

Untersuchungen zur Funktion des  
Wachstumsfaktors Midkine im  
Knochenstoffwechsel anhand eines  
Mausdefizienzmodells  
*Mus musculus* (Linnaeus, 1758)

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Biologie  
der Universität Hamburg

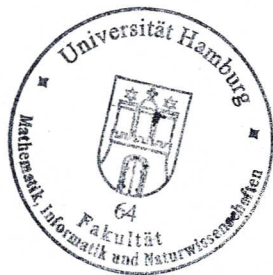
vorgelegt von

**Claudia Neunaber**

Hamburg 2009

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Priv.-Doz. Dr. T. SCHINKE  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. T. BURMESTER  
Tag der Disputation: 17. Juli 2009

Hamburg, den 30. Juni 2009



*J. Ganzhorn*

Professor Dr. Jörg Ganzhorn  
Leiter des Departments Biologie

<b>1. INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>2. ABKÜRZUNGEN</b>	<b>VI</b>
<b>3. EINLEITUNG</b>	<b>09</b>
3.1  Physiologie des Skelettsystems	09
3.2  Zelltypen des Knochens	11
3.2.1  Osteoblasten	11
3.2.2  Osteozyten	12
3.2.3  Knochenbelegzellen	13
3.2.4  Osteoklasten	13
3.3  Knochenwachstum und Knochenremodeling	14
3.3.1  Knochenwachstum	14
3.3.2  Knochenremodeling	14
3.4  Regulation des Knochenremodelings	16
3.4.1  Die Rolle von Östrogen im Knochenstoffwechsel	16
3.4.2  Regulation der Kalziumhomöostase	17
3.4.3  Der kanonische Wnt-Signalweg	18
3.4.4  Rank-Rankl-Opg-System	19
3.5  Die Familie der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren	19
3.5.1  Struktur der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren	19
3.5.2  Funktion der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren	20
3.5.3  Funktion der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren im Knochenstoffwechsel	20
3.5.4  Rezeptoren und Signaltransduktionswege	21
<b>4. AUFGABENSTELLUNG</b>	<b>22</b>

<b>5. MATERIALIEN &amp; METHODEN</b>	<b>23</b>
5.1 Materialien	23
5.1.1 Chemikalien und Enzyme	23
5.1.2 Antikörper	23
5.1.3 Puffer und Lösungen	24
5.1.4 Bakterien	29
5.1.5 Plasmide	29
5.1.6 Zellen	29
5.1.6.1 MC3T3-E1-Zellen	29
5.1.6.2 Primärzellen	30
5.2 Methoden	30
5.2.1 Maushaltung	30
5.2.1.1 Ovariectomie der Mäuse	30
5.2.1.2 Calceinmarkierung	31
5.2.2 Histologie und Morphologie	31
5.2.2.1 Tötung der Mäuse	31
5.2.2.2 Kontaktröntgen, $\mu$ CT und Bruchtest	31
5.2.2.3 Paraffin- und Acrylathistologie	32
5.2.2.4 Von Kossa/van Gieson-Färbung	32
5.2.2.5 Toluidin-blau-Färbung	33
5.2.2.6 Trichrom-Goldner-Färbung	33
5.2.2.7 TRAP-Färbung	33
5.2.2.8 Immunhistologie an Gewebeschnitten	34
5.2.2.9 Histomorphometrie	34
5.2.3 Serum- und Urinalysen	35
5.2.3.1 Serumgewinnung und Urinentnahme	35
5.2.3.2 Verwendete Kits	35
5.2.4 Molekularbiologische Methoden	37
5.2.4.1 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwänzen	37
5.2.4.2 Genotypisierung der Mäuse mittels PCR	37
5.2.4.3 DNA-Agarosegelelektrophorese	39
5.2.4.4 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	40
5.2.4.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	40
5.2.4.6 RNA-Isolierung aus Geweben und Organen	40

5.2.4.7	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	41
5.2.4.8	Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR	41
5.2.4.9	Herstellung der Sonden für den Northern Blot	41
5.2.4.10	Northern Blot	42
5.2.4.11	Transformation von Plasmiden in Bakterien	43
5.2.4.12	Präparation von Plasmid-DNA (Maxi-Präp)	43
5.2.4.13	Microarray-Genchip-Analyse	44
5.2.5	Zellkultur	45
5.2.5.1	Isolierung und Differenzierung von primäre Osteoblasten aus der Schädeldecke	45
5.2.5.2	Isolierung und Differenzierung von Osteoblastenvorläuferzellen aus dem Knochenmark	46
5.2.5.3	Isolierung und Differenzierung von Osteoklastenvorläuferzellen aus dem Knochenmark	46
5.2.5.4	Kultur und Pflege von MC3T3-E1 Zellen	47
5.2.5.5	Färbung der Osteoblasten mit der Von Kossa-Färbung	47
5.2.5.6	Bestimmung der Alkalischen Phosphatase Aktivität	47
5.2.5.7	TRAP-Färbung der Osteoklastenkulturen	48
5.2.5.8	Auswertung der Osteoklastenresorption	48
5.2.5.9	Isolierung von RNA aus Zellen	48
5.2.5.10	Isolation von Proteinen aus Zellen	48
5.2.5.11	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	49
5.2.5.12	Western Blot	49
5.2.5.13	Transfektion	50
<b>6.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>52</b>
6.1	Midkine wird in Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten exprimiert	52
6.2	<i>Mdk</i> -defiziente Mäuse besitzen im Alter von 12 und 18 Monaten eine erhöhte Knochendichte	53
6.3	<i>Mdk</i> -defiziente Mäuse weisen im Alter von 4 und 6 Monaten eine geringere Körpergröße und ein vermindertes Gewicht auf	54

6.4	Die Defizienz des <i>Mdk</i> -Gens führt zu einem Knochenphänotyp, der einen Knochenmasseverlust im Alter verhindert	55
6.5	Die Knochenformationsrate in <i>Mdk</i> -defizienten Mäusen ist im höheren Alter nahezu verdoppelt	57
6.6	<i>Mdk</i> -defiziente Mäuse weisen im höheren Alter einen „High bone turnover“-Phänotyp auf	58
6.7	Mit dem Alter entwickeln <i>Mdk</i> -defiziente Mäuse hyperostotische Läsionen in der Kortikalis der Röhrenknochen	60
6.8	<i>Mdk</i> -defiziente Femora haben im Alter von 12 Monaten eine verringerte kortikale Dicke, jedoch eine erhöhte Bruchfestigkeit	61
6.9	Der Knochenphänotyp <i>Mdk</i> -defizienter Mäuse kann nicht über bekannte Knochenstoffwechselfparameter erklärt werden	62
6.10	Primäre Osteoblasten aus <i>Mdk</i> -defizienten Mäusen weisen einen erhöhten Mineralisationsgrad und eine erhöhte Alkalische Phosphatase-Aktivität auf	64
6.11	<i>Mdk</i> -defiziente Osteoklasten besitzen keine erhöhte Aktivität	65
6.12	Eine Kombination aus <i>Mdk</i> und <i>Ptprz1</i> hemmt <i>in vitro</i> den Wnt-Signalweg	66
6.13	Untersuchungen zum Einfluss von <i>Mdk</i> auf die Genexpression in Osteoblasten	68
6.14	Die <i>Dmp1</i> -Expression ist unverändert in primären Wildtyp- und <i>Mdk</i> -defizienten Osteoblasten	70
6.15	Untersuchungen der <i>Ank</i> -, <i>Enpp1</i> und <i>Alpl</i> -Genexpression in primären Osteoblasten	71
6.16	<i>Mdk</i> -defiziente Mäuse sind vor einem Knochenmasseverlust geschützt, der durch eine Ovariectomie induziert wird	73
<b>7.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>76</b>
7.1	Einfluss von Midkine auf den Knochenstoffwechsel	76
7.2	Einfluss von Midkine auf Osteoblasten	78
7.3	Einfluss von Midkine auf Osteoklasten	79
7.4	Inhibition des Wnt-Signalwegs durch <i>Mdk</i>	80
7.5	Einfluss von Midkine auf die Genexpression in Osteoblasten	82

---

7.6	Die Mdk-Defizienz schützt vor einem Ovariectomie-induzierten Knochenmasseverlust	85
7.7	Ausblick	86
<b>8.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>88</b>
<b>9.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>90</b>
<b>10.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>99</b>
10.1	Danksagung	99

## 2. ABKÜRZUNGEN

<u>ALK:</u>	<i>Anaplastic lymphoma kinase</i>	<u>cDNA:</u>	<i>complementary (komplementäre) DNA</i>
<u>Alpl:</u>	<i>alkaline phosphatase, liver/bone/kidney (gewebeunspezifische Alkalische Phosphatase)</i>	<u>Chrm4:</u>	Muscariner Acetylcholin Rezeptor M4
<u>Amp:</u>	Ampicillin	<u>Clc-7:</u>	<i>Chlorid channel 7 (Chloridkanal 7)</i>
<u>Ank:</u>	<i>progressive ankylosis (murin)</i>	<u>Col1a1:</u>	<i>collagen, type I (Kollagen Typ I)</i>
<u>ANKH:</u>	<i>progressive ankylosis (human)</i>	<u>cort:</u>	<i>cortical (kortikal)</i>
<u>APC:</u>	<i>adenomatous polyposis coli</i>	<u>CT:</u>	Calcitonin
<u>ATP:</u>	Adenosintriphosphat	<u>DBH:</u>	Dopamin- $\beta$ -hydroxylase
<u>BFR/BS:</u>	<i>bone formation rate per bone surface (Knochenformationsrate pro Knochenoberfläche)</i>	<u>DEPC:</u>	Diethylpyrocarbonat
<u>BGP:</u>	<i>bone gla protein (Osteocalcin)</i>	<u>DGK:</u>	Diacylglycerinkinase
<u>BMP:</u>	<i>bone morphogenetic protein</i>	<u>Dmp1:</u>	Dentin matrix protein 1
<u>BMU:</u>	<i>basic multicellular unit</i>	<u>DMSO:</u>	Dimethylsulfoxid
<u>bp:</u>	Basenpaare	<u>DNA:</u>	<i>deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)</i>
<u>BSA:</u>	bovines Serumalbumin	<u>dNTPs:</u>	Desoxynukleotidtriphosphat
<u>BSP:</u>	<i>bone sialoprotein</i>	<u>DTT:</u>	Dithiotreitol
<u>BV/TV:</u>	<i>bone volume per tissue volume (Knochenvolumen pro Gewebevolumen)</i>	<u>EDTA:</u>	Ethylendiamintetraazetat
<u>CDD:</u>	Cleidocraniale Dysplasie	<u>ELISA:</u>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)</i>
		<u>Enpp1:</u>	<i>ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 1</i>
		<u>FGF:</u>	<i>fibroblast growth factor</i>
		<u>FKS:</u>	fötales Kälberserum
		<u>Fmax:</u>	Maximalkraft
		<u>Fzd:</u>	Frizzled



<u>Git1:</u>	<i>G protein-coupled receptor kinase interactor 1</i> (auch Cat-1 genannt)	<u>NOc/BPm:</u>	<i>number of osteoclasts per bone perimeter</i> (Anzahl der Osteoklasten pro Knochenoberfläche)
<u>Gsk3:</u>	Glykogen Synthase Kinase 3	<u>NTPs:</u>	Nukleotidtriphosphate
<u>H<sub>2</sub>O:</u>	Wasser	<u>Obl:</u>	Osteoblasten
<u>HRP:</u>	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)	<u>ObS/BS:</u>	<i>osteoblast surface per bone surface</i> (Osteoblastenoberfläche pro Knochenoberfläche)
<u>lbsp:</u>	<i>integrin binding sialoprotein</i>	<u>Ocl:</u>	Osteoklasten
<u>Il-6:</u>	Interleukin 6	<u>Opg:</u>	Osteoprotegerin
<u>kDa:</u>	kiloDalton	<u>OVX:</u>	Ovarektomie
<u>lacZ:</u>	β-Galaktosidase Gen	<u>PBS:</u>	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
<u>LB:</u>	<i>Luria Broth</i> , Kulturmedium	<u>PCR:</u>	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
<u>Lsg.:</u>	Lösung	<u>p-GSK3:</u>	phospho-Glykogen synthasekinase 3
<u>LRP 5/6:</u>	<i>low density lipoprotein 5/6</i>	<u>OPG:</u>	Osteoprotegerin
<u>M:</u>	Molar	<u>Pi:</u>	anorganisches Phosphat
<u>M-CSF:</u>	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>	<u>PI3K:</u>	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
<u>μCT:</u>	μ-Computertomographie	<u>PPi:</u>	Pyrophosphat
<u>Mdk:</u>	Midkine	<u>PTH:</u>	Parathormon
<u>Mdk<sup>+/+</sup>:</u>	Wildtypmaus	<u>Ptn:</u>	Pleiotrophin
<u>Mdk<sup>-/-</sup>:</u>	Midkine-defiziente Maus	<u>Ptprz1:</u>	Proteintyrosin-Phosphatase, Rezeptor Typ Z, Polypeptid 1
<u>Min:</u>	Minute	<u>p-Tyr:</u>	phospho-Tyrosin
<u>MNC/VF:</u>	<i>multinuclear cells per field of view</i> (Multinukleare Zellen pro Gesichtsfeld)	<u>RA:</u>	Rheumatoide Arthritis
<u>NaOH:</u>	Natriumhydroxid		
<u>NOb/BPm:</u>	<i>number of osteoblast per bone perimeter</i> (Anzahl der Osteoblasten pro Knochenoberfläche)		

<u>Rank:</u>	<i>receptor activator of NF-<math>\kappa</math>B</i> (Rezeptor Aktivator vom NF- $\kappa$ B)	<u>TbSp:</u>	<i>trabecular spacing</i> (Abstand der Trabekel)
<u>Rankl:</u>	RANK ( <i>receptor activator of NF-<math>\kappa</math>B</i> ) Ligand	<u>TbTh:</u>	<i>trabecular thickness</i> (Trabekeldicke)
<u>RARE:</u>	<i>retinoic acid-responsive Element</i>	<u>TE:</u>	Tris-EDTA
<u>rhMdk:</u>	rekombinantes humanes Midkine	<u>trab:</u>	<i>trabecular</i> (trabekulär)
<u>RNA:</u>	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)	<u>TRAP:</u>	<i>tartrat resistant acid phosphatase</i> (Tartrat resistente azide Phosphatase)
<u>rpm:</u>	= Upm; Umdrehungen pro Minute	<u>Tris:</u>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<u>RT:</u>	Raumtemperatur	<u>Trp53:</u>	<i>transformation related protein 53</i>
<u>RT-PCR:</u>	Reverse-Transkriptase PCR	<u>U:</u>	<i>unit</i> , Enzimeinheit
<u>Runx2:</u>	<i>runt related transcription factor 2</i>	<u>ü.N.:</u>	über Nacht
<u>SDS:</u>	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)	<u>UV:</u>	Ultraviolett
<u>sham-OP:</u>	schein-operiert	<u>V:</u>	Volt
<u>SLR:</u>	<i>signal log ratio</i> (Signalintensitätsparameter)	<u>v/v:</u>	volume/volume (Volumen/Volumen)
<u>Sp7:</u>	<i>Sp7 transcription factor</i> (Osterix)	<u>Wnt3a:</u>	<i>wingless-related MMTV integration site 3A</i>
<u>TAE:</u>	Tris-Azetat-EDTA	<u>WT:</u>	Wildtyp
<u>TbN:</u>	<i>trabecular number</i> (Anzahl der Trabekel)	<u>WT1:</u>	Wilms Tumor 1
		<u>Wtf:</u>	<i>Work to failure</i> (Bruchenergie)
		<u>w/v:</u>	weight/volume (Masse/Volumen)

### 3. Einleitung

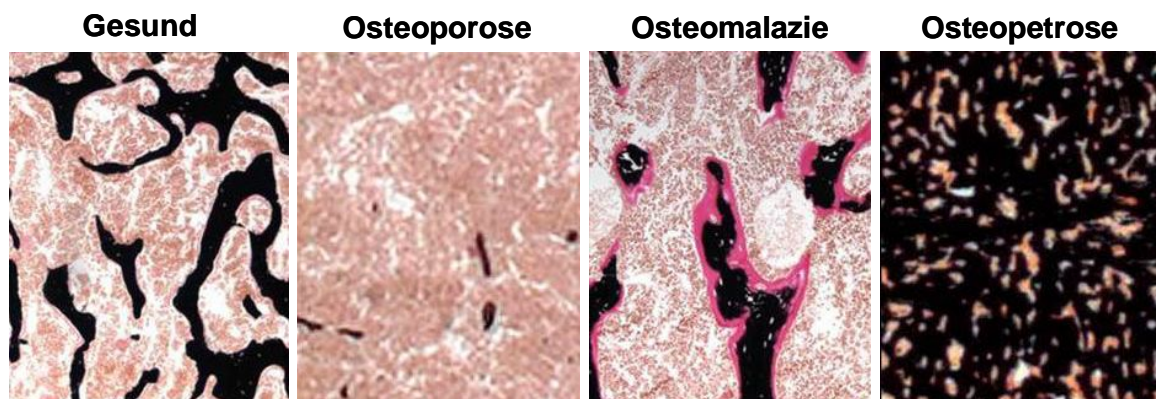
#### 3.1 Physiologie des Skelettsystems

Das menschliche Skelett besteht aus etwa 206 Knochen und macht mit 12 bis 20 Prozent einen großen Anteil des Gesamtkörpergewichts aus. Abgesehen davon, dass es dem Körper die nötige Stabilität verleiht und die inneren Organe schützt, besitzt das menschliche Skelett noch eine weitere wichtige Funktion als Kalziumreservoir. 99% des mit der Nahrung aufgenommenen Kalziums wird im Knochen abgelagert und im Falle eines Kalziummangels auch wieder aus den Knochen herausgelöst und für andere Aufgaben im Körper zur Verfügung gestellt. Dies ermöglicht die Aufrechterhaltung eines konstanten Kalziumspiegels im Serum. Somit ist das Skelett kein starres System, sondern auf zellulärer Ebene einem stetigen Auf- und Abbau unterworfen, um es an die wechselnden Belastungen anzupassen, die auf den Körper einwirken. In einem Zeitraum von etwa 10 Jahren wird soviel Knochenmasse bei einem Menschen umgebaut (Remodeling), dass es dem gesamten Skelett entspricht (Cohen, 2006).

In den ersten beiden Lebensdekaden überwiegt hierbei die Knochenneubildung (Formation), um ein Wachstum des Skeletts zu ermöglichen. Anschließend ist ein sensibles Gleichgewicht von Knochenformation und Knochenresorption (Abbau) nötig, um die Knochenmasse konstant zu halten. Im Alter verschiebt sich dieses Gleichgewicht oft zu Gunsten der Knochenresorption, wodurch Knochenmasse verloren geht. Hierdurch kann es zu einer Osteoporose (Abb.3.1) kommen, woran häufig Frauen nach der Menopause oder Männer ab dem 60. Lebensjahr erkranken. Laut Definition der WHO (*world health organisation*) aus dem Jahr 1994 liegt eine Osteoporose dann vor, wenn der Knochenmineralgehalt in einer Knochendichtemessung an der Lendenwirbelsäule oder dem Oberschenkel mehr als 2,5 Standardabweichungen unterhalb des Mittelwerts einer 30-jährigen Frau liegt (DVO Osteoporose-Leitlinie, 2006). Dies geht oft einher mit spontanen Knochenfrakturen und einer Immobilisation der betreffenden Personen, was die Lebensqualität stark einschränkt.

Auch wenn die Osteoporose die häufigste Knochenerkrankung ist, gibt es noch viele weitere Erkrankungen des Skeletts, wie zum Beispiel die Osteomalazie und die Osteopetrose (Abb.3.1). Eine Osteomalazie wird zum größten Teil durch einen Mangel an Vitamin D ausgelöst. Hierdurch kommt es zu einer

schmerzhaften Knochenerweichung, da der Knochen nicht mehr genügend mineralisiert ist. Bei der Osteopetrose (Marmor Knochenkrankheit) ist die Resorption des Knochens gestört, was zu einer ungerichteten Anhäufung von Knochengewebe führt. Die Ursache hierfür ist meist ein vererbter genetischer Defekt, der zu einer Unterfunktion oder einem Funktionsausfall der knochenabbauenden Zellen (Osteoklasten) führt. Daraus ergibt sich eine Verringerung der mechanischen Stabilität des Knochens, da dessen Mikrostruktur verändert wurde. So kommt es trotz der erheblichen Vermehrung der Knochenmasse zu häufigen Knochenbrüchen, die nur schwer heilen.



**Abbildung 3.1: Knochenerkrankungen im Überblick.** Diese nicht-dekalzifizierten Schnitte von Wirbelkörpern in der von Kossa-/van Gieson-Färbung zeigen die bekanntesten Knochenerkrankungen. Der mineralisierte Knochen ist hierbei schwarz und das nicht-mineralisierte Osteoid rot dargestellt. Beim gesunden Knochen ist eine klare und deutliche Trabekelstruktur des mineralisierten Knochens zu erkennen. Bei der Osteoporose verschiebt sich das Gleichgewicht von Knochenauf- und -abbau zu Gunsten der Resorption. Dies führt zu einem Verlust an Knochenmasse. Bei der Osteomalazie sind die Trabekel nicht komplett mineralisiert und von Osteoid umgeben, was zu schmerzhaften Knochenerweichungen führt. Bei der Osteopetrose ist die Resorption des Knochens gestört, was zu einer ungerichteten Anhäufung von Knochengewebe führt.

Um die Ursachen genetisch bedingter skelettaler Erkrankungen erforschen zu können, hat es sich bewährt, gentechnisch veränderte Tiere als Modell für den Menschen zu nehmen. Besonders geeignet sind hierfür Mäuse, da ihr Organismus nicht nur dem des Menschen sehr ähnelt, sondern weil sie relativ leicht gentechnisch zu verändern sind und sich auch schnell vermehren. So konnte gezeigt werden, dass die Ausschaltung des Gens des Chloridkanals *Clc-7* in Mäusen zu einer schweren Form der Osteopetrose führt, da in diesen Mäusen die knochenabbauenden Osteoklasten ihre Funktion verlieren (Kornak et al., 2001). Nach dieser Entdeckung führte man DNA-Analysen an Patienten mit Osteopetrose durch und entdeckte im humanen *CLC-7* Gen dieselbe Mutation, wie zuvor in den Mäusen und kam damit zu der Aufklärung einer Ursache für

Osteopetrose beim Menschen (Cleiren et al., 2001). Im Osteoblasten spielt der Transkriptionsfaktor *Runx2* (auch *Cbfa1* genannt) eine Schlüsselrolle in der Osteoblastogenese. So weisen Mäuse, die einen homozygoten Defekt im *Runx2*-Gen besitzen, eine vollständige Inhibierung der Osteoblastendifferenzierung und eine fehlende Knochenbildung auf (Ducy et al., 1997; Komori et al., 1997; Otto et al., 1997; Kern et al., 2001; Vaes et al., 2006). Ein heterozygoter Defekt im *Runx2*-Gen in der Maus, führt zu einem Phänotyp, welcher stark der menschlichen Erbkrankheit Cleidocraniale Dysplasie (CDD) ähnelt (Mundlos et al., 1997; Karsenty, 2001). Diese Krankheit äußert sich in einer Fehlentwicklung des Beckens, des Schlüsselbeins und Schädels. Nach Analysen der *Runx2*-defizienten Mäuse konnte anschließend in Studien gezeigt werden, dass bei 50 bis 80% der Patienten, die an einer Cleidocranialen Dysplasie leiden, eine Mutation im *Runx2*- Gen vorliegt (Schäfer, 2005).

### 3.2 Zelltypen des Knochens

Am Knochenumbau sind vier Zelltypen beteiligt: Osteoblasten (3.2.1), Osteozyten (3.2.2), Knochenbelegzellen (3.2.3) und Osteoklasten (3.2.4).

#### 3.2.1 Osteoblasten

Die Osteoblasten sind die eigentlichen knochenaufbauenden Zellen. Wie Chondrozyten (Knorpelzellen) und Adipozyten (Fettzellen) entstehen sie aus mesenchymalen Vorläuferzellen. Damit aus einer mesenchymalen Vorläuferzelle ein Präosteoblast werden kann, müssen Wachstums- und Transkriptionsfaktoren wie *RUNX-2*, *FGFs* (*fibroblast growth factors*) und *BMPs* (*bone morphogenetic proteins*) vorhanden sein, welche die osteogene Weiterentwicklung ermöglichen. In Gegenwart von Zytokinen, PTH (Parathormon), Vitamin D und Östrogenen reifen die Präosteoblasten anschließend zu aktiven Osteoblasten heran, die eine extrazelluläre Matrix, das Osteoid, sezernieren, die zu 95% aus Typ I-Kollagen besteht. Die restlichen 5% der extrazellulären Matrix setzen sich zum größten Teil aus knocheneigenen Glykoproteinen, wie Osteocalcin (BGP, *bone gla protein*), BSP (*bone sialoprotein*) und Osteopontin, zusammen. Osteoblasten treten immer in Gruppen von ungefähr 200 Zellen pro Formationsfeld auf.

Das Osteoid wird zwei bis drei Wochen nach dessen Bildung mineralisiert. Der genaue Mechanismus dieses Vorganges wurde jedoch noch nicht entschlüsselt.

Es ist allerdings bekannt, dass in erster Linie die Ablagerung von Kalziumphosphatkristallen in die Knochenmatrix, vor allem Hydroxylapatit, die Mineralisation des Knochens ausmacht. Für die Bildung des Hydroxylapatits werden Kalzium und anorganische Phosphationen (Pi) benötigt. Gehemmt wird die Bildung von Hydroxylapatit durch anorganisches Pyrophosphat (PPi). Das empfindliche Gleichgewicht zwischen Pi und PPi wird hauptsächlich von drei Proteinen reguliert. Die gewebeunspezifische Alkalische Phosphatase (*Alpl*; früher: *TNAP*, *tissue-nonspecific alkaline phosphatase*) spaltet hierbei PPi in Pi, wodurch die Bildung von Kalziumphosphatkristallen ermöglicht wird. Die Gegenspieler der Alkalischen Phosphatase sind *Enpp1* (*ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1*) und *Ank* (*progressive ankylosis*). *Enpp1* generiert PPi aus ATP (Nukleosidtriphosphat) und *Ank* ist ein Transmembranprotein, welches PPi aus dem Zellinneren in das Zytoplasma transportiert.

### 3.2.2 Osteozyten

Zu Beginn sondern die Osteoblasten das Osteoid noch gerichtet zu einer Zellseite ab. Im Laufe der Zeit verlieren sie jedoch diese Polarität, und sondern zellumfassend Osteoid ab. Diese fortführende Sezernierung führt dazu, dass die Osteoblasten in ihre eigene mineralisierte Knochenmatrix eingebettet werden, wodurch ihre Differenzierung zu Osteozyten gefördert wird.

Osteozyten sind als Zellen definiert, die vollständig von mineralisierter Knochenmatrix eingeschlossen sind und nur über neuronähnliche Zellausläufer untereinander in Kontakt stehen. Über ihre Funktion ist bisher nur wenig bekannt. Da jedoch das gesamte Skelett vom Osteozytennetzwerk (auch Canaliculi genannt) durchzogen ist, wird vermutet, dass die Osteozyten im Knochen als Sensoren fungieren, die z. B. mechanische Belastung in zelleigene Signale transduzieren und weiterleiten. Dies ist durchaus denkbar, da gezeigt werden konnte, dass eine regelmäßige mechanische Belastung von Knochen zu einer Verstärkung des Knochens genau in dem Bereich führt, der über längere Zeit belastet wurde (Lee et al., 2002). Das Dentin matrix protein 1 (kodiert vom *Dmp1*-Gen) wird stark in den Osteozyten exprimiert und spielt eine wichtige Rolle während der Differenzierung von Osteoblasten zu Osteozyten (Rios et al., 2005). So führt eine Defizienz im *Dmp1*-Gen zu einem hypomineralisierten Knochen und

als Folge davon zu einer Osteomalazie. Spezifische Untersuchungen der Canaliculi in diesen *Dmp1*-defizienten Mäusen zeigten bedeutende Anomalitäten in der Osteozytenmorphologie. Hierbei waren sowohl die einzelnen Canaliculi um das Doppelte vergrößert, sowie die inneren Wände der Canaliculi uneben und „buckelig“ waren. Dies führte zu einer gestörten Integrität des gesamten Osteozytennetzwerkes (Rios et al., 2005; Feng et al., 2006).

### 3.2.3 Knochenbelegzellen

Die Knochenbelegzellen sind lang gestreckte Zellen, die die gesamte Knochenoberfläche besiedeln, aber metabolisch inaktiv sind. Sie bilden eine Art Schutzhülle des Knochens. Über ihre genaue Funktion ist allerdings noch wenig bekannt.

### 3.2.4 Osteoklasten

Die mehrkernigen Osteoklasten sind die einzigen Zellen im Körper, die Knochen resorbieren können und stellen somit die Gegenspieler der Osteoblasten dar. Anders als Osteoblasten treten Osteoklasten vereinzelt auf und besiedeln nur etwa 1% der gesamten Knochenoberfläche. Sie entstehen durch Fusion hämatopoetischer Vorläuferzellen aus der Monozyten-Makrophagen-Linie in Anwesenheit verschiedener Faktoren wie Vitamin D, PTH, M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) und Rankl (*receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand*). Um den Knochen resorbieren zu können, heften sich reife Osteoklasten an der Knochenoberfläche an und bilden eine sogenannte „*sealing zone*“. Hierdurch schafft der Osteoklast, in Zusammenarbeit mit Integrinen, eine undurchlässige Verankerung am Knochen. Es entsteht ein extrazelluläres Kompartiment zwischen Knochenoberfläche und Osteoklast, welches für Proteine und die meisten Ionen nicht zugänglich ist. Aus dem Inneren des Osteoklasten werden dann lysosomale Enzyme in das extrazelluläre Kompartiment geschleust. Dies geschieht, indem Vesikel mit den lysosomalen Enzymen aus dem Osteoklasteninneren mit der apikalen Zytoplasmamembran des Osteoklasten verschmelzen. Hierdurch wird zum einen die Zytoplasmamembran zu einer „*ruffled border*“ aufgefaltet und das extrazelluläre Kompartiment vergrößert und zum anderen werden die lysosomalen Enzyme ins Kompartiment freigesetzt. Protonen- und Chlorid-Ionen-Transporter, die in der apikalen Zytoplasmamembran des Osteoklasten lokalisiert sind, führen nun zu einer

Ansäuerung des extrazellulären Kompartiments, indem sie Salzsäure produzieren und so den pH-Wert des Kompartiments auf 4,5 heruntersetzen. Dies wiederum aktiviert die lysosomalen Enzyme und der Knochen wird resorbiert.

### **3.3 Knochenwachstum und Knochenremodeling**

#### **3.3.1 Knochenwachstum**

Es gibt zwei verschiedene Wege, wie Knochen gebildet werden können: zum einen enchondral, über eine Vorstufe aus Knorpelzellen, zum anderen desmal, wobei der Knochen direkt aus mesenchymalem Gewebe gebildet wird.

Die desmale Ossifikation beginnt damit, dass sich das Mesenchym, an der Stelle wo Knochen gebildet werden soll, verdichtet und stärker kapillarisiert. Mesenchymale Zellen wandeln sich dann durch Vergrößerung in Präosteoblasten und schließlich in Osteoblasten um, die Osteoid abgeben, welches mineralisiert. Diese Art der Knochenentwicklung findet vor allem bei platten Knochen statt, wozu das Schädeldach und die Rippen gehören.

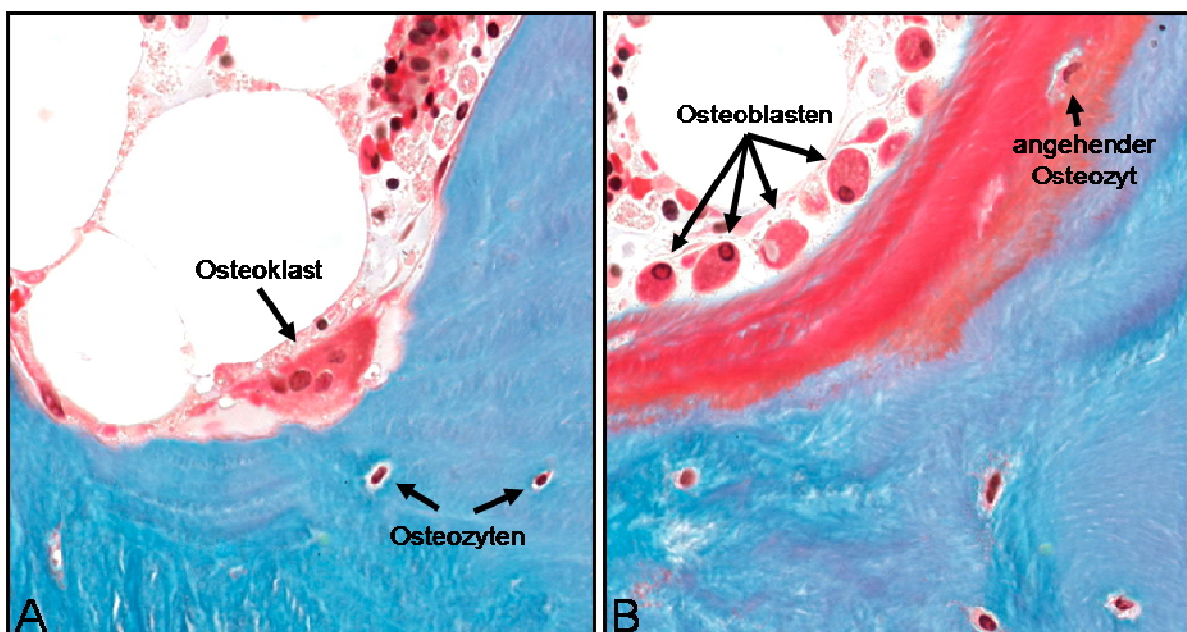
Die enchondrale Ossifikation ist typisch für die Entwicklung von Röhrenknochen. Hierbei dient eine Matrize aus Knorpelzellen den Osteoblasten und Osteoklasten als Grundgerüst. Diese Matrize wird nach und nach von Osteoblasten und Osteoklasten in Knochen umgebaut, zuerst in weniger strukturierten Gewebsknochen und später in Lamellenknochen. Wenn die Bildung der Lamellenknochen abgeschlossen ist, das Wachstum jedoch noch andauert, bleibt eine so genannte Wachstumsfuge erhalten. Sie befindet sich zwischen Knochenschaft und gelenknahem Knochenanteil und ist für das Längenwachstum verantwortlich. Die Knochenbildung findet hierbei analog zu der Knochenbildung während der Knochenentstehung statt.

