pituitary. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 78(12), 7801-7805.
- Force,T., Bonventre,J.V., Flannery,M.R., Gorn,A.H., Yamin,M., & Goldring,S.R. (1992). A cloned porcine renal calcitonin receptor couples to adenylyl cyclase and phospholipase C. *Am.J.Physiol*, 262(6 Pt 2), F1110-F1115.
- Friedman,J. & Raisz,L.G. (1965). Thyrocalcitonin: inhibitor of bone resorption in tissue culture. *Science*, 150(702), 1465-1467.
- Galvin,R.J., Bryan,P., Venugopalan,M., Smith,D.P., & Thomas,J.E. (1998). Calcitonin responsiveness and receptor expression in porcine and murine osteoclasts: a comparative study. *Bone*, 23(3), 233-240.
- Gnaedinger,M.P., Uehlinger,D.E., Weidmann,P., Sha,S.G., Muff,R., Born,W., Rascher,W., & Fischer,J.A. (1989). Distinct hemodynamic and renal effects of calcitonin gene-related peptide and calcitonin in men. *Am.J.Physiol*, 257(6 Pt 1), E848-E854.
- Goldring,S.R., Dayer,J.M., Ausiello,D.A., & Krane,S.M. (1978). A cell strain cultured from porcine kidney increases cyclic AMP content upon exposure to calcitonin or vasopressin. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 83(2), 434-440.

- Goldring,S.R., Gorn,A.H., Yamin,M., Krane,S.M., & Wang,J.T. (1993). Characterization of the structural and functional properties of cloned calcitonin receptor cDNAs. *Horm.Metab Res.*, 25(9), 477-480.
- Goltzman,D. & Mitchell,J. (1985). Interaction of calcitonin and calcitonin gene-related peptide at receptor sites in target tissues. *Science*, 227(4692), 1343-1345.
- Gorn,A.H., Lin,H.Y., Yamin,M., Auron,P.E., Flannery,M.R., Tapp,D.R., Manning,C.A., Lodish,H.F., Krane,S.M., & Goldring,S.R. (1992). Cloning, characterization, and expression of a human calcitonin receptor from an ovarian carcinoma cell line. *J.Clin.Invest*, 90(5), 1726-1735.
- Gorn,A.H., Rudolph,S.M., Flannery,M.R., Morton,C.C., Weremowicz,S., Wang,T.Z., Krane,S.M., & Goldring,S.R. (1995). Expression of two human skeletal calcitonin receptor isoforms cloned from a giant cell tumor of bone. The first intracellular domain modulates ligand binding and signal transduction. *J.Clin.Invest*, 95(6), 2680-2691.
- Gravel,M.R., Zheng,Z.G., Sims,S.M., & Dixon,S.J. (1994). Platelet-activating factor induces pseudopod formation in calcitonin-treated rabbit osteoclasts. *J.Bone Miner.Res.*, 9(11), 1769-1776.
- Gu,H., Marth,J.D., Orban,P.C., Mossmann,H., & Rajewsky,K. (1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science*, 265(5168), 103-106.
- Henke,H., Tobler,P.H., & Fischer,J.A. (1983). Localization of salmon calcitonin binding sites in rat brain by autoradiography. *Brain Res.*, 272(2), 373-377.
- Hill,S.J. (2006). G-protein-coupled receptors: past, present and future. *Br.J.Pharmacol.*, 147 Suppl 1, S27-S37.
- Hilton,J.M., Dowton,M., Houssami,S., & Sexton,P.M. (2000). Identification of key components in the irreversibility of salmon calcitonin binding to calcitonin receptors. *J.Endocrinol.*, 166(1), 213-226.
- Hirsch,P.F. & Baruch,H. (2003). Is calcitonin an important physiological substance? *Endocrine.*, 21(3), 201-208.

Hirsch,P.F., Lester,G.E., & Talmage,R.V. (2001). Calcitonin, an enigmatic hormone: does it have a function? *J.Musculoskelet.Neuronal.Interact.*, 1(4), 299-305.