#### **3.3.2 Knochenremodeling**

Nach Beendigung des Knochenwachstums beginnt die Phase des Knochenumbaus, wobei kontinuierlich alter Knochen durch Neuen ersetzt wird. Das „Remodeling“ dient zur Aufrechterhaltung des Knochenvolumens und es ermöglicht eine Anpassung des Knochens an mechanische und wechselnde Belastungen des Alltags, sowie zur Reparatur von Mikrofrakturen, die im Inneren des Knochens auftreten. Ohne Knochenremodeling würde der Knochen spröde



und brüchig werden. Die für den Umbau des Knochens verantwortliche so genannte *basic multicellular unit* (BMU) besteht aus Osteoblasten, Osteoklasten, sowie aus Osteozyten und Immunzellen, die in einer engen zeitlichen und räumlichen Abfolge agieren (Martin & Seeman, 2008). Täglich, und gleichzeitig an vielen Stellen des Skeletts, resorbieren hierbei Osteoklasten Knochengewebe (Abb.3.2 A). Diese Resorptionslakunen werden später von Osteoblasten mit neu gebildeter Knochenmatrix wieder aufgefüllt (Abb.3.2 B). Die Resorptionsphase des Knochens dauert 2 bis 3 Wochen an, während die anschließende Neubildung des Knochens bis zu 3 Monaten andauert.



**Abbildung 3.2: Knochenremodeling.** Das Knochenremodeling dient zur Aufrechterhaltung der Knochenmasse, und ermöglicht eine Anpassung des Knochens an wechselnde Belastungen. Das Remodeling ist in zwei Schritte unterteilt: A) Die Resorption des Knochens: In diesem Prozess bauen mehrkernige Osteoklasten, den mineralisierten Knochen (blau) ab. B) In der anschließenden Phase der Knochenformation formieren sich Osteoblasten am Grunde der Resorptionslakune und füllen diese mit Osteoid (rot) auf, welches später mineralisiert. Einige der Osteoblasten werden vom Osteoid eingeschlossen, wodurch dessen Differenzierung zu Osteozyten gefördert wird.

Osteozyten spielen eine entscheidende Rolle während des Knochenremodelings. Sie sind nicht nur der zahlenmäßig größte und langlebigste Zelltyp im Knochen, sondern sie durchspannen mit ihren Canaliculi den gesamten Knochen, worüber die Osteozyten untereinander und mit den Knochenbelegzellen in Kontakt stehen. Kommt es nun im Inneren eines Knochens zu einer Mikrofraktur, so werden auch einige Canaliculi beschädigt, woraufhin diese Osteozyten in die Apoptose (programmierter Zelltod) eintreten. Es wird angenommen, dass die apoptotischen

Osteozyten ein Signal an die Knochenbelegzellen senden, welches auf den Ort und die Größe des Schadens im Knochen hinweist. Die Knochenbelegzellen setzen daraufhin Kollagenase frei, ein Enzym, welches die oberste Schicht des Knochens degradiert. Dies, und das Wirken spezifischer Hormone, lockt Präosteoklasten aus dem Knochenmark oder dem Blut an, die aktiviert und zu Osteoklasten differenzieren, wodurch die Resorption des Defekts in Gang gesetzt wird. Zur selben Zeit werden auch Präosteoblasten angelockt, die zu Osteoblasten differenzieren. Die Osteoblasten formieren sich am Grund der, von den Osteoklasten erzeugten, Resorptionslakune, und füllen diese wieder mit Osteoid auf, welches später mineralisiert und von Knochenbelegzellen besiedelt wird. Das Knochenremodeling ist hiermit abgeschlossen (Martin & Seeman, 2008). Ist das Verhältnis von Knochenresorption zur Knochenformation ausgewogen, so bleibt das Gesamtknochenvolumen erhalten. Überwiegt jedoch die Aktivität der Osteoklasten, so nimmt das Knochenvolumen ab, da die Resorptionsaktivität der Osteoklasten dominiert. Hierzu kommt es häufig bei Frauen nach der Menopause oder allgemein bei Menschen nach dem 65. Lebensjahr, wodurch die Fragilität der Knochen zunimmt.

### **3.4 Regulation des Knochenremodelings**

Der zuvor beschriebene Prozess des Knochenremodelings ist äußerst vielfältig und komplex und wird sowohl zentral und endokrin als auch von auto- und parakrinen Mechanismen reguliert. Zu den wichtigsten systemischen Regulationsmolekülen gehören das Parathormon (PTH), Calcitonin, Vitamin D<sub>3</sub> und Östrogen. Die autokrine Regulation erfolgt primär über den Wnt- und den Rank-Rankl-Opg Signalweg.

#### **3.4.1 Die Rolle von Östrogen im Knochenstoffwechsel**

Östrogene gehören zu den Steroidhormonen und wirken auf den Knochen über den Östrogen Rezeptor  $\alpha$  und  $\beta$ . Östrogene wirken sowohl stimulierend auf die Knochenformation, sowie inhibierend auf die Knochenresorption (Raisz & Rhodan, 2003). Neben der direkten Wirkung von Östrogen auf den Knochen wurde auch eine indirekte Wirkung nachgewiesen. Hierbei reguliert Östrogen die Produktion von Zytokinen in den Osteoblasten und Knochenmarkszellen (Jilka et al., 1992). Einen hemmenden Effekt übt Östrogen hierbei z.B. auf die Bildung des

Interleukin-6 (Il-6) aus (Jilka et al., 1992; Manolagas et al., 1998). Il-6 ist ein Zytokin, welches wichtig für die Osteoklastogenese ist (Manolagas et al., 1996). Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass Östrogen die Produktion von Osteoprotegerin (Opg) stimuliert, wodurch die Osteoklastogenese gehemmt wird (Hofbauer et al., 1999).

Während der Wechseljahre sinkt der Östrogenspiegel bei Frauen stark ab, wodurch häufig eine postmenopausale Osteoporose entsteht. Auch eine Ovariectomie führt zu einem starken Knochenmasseverlust, der auf einen Östrogenmangel zurückzuführen ist. Dieser starke Knochenmasseverlust wird in beiden Fällen durch zwei Hauptfaktoren ausgelöst. Zum einen durch eine erhöhte Osteoklastenaktivität, da der pro-apoptotische Effekt, den das Östrogen auf Osteoklasten ausübt, ausbleibt (Hughes et al., 1996). Und zum anderen nimmt die Apoptose der Osteoblasten und Osteozyten dramatisch zu, da der anti-apoptotische Effekt des Östrogens auf diese beiden Zelltypen fehlt (Kousteni et al., 2001).

### **3.4.2 Regulation der Kalziumhomöostase**

Die wichtigsten Regulatoren der Kalziumhomöostase sind das PTH, das Calcitonin und die aktive Form des Vitamin D<sub>3</sub> (1,25-Dihydroxy-Calciferol).

Sinkt der Kalziumspiegel im Blut unter den Schwellenwert, wird PTH in der Nebenschilddrüse gebildet und in den Blutkreislauf abgegeben. Dies regt Osteoklasten an, Knochen zu resorbieren, um Kalzium aus den Knochen herauszulösen. Hierdurch steigt der Kalziumgehalt im Blut wieder an. Eine weitere Funktion des PTH ist die Aktivierung des Adenylatcyclasesystems, wodurch die Kalziumrückresorption in der Niere gesteuert wird. Die aktive Form des Vitamin D<sub>3</sub> wirkt hauptsächlich am Dünndarm, indem es dort die Kalziumresorption steuert. PTH und die aktive Form des Vitamin D<sub>3</sub> regulieren einander gegenseitig, indem zum einen PTH die Bildung des aktiven Vitamin D<sub>3</sub> in der Niere, durch Aktivierung des Enzyms 1-Hydroxylase, stimuliert. Zum anderen reguliert das Vitamin D<sub>3</sub>, neben Kalzium, die Parathormonsekretion der Nebenschilddrüse. Über spezifische intrazelluläre Vitamin D<sub>3</sub>-Rezeptoren wird die Parathormonsekretion gehemmt (Feinfeld & Sherwood, 1988).

Calcitonin wird in der Schilddrüse gebildet. Es senkt den Kalziumspiegel im Serum und ist damit der Gegenspieler des PTH. Lachs-Calcitonin findet klinisch

Anwendung zur Behandlung von Knochenmasseverlustkrankungen, da es ein Inhibitor der Knochenresorption ist (Chesnut et al., 2008).

### 3.4.3 Der kanonische Wnt-Signalweg

Der kanonische Wnt-Signalweg ist einer der wichtigsten Signalwege zum Knochenerhalt und zur Knochenentwicklung (Almeida et al., 2005). Der Signalweg ist nach seinem Liganden „Wnt“ benannt, einer Familie von sezernierenden Glykoproteinen, die an Serpentinrezeptoren der Frizzled-Familie binden. Der erste Hinweis auf eine wichtige Funktion des Wnt-Signalweges im Knochenstoffwechsel des Menschen war die Entdeckung, dass bei einigen Trägern des Osteoporose-Pseudoglioma-Syndroms, eine inaktivierende Mutation des *LRP5*-Gens, einem Co-Rezeptor des Wnt, vorliegt (Gong et al., 2001). Das Osteoporose-Pseudoglioma-Syndrom ist eine sehr seltene, autosomal-rezessiv vererbte Krankheit mit angeborener oder sich im Kindesalter manifestierender Blindheit und schwerer, in der Jugend beginnender Osteoporose mit Spontanfrakturen. An der Signaltransduktion des Wnt-Signalweges sind zahlreiche Proteine beteiligt. Wnt bindet hierbei an einen Rezeptorkomplex, der aus dem Rezeptor Fzd und den Co-Rezeptoren LRP 5/6 zusammensetzt ist. Hierdurch wird das Protein Dishevelled aktiviert, welches wiederum inaktivierend auf den Proteinkomplex, bestehend aus Axin, APC und GSK3, wirkt. Hierdurch wird  $\beta$ -Catenin im Zytosol akkumuliert und in den Zellkern transportiert. Im Zellkern bindet  $\beta$ -Catenin an die Transkriptionsfaktoren TCF/LEF (*T cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor 1*) und reguliert über sie die Genexpression spezifischer *Wnt*-Zielgene (Gordon & Nusse., 2006). Ohne eine Stimulation durch die Wnt-Familie wird  $\beta$ -Catenin durch einen Komplex bestehend aus Axin, APC und GSK3 phosphoryliert und durch das Proteasom abgebaut.

### 3.4.4 Rank-Rankl-Opg System

Eine ebenso wichtige Rolle in der Regulation des Knochenremodelings kommt dem Rank-Rankl-Opg System zu. Rankl wird von Osteoblasten sezerniert, und fördert durch die Bindung an seinen Rezeptor Rank die Bildung und Differenzierung von Osteoklasten, was letztendlich zu einer erhöhten Knochenresorption führt. Opg ist ein kompetitiver Inhibitor des Rankl. Es wird

auch von Osteoblasten sezerniert und verhindert die Bindung von Rankl an seinen Rezeptor Rank. Während einer postmenopausalen Osteoporose ist oft das empfindliche Gleichgewicht von Rankl und Opg, zu Gunsten des Rankl gestört, wodurch vermehrt Knochen abgebaut werden kann. Ein Grund hierfür könnte das Fehlen von Östrogenen sein. Denn es konnte gezeigt werden, dass eine 17 $\beta$ -Estradiol-Gabe die Expression von Opg fördert (Hofbauer et al., 2004).

### **3.5 Die Familie der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren**

#### **3.5.1 Struktur der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren**

Midkine (Mdk) und Pleiotrophin (Ptn) bilden eine eigenständige Familie von Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren (Muramatsu, 1993). Sie besitzen eine 45%ige Homologie ihrer Aminosäuresequenz, wobei alle 10 Cysteinreste in Wirbeltieren konserviert sind. Beide Proteine bestehen aus einer C- und N-terminalen Domäne, die sich jeweils aus drei anti-parallelen  $\beta$ -Faltblattstrukturen zusammensetzt (Muramatsu, 2002; Kadomatsu et al., 2004). Die beiden Domänen sind untereinander durch eine flexible „linker-region“ verbunden. Die C-terminale Domäne des Mdk besitzt zwei Cluster, die Heparin binden können und häufig ist hierfür eine Dimerisierung des Mdk-Moleküls notwendig (Iwasaki et al., 1997; Kadomatsu et al., 2004).

Das 13 kDa große Mdk Protein wurde 1993 in malignen embryonalen Keimzelltumoren entdeckt, bei denen untersucht wurde, welche Gene durch eine Behandlung mit Retinolsäure induziert werden (Kadomatsu et al., 1988; Tomomura et al., 1990). Humanes und murines Mdk besitzen eine 87%ige Sequenzhomologie und die Kodierungssequenz von beiden Proteinen besteht aus vier Exonen, wobei die Exon-Intron Grenzen konserviert sind. In der Promoterregion vom *Mdk*-Gen befindet sich sowohl ein Retinolsäure-Aktivierungselement (*retinoic acid-responsive element*, RARE), wie auch eine Bindungsstelle für das Wilms Tumor Supressor Gen (WT1). Flankiert wird das *Mdk*-Gen durch das Diacylglycerolkinase-Gen (*DGK*) und das Muscarine Acetylcholine Rezeptor M4-Gen (*CHRM4*). Beim Menschen befindet sich *Mdk* auf Chromosom 11 und bei der Maus auf dem Chromosom 2 (Muramatsu, 2002).

### 3.5.2 Funktion der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren

Die Expression von *Mdk* und *Ptn* ist in der Entwicklungsphase am stärksten (Rauvala et al., 1989; Muramatsu, 1991), wobei in ausgewachsenen Mäusen eine Expression des *Mdk*-Gens nur noch in der Niere und den Gonaden nachweisbar ist (Muramatsu, 1993). *Mdk* und *Ptn* stimulieren beide die Migration embryonaler Neuronen und Osteoblasten (Maede et al., 1999; Qi et al., 2001) und fördern den Neuritenauswuchs embryonaler Neuronen (Rauvala et al., 1989; Muramatsu et al., 1991; Muramatsu et al., 1993). Außerdem fördert *Mdk* die Migration von inflammatorischen Zellen, zu denen Makrophagen und Neutrophile gehören (Takada et al., 1997; Horiba et al., 2000). Auch die Differenzierung von Osteoklasten aus Makrophagen wird von *Mdk* gefördert (Maruyama et al., 2004). Eine weitere wichtige Funktion scheinen *Mdk* und *Ptn* während der Tumorentwicklung zu haben. In vielen Karzinomarten, wie Lungen-, Brust-, Speiseröhren-, Pankreas- und Magenkrebs, wird *Mdk* stark und gewebeunabhängig exprimiert (Tsutsui et al., 1993, O'Brien et al., 1996). Hierbei korreliert eine starke *Mdk*-Expression mit einer schlechten Heilungschance der Krebsart (Maehara et al., 2007). Das Gegenteil ist bei *Ptn* der Fall. Je weniger *Ptn* im Tumor gebildet wird, desto schlechter ist die Prognose auf Heilung (Kadomatsu et al., 2002). Daher wird *Mdk* als Tumormarker in Betracht gezogen und ein Antikörper gegen *Mdk* könnte ein interessantes Ziel für eine Therapie bieten (Maehara et al., 2007).

### 3.5.3 Funktion der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren im Knochenstoffwechsel

Auch im Knochenstoffwechsel scheinen *Mdk* und *Ptn* eine Rolle zu spielen. Bei einer Fraktur der Tibia in der Maus, wurde eine starke *Mdk*-Expression in den proliferierenden Chondrozyten und eine schwache *Mdk*-Expression in der inflammatorischen Phase nachgewiesen (Ohta et al., 1999). Auch im Krankheitsbild der Rheumatoiden Arthritis (RA) ist *Mdk* involviert. Hierbei reguliert es zwei wichtige Schritte in der Entwicklung der RA, nämlich die Migration von inflammatorischen Leukozyten und die Osteoklastendifferenzierung (Maruyama et al., 2004). In *in vivo* Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von *Ptn* im frühen Stadium der Knochenentwicklung zu einem gesteigerten Knochenwachstum führt, wobei der Knochen im Alter jedoch brüchig

wird. Außerdem zeigten Frakturheilungsstudien in diesen Mäusen ein verzögerte Knochenheilung (Li et al., 2004). Diese Ergebnisse scheinen den Einfluss von Ptn auf den Knochenmetabolismus zu unterstreichen. Daraufhin wurde ein *Ptn*-defizientes Mausmodell entwickelt. In diesen Mäusen konnte jedoch keinerlei Veränderung auf die Knochenbildung oder Mineralisation beobachtet werden. Die *Ptn*-defizienten Mäuse zeigten keinerlei Unterschied zu den Wildtypkontrollen (Lehmann et al., 2004).

#### **3.5.4 Rezeptoren und Signaltransduktionswege**

Als potentielle Rezeptoren für die Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren Mdk und Ptn wird ein Rezeptorkomplex vermutet, der aus der Protein-Tyrosin-Phosphatase Rezeptor  $\zeta$  (*Ptprz1*) und Mitgliedern der LRP (low density lipoprotein receptor-related protein)-Familie bestehen könnte (Muramatsu et al., 2000; Muramatsu, 2002). Allerdings wurde auch eine Bindung von Mdk an die Syndecan- Familie (Syndecan-1, -3 und -4) (Kojima et al., 1996), und an ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) (Stoica et al., 2002) nachgewiesen. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist allerdings in den meisten Geweben noch nicht bekannt, an welchen Rezeptor Mdk bindet und über welchen Signaltransduktionsweg die Mdk-Wirkung vermittelt wird.

#### 4. Aufgabenstellung

Analytische Untersuchungen transgener Mäuse, bei denen eine Überexpression von *Ptn* vorlag, zeigten, dass es im frühen Stadium der Knochenentwicklung zu einem gesteigerten Knochenwachstum kommt und ein Schutz vor einem Knochenmasseverlust nach einer Ovariectomie vorlag. Verglichen mit diesen Ergebnissen ist es verwunderlich, dass in den *Ptn*-defizienten Mäusen kein Knochenphänotyp festzustellen war. Während der Osteoblastendifferenzierung konnte weiterhin gezeigt werden, dass in den Osteoblasten keine Expression von *Ptn* detektiert werden konnte, wohingegen die Expression von *Mdk* kontinuierlich anstieg (Lehmann et al., 2004). Es ist weiterhin bekannt, dass *Mdk* in der Embryonalentwicklung vor *Ptn* gebildet wird und beide Proteine ähnliche Aufgaben im Organismus übernehmen (Herradon et al., 2005). Zusammengefasst lassen diese Befunde vermuten, dass ein Fehlen von *Ptn* ohne Auswirkungen bleibt, da es entweder keine physiologische Funktion in den Osteoblasten hat oder das *Mdk* dessen Funktionen übernimmt und damit einen Defekt kompensieren kann. Weiterhin wurden auch *Ptprz1*-defiziente Mäuse analysiert, die eine Osteopenie in Wirbelkörpern und Röhrenknochen aufweisen. Da *Ptprz1* ein potentieller Rezeptor von *Mdk* ist und dessen Defizienz zu einem Knochenphänotyp führt, wohingegen *Ptn* scheinbar keinen Einfluss hat, ist es wichtig herauszufinden, welche Rolle *Mdk* im Knochenstoffwechsel spielt. Aus diesem Grund beschlossen wir, ein *Mdk*-defizientes Mausmodell zu analysieren. Ein Zuchtpaar *Mdk*-defizienter Mäuse wurde uns von Prof. Dr. Takashi Muramatsu (Nagoya, Japan) zur Verfügung gestellt. Mit diesen Mäusen sollte eine eigenständige Kolonie am UKE gezüchtet und im Alter von 4, 6, 12 und 18 Monaten histologisch und histomorphometrisch, im Vergleich zu Kontrolltieren aus der selben Kolonie, analysiert werden. Anschließende Zellkultur- und molekularbiologische Versuche sollten zur Ermittlung eines möglichen Signaltransduktionsweges dienen, über den *Mdk* seine Funktion im Knochen übermittelt. Da in *Ptn*-transgenen Mäusen gezeigt werden konnte, dass diese Mäuse vor einem durch eine Ovariectomie induzierten Knochenmasseverlust geschützt sind, sollten auch Wildtyp- und *Mdk*-defiziente Mäuse ovariectomiert werden, um zu untersuchen, welchen Einfluss eine *Mdk*-Defizienz auf den Knochenmasseverlust hat, der durch eine Ovariectomie verursacht wird.



## 5. Materialien & Methoden

### 5.1 Materialien

#### 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 und rekombinanten Proteine wurden von den Firmen Roche (Mannheim) und NEW ENGLAND BIOLABS (Frankfurt am Main) bezogen.

#### 5.1.2 Antikörper

Die für die Westernblot und Immunhistologie verwendeten Antikörper und Reagenzien sind in folgender Liste zusammen gefasst. Sollte bei den Antikörpern keine Spezifität genannt werden, so ist der Antikörper sowohl gegen Maus wie auch Mensch gerichtet.

Anti-human Midkine-Antikörper (AK): R&D Systems, # AF-258-PB

$\beta$ -Actin-AK: Sigma, # GW-23017

$\beta$ -Catenin-AK: R&D Systems, # AF-1329

Phospho- $\beta$ -Catenin (Ser33/37/Thr41)-AK: Cell Signaling, # 9561

Polyklonaler Anti-Kaninchen-IgG-HRP-AK: DakoCytomation, # P-0449

Polyklonaler Anti-Ziege-IgG-HRP-AK: DakoCytomation, # P-0447

### 5.1.3 Puffer und Lösungen

<u>Alcianblau-Färbelösung:</u>	0,015% Alcianblau 8GX (Sigma), 20% Essigsäure, 75% Ethanol
<u>Alizarinrot-Färbelösung:</u>	0,005% Alizarinrot-Natriumsulfat (Sigma) in 1% Kaliumhydroxid
<u>Alkalische Phosphatase Substrat- Lösung:</u>	1% Diethanolamin, 0,01% TRITON X-100 ad 500ml H <sub>2</sub> O; pro 3ml Substratlösung 1 Tablette p-Nitrophenylphosphat (Sigma)
<u>β-Galaktosidase-Puffer (Tranfektion):</u>	50mM Tris (pH 7,5), 10mM MgCl <sub>2</sub> , 100mM NaCl
<u>Blocking Puffer:</u>	15ml 10x TBS, 135ml H <sub>2</sub> O, 7,5g Milchpulver, 0,15ml Tween20
<u>Calcein-Lösung:</u>	0,2g NaCl, 0,5g Natriumbicarbonat, 25ml H <sub>2</sub> O, 0,25g Calcein; steril filtrieren, bei 4°C lagern
<u>Coomassie-Entfärbelösung:</u>	15% Methanol, 10% Essigsäure
<u>Coomassie-Färbelösung:</u>	50% Methanol, 0,1% Coomassie (Sigma), 10% Essigsäure
<u>Chromalaunlösung:</u>	4g Kalium-3-sulfat, 100ml Aqua dest, filtrieren und bei 4°C lagern
<u>ECL-Lösung (Western blot):</u>	20ml 0,1M Tris (pH 8,5), 6,1µl 30% Wasserstoffperoxid, 100µl Luminol, 100µl Coumarinsäure

<u>DEPC-H<sub>2</sub>O:</u>	1000µl Diethylpyrokarbonat ad 1L H <sub>2</sub> O, ü. N. bei RT inkubieren, autoklavieren
<u>Differenzierungsmedium Osteoblasten:</u>	Kulturmedium, 50µg/ml Ascorbinsäure 10mM β-Glyzerolphosphat
<u>Differenzierungsmedium Osteoklasten:</u>	Kulturmedium, 10nM Vitamin D, ab Tag 5: 20ng/ml M-CSF, 40ng/ml sRANKL
<u>10x DNA-Gel-Ladepuffer:</u>	10g Ficoll 400, 0,5g SDS, 0,1g Bromphenolblau, 0,1g Methylencyanol, 10ml 0,5M EDTA ad 50ml H <sub>2</sub> O; autoklavieren
<u>Gelatinelösung (Beschichtung der</u>	0,5g Gelatine in 50ml Aqua dest bei 60°C
<u>Objekträger für Acrylathistologie):</u>	lösen, 2ml Chromalaunlösung hinzugeben; bei 4°C lagern
<u>Giesslösung:</u>	1L Methylmethacrylat, 100ml Nonylphenylpolyglycolaether-Acetat, 6,6g Benzoylperoxid
<u>GTE (Maxi-Präp):</u>	4,95g Glukose, 1,97g Tris-HCl, 10ml 0,5M EDTA ad 500ml H <sub>2</sub> O
<u>Hybridisierungspuffer:</u>	0,5M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> und 0,5M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> gegeneinander titrieren bis pH 7 eingestellt ist, danach 6.6% SDS hinzufügen

<u>Infiltrationslösung I und II:</u>	1L entstabilisiertes MMA, 100ml Nonylphenylpolyglycolaether-Acetat, 3.3g BPO
<u>Kaliumazetatlösung (Maxi-Präp):</u>	294g Kaliumazetat (5M), 115ml Essigsäure ad 1L H <sub>2</sub> O; steril filtrieren und Lagern bei 4°C
<u>Kulturmedium (Osteoblasten):</u>	1L alpha-MEM, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin
<u>Kulturmedium (Osteoklasten):</u>	1L alpha-MEM, 10% FKS (BioWhittaker, # DE 14-801F), 1% Penicillin / Streptomycin
<u>Lichtgrün-Lösung:</u>	0,5g Lichtgrün, 0,5ml Eisessig, 250ml Aqua dest.
<u>Luziferin-Puffer:</u>	100mM Tris (pH 7,8), 5mM ATP, 15mM MgSO <sub>4</sub> , 1mM DTT
<u>Mausschwanz-Lyse-Puffer:</u>	50ml 1M Tris, 200ml 0,5M EDTA, 100ml 1M NaCl, 50ml 20%SDS ad 1L H <sub>2</sub> O
<u>10x MOPS:</u>	83,7g MOPS (pH 7), 41g Na-Acetat, 3,7g EDTA-Pulver ad 1L DEPC-H <sub>2</sub> O
<u>Narkosemittel:</u>	1,2ml Ketamin Lösung, 100mg Ketamin/ml (GRÄUB-AG, Bern), 0,8ml Rompun Injektions- lösung, 2% (BAYER, Leverkusen), 8ml 0,9%ige NaCl-Lösung (BRAUN, Melsungen)

<u>NET-Puffer (Western Blot):</u>	100ml 1M Tris/HCl (pH 7,4), 210ml 1M NaCl, 20ml 0,5M EDTA, 1ml TRITON X-100, 5g Gelantine ad 2L H <sub>2</sub> O
<u>PEG-Lösung (Maxi-Präp):</u>	15g PEG 8000, 4,7g NaCl ad 50ml H <sub>2</sub> O; Lagern bei 4°C
<u>Phosphorwolfram-Orange G Lsg.:</u>	2,5g Phosphorwolfram, 1,25g Orange G, 150ml Aqua dest.
<u>Ponceau de Xylidine Lösung:</u>	2,5g Ponceau de Xylidine, 1,25g Säure-fuchsin, 0,5ml Eisessig, 150ml Aqua dest.
<u>Resorufin-β-Galaktopyranosid:</u>	7,5mg/ml in DMSO
<u>RIPA-Lösung:</u>	1% NP40, 1% Nadeoxycholol, 0,1% SDS, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 0,01M Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , immer frisch Protease Inhibitoren hinzusetzen
<u>Sodaformollösung:</u>	12,5g Natriumkarbonat, 187ml Aqua dest, 62,5ml 37% Formalin
<u>10x SDS-Elektrophorese-Puffer:</u>	30,2g Tris Base, 144g Glyzin, 10g SDS ad 1000ml H <sub>2</sub> O; Lagerung bei 4°C
<u>6x SDS-Probepuffer:</u>	7ml 4x Tris*HCl/SDS (pH 6,8), 3ml Glyzerol, 1g SDS, 0,93 DTT, 1,2mg Bromphenol Blau ad 10ml H <sub>2</sub> O; Aliquots bei -70°C lagern

<u>20x SSC:</u>	175,5g Natriumchlorid, 88,2g Natriumcitrat ad 1L H <sub>2</sub> O, mit HCl auf pH 7 einstellen
<u>50x TAE-Puffer:</u>	242g Tris Base, 57,1ml Eisessig, 37,2g Na <sub>2</sub> EDTA-2*H <sub>2</sub> O ad 1L H <sub>2</sub> O, pH 8,5
<u>TE-Puffer:</u>	10mM Tris (pH 7,4), 1mM EDTA
<u>20x Transferpuffer:</u>	80ml 1M Tris, 60g Glycin ad 400ml H <sub>2</sub> O
<u>TRAP-Puffer:</u>	40mM Na-Acetat (pH 5), 10mM Na-Tatrat
<u>TRAP-Substrat:</u>	5mg Naphtol ASMX-Phosphat, 500µl Dimethylformamid, 50ml TRAP-Puffer, 30mg Fast Red Violet, direkt vor Gebrauch dazugeben
<u>10x Tris Buffered Saline (TBS):</u>	24,4g Tris base, 80g NaCl ad 1L H <sub>2</sub> O; pH auf 7,6 einstellen
<u>4x Tris*Cl/SDS, pH 6,8:</u>	6g Tris Base ad 100ml H <sub>2</sub> O (pH 6,8), steril filtrieren, 0,4g SDS hinzufügen; Lagerung 4°C
<u>4x Tris*Cl/SDS, pH 8,8:</u>	91g Tris Base ad 500ml H <sub>2</sub> O (pH 8,8), steril filtrieren, 2g SDS hinzufügen; Lagerung 4°C
<u>Toluidin-blau Lösung:</u>	1g Toluidinblau O, 100ml dest. Wasser, pH 4,5

<u>Van Gieson Lösung:</u>	2,5g Säurefuchsin, 900ml gesättigte Pikrinsäure, 100ml Glyzerin, 5ml konzentrierte Salpetersäure
<u>Verdau-Lösung:</u>	40ml $\alpha$ -MEM (serum- und antibiotikafrei), 0,04g Collagenase Typ Ia, 0,08g Dispase; steril filtrieren
<u>Waschpuffer (Western Blot):</u>	1x TBS, 0,1% Tween20
<u>Zell-Lyse-Puffer (Transfektion):</u>	100mM Tris (pH 7,8), 1mM DTT

#### 5.1.4 Bakterien

Zur Vermehrung der Plasmide wurden chemiekompetente *E.coli* der Firma INVITROGEN, namens „One shot TOP10 *E.coli*“, (#C404003) verwendet.

#### 5.1.5 Plasmide

Das TOPflash-Plasmid (TCF Reporter Plasmid) mit dem TK-Luciferase-Reporter wurde von der Firma BIOMOL GmbH, Hamburg (#21-170) bezogen. Das pCMV5-LacZ, sowie das pLNCWnt3HA Plasmid wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. Karsenty (New York, USA), und das Ptpz1-Plasmid von der Arbeitsgruppe um Dr. Harroch (Paris, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Die Plasmide pCMV-Mdk (#BC012244) und pCMV-Ptn (#BC061695) wurden vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin bezogen.

#### 5.1.6 Zellen

##### 5.1.6.1 MC3T3-E1-Zellen

Die Zelllinie MC3T3-E1 (#ACC-210) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig bezogen. Die MC3T3-E1 Zelllinie wurde abgeleitet von präosteoblastären Zellen, die aus den Calvarien von embryonalen C57/BL6 Mäusen gewonnen wurden.

### 5.1.6.2 Primärzellen

Murine primäre osteoblastäre Zellen wurden in unserem Labor aus den Calvarien von drei bis fünf Tage alten Mäusen isoliert und kultiviert. Die Tiere stammen aus dem Tierstall des UKE. Hierbei wurden immer defiziente Zellen mit ihren Wildtypkontrollen verglichen.

## 5.2 Methoden

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

### 5.2.1 Maushaltung

Die Mäuse wurden in der Tierhaltung des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf gehalten. Sie wurden mit einem Standardfutter und Wasser *ad libitum* ernährt und unterlagen einem normalen Tag-Nacht-Zyklus.