Hirsch,P.F., Voelkel,E.F., & Munson,P.L. (1964). Thyrocalcitonin:: Hypocalcemic hypophosphatemic principle of the thyroid gland. *Science*, 146, 412-413.

Hoff,A.O., Catala-Lehnen,P., Thomas,P.M., Priemel,M., Rueger,J.M., Nasonkin,I., Bradley,A., Hughes,M.R., Ordonez,N., Cote,G.J., Amling,M., & Gagel,R.F. (2002). Increased bone mass is an unexpected phenotype associated with deletion of the calcitonin gene. *J.Clin.Invest*, 110(12), 1849-1857.

Holick,M.F. (2004). Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am.J.Clin.Nutr.*, 80(6 Suppl), 1678S-1688S.

Houssami,S., Findlay,D.M., Brady,C.L., Martin,T.J., Epand,R.M., Moore,E.E., Murayama,E., Tamura,T., Orłowski,R.C., & Sexton,P.M. (1995). Divergent structural requirements exist for calcitonin receptor binding specificity and adenylate cyclase activation. *Mol.Pharmacol.*, 47(4), 798-809.

Hunter,S.J., Schraer,H., & Gay,C.V. (1989). Characterization of the cytoskeleton of isolated chick osteoclasts: effect of calcitonin. *J.Histochem.Cytochem.*, 37(10), 1529-1537.

Hurley,D.L., Tiegs,R.D., Wahner,H.W., & Heath,H., III (1987). Axial and appendicular bone mineral density in patients with long-term deficiency or excess of calcitonin. *N.Engl.J.Med.*, 317(9), 537-541.

Ikegame,M., Rakopoulos,M., Martin,T.J., Moseley,J.M., & Findlay,D.M. (1996). Effects of continuous calcitonin treatment on osteoclast-like cell development and calcitonin receptor expression in mouse bone marrow cultures. *J.Bone Miner.Res.*, 11(4), 456-465. dependent down-regulation of the mouse C1a calcitonin receptor in cells of the osteoclast lineage involves a transcriptional mechanism. *Endocrinology*, 140(3), 1060-1068.

Jayo,M.J., Weaver,D.S., Adams,M.R., & Rankin,S.E. (1990). Effects on bone of surgical menopause and estrogen therapy with or without progesterone replacement in cynomolgus monkeys. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, 163(2), 614-618.

Inoue,D., Shih,C., Galson,D.L., Goldring,S.R., Horne,W.C., & Baron,R. (1999). Calcitonin-

- Kalu,D.N. (1991). The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.*, 15(3), 175-191.
- Kawasaki,H., Takasaki,K., Saito,A., & Goto,K. (1988). Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat. *Nature*, 335(6186), 164-167.
- Komori,T., Yagi,H., Nomura,S., Yamaguchi,A., Sasaki,K., Deguchi,K., Shimizu,Y., Bronson,R.T., Gao,Y.H., 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(5), 755-764.
- Kornak,U., Kasper,D., Bosl,M.R., Kaiser,E., Schweizer,M., Schulz,A., Friedrich,W., Delling,G., & Jentsch,T.J. (2001). Loss of the *ClC-7* chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell*, 104(2), 205-215.
- Kuestner,R.E., Elrod,R.D., Grant,F.J., Hagen,F.S., Kuijper,J.L., Mathewes,S.L., O'Hara,P.J., Sheppard,P.O., Stroop,S.D., Thompson,D.L., & . (1994). Cloning and characterization of an abundant subtype of the human calcitonin receptor. *Mol.Pharmacol.*, 46(2), 246-255.
- Lee,K.C., Maxwell,A., & Lanyon,L.E. (2002). Validation of a technique for studying functional adaptation of the mouse ulna in response to mechanical loading. *Bone*, 31(3), 407-412.
- Lee,S.K., Goldring,S.R., & Lorenzo,J.A. (1995). Expression of the calcitonin receptor in bone marrow cell cultures and in bone: a specific marker of the differentiated osteoclast that is regulated by calcitonin. *Endocrinology*, 136(10), 4572-4581.
- Lin,H.Y., Harris,T.L., Flannery,M.S., Aruffo,A., Kaji,E.H., Gorn,A., Kolakowski,L.F., Jr., Lodish,H.F., & Goldring,S.R. (1991). Expression cloning of an adenylate cyclase-coupled calcitonin receptor. *Science*, 254(5034), 1022-1024.
- Lindsay,R., Hart,D.M., MacLean,A., Clark,A.C., Kraszewski,A., & Garwood,J. (1978). Bone response to termination of oestrogen treatment. *Lancet*, 1(8078), 1325-1327.
- Lips,C.J., Steenbergh,P.H., Hoppener,J.W., Bovenberg,R.A., van,d.S., V, & Jansz,H.S. (1988). Evolutionary pathways of the calcitonin genes. *Mol.Cell Endocrinol.*, 57(1-2), 1-6.

- Longoni,M. & Ferrarese,C. (2006). Inflammation and excitotoxicity: role in migraine pathogenesis. *Neurol.Sci.*, 27 Suppl 2, S107-S110.
- Lu,J.T., Son,Y.J., Lee,J., Jetton,T.L., Shiota,M., Moscoso,L., Niswender,K.D., Loewy,A.D., Magnuson,M.A., Sanes,J.R., & Emeson,R.B. (1999). Mice lacking alpha-calcitonin gene-related peptide exhibit normal cardiovascular regulation and neuromuscular development. *Mol.Cell Neurosci.*, 14(2), 99-120.
- McLatchie,L.M., Fraser,N.J., Main,M.J., Wise,A., Brown,J., Thompson,N., Solari,R., Lee,M.G., & Foord,S.M. (1998). RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*, 393(6683), 333-339.
- Muff,R., Buhlmann,N., Fischer,J.A., & Born,W. (1999). An amylin receptor is revealed following co-transfection of a calcitonin receptor with receptor activity modifying proteins-1 or -3. *Endocrinology*, 140(6), 2924-2927.
- Mundlos,S., Otto,F., Mundlos,C., Mulliken,J.B., Aylsworth,A.S., Albright,S., Lindhout,D., Cole,W.G., Henn,W., Knoll,J.H., Owen,M.J., Mertelsmann,R., Zabel,B.U., & Olsen,B.R. (1997). Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell*, 89(5), 773-779.
- Naro,F., Perez,M., Migliaccio,S., Galson,D.L., Orcel,P., Teti,A., & Goldring,S.R. (1998). Phospholipase D- and protein kinase C isoenzyme-dependent signal transduction pathways activated by the calcitonin receptor. *Endocrinology*, 139(7), 3241-3248.
- Nicholson,G.C., Horton,M.A., Sexton,P.M., D'Santos,C.S., Moseley,J.M., Kemp,B.E., Pringle,J.A., & Martin,T.J. (1987). Calcitonin receptors of human osteoclastoma. *Horm.Metab Res.*, 19(11), 585-589.
- Nicholson,G.C., Moseley,J.M., Sexton,P.M., Mendelsohn,F.A., & Martin,T.J. (1986). Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization. *J.Clin.Invest*, 78(2), 355-360.
- Nishikawa,T., Ishikawa,H., Yamamoto,S., & Koshihara,Y. (1999). A novel calcitonin receptor gene in human osteoclasts from normal bone marrow. *FEBS Lett.*, 458(3), 409-414.
- O'Dor,R.K., Parkes,C.O., & Copp,D.H. (1969). Amino acid composition of salmon calcitonin. *Can.J.Biochem.*, 47(8), 823-825.