#### 5.2.1.1 Ovariectomie der Mäuse

Die Mäuse wurden kurz mit Äther narkotisiert, um ihnen anschließend intraperitoneal (in den Bauchraum) Ketanest-Rompun-Narkosemittel injizieren zu können. Dadurch wurde eine schnelle, ausreichend tiefe Narkose erreicht, mit einer chirurgischen Toleranz von 30 Minuten. Um das Austrocknen der Augen zu verhindern, wurden diese, sobald die Tiefschlafphase der Mäuse erreicht war, mit Augensalbe versehen. Der Bauchraum der Mäuse wurde mit Cutasept®F desinfiziert und das Abdomen durch einen medianen Schnitt eröffnet. Das Dünndarmkonvulat wurde vorsichtig mit der geschlossenen Pinzette zur Seite geschoben, oder bei Bedarf herausgehoben, und in eine mit 0,9%iger Natriumchloridlösung getränkte Kompresse gelegt. Nach Aufsuchen der Eileiter des Uterus wurden die Ovarien beidseitig vorsichtig reseziert. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass das komplette Ovar entfernt und die Arterien nicht beschädigt wurden. Das Dünndarmkonvulat wurde anschließend wieder vorsichtig in die Bauchhöhle zurückverlegt und das Peritoneum, sowie der Hautschnitt mit einer Einzelknopfnah (4/0 Ethilon®-Faden) verschlossen. Postoperativ erhielten die Tiere eine Analgesie mit Tramal®-Tropfen (1,25mg Tramal® auf 100ml Trinkwasser).



### **5.2.1.2 Calceinmarkierung**

Um die Zuwachsrate an Knochen histologisch darstellen zu können, wurde den Mäusen zweimal im Abstand von sieben Tagen der fluorochrome Farbstoff Calcein (100µl Injektionslösung) subcutan in den Bauchraum injiziert, welcher sich in die mineralisierende Matrix einlagert. Unter UV-Licht wurde anschließend auf 12µm dicken, ungefärbten Acrylatschnitten, von Tibia und Wirbelkörper, der Abstand zwischen den beiden grün-fluoreszierenden Banden gemessen und die Knochenformationsrate (BFR, bone formation rate) bestimmt.

## **5.2.2 Histologie und Morphologie**

### **5.2.2.1 Tötung der Mäuse**

Die Mäuse wurden mittels einer Inhalationsnarkose getötet und gewogen. Anschließend wurde der Bauchraum geöffnet, aus dem Herzen Blut entnommen und die Blase punktiert, um Urin zu gewinnen. Die Tiere wurden gehäutet und die inneren Organe entnommen, damit nur noch das Skelett zur Analyse übrig blieb. Auf einer Korkplatte wurden die Skelette gestreckt und für 24 Stunden in frischen 3,7% gepuffertem Formaldehyd fixiert und anschließend in 80%igem Ethanol gelagert.

### **5.2.2.2 Kontaktröntgen, µCT und Bruchtest**

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

Im µCT 40 (Fa. SCANCO MEDICAL, Basserdorf, Schweiz) wurde von den Femora eine dreidimensionale Darstellung gemacht. Die Auflösung betrug hierbei 1024 x 1024 bits, 2,5cm Durchmesser und 16 bit Graustufen. Nach dem Scanvorgang wurden die Femora im Dreipunktbiegetest gebrochen. Hierzu wurden die Knochen im Rhinoceros 3.0 (Fa. Mc Neel North America, Seattle, USA) eingespannt und ein Stempel drückte auf die Knochen, bis ein Ermüdungsbruch auftrat. Die Protokollierung der Daten erfolgte mittels der TestExpert-Software Version 10.1. Es wurden die Maximalkraft, die Steifigkeit des Knochens und die absorbierende Energie bis zum Materialversagen gemessen.

### 5.2.2.3 Paraffin- und Acrylathistologie

Von allen Mäusen wurden die rechte Tibia und die oberen vier Lendenwirbel entnommen, in Acrylat eingebettet und histologisch untersucht. In der Acrylathistologie können Knochen unentkalkt und damit völlig intakt analysiert werden, wodurch es auch möglich ist, Mineralisationsdefekte nachzuweisen. Dies ist bei der Paraffinhistologie nicht möglich, da der Knochen vorher bei 37°C für 24 bis 72 Stunden in 20% EDTA entkalkt wird, wodurch sämtliche Strukturen verloren gehen.

Zu Beginn der Acrylathistologie wurden die Knochen im Autotechnikon entwässert (2x 60 Minuten 70% Ethanol, 3x 60 Minuten 80% Ethanol, 3x 60 Minuten 96% Ethanol, 4x 60 Minuten absoluten Ethanol). Hiernach wurden sie für je einen Tag bei 4°C in Infiltrationslösung I und II infiltriert und dann in Gießlösung in Glasgefäße eingebettet. Die Polymerisation erfolgte bei 4°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Blöcke aus den Glasgefäßen herausgelöst, geschliffen und mit dem Rotationsmikrotom (MICROTEC CUT 4060E) wurden 4 und 12µm dicke Schnitte angefertigt, die auf Objektträger aufgezogen wurden, die mit Gelatinelösung beschichtet waren. Zum Strecken der Schnitte wurde eine Strecklösung verwendet, bestehend aus 80%igem Isopropanol und einem Tropfen Butylether. Über Nacht wurden die Objektträger in einer Presse im Wärmeschrank bei 60°C getrocknet und anschließend gefärbt.

Da nicht jede Färbung auf Acrylatschnitten möglich ist, wurden zum Teil auch Paraffinschnitte aus der linken Tibia der Mäuse angefertigt. Nach der Entkalkung der Knochen in 20% EDTA, wurden sie im Paraffin-Autotechnikon entwässert (2x 60 Minuten 70% Ethanol, 60 Minuten 80% Ethanol, 2x 60 Minuten 96% Ethanol, 2x 60 Minuten absoluten Ethanol, 2x 60 Minuten Xylol, 3x 60 Minuten Paraffin, 60°C), dann in 60°C warmes Paraffin gegossen und zur Aushärtung auf Eis gestellt. Auf dem Schlittenmikrotom (Fa. Jung) wurden dann 3µm dicke Schnitte angefertigt, auf polysinbeschichtete Objektträger (Fa. Menzel GmbH) aufgezogen und eine Stunde bei 60°C im Wärmeschrank fixiert, bevor sie gefärbt wurden.

### 5.2.2.4 Von Kossa/van Gieson-Färbung

Bei der von Kossa-/van Gieson-Färbung wird mineralisierter Knochen schwarz und Kollagen und Bindegewebe rot angefärbt. Das Acrylat der Schnitte wurde drei Mal für 10 Minuten mit 2-(Methoxyethyl)-azetat (Merck, #806061)

herausgelöst und anschließend wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (absolut Ethanol bis 50% Ethanol) bewässert. Gefärbt wurde fünf Minuten mit 3%iger Silbernitratlösung, 10 Minuten mit Aqua dest., fünf Minuten mit Sodaformollösung, 10 Minuten mit fließendem Leitungswasser und 20 Minuten mit van Gieson-Lösung. Danach wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit DPX (SIGMA-ALDRICH, #44581) eingedeckt.

#### **5.2.2.5 Toluidin-blau-Färbung**

Bei der Toluidin-Färbung stellen Zellkerne sich dunkelblau, Osteoblasten hellblau, Osteoklasten türkisblau und Knorpel violett angefärbt dar. Die Vor- und Nachbehandlung der Schnitte erfolgte analog zu der von Kossa-/van Gieson-Färbung. Für die Färbung wurden die Schnitte 30 Minuten in Toluidin-blau Lösung gestellt.

#### **5.2.2.6 Trichrom-Goldner-Färbung**

Bei der Trichrom-Goldner-Färbung werden die Zellkerne bräunlich-schwarz, das Zytoplasma ziegelrot und das Bindegewebe grün angefärbt. Die Vor- und Nachbehandlung der Schnitte erfolgte analog zu der von Kossa-/van Gieson-Färbung. Für die Färbung wurden die Schnitte 15 Minuten in Eisenhämatoxylin inkubiert, bevor sie 10 Minuten unter fließendem Wasser gewässert und anschließend 45 Minuten in der Ponceau de Xylidine Lösung gefärbt wurden. Nach kurzem Eintauchen in 1%iger Essigsäure und Aqua dest. folgte eine siebenminütige Inkubation der Schnitte in Phosphorwolfram-Orange G-Lösung. Erneutes kurzes eintauchen in 1%iger Essigsäure und anschließendem Aqua dest., wie eine 15minütige Inkubation in Lichtgrün-Lösung schlossen die Färbung ab.

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

Bei der TRAP-Färbung werden spezifisch die Osteoklasten rot angefärbt, da TRAP ein spezifischer Marker für aktive Osteoklasten ist. Diese Färbung wurde an Paraffinschnitten durchgeführt, welche zuerst in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe entwässert wurden. Auf dem Schüttler wurden die Schnitte bei 37°C für eine Stunde im TRAP-Substrat gefärbt, bevor die

Reaktion durch Eintauchen der Schnitte in Aqua dest. gestoppt wurde. Eine einminütige Gegenfärbung mit Meyer's Hämalaun zur Anfärbung der Zellkerne, schloss die Färbung ab. Eingedeckt wurden die Schnitte in wässrigem Medium (Faramount Aqua Mounting Medium, Fa. DAKO, #S3025).

#### **5.2.2.8 Immunhistologie an Gewebeschnitten**

Für die Immunhistologie wurden humane Knochenschnitte auf SuperFrost®Plus Objektträger (MENZAL-GLÄSER, #041300) aufgezogen bei Raumtemperatur getrocknet und vor der Immunhistologie für eine Stunde bei 60°C erhitzt. Anschließend wurden sie in Xylol zwei Mal für fünf Minuten entparaffiniert, in der absteigenden Alkoholreihe entwässert und für fünf Minuten mit PBS gespült. Für 60 Minuten wurden die Schnitte bei 37°C mit Pepsin (DAKO, # S3002) anverdaut, mit PBS und Wasser gespült und dann 30 Minuten im Dunkeln mit der Peroxidase-Blockreagenz (DAKO, #S2001) behandelt. Um freie Bindungsstellen auf den Schnitten zu entfernen, folgte eine 30-minütige Inkubation der Schnitte in 2,5% BSA in PBS. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper (1:10) inkubiert. Nach dreimaligem Spülen der Schnitte mit PBS wurde der sekundäre Antikörper (1:200) für 30 Minuten auf die Schnitte pipettiert. Anschließendes Spülen mit PBS und Inkubation der Schnitte mit dem Streptavidin-HRP Konjugat (DAKO, #K1016) beendeten die Antikörperreaktion. Als Gegenfärbung wurden die Schnitte für eine Minute mit Meyer's Hämalaun gefärbt. Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe und eine Inkubation in Xylol von drei Mal fünf Minuten, bevor die Schnittpräparate mit DPX (SIGMA-ALDRICH, #44581) eingedeckt wurden.

#### **5.2.2.9 Histomorphometrie**

Außer der Knochenformationsrate (BFR) wurden noch weitere Parameter histomorphometrisch bestimmt. Anhand von Toluidin-blau-gefärbten Acrylatschnitten wurde mittels des standardisierten Osteomeasure Histomorphometrie-Systems (OSTEOMETRICS INC., Atlanta, Georgia, USA) die Quantifizierung von Knochenvolumen (BV/TV, bone volume per tissue volume), die Anzahl der Trabekel (TbN, trabecular number), der Abstand der Trabekel (TbSp, trabecular spacing), die Trabekeldicke (TbTh, trabecular thickness) und

die Osteoblasten- und Osteoklastenzahl (NOb bzw. Noc/BPm, number of osteoblasts bzw. osteoclasts per bone parameter) bestimmt.

### 5.2.3 Serum- und Urinalysen

#### 5.2.3.1 Serumgewinnung und Urinentnahme

Zur Serumgewinnung wurden die Mäuse getötet und das Blut direkt aus dem Herzen entnommen. Nachdem das Blut bei Raumtemperatur geronnen war, wurde es zwei Mal für fünf Minuten bei 4.000rpm zentrifugiert und das Serum in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bis zur Verwendung wurde das Serum bei -80°C gelagert. Für die Urinuntersuchungen wurde entweder Spontanurin von Mäusen verwendet oder die Blase wurde nach der Tötung punktiert und der Urin entnommen. Auch der Urin wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 5.2.3.2 Verwendete Kits

Die Kits wurden jeweils nach den Angaben des Herstellers verwendet.

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Probenart</b>
QuantiChrom™ Calcium Assay Kit	BioAssay Systems, Kalifornien, USA	DICA-500	Serum
PiPer™ Pyrophosphate Assay Kit	Invitrogen, Karlsruhe	P 22062	Serum, Zellkultur- überstand
RatLaps™ ELISA	Nordic Biosciences, Herlev, Dänemark	1RTL4000	Serum

Mouse Intact PTH ELISA Kit	Immuntopics, Kalifornien, USA	60-2300	Serum
Quantakine® Mouse TRANCE/RANK -Ligand Immunoassay	R&D Systems, Wiesbaden	MTR00	Serum, Zellkultur- überstand
Mouse TRAP™ Assay	Immunodiagn ostic Systems, Frankfurt am Main	SB-TR 103	Serum
Metra™ DPD EIA Kit	Quidel Corporation, Kalifornien, USA	8007	Urin
Metra™ Creatinine Assay	Quidel Corporation, Kalifornien, USA	8009	Urin
Quantikine® Mouse OPG	R&D Systems, Wiesbaden	MOP00	Serum, Zellkultur- überstand
Phosphorus Liqui-UV®	STANBIO,	0830-125	Serum, Zellkultur- überstand

Die Östrogenkonzentrationen wurden aus dem Serum im Zentrallabor der klinischen Chemie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bestimmt.

## 5.2.4 Molekularbiologische Methoden

### 5.2.4.1 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwänzen

Zu einem ein bis zwei Millimeter langen Schwanzstück neugeborener Mäuse wurden 700µl Mausschwanz-Lysepuffer und 50µl Proteinase K (10mg/ml) gegeben und über Nacht bei 55°C im Heizblock inkubiert. Dieser Ansatz wurde mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (ROTH, Karlsruhe, #A156.2) versetzt, gut geschüttelt und zwei Minuten bei 13.000rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Prozedur noch zwei Mal wiederholt. Anschließend wurde zur oberen Phase das gleiche Volumen Isopropanol hinzugefügt, beides gut miteinander vermischt, fünf Minuten bei -20°C inkubiert und dann fünf Minuten bei 13.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Zum Waschen wurde zum Pellet 500µl 70%iger Ethanol hinzugefügt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt bei 13.000rpm wurde das Ethanol komplett abgenommen und das Pellet in 50µl TE-Puffer aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur gelöst.

### 5.2.4.2 Genotypisierung der Mäuse mittels PCR

Bei der PCR (Polymerasekettenreaktion) wird *in vitro* eine definierte DNA-Sequenz enzymatisch synthetisiert und vervielfältigt. Hierbei wird eine doppelsträngige DNA-Matrize denaturiert, wodurch zwei komplementäre DNA-Einzelstränge entstehen. An diese Einzelstränge hybridisieren zwei Oligonukleotid-Primer, welche die zu amplifizierende Region (Ziel-DNA) flankieren. Von diesen Oligonukleotid-Primern ausgehend, wird mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase, der jeweilige komplementäre DNA-Strang der Ziel-DNA synthetisiert. Eine repetitive Folge von Template-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Verlängerung der Primer durch die DNA-Polymerase, führt zu einer exponentiellen Anreicherung der Ziel-DNA.

Für alle PCR-Anwendungen wurde die thermostabile Taq-DNA-Polymerase, der dNTP-Mix und der Taq-Probenpuffer der Fa. ROCHE, Mannheim verwendet (#04 728 858 001). Die PCR-Reaktionen wurden in den PCR-Maschinen von BIOMETRA (T3 Thermocycler, Göttingen) oder im iCycler von BIO-RAD (München) durchgeführt. Es wurde standardmäßig folgender Ansatz mit 20µl Gesamtvolumen verwendet:

2,00µl	10x Taq-Polymerase-Puffer inkl. MgCl <sub>2</sub>
0,35µl	dNTPs (2,5mM)
1,70µl	Vorwärtsprimer (200µM)
1,70µl	Rückprimer (200µM)
0,10µl	Taq-Polymerase (5U/µl)
13,25µl	Aqua dest.
1,00µl	DNA-Template (1:10 verdünnt aus Abschnitt 5.2.1.1)

Die Primer für die Genotypisierung der *Mdk*- und *Ptprz1*-Mäuse und das Cyclerprogramm sahen wie folgt aus:

*Mdk*-Wildtyp Primer:

Vorwärtsprimer: 5'-TAA CCC AGG TTT TAC CCC TA-3'

Rückwärtsprimer: 5'-GTT GCA GGG CAC CTT GCA ATG GAC-3'

Erwartete Bandengröße: 360bp bei Wildtyp-, 1,36kb bei *Mdk*-defizienten Mäusen

*Mdk*-defiziente Primer:

Vorwärtsprimer: 5'-TAA CCC AGG TTT TAC CCC TA-3'

Rückwärtsprimer: 5'-GAG AAC CTG CGT GCA ATC CAT C-3'

Erwartete Bandengröße: 400bp bei *Mdk*-defizienten Mäusen

Cyclerprogramm: Wildtyp- und Mdk-defiziente Primer		
I	94°C	4 Minuten
II (35x)	94°C	45 Sekunden
	58°C	45 Sekunden
	72°C	2 Minuten
III	72°C	7 Minuten
IV	4°C	∞



Ptprz1-Wildtyp-Primer:

Vorwärtsprimer: 5'-AGA TCC ATT CGT CTT GCA GCC TCC-3'

Rückwärtsprimer: 5'-CAC CTG CCT GGA AAA CTT GTA CTG-3'

Erwartete Bandengröße: 400bp bei Wildtyp-Mäusen

Ptprz1-defiziente Primer:

Vorwärtsprimer: 5'-GAA AAG CGC CTC CCC TAC CCG GTA GAA TTG AC-3'

Rückwärtsprimer: 5'-CCA GAC ATG ACA CCC CAA TGC CTG AAC ATC TC-3'

Erwartete Bandengröße: 650bp bei *Ptprz1*-defizienten Mäusen

Cyclerprogramm: <i>Ptprz</i> -Wildtyp			Cyclerprogramm: <i>Ptprz</i> -Defizienz		
I	94°C	4 Minuten	I	94°C	4 Minuten
(35x)	94°C	30 Sekunden	(35x)	94°C	30 Sekunden
	61°C	45 Sekunden		55°C	45 Sekunden
	72°C	45 Sekunden		72°C	45 Sekunden
III	72°C	7 Minuten	III	72°C	7 Minuten
IV	4°C	∞	IV	4°C	∞

**5.2.4.3 DNA-Agarosegelelektrophorese**

Um das PCR-Produkt in einer Agarosegelelektrophorese nach der Fragmentgröße aufzutrennen, wurde das PCR-Produkt mit 5µl DNA-Gel-Ladepuffer versetzt. Dies wurde auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und bei 110 Volt in 1x TAE-Puffer in einer horizontalen Laufkammer (BIO-RAD, München) elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Anfärbung der DNA-Banden wurde das Gel vor dem Gießen mit 0,05µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Anschließend wurde das Agarosegel auf einem UV-Transilluminator fotografiert. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde eine 1kb-Leiter von INVITROGEN (#15615-024), als DNA-Standardgröße mit aufgetragen.

#### **5.2.4.4 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen**

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agaroseblöckchen nach der Elektrophorese erfolgte mit dem QIAEX<sup>®</sup> II Gel Extraktions Kit (QIAGEN, Hilden, #20051) entsprechend der Angaben des Herstellers.

Hierbei binden bei einer hohen Salzkonzentration DNA-Fragmente mit einer Mindestlänge von 40 Basenpaaren an eine Silica-Gel-Matrix. Nach Aufreinigung der Fragmente, bei denen unter anderem überschüssige Oligonukleotide entfernt werden, wird die gereinigte DNA mit Wasser wieder von der Matrix eluiert. Mit dieser Methode reinigt man z.B. Sonden für den Northern Blot auf.

#### **5.2.4.5 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren**

Die Konzentration wässriger Lösungen von Nukleinsäuren wurde mit dem NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 von der Firma PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen bestimmt. Hierbei wurden 2µl Probe direkt auf das Gerät aufgetragen und vermessen.

#### **5.2.4.6 RNA Isolierung aus Geweben und Organen**

Für die Isolierung von RNA wurden frisch isolierte Gewebestücke bis zu einem Gewicht von 500µg in 1ml Trizol (INVITROGEN, #15596-018) mit einem Ultra-Turrax-Gerät homogenisiert. Das Homogenat wurde drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 200µl Chloroform vermengt und weitere zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach folgte eine Zentrifugation der Proben bei 4°C für 15 Minuten bei 13.000rpm. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500µl Isopropanol versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation bei 4°C für weitere 15 Minuten bei 13.000rpm, erfolgte ein Waschschrift mit 70%igem Ethanol in DEPC-Wasser. Nach einer erneuten Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und 13.000rpm wurde das Pellet in 25µl DEPC-Wasser aufgenommen und 15 Minuten bei Raumtemperatur gelöst, bevor die RNA Konzentration bestimmt wurde.

Um RNA aus Knochen zu isolieren, wurde der Knochen zuerst in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff zu Knochenpulver zerstampft und dann erst in Trizol aufgenommen.

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

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem SuperScript™ First-Strand Synthesis System von INVITROGEN (#11904-018) nach Angaben des Herstellers. Die synthetisierte cDNA wurde dann in der quantitativen Reverse-Transkriptase-PCR eingesetzt.

#### 5.2.4.8 Quantitative Reverse-Transkriptase-PCR

Die quantitative Reverse-Transkriptase-PCR wurde mit dem StepOnePlus™ Real-Time-PCR-System der Fa. Applied Biosystems durchgeführt. Die spezifischen Primer für jedes Gen wurden direkt bei Applied Biosystems bestellt und synthetisiert, wodurch die Primersequenzen nicht bekannt waren. Zur Durchführung der quantitativen Reverse-Transkriptase-PCR wurden 10µl TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Kalifornien, USA, #4369016), 1µl TaqMan® Gene Expression Assay Primer und 7µl RNase-freies Wasser zu 2µl 1:10 verdünnter cDNA in 96-Well Platten (Applied Biosystems, #4346906) pipettiert. Die Auswertung erfolgte mittels der delta-delta-CT Methode mit Hilfe der StepOne Software Version 2.0. Als Referenzgen wurde das Haushaltsgen GAPDH verwendet.

#### 5.2.4.9 Herstellung der Sonden für den Northern Blot

Die Sonden für den Northern Blot wurden über eine Standard-PCR mit 35 Zyklen, bei einer Temperatur von 58°C hergestellt. Als Template wurde 1µl cDNA aus Wildtyp Osteoblasten Tag 20 eingesetzt. Die Primer für die PCR sahen wie folgt aus:

##### Mdk-Primer:

Vorwärtsprimer: 5'-GGA GCC GAC TGC AAA TAC AAG-3'

Rückwärtsprimer: 5'-TCT GGC CTC CTG ACT TAG TCC T-3'

##### Enpp1-Primer:

Vorwärtsprimer: 5'-TGA CTT TGA TTA TGA CGG ACG C-3'

Rückwärtsprimer: 5'-CAA CTC CTC GAC CCA TGA AGA-3'

##### Ank-Primer:

Vorwärtsprimer: 5'-TCA GTC GGC CCA TTG TCA A-3'

Rückwärtsprimer: 5'-GGT GAC CGT GTT GCT TGT GTT-3'

Das PCR-Produkt wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt, die Bande ausgeschnitten und mittels des QIAEX<sup>®</sup> II Gel Extraktions Kit (siehe 5.2.4.4) aufgereinigt und im Northern Blot eingesetzt.

#### 5.2.4.10 Northern Blot

Für den Northern Blot wurde ein horizontales 1%iges Agarosegel mit 1% MOPS-0,5% Formaldehydpuffer gegossen. Die RNA wurde 1:1 mit RNA-Ladepuffer (Fermentas, St. Leon-Rot, #R0641) versetzt, 10 Minuten auf 65°C erhitzt, auf Eis gestellt und dann auf das Gel aufgetragen. Bei 60 Volt wurde das Gel in 1x MOPS-Puffer für zwei Stunden aufgetrennt. Da in dem RNA-Ladepuffer schon Ethidiumbromid enthalten war, entfiel eine anschließende Färbung des Gels. Um zu zeigen, dass die Proben nicht degradiert waren, wurde auf einem UV-Transilluminator das Gel fotografiert, wobei deutlich die 18S und 28S Banden sichtbar waren. Anschließend wurde das Gel mehrere Stunden mit DEPC-Wasser gewaschen. Nach einer kurzen Äquilibrierungsphase in 10x SSC wurde das Gel über Nacht auf eine Hybond<sup>™</sup>-XL-Membran (GE Healthcare, München, #RPN303S) transferiert und anschließend mittels UV-Strahlung auf der Membran verankert. Nachdem die Membran 15 Minuten in 6x SSC gewaschen wurde, wurde sie in Hybridisierungspuffer im Hybridisierungsofen für mind. zwei Stunden bei 60°C inkubiert. Die DNA-Sonde wurde mit Wasser auf 9µl aufgefüllt, fünf Minuten gekocht und anschließend auf Eis gestellt. Zur DNA-Sonde wurden dann 2µl 10x Random Primer-Puffer, 3µl ATG-Nukleotid-Mix, 5µl <sup>32</sup>P-dCTP und 1µl Klenow Enzym hinzu pipettiert und im Heizblock bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. In diesen 30 Minuten wurden die Sephadex G50-Spin Columns mit STE Puffer äquilibriert. Zum Labeling Mix wurden dann auch 80µl STE Puffer gegeben und das gesamte Volumen wurde auf die Sephadex Säule gegeben und zentrifugiert. Der Durchfluss wurde anschließend fünf Minuten gekocht und dann auf Eis gestellt, bevor er zu der Hybridisierungslösung gegeben wurde. Der Blot wurde über Nacht im Hybridisierungsofen inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Blot mit 2x SSC, 0,1% SDS und anschließend mit 0,5x SSC, 0,1% SDS gewaschen, um die überschüssige Radioaktivität zu entfernen. Anschließend wurde der Blot zwischen Frischehaltefolie gelegt und ein KODAK BioMax XAR-Film (SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen, #8532665) wurde für 72 Stunden aufgelegt.

#### 5.2.4.11 Transformation von Plasmiden in Bakterien

Ein Reaktionsgefäß One shot TOP10 *E.coli* wurde auf Eis aufgetaut und 1 µl Plasmid (1 µg/µl) wurde hinzu pipettiert. Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit auf Eis, wurde das Gemisch für 20 Sekunden bei 42°C im Wasserbad erhitzt, wodurch die Aufnahme der Plasmide in die *E.coli* ermöglicht wurde. Anschließend wurde der Ansatz sofort für drei Minuten auf Eis inkubiert und auf LB-Platten mit dem Selektionsantibiotikum ausplattiert. Über Nacht wurden die Bakterien, die das Plasmid aufgenommen hatten, selektiv vermehrt. Aus einer einzelnen Kolonie wurde dann eine Bakterienvorkultur hergestellt, indem eine Kolonie gepickt und in 4ml LB-Medium plus selektives Antibiotikum über 6 Stunden auf dem Schüttler bei 37°C und 200rpm vermehrt wurde.

#### 5.2.4.12 Präparation von Plasmid-DNA (Maxi-Präp)

500ml LB-Ampicillin Lösung (Ampicillin 1:1000) wurden mit 1ml einer Bakterienvorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Bakterien durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 5.000rpm und 4°C geerntet, wobei der Überstand verworfen wurde. Das Pellet wurde in 16ml eiskalter GTE-Lösung resuspendiert und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 32ml frisch angesetzter 0,2M NaOH/1%SDS-Lösung hinzugefügt, leicht gemischt und erneut fünf Minuten auf Eis inkubiert. Weiterhin wurden 24ml Kaliumazetatlösung zum Pellet pipettiert, gut vermischt und eine Inkubation von 15 Minuten auf Eis wurde vollzogen, dem sich eine Zentrifugation von 15 Minuten bei 4°C und 5.000rpm anschloss. Der Überstand wurde durch einen Filter in ein neues Gefäß transferiert und mit 36ml Isopropanol versetzt, gut geschüttelt und direkt 15 Minuten bei 4°C und 5.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 6ml TE-Puffer resuspendiert und die RNA wurde durch Zugabe von 3ml 7,5M Ammoniumazetat, mit anschließender Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 5.000rpm, präzipitiert. Der Überstand wurde mit zwei Anteilen 100% Ethanol vermischt und für fünf Minuten bei -80°C inkubiert, wodurch die DNA gefällt wurde. Anschließend wurde 15 Minuten bei 4°C und 4.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet getrocknet, bevor es in 800µl TE-Puffer resuspendiert wurde. Um auch noch die verbliebene RNA aus der Kultur zu eliminieren, schloss sich ein RNase A Verdau

(100µg/ml) von mind. einer Stunde bei 37°C an. Es folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion im gleichen Volumen und anschließend eine Chloroform-Extraktion im doppelten Volumen, bevor die DNA mit dem halben Volumen 7,5M Kaliumazetat und dem doppelten Volumen 100% Ethanol gefällt wurde. Das Präzipitāt wurde 15 Minuten bei 4°C und 13.000rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet trocken gelassen und für mehrere Stunden in 200µl TE Puffer gelöst. Um die hohen Salzkonzentrationen aus der Lösung zu bekommen, wurde 400µl PEG-Lösung über Nacht zu der DNA gegeben und geschüttelt. Am nächsten Tag erfolgte dann noch eine abschließende Fällung und Waschung mit 70%igem Ethanol, bevor das Pellet in 200µl TE-Puffer gelöst wurde und nach einigen Stunden Inkubation bei Raumtemperatur bereit war, bei der Transfektion verwendet zu werden.

#### **5.2.4.13 Microarray-Genchip-Analyse**

Die Microarray-Genchip-Analyse ermöglichte eine vergleichende Expressionsanalyse aller Gene, die auf dem Chip enthalten sind, zwischen zwei oder mehr Proben. Auf dem verwendeten Genchip waren nahezu alle 30.000 Gene einer Maus mehrfach repräsentiert. In dieser Arbeit wurde die Microarray-Genchip-Analyse eingesetzt, um die Genexpression in Osteoblasten, mit oder ohne Zugabe von rekombinanten humanen Midkine (6 Stunden, 100ng Mdk), zu vergleichen und evtl. einen Hinweis darauf zu bekommen, welche Gene Midkine im Osteoblasten anschaltet. Dazu wurde aus Osteoblasten, mit oder ohne rekombinanten Mdk, RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mit der cDNA wurde der Genchip hybridisiert. Bei erfolgter Hybridisierung entstanden Signale, die mittels einer speziellen Software von Affymetrix in die Expressionsstärke des jeweiligen Gens umgerechnet wurde. Die Hybridisierung und die Auswertung der Genchips wurden in der Klinischen Chemie des UKEs in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Streichert durchgeführt.

### **5.2.5 Zellkultur**

Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert.

#### **5.2.5.1 Isolierung und Differenzierung primärer Osteoblasten aus der Schädeldecke**

Da in neugeborenen Mäusen die Mineralisation der Schädeldecke noch nicht komplett abgeschlossen ist, ist es möglich die enthaltenden Knochenzellen durch einen enzymatischen Verdau aus der Matrix zu gewinnen. Hierzu wurden drei bis fünf Tage alte Mäuse getötet und zur Desinfektion kurz in 80%igem Ethanol getaucht. Mit einer Schere wurde hinter dem Hinterhauptsloch die Haut eingeschnitten und mit einer Pinzette bis zur Nasenwurzel abgezogen. Anschließend wurden mit einer Schere zwei Schnitte vom Hinterhauptsloch bis zu den Augen vollzogen, wodurch die Schädeldecke nach oben aufklappbar und abtrennbar wurde. Mit dem Skalpell wurde die Schädeldecke gesäubert und in kaltem PBS gelagert, bis alle Calvarien isoliert waren. Nach Abschluss der Präparation wurde das PBS abgesaugt und 20ml Verdauungslösung zu den Calvarien gegeben. Der erste Verdau erfolgte für 20 Minuten bei 37°C auf dem Schüttler, wobei die Verdauungslösung verworfen wurde. Der zweite Verdau erfolgte für 30 Minuten auf dem Schüttler. Der Überstand wurde durch ein 70µm Zellsieb gefiltert, um grobe Knochenstücke zu eliminieren, und dann für fünf Minuten bei 1.200rpm zentrifugiert. Die Verdauungslösung wurde abgenommen und die Zellen im Osteoblasten-Kulturmedium resuspendiert und gezählt. Pro 6-Well wurden 50.000 Zellen pro 2ml Kulturmedium ausplattiert.

Die Zellen wurden kultiviert bis sie eine Konfluenz von 80-90% auf der Platte erreicht hatten. Ab diesem Zeitpunkt wurden sie durch Zugabe von  $\beta$ -Glycerolphosphat (10mM) und Ascorbat (50µg/ml) differenziert. Der Tag, an dem die Zellen erstmalig Differenzierungsmedium erhielten, war Tag 0 der Differenzierung. Die Mineralisation der Zellen war nach 20 Tagen abgeschlossen.

### **5.2.5.2 Isolierung und Differenzierung von Osteoblastenvorläuferzellen aus dem Knochenmark**

Um aus dem Knochenmark osteoblastäre Vorläuferzellen isolieren zu können, wurde das Knochenmark aus adulten Mäusen isoliert. Für eine 6-Well-Platte wurden zwei Mäuse benötigt. Hierzu wurden die adulten Mäuse getötet und zur Desinfektion mit 80%igem Ethanol besprüht. Anschließend wurde das Fell über den Hinterläufen abgezogen und die Beine amputiert. Das Fleisch und die Muskelmasse der Beine wurden so gut wie möglich entfernt, ohne dabei die Knochen zu beschädigen. Unter der Sterilbank wurden dann die Enden des Femur bzw. der Tibia mit einer Schere abgeschnitten und das Knochenmark mit alpha-MEM herausgespült. Hiernach wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand verworfen und in neuem alpha-MEM aufgenommen und über ein 100µm Zellsieb in ein neues Tube überführt, gezählt und auf 6-Well-Platten ausplattiert. Pro 6-Well wurde eine Zellzahl von  $15 \times 10^6$  ausplattiert. Einen Tag später wurde das Medium gewechselt, um tote Zellen zu entfernen und das Medium wurde durch Differenzierungsmedium mit Ascorbat und  $\beta$ -Glycerolphosphat ersetzt.