- Olgiate, V.R., Guidobono, F., Netti, C., & Pecile, A. (1983). Localization of calcitonin binding sites in rat central nervous system: evidence of its neuroactivity. *Brain Res.*, 265(2), 209-215.
- Otto, F., Thornell, A.P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K.C., Rosewell, I.R., Stamp, G.W., Beddington, R.S., Mundlos, S., Olsen, B.R., Selby, P.B., & Owen, M.J. (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, 89(5), 765-771.
- Oursler, M.J., Osdoby, P., Pyfferoen, J., Riggs, B.L., & Spelsberg, T.C. (1991). Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 88(15), 6613-6617.
- Overgaard, K., Hansen, M.A., Jensen, S.B., & Christiansen, C. (1992). Effect of salcatonin given intranasally on bone mass and fracture rates in established osteoporosis: a dose-response study. *BMJ*, 305(6853), 556-561.
- Pask, A.J., Kanasaki, H., Kaiser, U.B., Conn, P.M., Janovick, J.A., Stockton, D.W., Hess, D.L., Justice, M.J., & Behringer, R.R. (2005). A novel mouse model of hypogonadotropic hypogonadism: N-ethyl-N-nitrosourea-induced gonadotropin-releasing hormone receptor gene mutation. *Mol.Endocrinol.*, 19(4), 972-981.
- Pientka, L. & Friedrich, C. (2000). [Osteoporosis: the epidemiologic and health economics perspective]. *Z.Arztl.Fortbild.Qualitatssich.*, 94(6), 439-444.
- Plosker, G.L. & McTavish, D. (1996). Intranasal salcatonin (salmon calcitonin). A review of its pharmacological properties and role in the management of postmenopausal osteoporosis. *Drugs Aging*, 8(5), 378-400.
- Pondel, M. (2000). Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *Int.J.Exp.Pathol.*, 81(6), 405-422.
- Potts, J.T. (2005). Parathyroid hormone: past and present. *J.Endocrinol.*, 187(3), 311-325.
- Reynolds, L., Jones, K., Winton, D.J., Cranston, A., Houghton, C., Howard, L., Ponder, B.A., & Smith, D.P. (2001). C-cell and thyroid epithelial tumours and altered follicular development in transgenic mice expressing the long isoform of MEN 2A RET. *Oncogene*, 20(30), 3986-3994.
- Rizzoli, R., Ferrari, S.L., Pizzurki, L., Caverzasio, J., & Bonjour, J.P. (1992). Actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein. *J.Endocrinol.Invest*, 15(9 Suppl 6), 51-56.

- Rodan,S.B., Fischer,M.K., Egan,J.J., Epstein,P.M., & Rodan,G.A. (1984). The effect of dexamethasone on parathyroid hormone stimulation of adenylate cyclase in ROS 17/2.8 cells. *Endocrinology*, 115(3), 951-958.
- Rodriguez,C.I., Buchholz,F., Galloway,J., Sequerra,R., Kasper,J., Ayala,R., Stewart,A.F., & Dymecki,S.M. (2000). High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat.Genet.*, 25(2), 139-140.
- Rosenfeld,M.G., Mermod,J.J., Amara,S.G., Swanson,L.W., Sawchenko,P.E., Rivier,J., Vale,W.W., & Evans,R.M. (1983). Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature*, 304(5922), 129-135.
- Sanger,F., Nicklen,S., & Coulson,A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 74(12), 5463-5467.
- Schinke,T., Liese,S., Priemel,M., Haberland,M., Schilling,A.F., Catala-Lehnen,P., Blicharski,D., Rueger,J.M., Gagel,R.F., Emeson,R.B., & Amling,M. (2004). Decreased bone formation and osteopenia in mice lacking alpha-calcitonin gene-related peptide. *J.Bone Miner.Res.*, 19(12), 2049-2056.
- Sexton,P.M., Albiston,A., Morfis,M., & Tilakaratne,N. (2001). Receptor activity modifying proteins. *Cell Signal.*, 13(2), 73-83.
- Sexton,P.M., Findlay,D.M., & Martin,T.J. (1999). Calcitonin. *Curr.Med.Chem.*, 6(11), 1067-1093.
- Shutter,J.R., Graham,M., Kinsey,A.C., Scully,S., Luthy,R., & Stark,K.L. (1997). Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes Dev.*, 11(5), 593-602.
- Strader,C.D., Fong,T.M., Graziano,M.P., & Tota,M.R. (1995). The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB J.*, 9(9), 745-754.
- Stroop,S.D., Nakamuta,H., Kuestner,R.E., Moore,E.E., & Eband,R.M. (1996). Determinants for calcitonin analog interaction with the calcitonin receptor N-terminus and transmembrane-loop regions. *Endocrinology*, 137(11), 4752-4756.