### **5.2.5.3 Isolierung und Differenzierung von Osteoklastenvorläuferzellen aus dem Knochenmark**

Die Isolierung von Osteoklastenvorläuferzellen aus dem Knochenmark erfolgte bis zur Resuspendierung der Zellen, nach der Zentrifugation, analog zu der Isolierung von Osteoblasten aus dem Knochenmark. Die Zellen wurden jedoch im Kulturmedium für Osteoklasten aufgenommen und mit einer Zellzahl von  $10 \times 10^6$  Zellen auf ein 6-Well ausplattiert. Am nächsten Tag wurde auch hier das Medium abgenommen und durch Differenzierungsmedium ersetzt. Das Differenzierungsmedium enthielt ab dem ersten Tag Vitamin D (10nM) und ab dem fünften Tag zusätzlich M-CSF (20ng/ml) und sRANKL (40ng/ml).

Um zusätzliche die Resorptionsaktivität der Osteoklasten messen zu können, wurden Dentinchips (Dicke 0,1mm) eingesetzt. Hierbei wurden zwei bis drei Dentinchips pro Well auf den Boden der Platte gelegt und die Zellen auf diese Dentinchips pipettiert. Während der Kultivierung der Zellen resorbierten die Osteoklasten die Oberflächen der Dentinchips und die Aktivität der Osteoklasten konnte nach 10 bis 20 Tagen ermittelt werden.



#### **5.2.5.4 Kultur und Pflege von MC3T3-E1 Zellen**

Die MC3T3-E1 Zellen wurden im Osteoblasten-Kulturmedium, ohne Zugabe von Ascorbat und  $\beta$ -Glycerolphosphat, gezüchtet. Das Kulturmedium wurde zweimal pro Woche gewechselt und mit Erreichen der Konfluenz wurde die Zellen mit 0,05% Trypsin abgelöst und im Verhältnis 1:6 gesplittet.

#### **5.2.5.5 Färbung der Osteoblasten mit der von Kossa-Färbung**

Mittels der von Kossa-Färbung kann der Grad der Mineralisation von Osteoblastenkulturen ermittelt werden. Hierzu wurde das Medium von den Osteoblastenkulturen abgenommen und die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Mit kaltem Methanol wurden die Zellen für 10 Minuten fixiert und anschließend drei Mal mit Leitungswasser gewaschen. Unter Licht wurden die Zellen 30 Minuten mit 5%iger Silbernitratlösung inkubiert und darauf erneut drei Mal mit Leitungswasser gewaschen. Eine fünfminütige Inkubation mit 10%igem Natriumthiosulfat fixierte die Silberfärbung. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit Leitungswasser wurden die Zellen im Wasser gelagert und fotografiert. Die Mineralisation der Zellen wurde im Programm Photoshop schwarz gefärbt und die unmineralisierten Flächen blieben weiß. Mittels des Programms Image Tool Version 3.0 wurde dann das Schwarz zu Weiß-Verhältnis berechnet.

#### **5.2.5.6 Bestimmung der Alkalischen Phosphatase Aktivität**

Zur Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde das Medium von den Osteoblastenkulturen abgenommen und die Zellen zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen. In einem Puffer, bestehend aus PBS und Protease-Inhibitoren, wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Platte abgekratzt und in ein 4ml Rundbodenröhrchen gegeben. Die Zellen wurden mittels eines Turrax für 15 Sekunden homogenisiert und auf Eis gestellt. 200 $\mu$ l Zellextrakt wurden dann mit 500 $\mu$ l Alkalische Phosphatase-Substratlösung in einer Küvette vermischt und drei Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde mit 200 $\mu$ l 2,5M NaOH gestoppt und die Absorption bei 405nm im Photometer gemessen. Mit dem Zellextrakt wurde parallel auch die Proteinkonzentration (siehe 5.2.5.11) ermittelt und die Phosphatase Aktivität auf die Proteinkonzentration bezogen.

### **5.2.5.7 TRAP-Färbung der Osteoklastenkulturen**

Von den Osteoklastenkulturen wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden fünf Minuten mit kaltem Methanol fixiert. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit Aqua dest. gewaschen und getrocknet. Für 30 Minuten folgte dann eine Inkubation der Zellen mit dem TRAP-Substrat, dem sich zweimaliges Waschen mit Aqua dest. anschloss. Die Zellen wurden nun in Aqua dest. gelagert und die rot angefärbten Osteoklasten konnten unter dem Mikroskop auf einem Raster ausgezählt werden.

### **5.2.5.8 Auswertung der Osteoklastenresorption**

Die Auswertung der Osteoklastenresorption erfolgte über die Auswertung der Resorptionslakunen auf den Dentinchips. Hierzu wurden die Dentinchips in Natriumhypochlorid gelegt und die Zellen auf den Dentinchips wurden vorsichtig mit Hilfe eines Zellschabers entfernt. Eine anschließende Färbung der Dentinchips mit 0,2%igem Toluidinblau, bei dem die Dentinchips drei Mal kurz in den Farbstoff getaucht und überschüssiger Farbstoff in Aqua dest. abgespült wurde, färbte die Resorptionslakunen sichtbar an. Die Auswertung erfolgte, indem die Dentinchips fotografiert, die Resorptionslakunen mit dem Programm Photoshop® schwarz und der Rest weiß gefärbt wurden. Das Verhältnis von Schwarz zu Weiß wurde dann mittels des Programms Image Tool, Version 3.0 ausgewertet.

### **5.2.5.9 Isolierung von RNA aus Zellen**

Die Isolierung von RNA aus Zellkulturen erfolgte mittels des RNeasy Mini Kits von Qiagen (#74104), laut Protokoll des Herstellers. Um die Zellen zu lysieren, wurde vor dem RNeasy Kit, die Zellsuspension durch einen QIAshredder (Qiagen, #79654) zentrifugiert.

### **5.2.5.10 Isolation von Proteinen aus Zellen**

Für die Isolation von Proteinen wurden die Zellen zwei Mal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde 200µl RIPA-Lösung inkl. der Proteaseinhibitoren 1x complete EDTA-free (Roche, #04693132001), 2mM Natriumvanadat und 2mM Natriumfluorid zu den Zellen pipettiert und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die

Zellen wurden 30 Minuten auf Eis inkubiert und dann bei 13.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration wurde vermessen.

#### **5.2.5.11 Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

Die Konzentration der Proteine wurde mit dem BIO-RAD Protein Assay (BIORAD, München, #500-0006) bestimmt. Als Eichreihe wurden verschiedene Konzentrationen von BSA verwendet. Von den Standards und Proben wurden jeweils 5µl mit 795µl Aqua dest. und 200µl BIO-RAD Protein Assay gemischt und in Küvetten gegeben. Bei 595nm Wellenlänge wurde dann die Absorption der Lösungen im Ultraspec 2100 pro (Fa. Biochrom, Cambridge, England) gemessen und die Konzentration der Proben anhand der Eichreihe ermittelt.

#### **5.2.5.12 Western Blot**

Um die isolierten Proteine aus den Zellen im Western Blot analysieren zu können, wurde die gleiche Menge Gesamtprotein im Verhältnis 1:6 mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 10 Minuten bei 95°C aufgeköcht und dann auf ein 10%iges Agarosegel aufgetragen. Die Proben wurden bei 150 Volt für 90 Minuten in einer vertikalen Laufkammer aufgetrennt und anschließend auf eine Amersham Hybond™- LFP PVDF Transfer-Membran (GE Healthcare, München, #RPN303LFP) geblottet (15 Volt, 80 Minuten). Zur Kontrolle, ob der Transfer vom Gel auf die Membran erfolgreich war, wurde das Gel mit Coomassie angefärbt und fotografiert. Die Membran wurde eine Stunde im Blocking Puffer inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran zu versiegeln. Über Nacht wurde die Membran mit dem ersten Antikörper (Verdünnung: 1:500 bis 1:1000), der in Blocking Puffer aufgenommen wurde, inkubiert. Nach dreimaligen 10-minütigem Waschen in 1% TBS/0,1% Tween20 wurde die Membran für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (Verdünnung: 1:5000) in Blocking Puffer inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 1% TBS/ 0,1% Tween20 wurde die Membran 30 Sekunden in der ECL-Lösung geschwenkt und dann ein Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare, München, #28906837) aufgelegt.

### 5.2.5.13 Transfektion

Für die Transfektionsversuche verwendeten wir MC3T3-E1 Zellen, die mit verschiedenen Plasmiden transfiziert wurden. Die Transfektion erfolgte mittels der TransFectin Lipid Reagenz (BIO-RAD, #170-3351). Der Ablauf der Transfektion mit diesem Reagenz beruhte auf dem Verfahren der Lipofektion. Hierbei wurden Plasmide, die das gewünschte Gen enthielten mit Hilfe von Liposomen in die MC3T3-E1 Zellen eingebracht und exprimiert. Um die Wirkung verschiedener Gene auf den Wnt-Signalweg in den MC3T3-E1 Zellen ermitteln zu können, wurden zu jedem Well nicht nur die jeweiligen Plasmide des Interesses, sondern auch zwei Reportergene namens LacZ und TOPflash gegeben. Das LacZ-Plasmid ist ein Kontrollvektor, der es ermöglicht nachzuvollziehen, wie viele Plasmide jeder Versuchsansatz aufgenommen hat. Das LacZ-Plasmid enthält das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase, welches das Substrat Resorufin- $\beta$ -Galaktopyranosid enzymatisch umwandelt, wodurch ein Fluoreszenzsignal messbar wird. So wurde bei der Endauswertung jeder Ansatz mit dem Ergebnis des LacZ-Plasmids normalisiert. Das Plasmid TOPflash exprimiert ein Protein, welches Bindungsstellen für den, über den Wnt-Signalweg aktivierten, Transkriptionsfaktor TCF besitzt. Durch die Bindung des Transkriptionsfaktors an die entsprechende Bindungsstelle im Reportervektor wurde das nachgeschaltete Reportergen Luciferase aktiviert.

Für die Transfektion wurden 100.000 MC3T3-E1 Zellen pro 6-Well ausplattiert und über Nacht wachsen gelassen. Für jeden Versuchsansatz wurde ein Dreifachansatz durchgeführt. Am nächsten Tag wurden für jedes Well Reaktionsgefäße vorbereitet, in die 250 $\mu$ l serumfreies alpha-MEM, je 1 $\mu$ g des Topflash und LacZ-Plasmids und die Plasmide des Interesses (je 1 $\mu$ g) kamen. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurde für jedes Well 250 $\mu$ l serumfreies alpha-MEM mit 2,5 $\mu$ l Transfectin versetzt und auf die Plasmide pipettiert. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde der komplette Ansatz auf die Zellen pipettiert und die Zellen wurden bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS, auf die anschließend Osteoblasten-kulturmedium gegeben wurde. Die Auswertung des Versuchs erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion. Die Zellen wurden hierzu zwei Mal mit kaltem PBS gewaschen, bevor 100 $\mu$ l Zell-Lyse Puffer auf die Zellen gegeben und sie mit einem

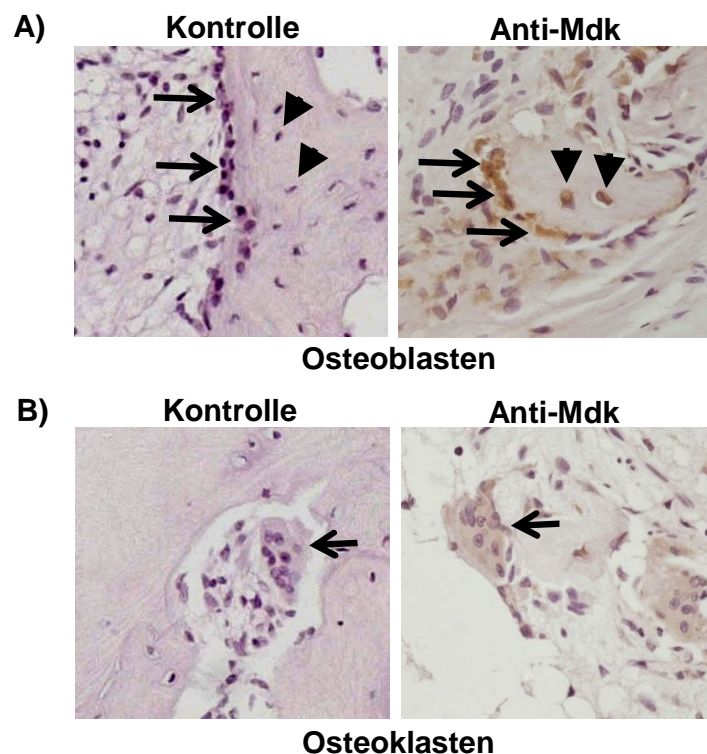
Zellschaber abgekratzt und in Reaktionsgefäße überführt wurden. Durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und schnellem Auftauen wurden die Zellen aufgebrochen. Durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 4°C in der Tischzentrifuge wurden die Zellreste pelletiert und der Überstand, der die Proteine enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zur Auswertung der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität wurden 40 $\mu$ l Zellextrakt mit 950 $\mu$ l  $\beta$ -Galaktosidase-Puffer und 10 $\mu$ l Resorufin- $\beta$ -Galaktopyranosid (Fluka, #83638) vermischt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Absorption der Farbreaktion bei 572nm gemessen wurde. Zur Auswertung der Luciferase-Aktivität des TOPflash-Plasmids wurden 40 $\mu$ l Zellextrakt mit 330 $\mu$ l Luziferin-Puffer vermischt und in ein Luminometerreaktionsgefäß überführt. 5ml des Luziferin-Puffers wurden zusätzlich mit 100 $\mu$ l 50x Luciferin (P.J.K., Kleinblittersdorf, #269149) versetzt und als Substrat in das Luminometer (Monolight™ 3010, Becton Dickenson Company) gefüllt. Im Luminometer wurde die Luciferin-Lösung mit der Probe vermischt und die Lumineszenz, die bei der Reaktion entstand, wurde gemessen.

## 6. Ergebnisse

### 6.1 Midkine wird in Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten exprimiert

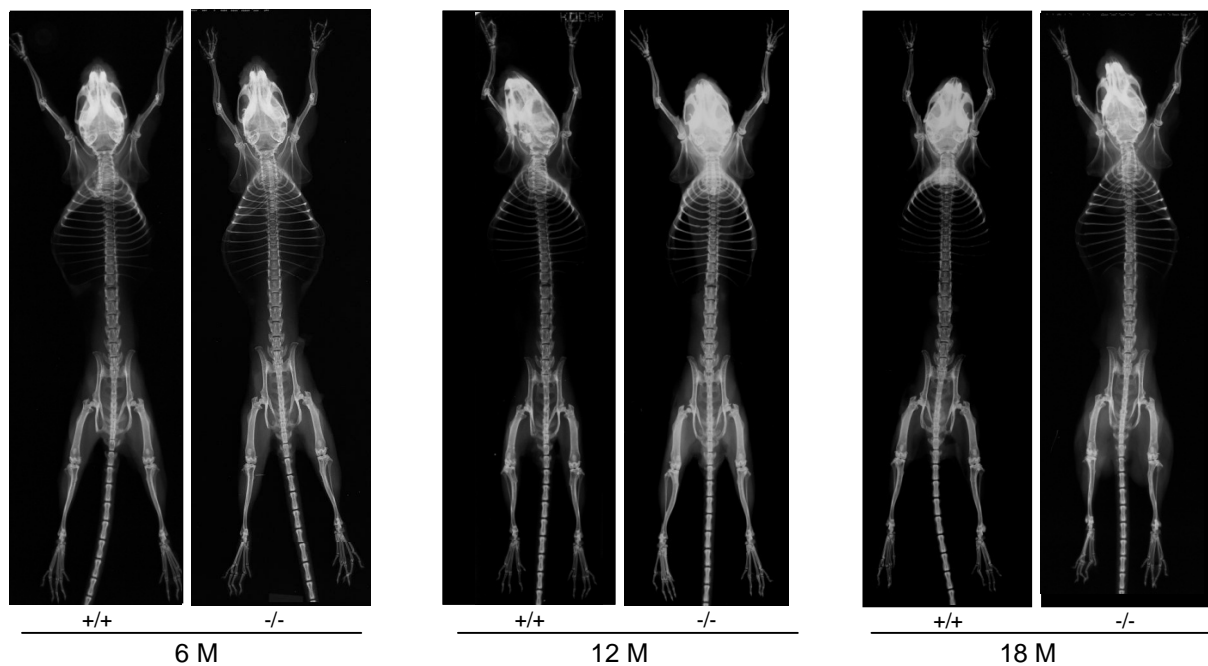
Um herauszufinden, ob Mdk von Knochenzellen exprimiert wird, wurde eine Immunhistologie an humanen Knochenpräparaten mit einem Anti-Mdk-Antikörper durchgeführt. In der Kontrollfärbung waren die am Knochen aufgereihten Osteoblasten mit den dunkelblauen Zellkernen gut zu erkennen (Abb.6.1 A). In der Anti-Mdk-Färbung nahmen Osteoblasten, genau wie Osteozyten, eine starke braune Färbung an, wodurch angezeigt wurde, dass Midkine im Osteoblasten, sowie im Osteozyten exprimiert wird (Abb.6.1 A). Auch der mehrkernige Osteoklast färbte sich in der Anti-Mdk-Färbung braun an, im Vergleich zur Kontrolle (Abb.6.2 B). Allerdings war die Färbung schwächer als bei den Osteoblasten. Im humanen Knochen wurde Midkine folglich im Osteoblasten, Osteozyten und etwas schwächer im Osteoklasten exprimiert.



**Abbildung 6.1: Immunhistologie an humanen Knochnschnitten mit einem Anti-Mdk-Antikörper.** A) Osteoblasten (Pfeil) und Osteozyten (Dreieck), sowie B) Osteoklasten in der Kontroll- und Anti-Mdk-Färbung. Alle drei Zelltypen färben sich in der Anti-Mdk-Färbung braun an, wobei die mehrkernigen Osteoklasten eine schwächere Färbung aufweisen, als die Osteoblasten und Osteozyten.

## 6.2 *Mdk*-defiziente Mäuse besitzen im Alter von 12 und 18 Monaten eine erhöhte Knochendichte

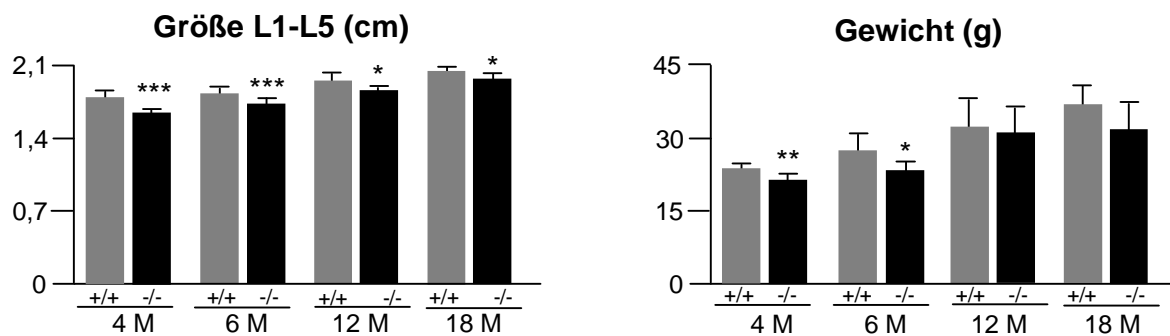
Der Verlust des *Mdk*-Gens auf beiden Allelen (*Mdk*<sup>-/-</sup>) und somit die Abwesenheit von Midkine in der Maus, führte auf den ersten Blick zu keinem offensichtlichen Phänotyp im Vergleich zu den Wildtyptieren, in Bezug auf das Aussehen oder das Verhalten der Tiere. Eine Betrachtung der Kontaktradiographien der Mausskelette (Abb.6.2) zeigte jedoch, dass die *Mdk*-defizienten Mäuse im Alter von 12 und 18 Monaten eine leicht erhöhte Knochendichte im Vergleich zu den Wildtyptieren aufwiesen. Bei diesen Tieren war die Röntgendichte erhöht.



**Abbildung 6.2: Kontaktradiographien der Mausskelette.** Von 6, 12 und 18 Monate alten Wildtyp- (+/+) und *Mdk*-defizienten Mäusen (-/-) wurden Kontaktradiographien angefertigt. Die 6 Monate alten Tiere zeigen keinen Unterschied in der Röntgendichte der Knochen. Bei den 12 und 18 Monate alten *Mdk*-defizienten Mäusen ist die Röntgendichte jedoch höher als bei den Kontrolltieren, was auf eine erhöhte Knochenmasse schließen lässt.

### 6.3 *Mdk*-defiziente Mäuse weisen im Alter von 4 und 6 Monaten eine geringere Körpergröße und ein vermindertes Gewicht auf

Genauere Analysen der Körpergröße und des Körpergewichts ergaben, dass *Mdk*-defiziente Mäuse in Bezug auf die Körpergröße in allen Altersstufen (4, 6, 12 und 18 Monaten) signifikant kleiner waren als die Wildtyptiere (Abb.6.3). Hierzu wurde anhand der Röntgenaufnahmen der Abstand der Lendenwirbelkörper L1 bis L5 vermessen. Der Unterschied in der Körpergröße war in den ersten 6 Monaten (4 Monate: *Mdk*+/:  $1,79 \pm 0,05$  vs. *Mdk*-/:  $1,64 \pm 0,03$ cm) jedoch stärker ausgeprägt als in den späteren Altersstufen (12 Monate: *Mdk*+/:  $1,96 \pm 0,08$  vs. *Mdk*-/:  $1,86 \pm 0,05$ cm). Einhergehend mit der verringerten Körpergröße der *Mdk*-defizienten Mäuse war auch das Gewicht der 4 (Mdk+/:  $23,92 \pm 0,98$  vs. *Mdk*-/:  $21,38 \pm 1,28$ g) und 6 Monate alten *Mdk*-defizienten Mäuse (Mdk+/:  $27,52 \pm 3,16$  vs. *Mdk*-/:  $23,38 \pm 1,93$ g) signifikant geringer als das Gewicht der Kontrolltiere (Abb.6.3). Dieser Unterschied war allerdings nicht mehr in den 12 und 18 Monate alten *Mdk*-defizienten Mäusen zu beobachten. In diesen Altersstufen hatte sich das Gewicht der *Mdk*-defizienten Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen normalisiert, auch wenn eine Tendenz des geringeren Körpergewichts noch zu erkennen war.

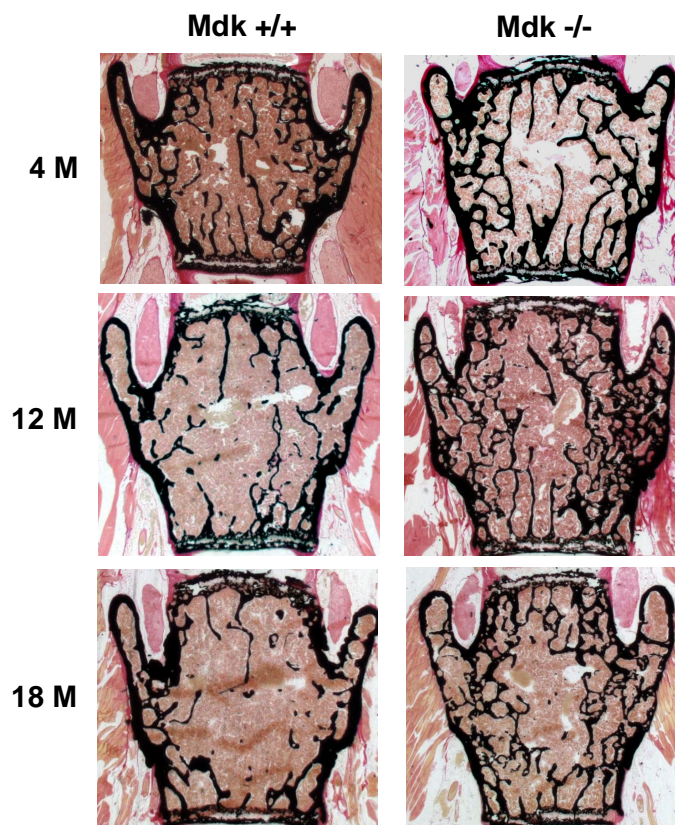


**Abbildung 6.3: Körpergröße und Gewicht der Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäuse.** Die Körpergröße wurde ermittelt, indem der Abstand der Lendenwirbelkörper L1 bis L5 auf den Röntgenbildern gemessen wurde. Die *Mdk*-defizienten Mäuse (-/-) weisen eine signifikant verringerte Körpergröße in allen Altersstufen auf, im Vergleich zu den Wildtypmäusen (+/+). Das Gewicht der *Mdk*-defizienten Mäuse ist im Alter von 4 und 6 Monaten signifikant geringer als das der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied hebt sich jedoch mit steigendem Alter auf. (n = 6 Tiere pro Gruppe; t-Test: \* bedeutet  $p < 0,05$ ; \*\* bedeutet  $p < 0,005$ ; \*\*\* bedeutet  $p < 0,0005$ )



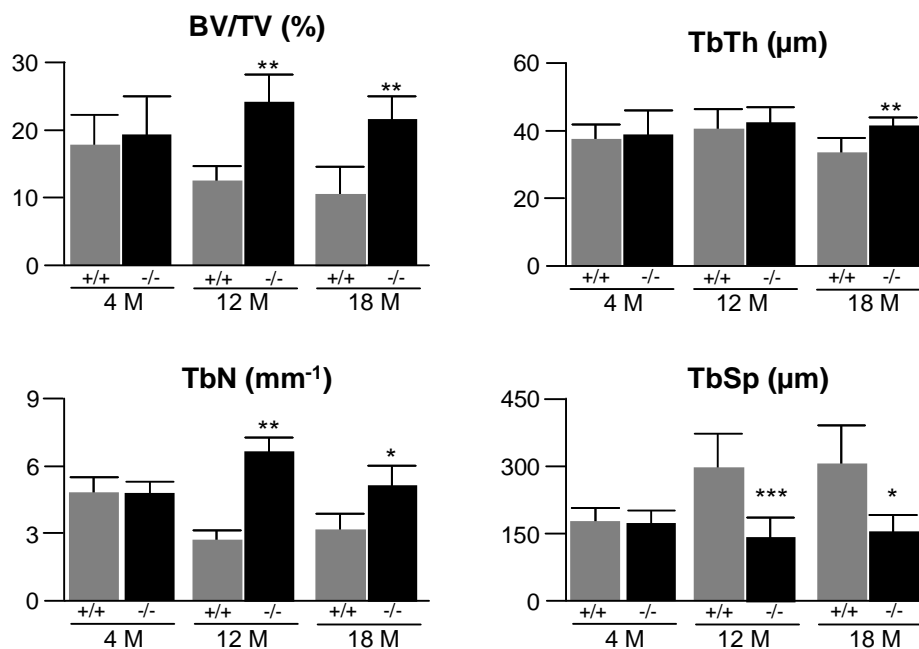
#### 6.4 Die Defizienz des *Mdk*-Gens führt zu einem Knochenphänotyp, der einen Knochenmasseverlust im Alter verhindert

An nicht-dekalzifizierten histologischen Schnitten von Lendenwirbelkörpern in der von Kossa/van Gieson-Färbung, stellt sich mineralisierter Knochen schwarz dar und die Trabekelanzahl und –struktur ist deutlich zu erkennen. In einem Alter von 4 Monaten sind Mäuse ausgewachsen und besitzen zu diesem Zeitpunkt ihr höchstes trabekuläres Knochenvolumen, welches im Alter (12 und 18 Monaten), aufgrund der Verschiebung des Knochenremodelings zu Gunsten der Knochenresorption, wieder abnimmt. Bei den *Mdk*-defizienten Mäusen nahm das trabekuläre Knochenvolumen nicht, wie bei den Wildtypmäusen, mit dem Alter ab (Abb.6.4). Die *Mdk*-defizienten Mäuse waren vor einem Knochenmasseverlust im Alter geschützt. Allerdings kam es in den Lendenwirbelkörpern dieser Mäuse zu einer deutlichen Veränderung der Trabekelstruktur (Abb.6.4). Die *Mdk*-defizienten Mäuse besaßen im Vergleich zu den Wildtypkontrollen, ab einem Alter von 12 Monaten, ein signifikant erhöhtes trabekuläres Knochenvolumen.



**Abbildung 6.4: Nicht-dekalzifizierte Schnitte von Lendenwirbelkörpern aus Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäusen im Alter von 4, 12 und 18 Monaten.** In der dargestellten von Kossa/van Gieson Färbung wird mineralisierter Knochen schwarz dargestellt. Die *Mdk*-defizienten Mäuse (*Mdk*-/-) weisen, im Vergleich zu den Wildtypmäusen (*Mdk*+/+), ab einem Alter von 12 Monaten ein stark erhöhtes trabekuläres Knochenvolumen auf, welches mit einer deutlichen Veränderung der Trabekelstruktur einhergeht.

Die Wirbelkörper der Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäuse wurden im Alter von 4, 12 und 18 Monaten histomorphometrisch vermessen und die strukturellen Knochenparameter wurden quantifiziert. Hierbei zeigte sich, dass es keinen Unterschied in Bezug auf das trabekuläre Knochenvolumen (BV/TV; *bone volume per tissue volume*), die Trabekeldicke (TbTh.; *trabecular thickness*), die Trabekelanzahl (TbN.; *trabecular number*) oder den Abstand der Trabekel (TbSp.; *trabecular spacing*) zwischen den 4 Monate alten Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäusen gab, weshalb diese Altersstufe nicht weiterführend analysiert wurde (Abb.6.5). Bei den 12 und 18 Monate alten *Mdk*-defizienten Mäusen war im Vergleich zu den Wildtypkontrollen das trabekuläre Knochenvolumen signifikant erhöht (12 Monate: Mdk+/+: 12,51 ± 2,36 vs. Mdk-/-: 24,08 ± 4,79%; 18 Monate: Mdk+/+: 10,61 ± 3,63 vs. Mdk-/-: 21,89 ± 3,78%).



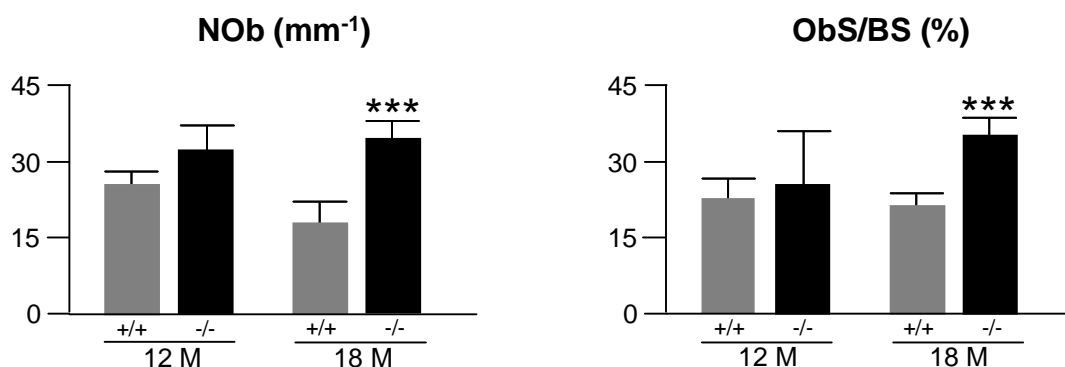
**Abbildung 6.5: Histomorphometrische Analyse der Knochenparameter von Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäusen.** BV/TV (*bone volume/tissue volume*): Knochenvolumen pro Gewebenvolumen; TbTh (*trabecular thickness*): Trabekeldicke; TbN (*trabecular number*): Anzahl der Trabekel; TbSp (*trabecular spacing*): Abstand der Trabekel. Die 4 Monate alten Wildtyp- (+/+) und *Mdk*-defizienten Mäuse (-/-) zeigen keinen Unterschied in den oben genannten Parameter. In den 12 und 18 Monaten alten *Mdk*-defizienten Mäusen ist ein signifikanter Anstieg des Knochenvolumens, wie der Trabekelanzahl zu verzeichnen und der Abstand der Trabekel nimmt signifikant ab, im Vergleich zu den Wildtypkontrollen. Die Trabekeldicke ist in den 12 Monate alten Mäusen unverändert, jedoch nimmt sie signifikant in den 18 Monate alten *Mdk*-defizienten Mäusen zu. (n = 6 Tiere pro Gruppe; t-Test: \* bedeutet p < 0,05; \*\* bedeutet p < 0,005; \*\*\* bedeutet p < 0,0005)

Der Anstieg des Knochenvolumens in den *Mdk*-defizienten Mäusen kann durch einen signifikanten Anstieg der Trabekelanzahl bei gleichzeitig verringertem

Trabekelabstand erklärt werden (Abb.6.5). Die Trabekeldicke war in den 12 Monate alten Mäusen nicht verändert, jedoch besaßen 18 Monate alte *Mdk*-defiziente Mäuse eine signifikant erhöhte Trabekeldicke, im Vergleich zu ihren Wildtypkontrollen (*Mdk*+/+ :  $33,35 \pm 4,44$  vs. *Mdk*-/- :  $42,12 \pm 0,71 \mu\text{m}$ ).

### 6.5 Die Knochenformationsrate in *Mdk*-defizienten Mäusen ist im höheren Alter nahezu verdoppelt

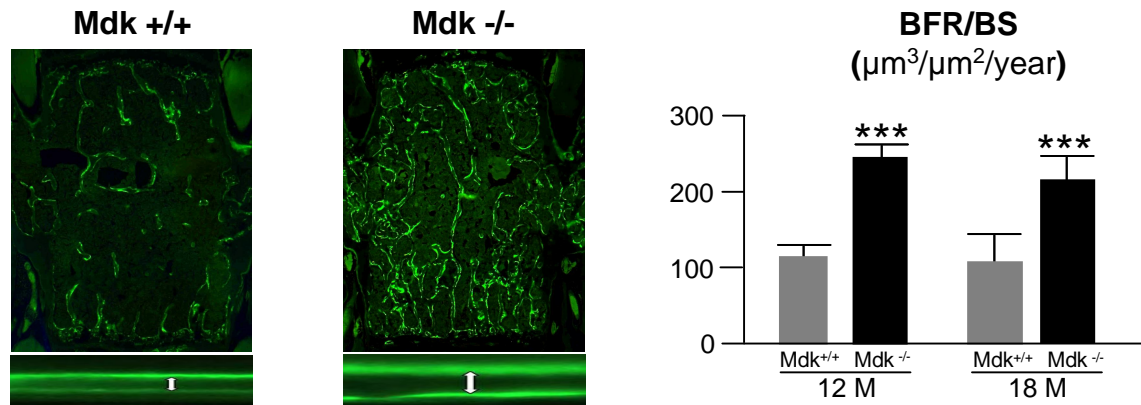
Anhand von Toluidin-blau-gefärbten nicht-kalzifizierten Lendenwirbelkörperschnitten wurde histomorphometrisch die Osteoblastenanzahl und -oberfläche ausgewertet. Beide Parameter waren in den 12 Monate alten *Mdk*-defizienten Mäusen nicht verändert im Vergleich zu den Wildtypkontrollen (Abb.6.6). Allerdings konnte ein signifikanter Anstieg der Osteoblastenanzahl (NOb) und Osteoblastenoberfläche (ObS/BS) in den 18 Monate alten *Mdk*-defizienten Mäusen beobachtet werden (NOb: *Mdk*+/+ :  $19,00 \pm 4,65$  vs. *Mdk*-/- :  $35,30 \pm 3,77 \text{mm}^{-1}$ ; ObS/BS: *Mdk*+/+ :  $22,26 \pm 2,93$  vs. *Mdk*-/- :  $35,7 \pm 3,93\%$ ; Abb.6.6).



**Abbildung 6.6: Osteoblastenanzahl und -oberfläche in Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäusen.** NOb (*number of osteoblasts*): Anzahl der Osteoblasten; ObS/BS (*osteoblast surface/ bone surface*): Osteoblastenoberfläche pro Knochenoberfläche. Die Anzahl der Osteoblasten und die Osteoblastenoberfläche pro Knochenoberfläche ist in den 12 Monate alten Mäusen unverändert und in den 18 Monate alten *Mdk*-defizienten Mäusen (-/-) signifikant erhöht im Vergleich zu den Wildtypkontrollen (+/+). (n = 6 Tiere pro Gruppe; t-Test: \*\*\* bedeutet p < 0,0005)

Weiterhin wurde mittels dynamischer Histomorphometrie die Knochenformationsrate (BFR; *bone formation rate*) ermittelt. Hierzu wurde den Mäusen im Abstand von sieben Tagen zweimal Calcein injiziert, welches sich in den neugebildeten Knochen einlagerte. Der Abstand zwischen den Doppelbänden und die Häufigkeit dieser Doppelbänden wurden quantifiziert. Die *Mdk*-defizienten Mäuse im Alter von 12 und 18 Monaten besaßen eine beinahe verdoppelte Knochenformationsrate im Vergleich zu ihren Wildtypkontrollen (12 Monate: *Mdk*+/+ :  $115,11 \pm 12,35$  vs. *Mdk*-/- :  $246,76 \pm$

15,04 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{year}$ ; 18 Monate: Mdk+/+: 108,13  $\pm$  38,34 vs. Mdk-/-: 215,98  $\pm$  29,96 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{year}$ ; Abb.6.7). Da die Anzahl der Osteoblasten nur in den 18 Monate alten *Mdk*-defizienten Mäusen signifikant erhöht war, könnte die unterschiedliche Geschwindigkeit der Knochenneubildung in den 12 Monate alten Mäusen auf eine erhöhte Aktivität der Osteoblasten zurückzuführen sein.

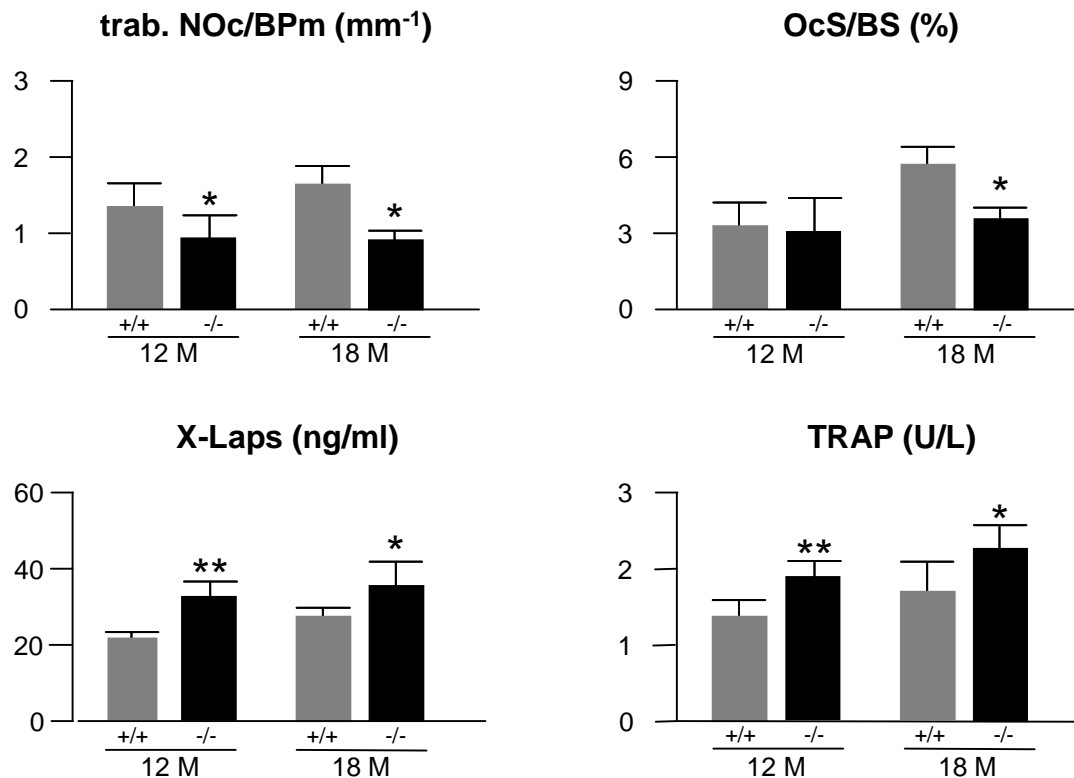


**Abbildung 6.7: Knochenformation in Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäusen.** Die Calceinmarkierung zeigt die Knochenformation bezogen auf die Knochenoberfläche (BFR/BS, *bone formation rate per bone surface*). Die Knochenformation ist in den *Mdk*-defizienten Mäusen (Mdk-/-; -/-) im Alter von 12 und 18 Monaten signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrolltieren (Mdk+/+; +/+). (n = 6 Tiere pro Gruppe; t-Test: \*\*\* bedeutet p < 0,0005)

## 6.6 *Mdk*-defiziente Mäuse weisen im höheren Alter einen „High bone turnover“-Phänotyp auf

An Toluidinblau gefärbten nicht-kalzifizierten Lendenwirbelkörperschnitten wurde histomorphometrisch die trabekuläre Anzahl der Osteoklasten (trab. NOc/BPm; *trabecular number of osteoclasts per bone parameter*) und die Osteoklastenoberfläche (OcS/BS; *osteoclast surface per bone surface*) bestimmt. Die Osteoklastenzahl war bei den 12 und 18 Monate alten *Mdk*-defizienten Mäuse signifikant geringer als in den Wildtypkontrollen (12 Monate: Mdk+/+: 1,36  $\pm$  0,30 vs. Mdk-/-: 0,97  $\pm$  0,27mm<sup>-1</sup>; 18 Monate: Mdk+/+: 1,67  $\pm$  0,21 vs. Mdk-/-: 0,93  $\pm$  0,10mm<sup>-1</sup>; Abb.6.8). Die Osteoklastenoberfläche war bei 12 Monate alten Tieren unverändert, jedoch bei 18 Monate alten *Mdk*-defizienten Tiere signifikant geringer als bei den Wildtypkontrollen (Mdk+/+: 5,767  $\pm$  0,66 vs. Mdk-/-: 3,38  $\pm$  0,62%). Außerdem konnte eine signifikante Erhöhung der X-Laps, der Menge an Kollagen Typ I Abbauprodukten im Serum (12 Monate: Mdk+/+: 22,13  $\pm$  1,21 vs. Mdk-/-: 33,06  $\pm$  4,00ng/ml; 18 Monate: Mdk+/+: 28,31  $\pm$  1,55 vs. Mdk-/-: 36,36  $\pm$  5,70ng/ml) und eine signifikante Erhöhung der Aktivität des osteoklastenspezifischen TRAP-Enzyms im Serum der *Mdk*-defizienten Mäuse (12 Monate: Mdk+/+: 1,43  $\pm$  0,21 vs. Mdk-/-: 1,94

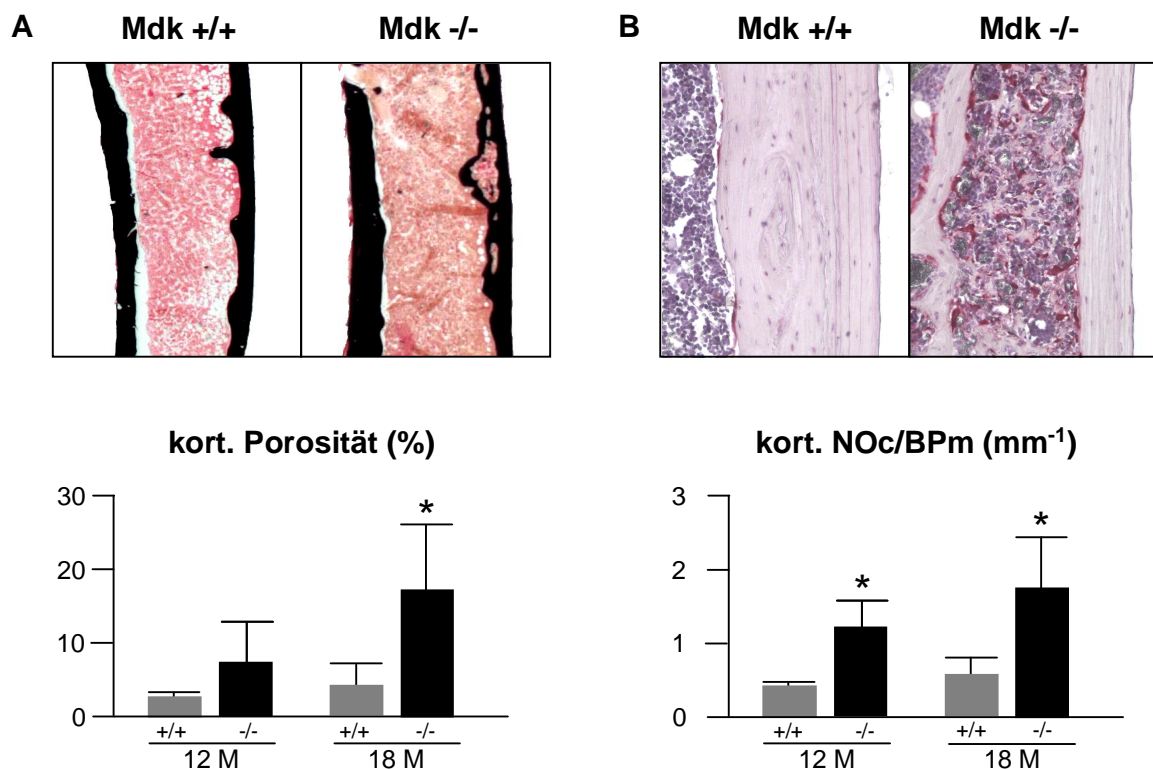
$\pm 0,20\text{U/L}$ ; 18 Monate:  $\text{Mdk}^{+/+}$ :  $1,52 \pm 0,07$  vs.  $\text{Mdk}^{-/-}$ :  $2,36 \pm 0,31\text{U/L}$ ) gemessen werden. Dies zeigte eine erhöhte Knochenresorption und damit einhergehend einen beschleunigten Knochenumbau (*high bone turnover*) an (Abb.6.8). Da die trabekuläre Osteoklastenzahl der *Mdk*-defizienten Mäuse signifikant erniedrigt war, im Vergleich zu den Wildtypkontrollen, musste davon ausgegangen werden, dass die Aktivität der Osteoklasten in den *Mdk*-defizienten Mäusen gesteigert war.



**Abbildung 6.8: Knochenresorption in Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäusen.** Trab. NOc/BPm (*trabecular number of osteoclast per bone parameter*): trabekuläre Anzahl der Osteoklasten pro Knochenoberfläche; OcS/BS (*osteoclast surface per bone surface*): Osteoklastenoberfläche pro Knochenoberfläche; X-Laps (Crosslaps): Kollagenabbauprodukte die im Serum gemessen werden und ein Maß für die Knochenresorption darstellen; TRAP (*tartrate-resistant alcalic phosphatase*): Aktivitätsmessung des aktiven osteoklastenspezifischen TRAP-Enzymes, zur Ermittlung des Grades der Knochenresorption. Die Anzahl der trabekulären Osteoklasten ist im Alter von 12 und 18 Monaten in den *Mdk*-defizienten Mäusen (-/-) signifikant erniedrigt im Vergleich zu den Wildtypkontrollen (+/+). Dasselbe gilt für die Osteoklastenoberfläche der 18 Monate alten *Mdk*-defizienten Mäuse. Die Knochenresorptionsparameter X-Laps und TRAP sind signifikant erhöht in den *Mdk*-defizienten Mäusen, was auf einen „high bone turnover“ (erhöhten Knochenstoffwechsel) hinweist. (n = 6 Tiere pro Gruppe; t-Test: \* bedeutet  $p < 0,05$ ; \*\* bedeutet  $p < 0,005$ )

### 6.7 Mit dem Alter entwickeln *Mdk*-defiziente Mäuse hyperostotische Läsionen in der Kortikalis der Röhrenknochen

Bei genauer histologischer Untersuchung der Röhrenknochen zeigte sich, dass *Mdk*-defiziente Mäuse ab einem Alter von 12 Monaten hyperostotische Läsionen aufwiesen, die in der Kortikalis lokalisiert waren (Abb.6.9 A). Die Häufigkeit des Auftretens und die Anzahl der hyperostotischen Läsionen in der Kortikalis nahmen mit dem Alter zu (18 Monate: *Mdk*<sup>+/+</sup>:  $4,3 \pm 3,0$  vs. *Mdk*<sup>-/-</sup>:  $17,4 \pm 8,9\%$ ). Mit Hilfe von Paraffinschnitten der Röhrenknochen wurden die Osteoklasten mittels TRAP-Färbung rot angefärbt. Hierbei zeigte sich deutlich, dass in den hyperostotischen Läsionen die Anzahl der Osteoklasten signifikant erhöht war. Die histomorphometrisch Analyse der Osteoklastenzahl (cort.NOc/BPm) in den hyperostotischen Läsionen bestätigte diesen Befund (12 Monate: *Mdk*<sup>+/+</sup>:  $0,43 \pm 0,05$  vs. *Mdk*<sup>-/-</sup>:  $1,23 \pm 0,36\text{mm}^{-1}$ ; 18 Monate: *Mdk*<sup>+/+</sup>:  $0,58 \pm 0,21$  vs. *Mdk*<sup>-/-</sup>:  $1,75 \pm 0,72\text{mm}^{-1}$ ; Abb.6.9 B).

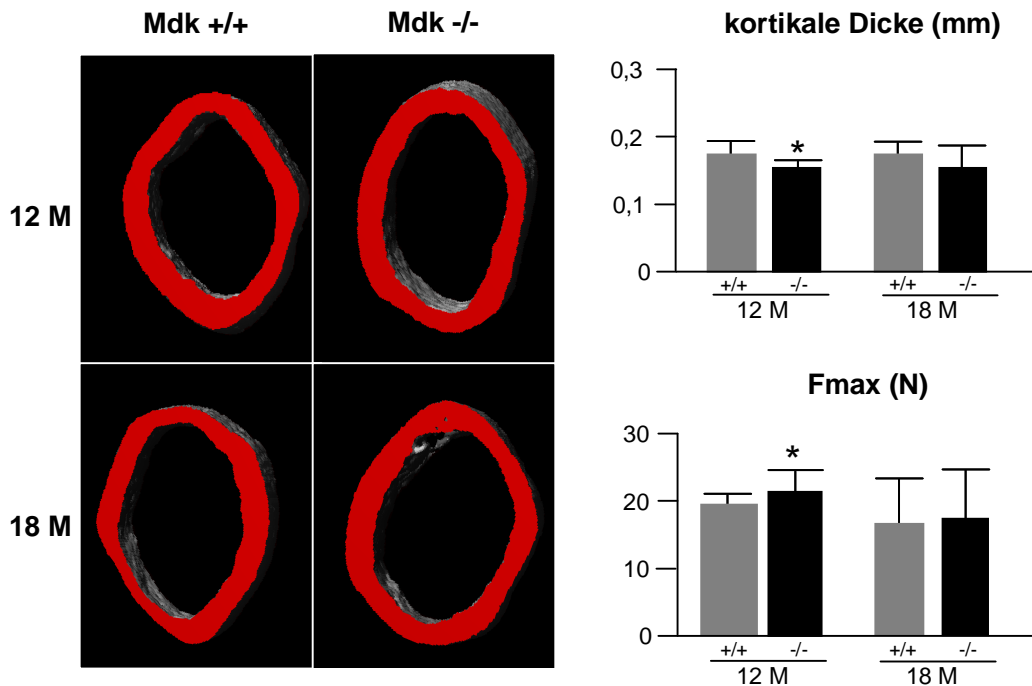


**Abbildung 6.9: Hyperostotische Läsionen in der Kortikalis langer Röhrenknochen.** A) Von Kossa/van Gieson gefärbte Schnitte von Röhrenknochen. Im Gegensatz zu den Wildtypkontrollen (*Mdk*<sup>+/+</sup>) sind in den Röhrenknochen *Mdk*-defizienter Mäuse (*Mdk*<sup>-/-</sup>) hyperostotische Läsionen aufgetreten. B) Vergrößerung einer hyperostotischen Läsion in der TRAP-Färbung. Hierbei werden Osteoklasten rot angefärbt. Die kortikale Porosität (cort. Porosity) und damit das Auftreten von hyperostotischen Läsionen nimmt mit dem Alter in *Mdk*-defizienten Mäusen zu. In den hyperostotischen Läsionen ist die Anzahl der Osteoklasten (cort. NOC/BPm) signifikant erhöht. (n = 6 Tiere pro Gruppe; t-Test: \* bedeutet p < 0,05)

### **6.8 Mdk-defiziente Femora haben im Alter von 12 Monaten eine verringerte kortikale Dicke, jedoch eine erhöhte Bruchfestigkeit**

Um zu testen, ob das Auftreten der hyperostotischen Läsionen in *Mdk*-defizienten Mäusen einen Einfluss auf die biomechanische Stabilität der Röhrenknochen hat, wurden dreidimensionale Darstellungen der Femora mit dem  $\mu$ CT angefertigt und anschließend ein Dreipunkt-Biegetest mit den Proben der Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäuse im Alter von 12 und 18 Monaten durchgeführt.

In den Femora der 12 Monate alten *Mdk*-defizienten Mäusen war die kortikale Dicke signifikant verringert im Vergleich zu den Wildtypkontrollen (*Mdk*+/:  $0,182 \pm 0,01$  vs. *Mdk*-/:  $0,168 \pm 0,007$ mm; Abb.6.10). Bei den 18 Monate alten *Mdk*-defizienten Mäusen war eine ähnliche Tendenz zu erkennen, die jedoch nicht signifikant war. Allerdings sollte hierbei bedacht werden, dass durch das Auftreten hyperostotischer Läsionen in der Kortikalis von Röhrenknochen die Ausgangssituation für die Messung der kortikalen Dicke im  $\mu$ CT verändert war, und hyperostotische Läsionen nur in den *Mdk*-defizienten Mäusen, jedoch nicht in den Wildtyptieren auftraten. Dies spiegelte sich auch in der verminderten kortikalen Dicke der *Mdk*-defizienten Mäuse wieder (Abb.6.10). Im Dreipunkt-Biegetest wurde anschließend die maximale Kraft ( $F_{max}$ ) ermittelt, die benötigt wurde, um einen Ermüdungsbruch des Femora auszulösen. Hierbei war die maximale Bruchfestigkeit in den 12 Monate alten *Mdk*-defizienten Mäusen signifikant erhöht im Vergleich zu den Wildtypkontrollen (*Mdk*+/:  $19,64 \pm 1,69$  vs. *Mdk*-/:  $18,7 \pm 18,96$ N; Abb.6.10). Bei den 18 Monate alten Mäusen gab es keinen Unterschied zu verzeichnen.

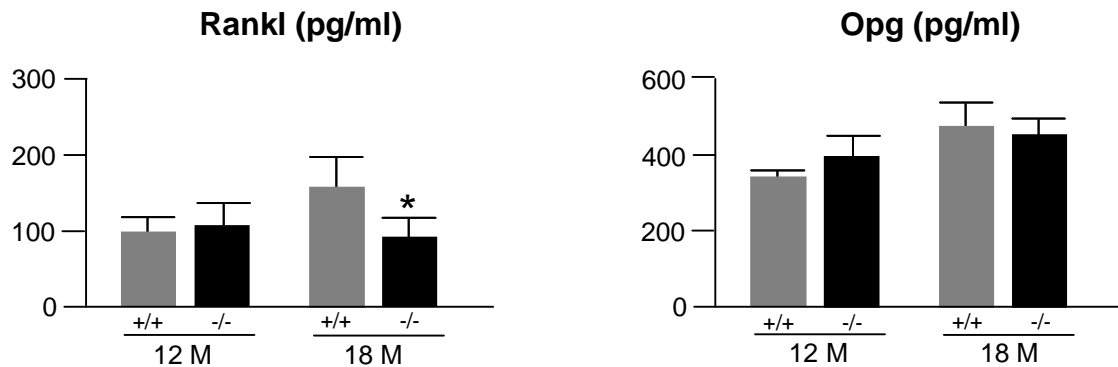


**Abbildung 6.10: Biomechanische Analyse der Röhrenknochen von Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäusen.**  $\mu$ CT-Aufnahmen vom Querschnitt des Femurs wurden mit Hilfe des  $\mu$ CTs aufgenommen und daraus wurde die kortikale Dicke berechnet. Durch Auftreten hyperostotischer Läsionen in den Röhrenknochen ist die kortikale Dicke bei *Mdk*-defizienten Mäusen (*Mdk*<sup>-/-</sup>; -/-) im Alter von 12 Monaten signifikant geringer und im Alter von 18 Monate tendenziell geringer als bei Wildtypkontrollen (*Mdk*<sup>+/+</sup>; +/+). In einem anschließenden Dreipunkt-Biegetest wurde die maximale Bruchkraft (*F*<sub>max</sub>) ermittelt, die nötig war um einen Ermüdungsbruch des Knochens hervorzurufen. Diese Kraft war in 12 Monate alten *Mdk*-defizienten Mäusen signifikant höher als bei Wildtypkontrollen. Im Alter von 18 Monaten gibt es keinen Unterschied in der maximalen Bruchkraft. (n = 6 Tiere pro Gruppe; t-Test: \* bedeutet p < 0,05)

### 6.9 Der Knochenphänotyp *Mdk*-defizienter Mäuse kann nicht über bekannte Knochenstoffwechselfparameter erklärt werden

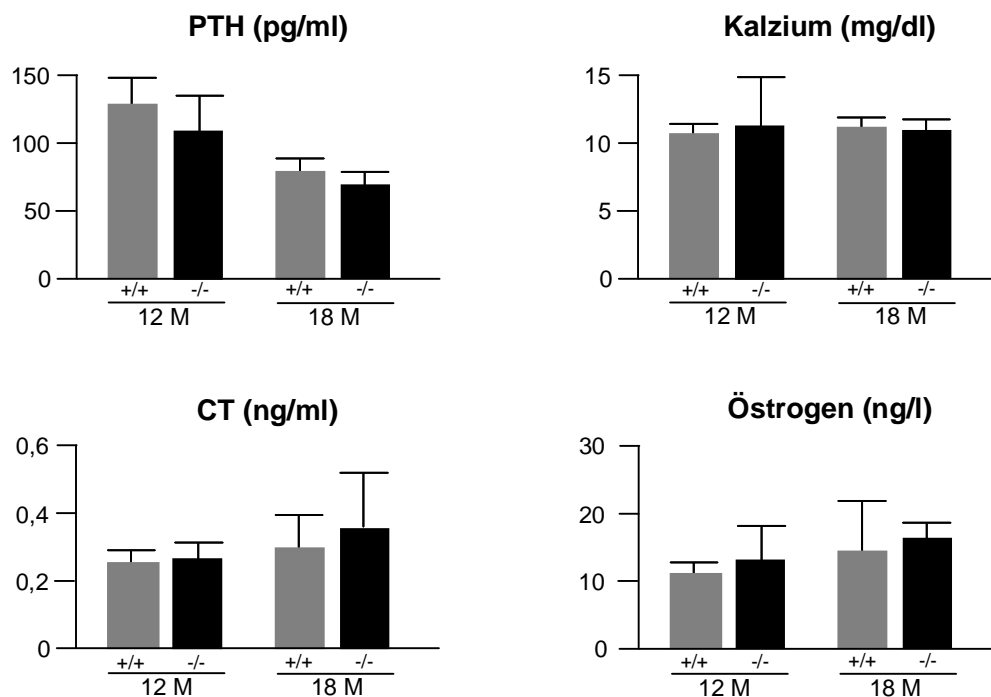
Das Rank-Rankl-Opg System spielt eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel. Eine Verschiebung dieses Systems z.B. zu Gunsten des Rankl, würde die Knochenresorption erhöhen. Allerdings lieferten die Konzentrationsmessung von Rankl und Opg im Serum in Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäusen keine Erklärung für den vorliegenden Knochenphänotyp, da es, bis auf eine Ausnahme, keinen Unterschied in den Konzentrationen der beiden Parameter zwischen Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäusen gab (Abb.6.11). Bei der Ausnahme handelte es sich um die Rankl-Konzentration der 18 Monate alten *Mdk*-defizienten Mäuse. Sie war signifikant erniedrigt im Vergleich zu den Kontrolltieren (*Mdk*<sup>+/+</sup>: 157,06 ± 41,6 vs. *Mdk*<sup>-/-</sup>: 98,83 ± 17,38pg/ml). Die Erniedrigung könnte mit ein Grund für das erhöhte trabekuläre Knochenvolumen sein, jedoch erklärt es nicht, dass Auftreten hyperostotischer Läsionen in den Röhrenknochen *Mdk*-defizienter Mäuse.





**Abbildung 6.11: Serumanalyse von Rankl und Opg in Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäusen.** Die Serumspiegel von Rankl und Opg in 12 Monate alten *Mdk*-defizienten Mäusen (-/-) entsprechen denen der Wildtypkontrollen (+/+). Der Rankl-Spiegel 18 Monate alter *Mdk*-defizienter Mäuse ist signifikant verringert im Vergleich zu den Wildtyptieren. Der Opg-Spiegel 18 Monate alter Wildtyp- und *Mdk*-defizienter Mäuse ist jedoch unverändert. (n = 6 Tiere pro Gruppe; t-Test: \* bedeutet p < 0,05)

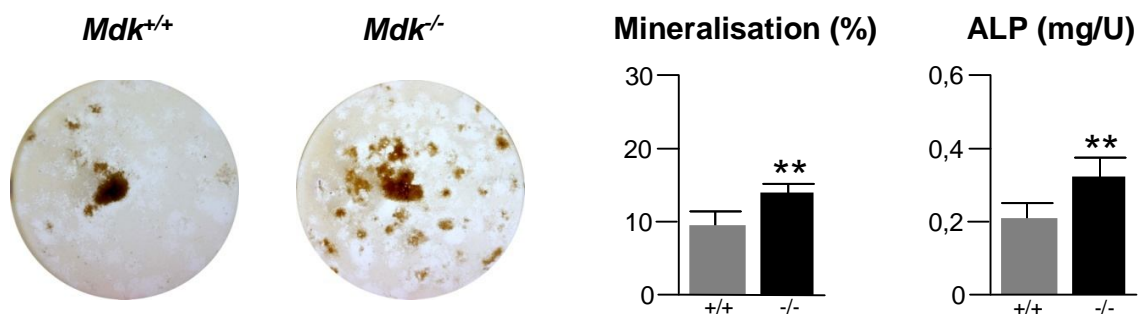
Um zu überprüfen, ob der beschleunigte Knochenumbau (high bone turnover) in den *Mdk*-defizienten Mäusen indirekt durch veränderte Serumspiegel von wichtigen Knochenstoffwechselfparametern gesteuert wird, wurde die Konzentration vom Parathormon (PTH), Calcitonin (CT), Calcium und Östrogen im Serum bestimmt. Im Alter von 12 und 18 Monaten ist keiner der oben genannten Stoffwechselfparameter signifikant bei *Mdk*-defizienten Mäusen, im Vergleich zu den Wildtypkontrollen, verändert (Abb.6.12).



**Abbildung 6.12: Serumanalyse von Parathormon, Kalzium, Calcitonin und Östrogen im Serum von Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäusen.** Im Serum von 12 und 18 Monate alten Wildtyp- (+/+) und *Mdk*-defizienten Mäusen (-/-) ist kein Konzentrationsunterschied der Knochenstoffwechselfparameter Parathormon (PTH), Kalzium, Calcitonin (CT) und Östrogen festzustellen. (n = 6 Tiere pro Gruppe)

### 6.10 Primäre Osteoblasten aus *Mdk*-defizienten Mäusen weisen einen erhöhten Mineralisationsgrad und eine erhöhte Alkalische Phosphatase-Aktivität auf

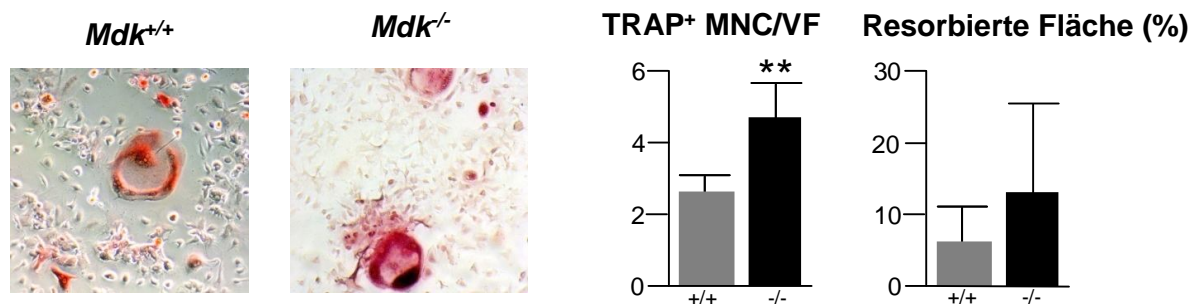
Um den beobachteten Knochenphänotyp *Mdk*-defizienter Mäuse weiterführend analysieren zu können, wurden Zellkulturversuche durchgeführt. Hierzu wurden primäre Osteoblasten aus den Calvarien neugeborener Mäuse und aus dem Knochenmark ausgewachsener Mäuse isoliert und über 20 Tage mit Ascorbat und  $\beta$ -Glycerolphosphat differenziert. Zur Auswertung wurden der Mineralisationsgrad, sowie die Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt. Da es bei den Osteoblastenkulturen, die aus den Calvarien neugeborener Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäuse isoliert wurden, keinen Unterschied im Mineralisationsgrad, wie in der Alkalischen Phosphatase Aktivität gab, wurden diese Ergebnisse nicht detailliert aufgeführt (Daten werden nicht gezeigt). Bei den primären Osteoblasten aus dem Knochenmark konnte hingegen ein Unterschied zwischen Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Zellen beobachtet werden. Die *Mdk*-defizienten Osteoblastenkulturen besaßen einen signifikant erhöhten Mineralisationsgrad an Tag 20 der Differenzierung (Abb.6.13) im Vergleich zu Wildtypkontrollen (*Mdk*<sup>+/+</sup>:  $9,69 \pm 1,76$  vs. *Mdk*<sup>-/-</sup>:  $13,99 \pm 1,35\%$ ). Die Alkalische Phosphatase ist ein Marker der Osteoblastenaktivität, da das Enzym im Knochen nur in den aktiven Osteoblasten gebildet wird. In den *Mdk*-defizienten Kulturen konnte auch ein signifikanter Anstieg der Alkalischen Phosphatase Aktivität verzeichnet werden (*Mdk*<sup>+/+</sup>:  $0,21 \pm 0,04$  vs. *Mdk*<sup>-/-</sup>:  $0,33 \pm 0,05$ mg/U; Abb.6.13).