- Su, Y., Chakraborty, M., Nathanson, M.H., & Baron, R. (1992). Differential effects of the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate and protein kinase C pathways on the response of isolated rat osteoclasts to calcitonin. *Endocrinology*, 131(3), 1497-1502.
- Syed, F. & Khosla, S. (2005). Mechanisms of sex steroid effects on bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 328(3), 688-696.
- Takahashi, K.I., Liu, Y.C., Hayashi, N., Goto, F., Kato, M., Kawashima, H., & Takeuchi, T. (1997). Production of bioactive salmon calcitonin from the nonendocrine cell lines COS-7 and CHO. *Peptides*, 18(3), 439-444.
- Takahashi, N., Akatsu, T., Sasaki, T., Nicholson, G.C., Moseley, J.M., Martin, T.J., & Suda, T. (1988). Induction of calcitonin receptors by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in osteoclast-like multinucleated cells formed from mouse bone marrow cells. *Endocrinology*, 123(3), 1504-1510.
- Teti, A., Paniccia, R., & Goldring, S.R. (1995). Calcitonin increases cytosolic free calcium concentration via capacitative calcium influx. *J. Biol. Chem.*, 270(28), 16666-16670.
- Tsilchorozidou, T. & Conway, G.S. (2004). Uterus size and ovarian morphology in women with isolated growth hormone deficiency, hypogonadotropic hypogonadism and hypopituitarism. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 61(5), 567-572.
- Turner, C.H. & Forwood, M.R. (1995). What role does the osteocyte network play in bone adaptation? *Bone*, 16(3), 283-285.
- Wilding, J.P., Gilbey, S.G., Bailey, C.J., Batt, R.A., Williams, G., Ghatei, M.A., & Bloom, S.R. (1993). Increased neuropeptide-Y messenger ribonucleic acid (mRNA) and decreased neurotensin mRNA in the hypothalamus of the obese (ob/ob) mouse. *Endocrinology*, 132(5), 1939-1944.
- Wong, M.M., Rao, L.G., Ly, H., Hamilton, L., Tong, J., Sturtridge, W., McBroom, R., Aubin, J.E., & Murray, T.M. (1990). Long-term effects of physiologic concentrations of dexamethasone on human bone-derived cells. *J. Bone Miner. Res.*, 5(8), 803-813.
- Woodrow, J.P., Sharpe, C.J., Fudge, N.J., Hoff, A.O., Gagel, R.F., & Kovacs, C.S. (2006). Calcitonin plays a critical role in regulating skeletal mineral metabolism during lactation. *Endocrinology*, 147(9), 4010-4021.

- 
- Wuster,C., Raue,F., Meyer,C., Bergmann,M., & Ziegler,R. (1992). Long-term excess of endogenous calcitonin in patients with medullary thyroid carcinoma does not affect bone mineral density. *J.Endocrinol.*, 134(1), 141-147.
- Yamin,M., Gorn,A.H., Flannery,M.R., Jenkins,N.A., Gilbert,D.J., Copeland,N.G., Tapp,D.R., Krane,S.M., & Goldring,S.R. (1994). Cloning and characterization of a mouse brain calcitonin receptor complementary deoxyribonucleic acid and mapping of the calcitonin receptor gene. *Endocrinology*, 135(6), 2635-2643.
- Zhang,Y., Buchholz,F., Muyrers,J.P., & Stewart,A.F. (1998). A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat.Genet.*, 20(2), 123-128.
- Zheng,M.H., Fan,Y., Wysocki,S., Wood,D.J., & Papadimitriou,J.M. (1994). Carbonic anhydrase II gene transcript in cultured osteoclasts from neonatal rats: effect of calcitonin. *Cell Tissue Res.*, 276(1), 7-13.