**Abbildung 6.13: Analyse primärer Osteoblasten aus dem Knochenmark von Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäusen.** Die primären Osteoblasten wurden aus dem Knochenmark von Wildtyp- (*Mdk*<sup>+/+</sup>; +/+) und *Mdk*-defizienten Mäusen (*Mdk*<sup>-/-</sup>; -/-) isoliert und durch Zugabe von  $\beta$ -Glycerolphosphat und Ascorbat differenziert. Am Tag 20 der Osteoblastendifferenzierung wurde eine von Kossa-Färbung der Zellkulturen durchgeführt und der Mineralisationsgrad bestimmt. Außerdem wurde eine Aktivitätsmessung der Alkalischen Phosphatase (ALP) durchgeführt. In der Abwesenheit von *Mdk* sind sowohl der Mineralisationsgrad wie auch die Aktivität der Alkalischen Phosphatase in den primären Osteoblasten signifikant erhöht, im Vergleich zu Wildtypkulturen. (n = 6 Isolationen pro Gruppe; t-Test: \*\* bedeutet p < 0,005; \*\*\* bedeutet p < 0,0005)

### 6.11 *Mdk*-defiziente Osteoklasten besitzen keine erhöhte Aktivität

Aus dem Knochenmark von Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäusen wurden hämatopoetische Vorläuferzellen aus der Monozyten-Makrophagen-Linie isoliert und durch Zugabe von Vitamin D<sub>3</sub>, RankL und MCSF zu Osteoklasten differenziert. Am Tag 10 der Osteoklastendifferenzierung wurden die Kulturen einer TRAP-Färbung unterzogen, was zu einer Anfärbung der aktiven, mehrkernigen Osteoklasten führte, die gezählt wurden (TRAP<sup>+</sup> MNC/VF; Abb.6.14). Die *Mdk*-defizienten Kulturen wiesen hierbei eine signifikant erhöhte Anzahl an Trap-gefärbten, mehrkernigen Osteoklasten auf, im Vergleich zu Kontrollkulturen (Mdk+/+: 2,62 ± 0,49 vs. Mdk-/-: 4,71 ± 1,04). Weiterhin wurden Osteoklastenkulturen der Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäuse 20 Tage lang auf Dentinchips kultiviert und die resorbierte Fläche wurde vermessen (Abb.6.14). Hierbei wurde keine signifikante Erhöhung der resorbierten Fläche in den *Mdk*-defizienten Kulturen festgestellt (Mdk+/+: 6,05 ± 4,56 vs. Mdk-/-: 13,09 ± 12,33). Die erhöhte Anzahl der TRAP-positiven Osteoklasten in den *Mdk*-defizienten Kulturen ging also nicht einher mit einer gesteigerten Aktivität der Osteoklasten.

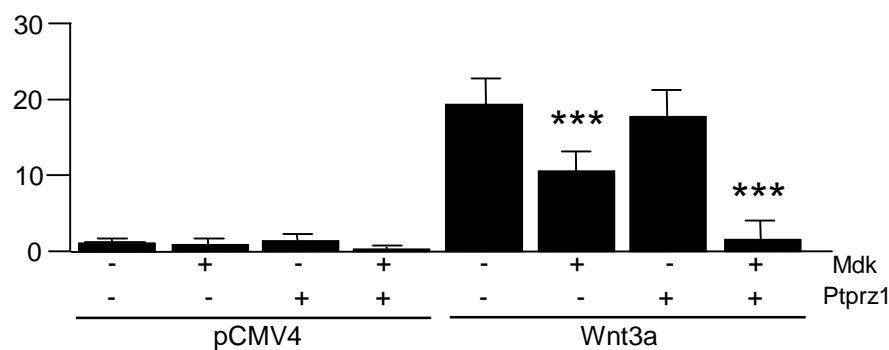


**Abbildung 6.14: Analyse von Osteoklasten aus dem Knochenmark von Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäusen.** Die Osteoklasten wurden aus dem Knochenmark von Wildtyp- (*Mdk*<sup>+/+</sup>;+/+) und *Mdk*-defizienten Mäusen (*Mdk*<sup>-/-</sup>; -/-) isoliert und durch Zugabe von Vitamin D, Rankl und M-CFS differenziert. Am Tag 10 der Osteoklastendifferenzierung wurde eine TRAP-Färbung der Zellkulturen durchgeführt und die Anzahl der mehrkernigen TRAP-positiven Zellen (TRAP<sup>+</sup> MNC/VF; *Trap positive multinuclear colonies per view field*) ermittelt. Weiterhin wurden Osteoklasten 20 Tage lang auf Dentinchips kultiviert und die resorbierte Fläche auf diesen Dentinchips ausgewertet. Die Anzahl der TRAP-positiven, mehrkernigen Osteoklasten ist in den *Mdk*-defizienten Kulturen signifikant erhöht im Vergleich zu den Wildtypkulturen. Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen den Kulturen in Bezug auf die Osteoklastenaktivität festgestellt werden, da die resorbierte Fläche der Dentinchips bei den Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Kulturen nicht signifikant unterschiedlich waren. (n = 6 Isolationen pro Gruppe; t-Test: \*\* bedeutet p < 0,005)

## 6.12 Eine Kombination aus Mdk und Ptpz1 hemmt *in vitro* den Wnt-Signalweg

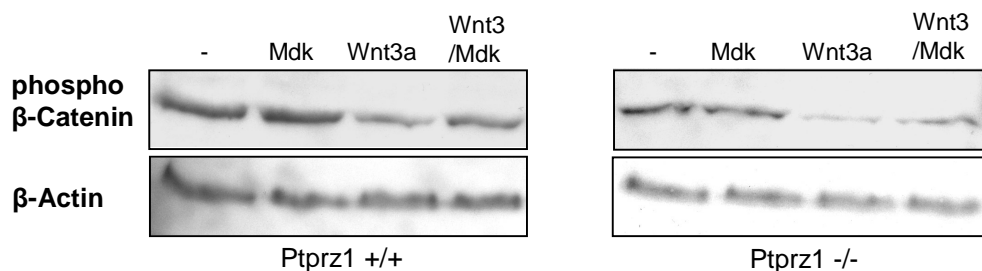
Der kanonische Wnt-Signalweg ist einer der wichtigsten Signalwege in Osteoblasten (siehe Einleitung; Kapitel 3.44). Um herauszufinden, ob Mdk einen Einfluss auf diesen Signalweg hat, wurden Transfektionsversuche mit osteoblastenähnlichen MC3T3-E1-Zellen durchgeführt. Mit Hilfe des TOPflash-Plasmids konnte der Einfluss von Mdk und Ptpz1 auf den kanonischen Wnt-Signalweg untersucht werden (Kapitel 5.2.5.13). Durch Zugabe von Wnt3a stieg die Signalintensität des TOPflash-Plasmids an, da der kanonische Wnt-Signalweg aktiviert wurde. Eine Co-Transfektion von Wnt3a und Mdk in die MC3T3-E1-Zellen führte zu einer signifikanten Hemmung der Signalintensität. Folglich schien Mdk den kanonischen Wnt-Signalweg *in vitro* zu hemmen. Eine Co-Transfektion von Wnt3a und Ptpz1 hatte hingegen keinerlei Einfluss auf die Signalintensität des kanonischen Wnt-Signalweges. Die Induktion blieb unverändert im Vergleich zu einer alleinigen Transfektion von Wnt3a. Überraschenderweise führte eine Transfektion von Wnt3a, Mdk und Ptpz1 zu einer kompletten Hemmung der Signalintensität des TOPflash-Plasmids. Mdk und Ptpz1 schienen in Kombination eine komplette Hemmung des Wnt-Signalwegs auszulösen.

### Induktion (x-fach):



**Abbildung 6.15: Untersuchung des Wnt-Signalwegs mittels transienter Transfektion.** In murinen osteoblastenähnlichen MC3T3-E1-Zellen wurde mit Hilfe des TOPflash-Plasmids der Wnt-Signalweg untersucht. Die Normierung der Ergebnisse erfolgte mittels eines  $\beta$ -Galaktosidase-Assays. Durch Transfektion des Wnt3a-Plasmids stieg die Signalintensität des Versuchs an, da der Wnt-Signalweg aktiviert wurde. Eine Co-Transfektion von Wnt3a und Mdk hemmte die Signalintensität signifikant, was nicht zu beobachten war, als Wnt3a und Ptpz1 co-transfiziert wurden. Eine komplette Hemmung des Wnt-Signalwegs wurde durch eine kombinierte Transfektion von Mdk und Ptpz1 erreicht. (n = 17; t-Test: \*\*\* bedeutet p < 0,0005)

Um die Hemmung des Wnt-Signalwegs durch Mdk und Ptpz1 in Osteoblasten weiterführend zu untersuchen, wurden Wildtyp- und *Ptpz1*-defiziente Osteoblasten aus den Calvarien der entsprechenden Mäuse isoliert und 10 Tage lang differenziert. 20 Minuten vor der Proteinisolation wurden die Osteoblasten mit rekombinanten Wnt3a und/oder Mdk inkubiert und anschließend Western Blot-Analysen durchgeführt. Hierbei diente ein  $\beta$ -Actin-Antikörper als Kontrolle, um zu veranschaulichen, dass in jeder Probe dieselbe Menge von Gesamtprotein enthalten war (Abb.6.16). Da einer der wichtigsten Schritte zur Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs die Dephosphorylierung von  $\beta$ -Catenin ist, wurde der phospho  $\beta$ -Catenin-Antikörper, der inaktives  $\beta$ -Catenin anzeigt, gewählt, um einen möglichen Einfluss von Mdk und Ptpz1 auf den kanonischen Wnt-Signalweg zu untersuchen. Solange der Wnt-Signalweg in den Osteoblasten inaktiv ist, liegt viel phosphoryliertes und damit inaktives  $\beta$ -Catenin in den Osteoblasten vor, und eine starke Bande wird mit dem phospho  $\beta$ -Catenin-Antikörper detektiert (Abb.6.16). Durch Zugabe von Wnt3a wird der Wnt-Signalweg eingeschaltet, wodurch vermehrt  $\beta$ -Catenin dephosphoryliert wird. Hierdurch wird die phospho- $\beta$ -Catenin Bande im Western Blot schwächer. Eine kombinierte Zugabe von rekombinantem Wnt3a und Mdk zu den Wildtyposteoblasten führte auch *in vitro* in Osteoblasten zu einer Hemmung des Wnt-Signalwegs.



**Abbildung 6.16: Untersuchung des Wnt-Signalwegs in primären Osteoblasten.** Primäre Osteoblasten wurden aus Calvarien von Wildtyp- (*Ptpz1*<sup>+/+</sup>) und *Ptpz1*-defizienten Mäusen (*Ptpz1*<sup>-/-</sup>) isoliert und 10 Tage unter Zugabe von Ascorbat und  $\beta$ -Glycerolphosphat differenziert. 20 Minuten vor der Proteinisolation wurden die Zellen mit 100ng rekombinatem Wnt3a und/oder Mdk inkubiert. Es folgte eine Western Blot-Analyse mit einem phospho- $\beta$ -Catenin Antikörper. Durch Zugabe von Wnt3a wird die phospho- $\beta$ -Catenin Bande schwächer, da der Wnt-Signalweg angeschaltet wird und somit weniger inaktives phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin vorliegt. Eine kombinierte Zugabe von Wnt3a und Mdk zu den primären Osteoblasten bewirkt, dass der Wnt-Signalweg in den Wildtypzellen gehemmt wird, wodurch die phospho- $\beta$ -Catenin Bande im Western Blot wieder stärker ist, da mehr inaktives  $\beta$ -Catenin vorhanden ist. Dies ist in den *Ptpz1*-defizienten Zellen nicht der Fall, da hier keine kombinierte Wirkung von Mdk und Ptpz1 möglich ist. Derselbe Versuchansatz wurde zusätzlich mit einem  $\beta$ -Actin-Antikörper ausgewertet, um sicherzustellen, dass in jeder Probe dieselbe Menge an Protein vorhanden war. (*Ptpz1*<sup>+/+</sup>: n = 3; *Ptpz1*<sup>-/-</sup>: n = 1)

Hierbei wurde die phospho- $\beta$ -Catenin Bande in den Wildtyposteoblasten (*Ptprz1*<sup>+/+</sup>) wieder stärker detektiert, im Vergleich zu der Bande, wo die Zellen nur mit rekombinantem Wnt3a inkubiert wurden (Abb.6.16). Dies war nicht der Fall in den *Ptprz1*-defizienten Osteoblasten (*Ptprz1*<sup>-/-</sup>). Hier war die Wnt3a/Mdk-Bande genauso schwach ausgeprägt, wie die Wnt3a-Bande. Die Hemmung des Wnt-Signalwegs in den Wildtyposteoblasten wurde, wie in den Transfektionsversuchen, durch eine kombinierte Wirkung von Mdk und *Ptprz1* ausgelöst. In den *Ptprz1*-defizienten Osteoblasten konnte diese kombinierte Wirkung nicht stattfinden, da in diesen Zellen kein *Ptprz1* vorhanden war.

### **6.13 Untersuchungen zum Einfluss von Mdk auf die Genexpression in Osteoblasten**

Die Tatsache, dass die Abwesenheit von Mdk im Alter in Mäusen zu einem Schutz vor einem Knochenmasseverlust führt und in den *Mdk*-defizienten Mäusen die Knochenformation verdoppelt ist, führt zu der Frage, was für eine Rolle Mdk in den Osteoblasten spielt. Um dieser Frage nachzugehen, wurde eine Affymetrix-Genchiphybridisierung durchgeführt, bei der die Genexpression primärer Osteoblasten an Tag 10, mit oder ohne vorherige Inkubation mit rekombinanten Mdk, miteinander verglichen wurde. Aufgelistet wurden zuerst die Gene, von denen bekannt ist, dass sie eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel spielen (Abb.6.17). Während die Expression der Gene *Runx2*, *Sp7* und *Atf4* notwendig für die Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen zu Präosteoblasten ist, sind die Gene *Col1a1*, *Ibsp*, *Alpl* und *Bglap* essentiell für die Funktion der Osteoblasten. Andere Gene, wie das *Gsk3*, welches im Wnt-Signalweg eine wichtige Rolle spielt, oder *Ptprz1* und *Ptn* wurden in der Affymetrix-Genchiphybridisierung ausgewertet, da sie einen speziellen Bezug zum *Mdk*-Gen besitzen. Die aufgeführten Gene weisen keine veränderte Genexpression auf („signal log ratio“ (SLR) von 0,5 bis -0,5), wenn Osteoblasten mit rekombinantem Mdk inkubiert wurden (Abb.6.17). Mdk scheint auf die Genexpression dieser Gene keinen Einfluss auszuüben.

Gene	WT	WT+Mdk	SLR
<i>Runx2</i>	35	42	0,3
<i>Col1a1</i>	11312	12242	0,1
<i>Tnfrsf11b</i>	231	271	0,1
<i>Atf4</i>	1647	1701	0
<i>Ibsp</i>	8997	9170	0
<i>Gsk3</i>	603	551	0
<i>Alpl</i>	2765	2604	-0,1
<i>Bglap</i>	8832	8430	-0,1
<i>Ptn</i>	3725	3469	-0,1
<i>Sp7</i>	832	753	-0,2
<i>Phex</i>	79	74	-0,2
<i>Ptprz1</i>	603	596	-0,5

**Abbildung 6.17: Auswertung der Affymetrix-Genchiphybridisierung in Bezug auf wichtige Knochenstoffwechsel-Zielgene.** Aus primären Wildtyposteoblasten wurde an Tag 10 RNA isoliert und in einer Affymetrix-Genchiphybridisierung eingesetzt. Hierbei wurde eine Wildtypprobe mit einer Wildtypprobe, die 6 Stunden mit 100ng rekombinanten humanen Mdk inkubiert wurde, miteinander verglichen. In der Tabelle sind wichtige Zielgene des Knochenstoffwechsels aufgelistet. Die Reihenfolge der Gene ergibt sich durch die Auswertung mit einer speziellen Software von Affymetrix, bei der die „*signal log ratio*“ (SLR) ermittelt wird. Diese SLR korreliert nicht notwendigerweise mit der x-fachen Expression. *Runx2*: Runt-related transcription factor 2; *Col1a1*: Collagen, type 1; *Tnfrsf11b*: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin); *Atf4*: activating transcription factor 4; *Ibsp*: integrin binding sialoprotein (bone sialoprotein); *Gsk3*: glycogen synthase kinase 3; *Alp1*: alkaline phosphatase, liver/bone/kidney; *Bglap*: bone gamma-carboxyglutamate protein (Osteocalcin); *Ptn*: Pleiotrophin; *Sp7*: Sp7 transcription factor 7 (Osterix), *Phex*: phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome; *Ptprz1*: protein tyrosine phosphatase, receptor type Z, polypeptide1. Alle aufgeführten Gene werden, im Vergleich zu der Wildtypprobe, durch eine rekombinante Zugabe von Mdk nicht signifikant verändert (n=1).

Die Gene, deren Expression durch eine Zugabe von Mdk zu den Wildtyposteoblasten am stärksten induziert wurden, sind in Abb.6.18 zusammengefasst. Hierbei wurden nur die Gene aufgelistet, die mindestens eine Signalstärke von 100 überschreiten und eine SLR über 1,1 besitzen. Die meisten dieser Gene besitzen keinen direkten Zusammenhang mit dem Knochenstoffwechsel und wurden daher nicht weiter analysiert. Interessanterweise wurden drei Gene in ihrer Expression durch Mdk induziert, die im direkten Zusammenhang mit dem Knochenstoffwechsel stehen. Hierbei handelt es sich um die Gene *Dmp1*, *Ank* und *Enpp1* (Abb.6.18). *Dmp1* kodiert das Dentin matrix protein 1, welches eine zentrale Rolle in der Regulation der Phosphat-Homöostase spielt. Die Gene *Ank* (progressive ankylosis) und *Enpp1* (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1) spielen eine wichtige Rolle in der Mineralisation des Knochens. Sie sind zusammen mit der gewebeunabhängigen Alkalischen Phosphatase (*Alpl*) zuständig für die Regulation der Hydroxylapatit-Ablagerung und damit für die Mineralisation des Knochens (Harmey et al.; 2004).

Gene	WT	WT+Mdk	SLR
<i>Mmp3</i>	32	151	2,1
<b><i>Dmp1</i></b>	1056	3008	1,6
<b><i>Ank</i></b>	545	1369	1,4
<i>Serpina3g</i>	74	162	1,4
<i>Ccl7</i>	38	102	1,4
<i>Steap4</i>	93	259	1,2
<i>Ccl19</i>	127	254	1,2
<i>Mt2</i>	155	410	1,2
<i>Klhdc8a</i>	106	226	1,2
<i>Mmp10</i>	35	107	1,2
<i>Hp</i>	54	107	1,1
<i>Slc20a1</i>	385	949	1,1
<b><i>Enpp1</i></b>	97	315	1,1

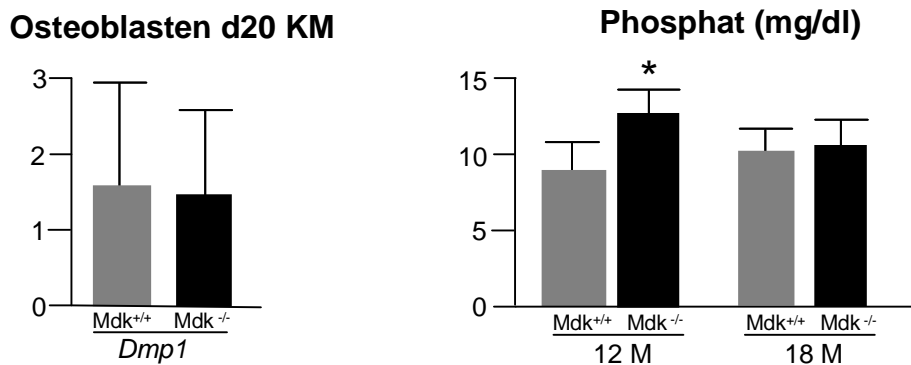
**Abbildung 6.18: Auswertung der am stärksten induzierten Gene der Affymetrix-Genchiphybridisierung.** Aus primären Wildtyposteoblasten (WT) wurde an Tag 10 RNA isoliert und in einer Affymetrix-Genchiphybridisierung eingesetzt. Hierbei wurde eine Wildtypprobe mit einer Wildtypprobe, die 6 Stunden mit 100ng rekombinanten humanen Mdk inkubiert wurde (WT+Mdk), miteinander verglichen. In der Tabelle ergibt sich die Reihenfolge der Gene durch die „signal log ratio“ (SLR), die bei der Auswertung mit einer speziellen Software von Affymetrix berechnet wurde. Diese „signal log ratio“ korreliert nicht notwendigerweise mit der x-fachen Expression. *Mmp3*: matrix metalloproteinase 3; *Dmp1*: Dentin matrix protein 1; *Ank*: progressive ankylosis; *Serpina3g*: serine (or cysteine) peptidase inhibitor; *Ccl7*: chemokine (C-C motif) ligand 7; *Steap4*: STEAP family member 4; *Ccl19*: chemokine (C-C motif) ligand 19; *Mt2*: metallothionein 2; *Klhdc8a*: kelch domain containing 8A; *Mmp10*: matrix metalloproteinase 10; *Hp*: haptoglobin; *Slc20a1*: solute carrier family 20, member 1; *Enpp1*: ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1. Bei den am stärksten induzierten Genen (Induziert) sind die drei Gene *Dmp1*, *Ank* und *Enpp1* von besonderem Interesse, da sie alle direkt im Knochenstoffwechsel involviert sind (n=1).

#### 6.14 Die *Dmp1*-Expression ist unverändert in primären Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Osteoblasten

Um die Ergebnisse aus der Affymetrix-Genchiphybridisierung zu bestätigen, wurden primäre Osteoblasten aus dem Knochenmark isoliert und 20 Tage differenziert. Die *Dmp1*-Expression wurde anschließend mittels Real-Time-PCR bestimmt. Da bei der Affymetrix-Genchiphybridisierung, durch eine Zugabe von rekombinanten Mdk zu den Osteoblasten, die Genexpression des *Dmp1* anstieg, wurde im Umkehrschluss vermutet, dass die *Dmp1*-Expression in *Mdk*-defizienten Osteoblasten erniedrigt sein könnte. Allerdings stellte sich heraus, dass es keine Veränderung in der *Dmp1*-Expression zwischen Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Osteoblastenkulturen gab (Abb.6.19). Da eine Mutation im *Dmp1*-Gen zu einem Phosphatmangel (Hypophosphatämie) führt (Ling et al., 2005), wurde im Serum die Phosphatkonzentration von 12 und 18 Monate alten Wildtyp und *Mdk*-defizienten Mäusen bestimmt (Abb.6.19). Die Phosphatkonzentration von 12 Monate alten *Mdk*-



defizienten Mäusen war signifikant erhöht im Vergleich zu Wildtypkontrollen. Im Alter von 18 Monaten gab es keinen Unterschied in der Phosphatkonzentration.



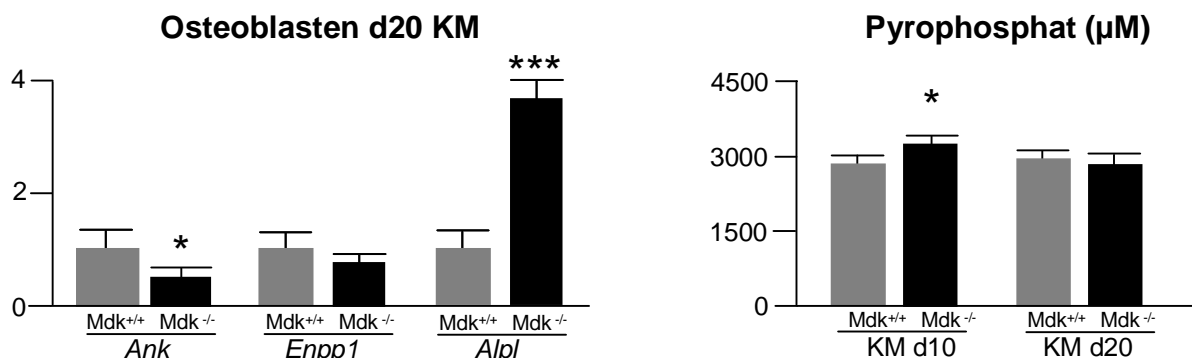
**Abbildung 6.19: Analyse der Genexpression von *Dmp1* in Osteoblasten und Bestimmung der Phosphatkonzentration von Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäusen.** RNA aus Wildtyp- (*Mdk*<sup>+/+</sup>) und *Mdk*-defizienten (*Mdk*<sup>-/-</sup>) Osteoblasten aus dem Knochenmark (KM) wurden am Tag 20 der Differenzierung in einer Real-Time-PCR eingesetzt, um die Genexpression von *Dmp1* zu ermitteln. Die Expression des *Dmp1*-Gens in *Mdk*-defizienten Osteoblasten ist unverändert im Vergleich zu Wildtyposteoblasten. Der Phosphatgehalt wurde im Serum von 12 und 18 Monate alten Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäusen gemessen. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Phosphatkonzentration in den 12 Monate alten *Mdk*-defizienten Mäusen (n=3; t-Test: \* bedeutet p < 0,05).

### 6.15 Untersuchungen der *Ank*-, *Enpp1*- und *Alpl*-Genexpression in primären Osteoblasten

Um die Ergebnisse der Affymetrix-Genchiphybridisierung zu bestätigen wurden primäre Wildtyposteoblasten aus Calvarien neugeborener Mäuse isoliert und für 6, 14 und 24 Stunden mit rekombinantem humanen Mdk inkubiert. Anschließend wurde die RNA der Osteoblasten in cDNA umgeschrieben und die Genexpression des *Ank* und *Enpp1*-Gens mittels Real-Time-PCR gemessen. Die Expression des *Ank*-Gens stieg tendenziell durch eine 6 stündige Inkubation mit rekombinantem Mdk an (Ohne rhMdk:  $1,05 \pm 0,38$  vs. 6 Std. mit rhMdk:  $1,80 \pm 0,55$ ). Dies war nicht zu beobachten bei einer Inkubationszeit über 14 und 24 Stunden. Dasselbe Ergebnis war bei der Genexpression des *Enpp1*-Gens zu verzeichnen (Ohne rhMdk:  $1,00 \pm 0,07$  vs. 6 Std. rhMdk:  $1,42 \pm 0,44$ ). Das Ergebnis der Affymetrix-Genchiphybridisierung konnte somit tendenziell bestätigt werden (Daten werden nicht gezeigt).

Da der osteoblastenspezifische Phänotyp der *Mdk*-defizienten Mäuse nur in Osteoblastenkulturen auftrat, die aus dem Knochenmark isoliert wurden, stellte sich die Frage, wie die *Ank* und *Enpp1*-Expression in Osteoblastenkulturen aus dem Knochenmark war. Hierzu wurden primäre Osteoblasten aus dem Knochenmark von Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäusen isoliert, 20 Tage differenziert und die *Ank* und

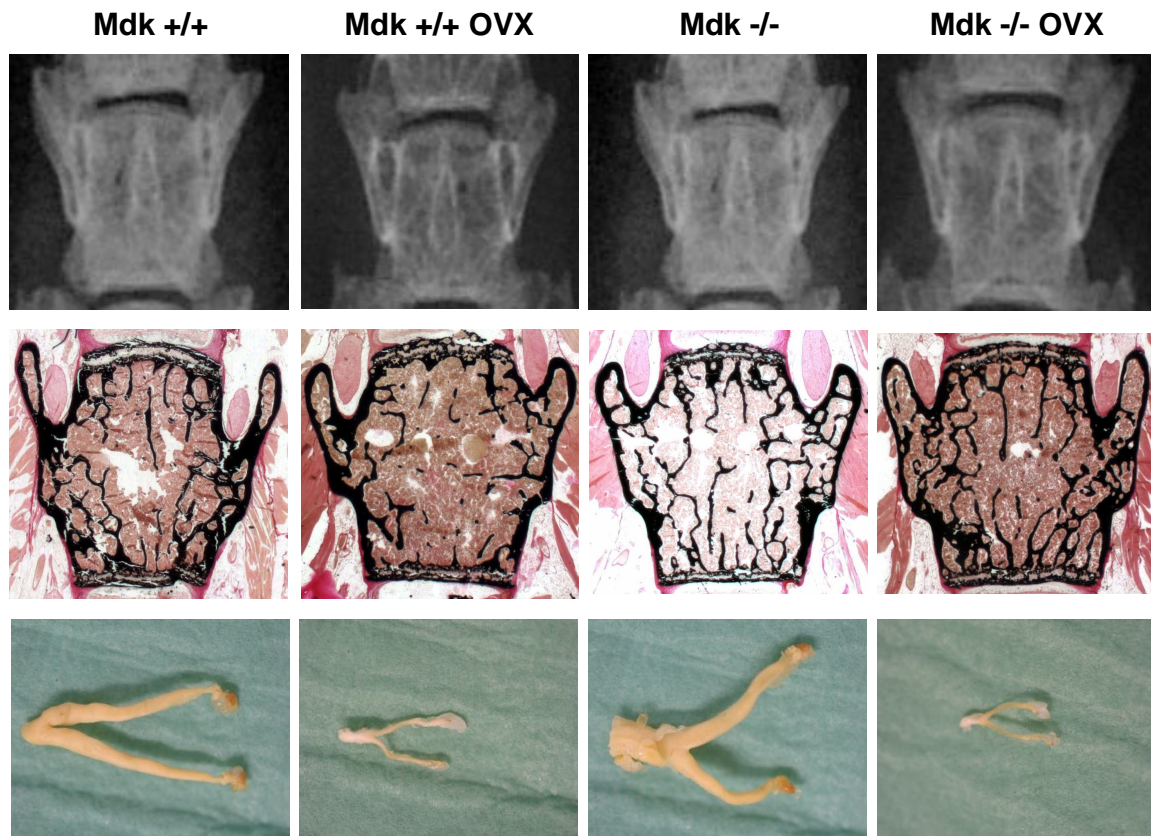
*Enpp1*-Expression mittels Real-Time-PCR ermittelt. Zusätzlich wurde die *Alpl*-Genexpression bestimmt, da die gewebeunabhängige Alkalische Phosphatase (*Alpl*) der natürliche „Gegenspieler“ von *Ank* und *Enpp1* ist. Die Expression des *Ank*-Gens sank signifikant in *Mdk*-defizienten Osteoblasten aus dem Knochenmark ( $Mdk^{+/+}$ :  $1,04 \pm 0,35$  vs.  $Mdk^{-/-}$ :  $0,54 \pm 0,18$ ; Abb.6.20), wobei diese Veränderung bei der *Enpp1*-Genexpression nur tendenziell zu erkennen war. Die *Alpl*-Expression war hingegen in *Mdk*-defizienten Kulturen signifikant erhöht ( $Mdk^{+/+}$ :  $1,04 \pm 0,33$  vs.  $Mdk^{-/-}$ :  $3,70 \pm 0,63$ ; Abb.6.20). Da in den *Mdk*-defizienten Kulturen mehr Osteoblasten vorhanden sind, kann die Expression von *Ank* und *Enpp1* auf *Alpl* bezogen werden, wodurch die Expression auf die Anzahl der Osteoblasten normiert wird. Dies führt zu einer signifikanten Abnahme der Expression von *Ank* und *Enpp1* in *Mdk*-defizienten Kulturen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Weiterführend wurde an Tag 10 und Tag 20 der Differenzierung die Pyrophosphatkonzentration in den Überständen der Osteoblasten aus dem Knochenmark gemessen (Abb.6.20). Am Tag 10 der Differenzierung war die Pyrophosphatkonzentration in den Überständen der *Mdk*-defizienten Osteoblasten signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollen. Am Tag 20 der Osteoblastendifferenzierung war dieser Unterschied jedoch nicht mehr vorhanden.



**Abbildung 6.20: Analyse der Genexpression von *Ank*, *Enpp1* und *Alpl* in Osteoblasten und Bestimmung der Pyrophosphatkonzentration im Überstand von Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Osteoblastenkulturen.** RNA aus Wildtyp- ( $Mdk^{+/+}$ ) und *Mdk*-defizienten ( $Mdk^{-/-}$ ) Osteoblasten aus dem Knochenmark (KM) wurden am Tag 20 der Differenzierung in einer Real-Time-PCR eingesetzt, um die Genexpression von *Ank*, *Enpp1* und *Alpl* zu ermitteln. Die Expression des *Ank*-Gens in *Mdk*-defizienten Osteoblasten nimmt signifikant ab im Vergleich zu Wildtyposteoblasten, wohingegen die *Enpp1*-Expression unverändert ist. Ein signifikanter Anstieg der *Alpl*-Expression ist in den *Mdk*-defizienten Osteoblasten zu beobachten. Der Pyrophosphatgehalt wurde am Tag 10 und Tag 20 der Differenzierung im Überstand von Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Osteoblastenkulturen gemessen. Ein Anstieg der Pyrophosphatkonzentration konnte nur am Tag 10 im Überstand der *Mdk*-defizienten Osteoblasten nachgewiesen werden ( $n=3$ , t-Test: \* bedeutet  $p < 0,05$ ; \*\* bedeutet  $p < 0,005$ ).

### **6.16 *Mdk*-defiziente Mäuse sind vor Knochenmasseverlust geschützt, der durch eine Ovariectomie induziert wird**

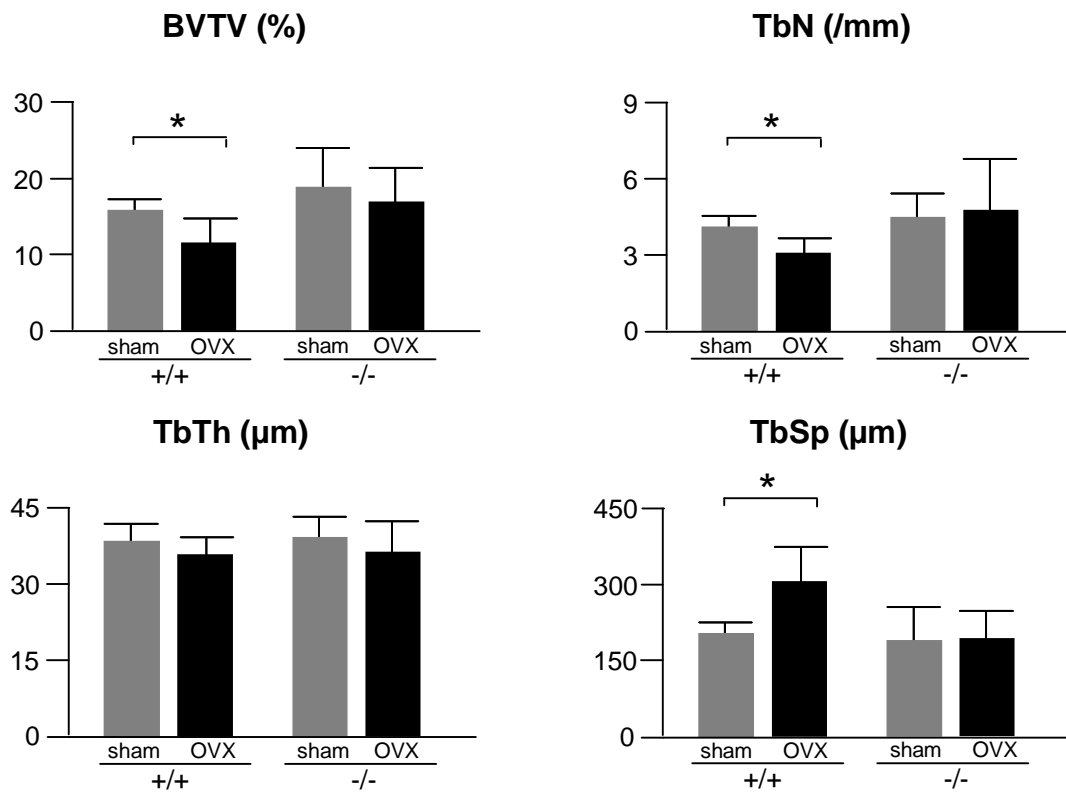
Da die Abwesenheit von *Mdk* in Mäusen zum Schutz vor einem Knochenmasseverlust führt, der durch das Alter induziert wird, liegt die Vermutung nahe, dass die Abwesenheit von *Mdk* auch vor einem Knochenmasseverlust schützt, der durch eine Ovariectomie induziert wird. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Wildtyp- und *Mdk*-defiziente Mäuse im Alter von 3 Monaten ovariectomiert. Hierdurch wurde eine chirurgisch bedingte Menopause eingeleitet, die zu einem Knochenmasseverlust führte. Drei Monate später wurde die Knochenstruktur der Mäuse untersucht, indem sie mit scheinoperierten Tieren (sham) derselben Gruppe verglichen wurden. In Abb.6.21 sind Kontaktradiographien und von Kossa/van Gieson-Färbungen von Wirbelkörpern der vier untersuchten Gruppen zu sehen. Auf den Kontaktradiographien ist deutlich zu erkennen, dass Wirbelkörper ovariectomierter Wildtypmäuse (*Mdk* +/+ OVX) eine deutlich geringere Röntgendichte aufwiesen, als ihre sham operierten Kontrollen (*Mdk* +/+). Bei der Kontaktradiographie der Wirbelkörper ovariectomierter *Mdk*-defizienter Mäuse (*Mdk* -/- OVX) war die Röntgendichte auch geringer als bei ihrer sham-operierten *Mdk*-defizienten Kontrollen (*Mdk* -/-). Allerdings war dieser Unterschied nicht so stark ausgeprägt wie bei den Wildtyptieren. In der von Kossa/van Gieson-Färbung war deutlich zu erkennen, dass die Trabekelanzahl in den ovariectomierten Wildtypmäusen im Vergleich zu den sham-operierten Kontrollen abnimmt. Dies war nicht der Fall bei den ovariectomierten *Mdk*-defizienten Mäusen. Die in Abb.6.21 gezeigten Ovarien der vier untersuchten Mausgruppen dienten dem Nachweis, dass die Ovariectomie erfolgreich war. Durch die Ovariectomie wurde der Östrogenspiegel der Mäuse drastisch gesenkt und die Menopause chirurgisch eingeleitet, wodurch die Ovarien verkümmerten und hypotrophierten im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren.



**Abbildung 6.21: Ovarektomie von Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäusen.** Im Alter von 3 Monaten wurden Wildtyp- und *Mdk*-defiziente Mäuse ovarektomiert und 3 Monate später analysiert. Verglichen wurden die ovarektomierten Wildtypmäuse (*Mdk* +/+ OVX) mit sham-operierten Wildtypkontrollen (*Mdk* +/+). Die ovarektomierten *Mdk*-defizienten Mäuse (*Mdk* -/- OVX) wurden mit sham-operierten *Mdk*-defizienten Mäusen (*Mdk* -/-) verglichen. In den Röntgenaufnahmen der Wirbelkörper ist eine Abnahme der Knochendichte in den ovarektomierten Wildtypkontrollen zu sehen, wohingegen die Knochendichte der ovarektomierten *Mdk*-defizienten Mäuse nicht so deutlich abnimmt. Dieselbe Beobachtung ist auch in den von Kossa/van Gieson-Färbungen der nicht dekalzifizierten Wirbelkörper zu sehen. Die Ovarien der vier untersuchten Mauspopulationen sind aufgeführt um zu zeigen, dass die Ovarektomie erfolgreich war, da die Ovarien der ovarektomierten Tiere deutlich hypotrophiert sind im Vergleich zu ihren Kontrollen. (n = 10)

Die Wirbelkörper der sham-operierten und ovarektomierten Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäuse wurden drei Monate nach der Operation histomorphometrisch vermessen und die strukturellen Knochenparameter quantifiziert. Hierbei zeigt sich, dass das trabekuläre Knochenvolumen der ovarektomierten Wildtypmäuse signifikant abnahm im Vergleich zu den sham-operierten Kontrollen (sham *Mdk*+/+:  $15,77 \pm 1,4$  vs. OVX *Mdk*-/-:  $11,31 \pm 3,29$ ). Dies ging einher mit einer signifikanten Verringerung der Trabekelanzahl und einer signifikanten Erhöhung des Abstandes der Trabekel (Abb.6.22). Die Trabekeldicke änderte sich hierdurch nicht. Die ovarektomierten *Mdk*-defizienten Mäuse verloren nicht signifikant an trabekulärem Knochenvolumen, auch wenn eine leichte Erniedrigung zu vermerken ist, im Vergleich zu den sham-

operierten *Mdk*-defizienten Mäusen (sham *Mdk*<sup>+/+</sup>: 18,73 ± 5,24 vs. OVX *Mdk*<sup>-/-</sup>: 17,16 ± 4,23; Abb.6.22).



**Abbildung 6.22: Histomorphometrische Auswertung der Ovariectomie.** BV/TV (*bone volume/tissue volume*): Knochenvolumen pro Gewebenvolumen; TbTh (*trabecular thickness*): Trabekeldicke; TbN (*trabecular number*): Anzahl der Trabekel; TbSp (*trabecular spacing*): Abstand der Trabekel. Die ovariectomierten Wildtypmäuse (OVX +/+) weisen ein signifikant verringertes trabekuläres Knochenvolumen im Vergleich zu ihren sham operierten Kontrollen (sham +/+) auf. Dies geht einher mit einer signifikant verringerten Trabekelanzahl und einem vergrößerten Trabekelabstand. Die Trabekeldicke bleibt hierbei jedoch unverändert. Die ovariectomierten *Mdk*-defizienten Mäuse (OVX -/-) weisen keinen signifikanten Unterschied im trabekulären Knochenvolumen, der Trabekelanzahl, der Trabekeldicke und dem Abstand der Trabekel auf im Vergleich zu ihren sham operierten Kontrolltieren (sham -/-). (n = 10 Tiere pro Gruppe; t-Test: \* bedeutet p < 0,05)

## 7. Diskussion

### 7.1 Einfluss von Midkine auf den Knochenstoffwechsel

Midkine (Mdk) wurde 1993 in malignen embryonalen Keimzelltumoren entdeckt, als Produkt eines Gens, welches durch Retinolsäure induziert wird (Muramatsu, 2002). Weitere Untersuchungen ergaben, dass *Mdk* am stärksten während der Embryonalentwicklung exprimiert wird (Muramatsu, 1993; Mitsiadis et al., 1995). Hierbei sank die *Mdk*-Expression jedoch ab dem 11. Tag der Embryonalentwicklung stark ab und war bei adulten Mäusen nur noch in der Niere und den Gonaden nachweisbar (Muramatsu, 1993). Die Charakterisierung eines *Mdk*-defizienten Mausmodells ergab, dass die Abwesenheit von *Mdk* in der Maus makroskopisch, wie mikroskopisch in Gehirn, Lunge, Herzen, Magen, Niere und in den Reproduktionsorganen zu keinen großen Anomalitäten führt (Nakamura et al., 1998). Die einzige Veränderung in den bisher analysierten *Mdk*-defizienten Mäusen wurde im Verhalten aufgezeigt. Hier wiesen sie ein erhöhtes Angstpotential und ein vermindertes Erinnerungsvermögen auf (Nakamura et al., 1998). Allerdings wurde das *Mdk*-Defizienzmodell nicht in Bezug auf knochenphysiologische Aspekte untersucht.

Es wurde jedoch ein transgenes Mausmodell analysiert, bei dem *Ptn* überexprimiert wurde. Da *Ptn* und *Mdk* eine eigenständige Gruppe von Wachstumsfaktoren bilden, von denen angenommen wird, dass sie einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel haben, war dieses Mausmodell von großem Interesse. Im frühen Stadium der Knochenentwicklung führte die Überexpression von *Ptn* in der Maus zu einem gesteigerten Knochenwachstum (Tare et al., 2002; Li et al., 2004). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Knochen im Alter porös und brüchig wurden und die Knochenheilung verzögert stattfand (Li et al., 2004). Diese Ergebnisse befürworteten die Theorie, dass *Ptn* einen Einfluss auf den Knochenmetabolismus hat und dass *Ptn* einen positiven Effekt auf die Regulierung der Osteoblastenrekutierung, -proliferation und -differenzierung besitzt (Imai et al., 1998; Li et al., 2004). Daraufhin wurde in unserem Labor ein *Ptn*-defizientes Mausmodell untersucht. In diesen Mäusen konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt eine Veränderung auf die Knochenbildung oder Mineralisation beobachtet werden (Lehmann et al., 2004). Weder Größe, noch Gewicht der Mäuse, Organisation der Wachstumsfugen oder die Knochenmasse waren in den *Ptn*-defizienten Mäusen verändert. Auch die

Morphologie und Anzahl der Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten war unverändert im Vergleich zu Wildtypkontrollen (Lehmann et al., 2004).

Eine mögliche Erklärung für den fehlenden Phänotyp *Ptn*-defizienter Mäuse, könnten die Ergebnisse einer Affymetrix-Genchipanalyse darstellen. Hierbei wurde die Genexpression während der Osteoblastendifferenzierung am Tag 5 und Tag 25 der Differenzierung miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass die *Mdk*-Genexpression während der Differenzierung von Wildtyp-Osteoblasten anstieg, die Expression des *Ptn* hingegen kaum detektierbar war (Lehmann et al., 2004). Dies könnte einerseits erklären, warum die Defizienz von *Ptn* keinen Knochenphänotyp bewirkt. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass der Phänotyp der *Ptn*-transgenen Mäuse einen physiologischen Effekt von *Mdk* widerspiegelt. Um dieser Ursache auf den Grund zu gehen, entschieden wir uns, ein *Mdk*-defizientes Mausmodell zu analysieren.

Zu Beginn unserer Analyse untersuchten wir in welchen Geweben *Mdk* exprimiert wird. Hierbei zeigte sich, dass *Mdk* in verschiedenen Geweben, wie Femur, Calvaria, Leber, Niere und Gehirn von adulten Mäusen exprimiert wird (Daten werden nicht gezeigt). Weiterhin bestätigten immunhistologische Untersuchungen an humanen Knochenpräparaten, dass *Mdk* sowohl in humanen Osteoblasten, Osteozyten, wie auch in Osteoklasten exprimiert wird. Bei der anschließenden Analyse der *Mdk*-defizienten Mäuse fiel auf, dass sie im Alter von 4 und 6 Monaten 10 – 20% kleiner und leichter waren, als ihre Wildtypkontrollen. Dieser Unterschied verschwand jedoch mit zunehmendem Alter. Da histologische Untersuchungen nicht-dekalzifizierter Wirbelkörper *Mdk*-defizienter Mäuse im Alter von 4 Monaten noch keinen Unterschied im Vergleich zu ihren Wildtypkontrollen aufwiesen, scheint die Körpergröße und das Gewicht nicht mit dem Knochenstoffwechsel in Verbindung zu stehen, weshalb dies nicht fortführend untersucht wurde. Ab einem Alter von 12 Monaten wiesen die *Mdk*-defizienten Mäuse ein erhöhtes trabekuläres Knochenvolumen auf, welches mit einer sichtbaren Änderung der Trabekelstruktur einherging. Hierbei nahmen sowohl die Trabekelanzahl, wie auch das Knochenvolumen signifikant zu.

Der Befund des Knochenphänotyps *Mdk*-defizienter Mäuse war überraschend, da vor der Analyse vermutet wurde, dass sie einen osteopenen Phänotyp aufweisen würden. Diese Vermutung begründete sich auf der Analyse von transgenen Mäusen, die *Ptn* überexprimieren, was zu einem gesteigerten Knochenwachstum führte (Tare

et al., 2002; Li et al., 2004). Im Umkehrschluss konnte also angenommen werden, dass in der Abwesenheit von Ptn, bzw. Mdk ein verringertes Knochenwachstum stattfindet. Da jedoch der Knochenphänotyp *Mdk*-defizienter Mäuse erst mit dem Alter auftritt und *Ptn*-defiziente Mäuse zu keinem Alterszeitpunkt einen Knochenphänotyp aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass Mdk und Ptn in adulten Mäusen verschiedene Funktionen im Knochenstoffwechsel besitzen, bzw. dass nur Mdk in adulten Mäusen eine Rolle im Knochenstoffwechsel spielt.

## 7.2 Einfluss von Midkine auf Osteoblasten

Der analysierte Knochenphänotyp *Mdk*-defizienter Mäuse, der sich im Alter 12 und 18 Monate in einem signifikant erhöhtem trabekulären Knochenvolumen manifestiert, ist zurückzuführen auf eine verdoppelte Knochenformationsrate. Dieses geht einher mit einer erhöhten Osteoblastenanzahl und Osteoblastenoberfläche. In Zellkulturversuchen konnte dies bestätigt werden, da sowohl die Mineralisation der Osteoblasten, als auch die Aktivität der Alkalischen Phosphatase in den *Mdk*-defizienten Kulturen im Vergleich zu Wildtypkontrollen erhöht war. Mdk scheint demnach ein potenter Inhibitor der Knochenformation zu sein, der seine Wirkung über den Osteoblasten vermittelt. Hierdurch führt die Abwesenheit von Mdk zu einem Schutz vor einem altersinduzierten Knochenmasseverlust.

Andere Arbeitsgruppen beobachteten, dass Mdk wichtig für die Migration von Osteoblasten ist (Qi et al., 2001; Muramatsu, 2002) und die direkte Umwandlung von mesenchymalen Zellen in Präosteoblasten mit der Expression sowohl von Mdk als auch von Ptn korreliert (Mitsiadis et al., 1995). Auch in der ersten Phase der enchondralen Knochenformation korreliert die Expression von Mdk mit den Orten, an denen mesenchymale Zellen kondensieren und sich zu Knorpelgewebe transformieren (Qi et al., 2001). Die von uns analysierten *Mdk*-defizienten Mäuse wiesen jedoch keinerlei Störung in der Osteoblastenmigration oder im Aufbau und der Funktion des Knorpelgewebes auf, so dass wir die Beobachtungen der anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigen konnten. Allerdings konnten wir zeigen, dass Mdk in Osteoblasten sowohl die Wnt-abhängige Signaltransduktion, als auch die Expression spezifischer Gene reguliert, was später in Kapitel 7.4 und 7.5 besprochen wird.



### 7.3 Einfluss von Mdk auf Osteoklasten

Die Abwesenheit von Mdk in der Maus besitzt jedoch nicht nur Auswirkungen auf Osteoblasten, sondern auch auf Osteoklasten. Hierdurch war in 12 und 18 Monate alten *Mdk*-defizienten Mäusen die Anzahl der trabekulären Osteoklasten signifikant erniedrigt. Überraschenderweise war jedoch, trotz der erniedrigten Anzahl der trabekulären Osteoklasten, die Aktivität der osteoklastenspezifischen Tartrat-resistenten aziden Phosphatase (TRAP) und die Menge der Kollagenabbauprodukte im Serum (X-Laps) erhöht. Diese beiden Parameter signalisieren einen verstärkten Knochenabbau durch eine erhöhte Osteoklastenaktivität. Zusammen mit der erhöhten Knochenformationsrate in *Mdk*-defizienten Mäusen weist dieses auf ein erhöhtes Knochenremodeling (*High bone turnover*) hin. Genauere Untersuchungen der Röhrenknochen zeigten weiterhin, dass es ab einem Alter von 12 Monaten in *Mdk*-defizienten Mäusen zu hyperostotischen Läsionen der Kortikalis kam, wobei die Anzahl der Läsionen mit dem Alter anstieg. In den hyperostotischen Läsionen war die Anzahl der Osteoklasten signifikant erhöht. Da sowohl die Aktivität der TRAP, wie auch die Menge der Kollagenabbauprodukte im Serum analysiert wurden, könnte die lokale Erhöhung der Osteoklastenzahl und -aktivität in den hyperostotischen Läsionen eine Erklärung für die erhöhten Serumparameter TRAP und X-Laps sein. Durch das Auftreten hyperostotischer Läsion kann wahrscheinlich auch die geringere kortikale Dicke der Femora der *Mdk*-defizienten Mäuse erklärt werden.

Auch die Auswertung von Osteoklastenkulturen zeigte, dass die Anzahl TRAP-positiver, mehrkerniger Osteoklasten in Abwesenheit von Mdk erhöht war, auch wenn dieses nicht die Resorptionsaktivität der Osteoklasten steigerte. Eine Erklärung hierfür könnte der Isolationsort der Osteoklastenvorläuferzellen sein, die aus dem Knochenmark der Röhrenknochen gewonnen wurden. Denn die erhöhte Osteoklastenzahl in den lokal auftretenden osteolytischen Läsionen in den Röhrenknochen älterer Mäuse, könnte theoretisch in jüngeren Mäusen schon zu einer erhöhten Anzahl von Osteoklastenvorläuferzellen im Knochenmark führen. Die Analyse weiterer Knochenstoffwechselfparameter zeigte keinerlei Veränderung zwischen Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäusen. So war die Konzentration von Rankl, welches von Osteoblasten sezerniert und die Bildung und Differenzierung von Osteoklasten fördert, wie auch die Konzentration von Opg, dem Gegenspieler des Rankl, im Serum *Mdk*-defizienter Mäuse unverändert. Auch die beiden wichtigen

Regulatoren der Kalziumhomöostase, Parathormon und Calcitonin, waren in ihrer Konzentration im Serum unverändert.

Eine Erklärung für die Verringerung der Osteoklastenzahl in den Wirbelkörpern *Mdk*-defizienter Mäuse stimmt im Umkehrschluss mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen überein, die gezeigt haben, dass Mdk die Differenzierung von Osteoklasten aus Makrophagen fördert (Maruyama et al., 2004). Dieser Einfluss von Mdk auf die Osteoklastogenese zeigte sich ebenfalls in einem Arthritis-Modell der Maus (Maruyama et al., 2004). Hierbei wurde die Arthritis durch eine Injektion von Anti-Typ II Kollagen, gefolgt von Lipopolysacchariden, ausgelöst. Wildtypmäuse entwickelten hierbei nach 7 Tagen eine Arthritis. Dies war in *Mdk*-defizienten Mäusen nicht der Fall. Sie entwickelten zu keinem Zeitpunkt des Versuchs eine Arthritis. Der Grund hierfür wurde zum einen auf die geringere Anzahl an Makrophagen in den *Mdk*-defizienten Mäusen zurückgeführt und auf eine Unterdrückung der Migration inflammatorischer Leukozyten (Maruyama et al., 2004).

#### **7.4 Inhibition des Wnt-Signalwegs durch Mdk**

Der kanonische Wnt-Signalweg ist einer der wichtigsten Signaltransduktionswege in der Knochenentwicklung und Knochenhomöostase und spielt eine wichtige Rolle in der Osteoblastendifferenzierung und -proliferation (Krishnan et al., 2006; Yavropoulou & Yovos., 2007; Piters et al., 2008). So wurde unter anderem gezeigt, dass  $\beta$ -Catenin in mesenchymalen Stammzellen, den Vorläuferzellen der Osteoblasten, ein essentieller molekularer Schalter für die osteogene Differenzierung ist (Day et al., 2005; Hill et al., 2005). Bei einer Inaktivierung des  $\beta$ -Catenin differenzieren hierbei die mesenchymalen Stammzellen zu Chondrozyten. Ist  $\beta$ -Catenin jedoch aktiv, so differenzieren die mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten (Day et al., 2005). Im Wnt-Signalweg ist die Dephosphorylierung, also die Aktivierung des  $\beta$ -Catenin, und der damit verbundene Schutz des  $\beta$ -Catenin nicht durch das Proteasom abgebaut zu werden, einer der wichtigsten Schritte. Hierdurch kann  $\beta$ -Catenin in der Zelle akkumuliert und in den Zellkern transportiert werden, wo es an den Transkriptionsfaktor TCF/LEF bindet und spezifisch die Expression von Wnt-Zielgenen reguliert (Yavropoulou & Yovos., 2007; Piters et al., 2008).

In Transfektionsversuchen mit Osteoblasten-ähnlichen MC3T3-E1-Zellen wurde der Einfluss von Mdk und dessen potentiellen Rezeptor Ptpz1 auf den Wnt-Signalweg untersucht. Durch eine Transfektion des Wnt3a-Plasmids wurde eine gesteigerte

Signalintensität herbeigeführt. Eine Co-Transfektion zum Wnt3a von Mdk, alleine oder zusammen mit Ptpz1, führte zu einer Hemmung des Wnt-Signalweges. Diese Hemmung war alleinig durch Mdk schon signifikant. Eine kombinierte Transfektion von Mdk und Ptpz1 führte jedoch zu einer kompletten Hemmung des Wnt-Signalweges. Da zuvor beschrieben worden war, dass eine Antagonisierung von Ptpz1 durch Ptn zu einer erhöhten Tyrosinphosphorylierung des  $\beta$ -Catenin führt (Meng et al, 1999, Lilien & Balsamo, 2005), wurde zudem untersucht, ob Mdk einen ähnlichen Effekt ausübt, was jedoch nicht der Fall war (Daten werden nicht gezeigt). Daher ist davon auszugehen, dass die Bindung von Mdk an Ptpz1 auf eine andere Art und Weise den Wnt-Signalweg reguliert, als es bei der Bindung von Ptn an Ptpz1 der Fall ist.

Um dies weiter zu erforschen, wurden Zellkulturversuche mit primären Osteoblasten aus den Calvarien von Mäusen durchgeführt, und hierbei konnte die Hemmung des Wnt-Signalweges durch Mdk und Ptpz1 in Wildtyp- und *Ptpz1*-defizienten primären Osteoblasten bestätigt werden. In diesem Versuch wurde die Konzentration an phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin in den Zellen analysiert. Eine rekombinante Zugabe von Wnt3a zu den primären Osteoblasten, und die daraus entstehende Aktivierung des Wnt-Signalweges, führten hierbei zu einer Abnahme der Phosphorylierung des  $\beta$ -Catenin. Eine Kombination aus rekombinatem Wnt3a und Mdk steigerte die Phosphorylierung des  $\beta$ -Catenin, wodurch das  $\beta$ -Catenin zum Abbau durch das Proteasom freigegeben wurde. In *Ptpz1*-defizienten Zellen löste die Kombination von rekombinatem Wnt3a und Mdk keine Erhöhung des Phosphorylierungsgrades des  $\beta$ -Catenin aus. Dies ist dadurch zu erklären, dass in den Wildtypzellen Ptpz1 als Rezeptor für Mdk zur Verfügung stand, was in den *Ptpz1*-defizienten Zellen nicht der Fall war.

Ob Ptpz1 allerdings als potentieller Rezeptor für Mdk den Phänotyp *Mdk*-defizienter Mäuse erklären kann, ist fraglich. Denn *Ptpz1*-defiziente Mäuse weisen im Alter von 12 Monaten ein erniedrigtes trabekuläres Knochenvolumen auf, bedingt durch eine Reduktion der Knochenformation (Schinke et al., 2007). Dies ist der konträre Phänotyp zu den *Mdk*-defizienten Mäusen, die ein erhöhtes trabekuläres Knochenvolumen im Alter von 12 Monaten aufweisen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte folgende These sein: Mdk bindet an Ptpz1 und inhibiert dadurch den Wnt-Signalweg. In der Abwesenheit von Mdk liegt Ptpz1 ungebunden vor und ist dadurch aktiv. Der Wnt-Signalweg ist somit angeschaltet, was zu einer erhöhten

Aktivität und Anzahl der Osteoblasten führt, wodurch es zu einem erhöhten trabekulären Knochenvolumen kommt. Dies ist auch in den *Mdk*-defizienten Mäusen zu beobachten. *Ptprz1*-defiziente Mäuse zeigen ein erniedrigtes trabekuläres Knochenvolumen, was auf einer Reduktion der Knochenformationsrate zurückzuführen ist. Denn in Abwesenheit von *Ptprz1* könnte die Aktivität der Osteoblasten, wie auch die Aktivität des Wnt-Signalwegs, herunter reguliert sein, wenn davon ausgegangen wird, dass *Ptprz1* essentiell im Wnt-Signalweg eingebunden ist. Um diese Hypothese *in vivo* zu bestätigen, wurde bereits damit begonnen Mäuse zu generieren, denen sowohl *Mdk*, als auch *Ptprz1* fehlt und die im Alter von 6 und 12 Monaten histologisch und histomorphometrisch analysiert werden sollen.

### **7.5 Einfluss von Midkine auf die Genexpression in Osteoblasten**

Um zu ermitteln, welche Gene im Osteoblasten durch *Mdk* induziert werden, wurde eine Affymetrix-Genchiphybridisierung durchgeführt. Diese ergab, dass die Gene *Dmp1*, *Ank* und *Enpp1* durch eine 6-stündige Inkubation mit rekombinanten humanen *Mdk* induziert werden. Diese Gene stehen in engem Zusammenhang mit der Mineralisation des Knochens. Das *Dmp1*-Gen kodiert das multifunktionale Dentin matrix protein 1, welches unter anderem die Zelladhäsion und Zelldifferenzierung reguliert (Ling et al., 2005) und hauptsächlich in Zellen von mineralisierenden Geweben, wie Osteoblasten, Osteozyten und hypertrophen Chondrozyten gebildet (Feng et al., 2003; Ye et al., 2004) wird. *In vitro* agiert *Dmp1* als Nukleator für die Bindung von Hydroxylapatitkristallen an Kollagen Typ 1 (Ling et al., 2005). Eine wichtige Funktion hat *Dmp1* im postnatalen Wachstum. Wenige Tage bis Wochen nach der Geburt führt die Abwesenheit von *Dmp1* in der Maus zu einem Chondrodysplasie-ähnlichem Phänotyp, bei der eine Verkürzung der Röhrenknochen vorliegt, was zu einem Zwergenwachstum führt. Zudem ist auch die Knorpelbildung gestört und die Wachstumsfuge ist verbreitert und unorganisiert (Ye et al., 2005). Im Alter von 16 Wochen weisen *Dmp1*-defiziente Mäuse einen Mineralisationsdefekt auf, der sich in einer Osteomalazie äußert (Feng et al., 2006). Dieser Phänotyp geht einher mit kleineren und disorganisierten Trabekeln und einer kortikalen Porosität. Außerdem sind im Serum die Kalzium- und Phosphatkonzentrationen in diesen Mäusen signifikant geringer als in Wildtypkontrollen (Ling et al., 2005).

Da die Affymetrix-Genchiphybridisierung zeigte, dass die *Dmp1*-Genexpression in Osteoblasten, durch eine Inkubation mit rekombinantem Mdk, erhöht wird, vermuteten wir, dass durch die Abwesenheit von Mdk, die Genexpression des *Dmp1* in den *Mdk*-defizienten Mäusen herunter reguliert wird und sie einen milderen, aber ähnlichen Phänotyp wie *Dmp1*-defiziente Tiere haben könnten. In den *Mdk*-defizienten Mäusen war jedoch weder eine Osteomalazie zu diagnostizieren, noch waren die Kalziumkonzentrationen im Serum erniedrigt. Nur das Auftreten von kortikalen Läsionen in *Mdk*-defizienten Mäusen, ab einem Alter von 12 Monaten, stimmte mit dem Phänotyp *Dmp1*-defizienter Mäuse überein. Die Phosphatkonzentration im Serum *Mdk*-defizienter Mäuse war, gegensätzlich zum *Dmp1*-Defizienzmodell, sogar signifikant erhöht, so dass wir keine Bestätigung des Arrays auf diesem Wege aufzeigen konnten und es somit spekulativ bleibt, ob Mdk einen regulatorischen Effekt auf *Dmp1* und dessen Funktionen ausübt.

Die Gene *Ank* und *Enpp1* kodieren Proteine, die verhindern, dass sich Hydroxylapatitkristalle in den Gelenken ablagern und somit z.B. eine Arthritis auslösen (Pendleton et al., 2002; Netter et al., 2004; Gurley et al., 2006; Ho et al., 2008). Hierbei kodiert *Ank* das Protein der Progressiven Ankylose. Es ist ein Transmembranprotein, welches die äußere Zellmembran durchspannt und anorganisches Pyrophosphat (PPi) aus dem Zellinneren in den Extrazellularraum transportiert (Ho et al., 2000; Nürnberg et al., 2001; Gurley et al., 2006; Kirsch et al., 2008). Das *Enpp1* kodiert das Protein Ektonukleotid-Pyrophosphatase 1. Es dient als physiologischer Inhibitor der Mineralisation, indem es aus der Dephosphorylierung von ATP extrazelluläres anorganisches Pyrophosphat (PPi) herstellt (Johnson et al., 2003; Zhang et al., 2007). Anorganisches Pyrophosphat ist ein potenter Inhibitor der Mineralisation des Knochens, indem es die Formation und das Wachstum von Hydroxylapatitkristallen inhibiert (Nürnberg et al., 2001; Hesse et al., 2002). Verschiedene Mutationen im *Ank* und *Enpp1* führen zu ernsthaften Erkrankungen des Knochens und der Gelenke. Hierzu gehören sowohl die Chondrokalzinose, die kraniometaphysäre Dysplasie, sowie ektopische Ossifikationen der Wirbelsäulenligamente. Die Chondrokalzinose wird durch eine Mutation im *Ank*-Gen ausgelöst, wodurch sich kalziumhaltige Kristalle in den Gelenken ablagern und starke Gliederschmerzen sowie eine Arthritis auslösen (Pendleton et al., 2002; Netter et al., 2004; Gurley et al., 2006; Ho et al., 2008). Auch die kraniometaphysäre Dysplasie wird durch eine *Ank*-Mutation ausgelöst und ist charakterisiert durch ein zu

starkes Wachstum und einer Verknöcherung der Schädelknochen, welches einhergeht mit einer Osteopenie der Röhrenknochen (Kirsch et al., 2008). Dies führt zu einer Kompression von Hirnnerven und evtl. zum Verlust des Gehörs (Nürnberg et al., 2001; Gurley et al., 2006, Kirsch et al., 2008). Eine Mutation im humanen *Enpp1*-Gen führt zu einer ektopischen Ossifikation der Wirbelsäulenligamente. Hierdurch wird der Rückenmarkskanal verengt, wodurch es zu einer Kompression des Rückenmarks kommen kann (Okawa et al., 1998). Die Charakterisierung der *ttw* (tiptoe-walking)- Mäuse, bei der eine inaktivierende Mutation im *Enpp1*-Gen vorliegt, ergab, dass diese Mäuse sowohl eine Reduktion des trabekulären Knochenvolumens, als auch eine erhöhte kortikale Knochenformation in den Wirbelkörpern besitzen (Kobayashi et al., 1998; Okawa et al., 1999).

Die Regulation der Mineralisation wird jedoch nicht nur durch die beiden Gene *Ank* und *Enpp1* reguliert, sondern auch vom *Alpl*-Gen (*Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney*; gewebeunabhängige Alkalische Phosphatase). Eine Mutation im *Alpl*-Gen führt zu einer Hypophosphatasie. Diese ist charakterisiert durch gering mineralisierten Knochen (Osteomalazie), spontane Frakturen und erhöhten extrazellulären Konzentrationen anorganischen Pyrophosphats (Hessle et al., 2002). *Alpl* generiert freies Phosphat, indem es Pyrophosphat hydrolysiert, welches wiederum benötigt wird, um Hydroxylapatitkristalle zu bilden. *Ank* und *Enpp1* hingegen, produzieren Pyrophosphat oder schleusen Pyrophosphat in den Extrazellularraum, wodurch die Mineralisation des Knochens gehemmt wird (Hessle et al., 2002; Johnson et al., 2003; Harmey et al., 2004). So entsteht ein empfindliches Gleichgewicht, welches die Mineralisation des Knochens reguliert.

Da die Genexpression von *Ank* und *Enpp1* in der Affymetrix-Genchiphybridisierung durch eine Inkubation der Zellen mit rekombinanten *Mdk* hochreguliert wurde, stellt sich die Frage, ob *Mdk* ein Regulator dieser beiden Gene ist. In Osteoblastenkulturen aus dem Knochenmark zeigte sich, dass die *Ank*-Expression in *Mdk*-defizienten Osteoblasten signifikant und die *Enpp1*-Expression tendenziell erniedrigt ist. Dies geht einher mit einer signifikanten Erhöhung der *Alpl*-Expression. Da hierdurch das Gleichgewicht zu Gunsten der *Alpl*-Expression verschoben wurde, erwarteten wir, in den Osteoblastenüberständen eine verringerte Pyrophosphatkonzentration vorzufinden, aufgrund der erniedrigten *Ank*- und *Enpp1*-Genexpression. Allerdings war die Pyrophosphatkonzentration am Tag 10 signifikant erhöht und am Tag 20 der Differenzierung unverändert.

Zusammenfassend wird jedoch deutlich, dass die Genexpression und das Gleichgewicht von *Ank* und *Enpp1* zu *Alpl* in der Abwesenheit von Mdk Veränderungen unterliegt. Allerdings kann nicht abschließend geklärt werden, ob der Einfluss von Mdk auf die Expression der Gene *Ank*, *Enpp1* und *Alpl* eine mögliche molekulare Erklärung für den Knochenphänotyp *Mdk*-defizienter Mäuse liefern könnte.

Um diese Fragestellung weiterführend zu untersuchen, wurde damit begonnen, *Alpl*-defiziente Mäuse mit *Mdk*-defizienten Mäusen zu verpaaren um ein Doppeldefizienzmodell zu generieren und zu analysieren. Da zuvor gezeigt werden konnte, dass eine Kreuzung von *Alpl*-defizienten Mäusen mit *Ank*- oder *Enpp1*-defizienten Mäusen, den durch die *Alpl*-Defizienz verursachten Mineralisationsdefekt korrigiert (Harmey et al., 2004), stellt sich die Frage, ob dies auch durch die Deletion von Mdk erreicht werden kann.

#### **7.6 Die *Mdk*-Defizienz schützt vor einem Ovariectomie-induzierten Knochenmasseverlust**

Da eine *Mdk*-Defizienz ab einem Alter von 12 Monaten in Mäusen zu einem Knochenphänotyp mit einer erhöhten trabekulären Knochenmasse und einer verdoppelten Knochenformationsrate führt, sind diese Mäuse, im Gegensatz zu Wildtypkontrollen, vor einem Knochenmasseverlust geschützt, der durch das Alter induziert wird. Hierdurch stellt sich die Frage, ob die Antagonisierung von Mdk ein Ansatzpunkt für eine osteoanabole Therapie sein könnte. Ein Alter von 12 Monaten entspricht bei der Maus ungefähr einem menschlichen Alter von 50 Jahren. Zu diesem Zeitpunkt setzt bei vielen Frauen das Klimakterium ein, wobei die Östrogenproduktion in den Ovarien eingestellt wird. Als Folge dessen nimmt die Knochendichte ab und das Risiko an einer Osteoporose zu erkranken steigt an. Durch eine Ovariectomie in drei Monate alten Mäusen, wodurch chirurgisch eine Menopause herbeigeführt wurde, konnte auch in jungen Mäusen, in der Abwesenheit von Mdk, ein Schutz vor einem Ovariectomie-induzierten Knochenmasseverlust herbeigeführt werden. Hierbei besaßen ovariectomierte *Mdk*-defiziente Mäuse dasselbe Knochenvolumen wie sham-operierte *Mdk*-defiziente Mäuse. Dieses war nicht der Fall bei Wildtyptieren, die analog zu den *Mdk*-defizienten Mäusen ovariectomiert und drei Monate später analysiert wurden. Die ovariectomierten

Wildtypmäuse verloren signifikant an Knochenmasse im Vergleich zu sham-operierten Wildtypkontrollen.

Es ist bekannt, dass durch den Verlust des Östrogens im Körper das Gleichgewicht zwischen Knochenformation- und -resorption gestört wird. Eine Ursache hierfür kann unter anderem die gesteigerte Lebensdauer der Osteoklasten sein, wobei sich gleichzeitig die Lebensdauer der Osteoblasten verkürzt (Manolagas et al., 2002). Weiterhin wurde gezeigt, dass es durch einen Verlust des Östrogens zu einer gesteigerten Anzahl apoptotischer Osteozyten kommt (Tomkinson et al., 1998). Die Erhöhung der Anzahl apoptotischer Osteozyten kann, durch Beeinträchtigung des Osteozytennetzwerkes weiterhin das Skelett schwächen. Hierbei könnte das Signal, welches Mikrofrakturen in den Canaliculi auslöst, nicht mehr richtig vermittelt werden, wodurch es zu einer verzögerten oder gar fehlenden Frakturheilung kommen kann, eine Instabilität entsteht und Knochenmassen verloren geht (Manolagas et al., 2002). Da in den 12 und 18 Monate alten Wildtyp- und *Mdk*-defizienten Mäusen die Östrogenkonzentration im Serum unverändert waren, scheint der Schutz vor dem Knochenabbau, der durch eine Ovariectomie induziert wird, nicht mit den Östrogenspiegeln assoziiert zu sein. Daher könnte der Schutz vorm Knochenmasseverlust mit den Osteozyten assoziiert sein, die bisher nicht weitergehend analysiert wurden.

### **7.7. Ausblick**

Die histologische Analyse des Knochenphänotyps *Mdk*-defizienter Mäuse in drei verschiedenen Altersstufen wurde in der vorliegenden Arbeit erfolgreich abgeschlossen und ergab, dass der Wachstumsfaktor *Mdk*, zumindest in der Maus, ein negativer Regulator der Knochenformation ist. Die Funktion des *Mdk* scheint hierbei erst in adulten Mäusen, ab einem Alter von 12 Monaten, eine Rolle zu spielen, wo die Abwesenheit von *Mdk* zu einem Schutz vor einem altersinduzierten Knochenmasseverlust führt. Die Herstellung eines *Mdk*-Antagonisten als potentiell osteoanaboles Medikament wäre daher viel versprechend. Um allerdings einen *Mdk*-Antagonisten herstellen zu können, müsste vorher weiter untersucht werden, wie *Mdk* genau auf den Knochen wirkt und welche Rezeptoren und Signaltransduktionswege hierbei eine Rolle spielen. Ein potenzieller Rezeptor zur Übermittlung des *Mdk*-Signals könnte *Ptprz1* sein. Wie jedoch der genaue Wirkungsmechanismus ist, muss weiterführend untersucht werden, da es außer



Ptprz1 noch andere potentielle Rezeptoren für Mdk gibt. Hierzu zählen sowohl die Syndecane, ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) oder LRP6 (Low density lipoprotein receptor –related protein 6) (Kojima et al, 1996 Muramatsu et al., 2000). Weiterhin könnte Mdk eine wichtige Funktion während der Tumorentwicklung haben. Mdk wird unter anderem in Osteosarkomen überexprimiert, und eine hohe *Mdk*-Expression in Osteosarkomen ist mit einer schlechten Heilungschance assoziiert (Maehara et al., 2007). Um die Rolle von Mdk bei der Entstehung von Osteosarkomen zu untersuchen, wurde bereits damit begonnen, *Mdk*-defiziente Mäuse mit *Trp53*-defizienten Mäusen zu verpaaren, denen der Tumor-Suppressor p53 fehlt. Da die *Trp53*-defizienten Mäuse spontan Osteosarkome entwickeln, soll untersucht werden, ob die gleichzeitige Deletion von Mdk die Tumorentstehung und/oder Tumorentwicklung beeinflusst.

## 8. Zusammenfassung

Pleiotrophin (Ptn) und Midkine (Mdk) bilden eine eigenständige Familie Heparin-bindender Wachstumsfaktoren und beeinflussen Proliferation, Lebensdauer und Migration neuronaler Zellen. Die physiologischen Funktionen beider Moleküle sind noch nicht vollständig aufgeklärt, da in den betreffenden Maus-Defizienz-Modellen keine auffälligen Phänotypen nachgewiesen werden konnten. Zuvor führte die Überexpression von *Ptn* in transgenen Mäusen zu einer erhöhten Knochendichte. Allerdings wiesen *Ptn*-defiziente Mäuse keine Veränderung der Knochenbildung und Mineralisation auf. In der Abwesenheit von Ptn war weder die Größe, noch das Gewicht der Mäuse, die Organisation der Wachstumsfugen oder die Knochenmasse verändert. Daher wurde in dieser Dissertation das *Mdk*-defiziente Mausmodell histologisch und histomorphometrisch untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die *Mdk*-defizienten Mäuse im Alter von 12 und 18 Monaten eine erhöhte Knochendichte aufweisen. Durch dynamische Histomorphometrie konnte dieser Phänotyp auf eine Verdopplung der Knochenformationsrate zurückgeführt werden, wodurch eine physiologische Funktion von Mdk als negativer Regulator der Osteoblastenfunktion etabliert werden konnte. Hierbei ist die Knochenresorption in den Wirbelkörpern *Mdk*-defizienter Mäuse signifikant erniedrigt, obwohl eine Erhöhung der osteoklastären Aktivität, durch Messung von Knochenabbau-Parametern im Serum und Urin, nachgewiesen werden konnte, verursacht durch eine Aktivierung von Osteoklasten im kortikalen Knochen. Diese Aktivierung der Osteoklasten führt ab einem Alter von 12 Monaten zum Auftreten von hyperostotischen Läsionen in den Röhrenknochen *Mdk*-defizienter Mäuse. Da die Messung Knochen-relevanter Hormone (PTH, Calcitonin, Östrogen, Rankl, Opg) im Serum *Mdk*-defizienter Mäuse keine Unterschiede zu Wildtyptieren ergab, und da die Aktivität *Mdk*-defizienter Osteoblasten auch *ex vivo* erhöht war, muss davon ausgegangen werden, dass die nachweisbare *Mdk*-Expression in Osteoblasten zu einer Zell-autonomen Regulation ihrer Aktivität führt. Eine mögliche Erklärung für den Einfluss von Mdk auf Osteoblasten liefert die für neuronale Zellen nachgewiesene Antagonisierung der membranständigen Protein-Tyrosin-Phosphatase Ptpcr1 durch Mdk. In Transfektionsversuchen und im Western Blot konnte gezeigt werden, dass eine Kombination von Mdk und Ptpcr1 den Wnt-Signaltransduktionsweg hemmt, wodurch die erhöhte trabekuläre Knochendichte *Mdk*-defizienter Mäuse erklärt werden könnte. Auch ein regulatorischer Einfluss von Mdk auf die Gene *Ank* und *Enpp1*, die

entscheidend für die Mineralisation des Knochens sind, ist denkbar. Denn in der Abwesenheit von Mdk ist *in vitro* die Genexpression von *Ank* und *Enpp1* erniedrigt, was zusätzlich eine erhöhte Knochendichte in den *Mdk*-defizienten Mäusen erklären könnte, da kein Pyrophosphat von den beiden Genen gebildet werden kann, um die Mineralisation des Knochens zu hemmen.

Zusammengefasst identifizieren unsere Ergebnisse den Wachstumsfaktor Mdk als einen negativen Regulator der Knochenformation, dessen Antagonisierung gegebenenfalls im Sinne einer osteoanabolen Therapie genutzt werden kann.

## 10. Literaturverzeichnis

Almeida, M., Han, L., Bellido, T., Manolagas, S.C., Koustini, S. (2005) Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by  $\beta$ -Catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. *J Biol Chem*, 280, 41342-41351.

Chen, S., Bu, G., Takei, Y., Sakamoto, K., Ikematsu, S., Muramatsu, T., Kadomatsu, K. (2007) Midkine and LDL-receptor-related protein 1 contribute to the anchorage-independent cell growth of cancer cells. *J Cell Sci.*, 120, 4009-4015.

Chesnut, C.H. 3rd, Azria, M., Silverman, S., Engelhardt, M., Olson, M., Mindeholm, L. (2008) Salmon calcitonin: a review of current and future therapeutic indications. *Osteoporos Int.*, 19, 479-491.

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, 2861-2867.

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

Dachverband der deutschsprachigen wissenschaftlichen Gesellschaften für Osteologie (DVO) e.V. Pfeilschifter J (eds.). Evidenzbasierte Konsensus-Leitlinien zur Osteoporose. Stuttgart: Schattauer, 2006: 16-17.

Day, T.F., Guo, X., Garrett-Beal, L., Yang, Y. (2005) Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell.*, 8, 739-750.

Ducy, P., Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, A.S., 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, 197-207.

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

Feinfeld, D.A., Sherwood, L.M. (1988) Parathyroid hormone and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in chronic renal failure. *Kidney Int.*, 33, 1049-1058.

Feng, J.Q., Huang, H., Lu, Y., Ye, L., Xie, Y., Tsutsui, T.W., Kunieda, T., Castranio, T., Scott, G., Bonewald, L.B., Mishina, Y. (2003) The Dentin matrix Protein 1 (Dmp1) is specifically expressed in mineralized, but not soft, tissues during development. *J Dent Res.*, 82, 776-780.

Feng, J.Q., Ward, L.M., Liu, S., Lu, Y., Xie, Y., Yuan, B., Yu, X., Rauch, F., Davis, S.I., Zhang, S., Rios, H., Drezner, M.K., Quarles, L.D., Bonewald, L.F., White, K.E. (2006) Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nature Genetics*, 28, 1310-1315.

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

Gordon, M.D., Nusse, R. (2006) Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem.*, 281, 22429-22433.

Gurley, K.A., Chen, H., Guenther, C., Nguyen, E.T., Rountree, R.B., Schoor, M., Kingsley, D.M. (2006) Mineral formation in joints caused by complete or joint-specific loss of ANK function. *J Bone Miner Res.*, 21, 1238-1247.

Gurley, K.A., Reimer, R.J., Kingsley, D.M. (2006) Biochemical and genetic analysis of ANK in arthritis and bone disease. *Am J Hum Genet.*, 79, 1017-1029.

Harmey, D., Hessle, L., Narisawa, S., Johnson, K.A., Terkeltaub, R., Millan, J.L. (2004) Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by Akp2, Enpp1, and Ank. *Am J Pathol.*, 164, 1199-1209.

Harmey, D., Johnson, K.A., Zelken, J., Camacho, N.P., Hoylaerts, M.F., Noda, M., Terkeltaub, R., Millan, J.L. (2006) Elevated skeletal osteopontin levels contribute to the hypophosphatasia phenotype in Akp2<sup>-/-</sup> mice. *J Bone Miner Res.*, 21, 1377-1386.

Harroch, S., Palmeri, M., Rosenbluth, J., Custer, A., Okigaki, M., Shrager, P., Blum, M., Buxbaum, J.D., Schlessinger, J. (2000) No obvious abnormality in mice deficient in receptor protein tyrosine phosphatase  $\beta$ . *Mol Cell Biol.*, 20 (20), 7706-7715.

Herradon, G., Ezquerro, L., Nguyen, T., Silos-Santiago, I., Deuel, T.F. (2005) Midkine regulates pleiotrophin organ-specific gene expression: Evidence for transcriptional regulation and functional redundancy within the pleiotrophin/midkine developmental gene family. *Biochem Biophys Res Commun.*, 333, 714-721.

Hessle, L., Johnson, K.A., Anderson, H.C., Narisawa, A. Sali, A., Goding, J.W., Terkeltaub, R., Millan, J.L. (2002) Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *PNAS*, 99, 9445-9449.

- Hill TP, Später D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C. (2005) Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell.*, 8, 727-738.
- Ho, A.M., Johnson, M.D., Kingsley, D.M. (2000) Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis. *Science*, 289, 265-270.
- Hofbauer, L.C., Khosla, S., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Spelsberg, T.C., Riggs, B.L. (1999) Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology*, 140, 4367-4370.
- Hofbauer, L.C., Kühne, C.A., Viereck, V. (2004) The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases. *J Musculoskelet Neuronal Interact.*, 4, 268-275.
- Horiba, M., Kadomatsu, K., Nakamura, E., Muramatsu, H., Ikematsu, S., Sakuma, S., Hayashi, K., Yuzawa, Y., Matsuo, S., Kuzuya, M., Kaname, T., Hirai, M., Saito, H., and Muramatsu, T (2000) Neointima formation in a restenosis model is suppressed in midkine-deficient mice. *J. Clin. Invest.*, 105, 489-495.
- Hughes, D.E., Dai, A., Tiffée, J.C., Li, H.H., Mundy, G.R., Boyce, B.F. (1996) Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- $\beta$ . *Nature Med.*, 2, 1132-1136.
- Imai, S., Kaksonen, M., Raulo, E., Kinnunen, T., Fages, C., Meng, X., Lakso, M., Rauvala, H. (1998) Osteoblast recruitment and bone formation enhanced by cell matrix-associated heparin-binding growth-associated Molecule (HB-GAM). *J Cell Biol.*, 143, 1113-1128.
- Iwasaki, W., Nagata, K., Hatanaka, H., Inui, T., Kimura, T., Muramatsu, T., Yoshida, K., Tasumi, M., Inagaki, F. (1997) Solution structure of midkine, a new heparin-binding growth factor. *EMBO J.*, 16, 6936-6946.
- Jilka, R.L., Hangoc, G., Girasole, G., Passeri, G., Williams, D.C., Abrams, J.S., Boyce, B., Broxmeyer, H., Manolagas, S.C. (1992) Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science*, 257, 88-91.
- Johnson, K., Goding, J., Van Etten, D., Sali, A., Hu, S., Farley, D., Krug, H., Hessle, L., Millan, J.L., Terkeltaub, R. (2003) Linked deficiencies in extracellular PPI and osteopontin mediate pathologic calcification associated with defective PC-1 and ANK expression. *J Bone Miner Res.*, 18, 994-1004.
- Kadomatsu, K., Muramatsu, T. (2004) Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer Lett.*, 204, 127-143.
- Kadomatsu, K., Tomomura, T., Muramatsu, T. (1988) cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis. *Biochem. Biophys. Commun.*, 151, 1312-1318.

- Kaksonen, M., Pavlov, I., Voikar, V., Lauri, S.E., Hienola, A., Riekk, R., Lakso, M., taira, T., Rauvala, H. (2002) Syndecan-3-deficient mice exhibit enhanced LTP and impaired hippocampus-dependent memory. *Mol Cell Neurosci.*, 21, 158-172.
- Karsenty, G. (2001) Minireview: Transcriptional Control of Osteoblast Differentiation. *Endocrinology*, 142, 2731-2733
- Kern, B., Shen, J., Starbuck, M., Karsenty G. (2001) Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. *J Biol Chem.*, 276, 7101-7107.
- Kirsch, T., Kim, H.J., Winkles, J.A. (2008) Progressive Ankylosis Gene (ank) regulates osteoblast differentiation. *Cells Tissues Organs*, 1-5.
- Kobayashi, Y., Goto, S., Tanno, T, Yamazaki, M., Moriya, H. (1997) Regional variations in the progression of bone loss in two different mouse osteopenia models. *Calcii Tissue Int.*, 62, 426-436.
- Kojima, T., Katsumi, A., Yamazaki, T., Muramatsu, T., Nagasaka, T., Ohsumi, K., Saito, H. (1996) Human Rydocan from endothelium-like cells binds basic fibroblast growth factor, midkine, and tissue factor pathway inhibitor. *J Biol Chem.*, 271, 5914-5920.
- 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, 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, 205-215.
- Kousteni, S., Bellido, T., Plotkin, L.I., O'Brien, C.A., Bodenner, D.L., Han, L., Han, K., DiGregorio, G.B., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S., Roberson, P.K., Weinstein, R.S., Jilka, R.L., Manolagas, S.C. (2001) Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell*, 104, 719-730.
- Krishnan, V., Bryant, H.U., MacDougald, O.A. (2006) Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest.*, 116, 1202-1209.
- 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, 407-412.
- Lehmann, W., Schinke, T., Schilling, A.F., Catala-Lehnen, P., Gebauer, M., Pogoda, P., Gerstenfeld, L.C., Rueger, J.M., Einhorn, T.A., Amling, M. (2004) Absence of mouse pleiotrophin does not affect bone formation in vivo. *Bone*, 35, 1247-1255.

- Li, G., Bunn, J.R., Mushipe, M.T., He, Q., Chen, X. (2005) Effects of pleiotrophin (PTN) over-expression on mouse long bone development, fracture healing and bone repair. *Calcif Tissue Int.*, 76, 299-306.
- Lilien, J., Balsamo, J. (2005) The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of  $\beta$ -catenin. *Curr Opin Cell Biol.*, 17, 459-465.
- Ling, Y., Rios, H.F., Meyers, E.R., Lu, Y., Feng, J.Q., Boskey, A.L. (2005) DMP1 Depletion Decreases Bone Mineralization In Vivo: An FTIR Imaging Analysis. *J Bone Miner Res.*, 20, 2169-2177.
- Maeda, N., Ichihara-Tanaka, K., Kimura, T., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., Noda, M. (1999) A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTP $\zeta$ /RPTP $\beta$  binds a heparin-binding growth factor midkine. Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTP $\zeta$ . *J Biol Chem.*, 274, 12474-12479.
- Maehara, H., Kaname, T., Yanagi, K., Hanzawa, H., Owan, I., Kinjou, T., Kadomatsu, K., Ikematsu, S., Iwamasa, T., Kanaya, F., Naritomi, K. (2007) Midkine as a novel target for antibody therapy in osteosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun.*, 358, 757-762.
- Manolagas, S.C. (1998) The role of IL-6 type cytokines and their receptors in bone. *Ann NY Acad Sci.*, 840, 194-204.
- Manolagas, S.C., Jilka, R.L., Bellido, T., O'Brien, C.A., Parfitt, A.M. (1996) Interleukin-6-type cytokines and their receptors. *Principles of Bone biology*, San Diego, Academic Press, 701-713.
- Martin, T.J., Seeman, E. (2008) Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*, 22,701-722.
- Maruyama, K., Muramatsu, H., Ishiguro, N., Muramatsu, T. (2004) Midkine, a heparin-binding growth factor, is fundamentally involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 50, 1420-1429.
- Masuda, H., Tsujimura, A., Yoshioka, M., Arai, Y., Kuboki, Y., Mukai, T., Nakamura, T., Tsuji, H., Nakagawa, M., Hashimoto-Gotoh, T. (1997) Bone mass loss due to estrogen deficiency is compensated in transgenic mice overexpressing human osteoblast stimulating factor-1. *Biochem Biophys Res Commun.*, 238, 528-533.
- Meng, K., Rodriguez-Pena, A., Dimitrov, T., Chen, W., Yamin, M., Noda, M., Deuel, T.F. (2000) Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of  $\beta$ -catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase  $\beta/\zeta$ . *PNAS*, 97, 2603-2608.
- Mitsiadis, T.A., Salmivirta, M., Muramatsu, T., Muramatsu, H., Rauvala, H., Lehtonen, E., Jalkanen, M., Thesleff, I. (1995) Expression of the heparin-binding cytokines, midkine (MK) and HB-GAM (pleiotrophin) is associated with epithelial-mesenchymal interactions during fetal development and organogenesis. *Development*, 121, 37-51.



- 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, 773-779.
- Muramatsu, H., Muramatsu, T. (1991) Purification of recombinant midkine and examination of its biological activities: functional comparison of new heparin binding factors. *Biochem. Biophys Res. Commun.*, 177, 652-658.
- Muramatsu, H., Shirahama, H., Yonezawa, S., Maruta, H., Muramatsu, T. (1993) Midkine (MK), a retinoic acid-inducible growth/differentiation factor: immunochemical evidence for the function and distribution. *Dev Biol.*, 159, 392-402.
- Muramatsu, H., Zou, K., Sakaguchi, N., Ikematsu, S., Sakuma, S., Muramatsu, T. (2000) LDL receptor-related protein as a component of the midkine receptor. *Biochem Biophys Res Commun.*, 270, 936-941.
- Muramatsu, T. (2002) Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. *J. Biochem.*, 132, 359-371.
- Muramatsu, T. (1993) Midkine (MK), the product of a retinoic acid responsive gene, and pleiotrophin constitute a new protein family regulating growth and differentiation. *Int. J. Dev. Biol.*, 37, 183-188.
- Nakamura, E., Kadomatsu, K., Yuasa, S., Muramatsu, H., Mamiya, T., Nabeshima, T., Fan, Q.W., Ishiguro, K., Igakura, T., Matsubara, S., Kaname, T., Horiba, M., Saito, H., Muramatsu, T. (1998) Disruption of the midkine gene (Mdk) resulted in altered expression of a calcium binding protein in the hippocampus of infant mice and their abnormal behaviour. *Genes Cells*, 3, 811-822
- Netter, P., Bardin, T., Bianchi, A., Richette, P., Loeuille, D. (2004) The ANKH gene and familial calcium pyrophosphate dihydrate deposition disease. *Joint Bone Spine*, 71, 365-368.
- Nürnberg, P., Thiele, H., Chandler, D., Höhne, W., Cunningham, M.L., Ritter, H., Leschik, G., Uhlmann, K., Mischung, C., Harrop, K., Goldblatt, J., Borochowitz, Z.U., Kotzot, D., Westermann, F., Mundlos, S., Braun, H.S., Laing, N., Tinschert, S. (2001) Heterozygous mutations in ANKH, the human ortholog of the mouse progressive ankylosis gene, result in craniometaphyseal dysplasia. *Nature Genetics*, 28, 37-41.
- O'Brien, T., Cranston, D., Fuggle, S., Bicknell, R., and Harris, A.L. (1996) The angiogenic factor midkine is expressed in bladder cancer, and overexpression correlates with a poor outcome in patients with invasive cancers. *Cancer Res.*, 56, 2515-2518.
- Ohta, S., Muramatsu, H., Senda, T., Zou, K., Iwata, H., Muramatsu, T. (1999) Midkine is expressed during repair of bone fracture and promotes chondrogenesis. *J Bone Miner Res.*, 14, 1132-1144.

- Okawa, A., Goto, S., Moriya, H. (1999) Calcitonin simultaneously regulate both periosteal hyperostosis and trabecular osteopenia in the spinal hyperostotic mouse (twy/twy) in vivo. *Calcif Tissue Int.*, 64, 239-247.
- 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, 765-771.
- Owada, K., Sanjo, N., Kobayashi, T., Mizusawa, H., Muramatsu, H., Muramatsu, T., Michikawa, M. (1999) Midkine inhibits caspase-dependent apoptosis via the activation of mitogen-activated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase in cultured neurons. *J Neurochem.*, 73, 2084-2092.
- Pasco, J.A. Henry, M.J., Sanders, K.M., Kotowicz, M.A., Seeman, E., Nicholson, G.C. (2004) Beta-adrenergic blockers reduce the risk of fracture partly by increasing bone mineral density: Geelong Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res.*, 19, 19-24.
- Pendleton, A., Johnson, M.D., Hughes, A., Gurley, K.A., Ho, A.M., Doherty, M., Dixey, J., Gillet, P., Loeuille, D., McGrath, R., Reginato, A., Shiang, R., Wright, G., Netter, P., Williams, C., Kingsley, D.M. (2002) Mutations in *Ankh* cause chondrocalcinosis. *Am. J. Hum. Genet.*, 71, 933-940.
- Peters, E., Boudin, E., Van Hul, W. (2008) Wnt signaling: a win for bone. *Arch Biochem Biophys*; 473, 112-116.
- Pogoda, P., Egermann, M., Schnell, J.C., Priemel, M., Schilling, A.F., Alini, M., Schinke, T., Rueger, J.M., Schneider, E., Clarke, I., Amling, M. (2006) Leptin inhibits bone formation not only in rodents, but also in sheep. *J Bone Miner Res.*, 21, 1591-1599.
- Qi, M., Ikematsu, S., Maeda, N., Ichihara-Tanaka, K., Sakuma, S., Noda, M., Muramatsu, T., Kadomatsu, K. (2001) Haptotactic migration induced by midkine: Involvement of protein-tyrosine phosphatase  $\zeta$ , mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.*, 276, 15868-15875.
- Raisz, L.G., Rodan, G.A. (2003) Pathogenesis of osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am.*, 32, 15-24.
- Rauvala, H. (1989) An 18-kd heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factors. *EMBO J.*, 8, 2933-2941.
- Rauvala, H., Huttunen, H.J., Fages, C., Kaksonen, M., Kinnunen, T., Imai, S., Raulo, E., Kilpeläinen, I. (2000) Heparin-binding proteins HB-GAM (pleiotrophin) and amphoterin in the regulation of cell motility. *Matrix Biology*, 19, 377-387.
- Rios, H.F., Ye, L., Dusevich, V., Eick, D., Bonewald, L.F., Feng, J.Q. (2005) DMP1 is essential for osteocyte formation and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact.*, 5, 325-327.

Sakaguchi, N., Muramatsu, H., Ichihara-Tanaka, K., Maeda, N., Noda, M., Yamamoto, T., Michikawa, M., Ikematsu, S., Sakuma, S., Muramatsu, T. (2003) Receptor-type protein tyrosine phosphatase  $\zeta$  as a component of the signaling receptor complex for midkine-dependent survival of embryonic neurons. *Neurosci Res.*, 45, 219-224.

Schäfer, H.S. (2005) Die Untersuchung des Transkriptionsfaktors RUNX2, insbesondere die RUNX2-Cbfb Interaktion in der Pathogenese der Cleidocranialen Dysplasie. URL: <http://www.freidok.uni-freiburg.de/volltexte/2334/>

Schinke, T., Gebauer, M., Schilling, A.F., Lamprianou, S., Priemel, M., Mueldner, C., Neunaber, C., Streichert, T., Ignatius, A., Harroch, S., Amling, M. (2008) The protein tyrosine phosphatase RPTP $\zeta$  is expressed in differentiated osteoblasts and affects bone formation in mice. *Bone*, 42, 524-534.

Schwarzman, R.J. (2000) New treatments for reflex sympathetic dystrophy. *N Engl J Med.*, 343, 654-656.

Shibata, Y., Muramatsu, T., Hirai, M., Inui, T., Kimura, T., Saito, H., McCormick, L.M., Bu, G., Kadomatsu, K. (2002) Nuclear targeting by the growth factor midkine. *Mol Cell Biol.*, 22, 6788-6796.

Stoica, G.E., Kuo, A., Powers, C., Bowden, E.T., Buchert Sale, E., Riegel, A.T., Wellstein, A. (2002) Midkine binds to Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *J Biol Chem.*, 277, 35990-35998.

Takada, T., Toriyama, K., Muramatsu, H., Song, X.-J., Tbrii, S., and Muramatsu, T. (1997) Midkine, a retinoic acid-inducible heparin-binding cytokine in inflammatory responses: chemotactic activity to neutrophils and association with inflammatory synovitis. *J. Biochem.*, 122, 453-458.

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

Tare, S.t., Oreffo, R.O.C., Clarke, N.M.P., Roach, H.I. (2002) Pleiotrophin/Osteoblast-Stimulating Factor 1: Dissecting its diverse function in bone formation. *J Bone Miner Res.*, 17, 2009-2020.

Tare, S.t., Oreffo, R.O.C., Sato, K., Rauvala, H., Clarke, N.M.P., Roach, H.I. (2002) Effects of targeted overexpression of pleiotrophin on postnatal bone development. *Biochem Biophys Res Commun.*, 298, 324-332.

Tomkinson, A., Gevers, E.F., Wit, J.M., Reeve, J., Noble, B.S. (1998) The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. *J Bone Miner Res.*, 13, 1243-1250.

Tomomura, M., Kadomatsu, K., Matsubara, S., Muramatsu, T. (1990) A retinoic acid-responsive gene, MK, found in the terato-carcinoma system. Heterogeneity of the transcript and the nature of the translation product. *J Biol Chem.*, 265, 10765-10770.

Tsutsui, J., Kadomatsu, K., Matsubara, S., Nakagawara, A., Hamanoue, M., Takao, S., Shimazu, H., Ohi, Y., Muramatsu, T. (1993) A new family of Heparin-binding Growth/Differentiation Factors: Increased midkine expression in Wilm's tumor and other human carcinomas. *Cancer Research*, 53, 1281-1285.

Vaes, B.L., Ducy, P., Sijbers, A.M., Hendriks, J.M., van Someren, E.P., de Jong, N.G., van den Heuvel, E.R., Olijve, W., van Zoelen, E.J., Dechering, K.J. (2006) Microarray analysis on Runx2-deficient mouse embryos reveals novel Runx2 functions and target genes during intramembranous and endochondral bone formation. *Bone*, 39, 724-738.

Ye, L., Mishina, Y., Chen, D., Huang, H., Dallas, S.L., Dallas, M.R., Sivakumar, P., Kunieda, T., Tsutsui, T.W., Boskey, A., Bonewald, L.F., Feng, J.Q. (2005) *Dmp1*-deficient mice display severe defects in cartilage formation responsible for a chondrodysplasia-like phenotype. *J Biol Chem.*, 280, 6197-6203.

You, Z., Dong, Y., Kong, X., Beckett, L.A., Gandour-Edwards, R., Melamed, J. (2008) Midkine is a NF- $\kappa$ B-inducible gene that supports prostate cancer cell survival. *BMC Med Genomics*, 1, 1-11.

Yavropoulou, M.P., Yovos, J.G. (2007) The role of the Wnt signaling pathway in osteoblast commitment and differentiation. *Hormones*, 6, 279-294.

Zhang, Y., Brown, M.A., Peach, C., Russell, G., Wordsworth, B.P. (2006) Investigation of the role of ENPP1 and TNAP genes in chondrocalcinosis. *Rheumatology*, 46, 586-589.

## **9. Anhang**

### **9.1 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Herrn Professor Johannes M. Rueger, dem Leiter der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie möchte ich danken, dass ich die Arbeit in seiner Abteilung anfertigen durfte. Ganz besonderer Dank gilt Professor Michael Amling, dem Leiter der Experimentellen Unfallchirurgie; und meinem Betreuer PD Dr. Thorsten Schinke für die uneingeschränkte Unterstützung meiner Arbeit. Ich danke ihnen besonders für die Hilfe und die guten Anregungen bei der Versuchsplanung und -durchführung und für die Möglichkeit, erfolgreich an nationalen, wie internationalen Kongressen teilnehmen zu dürfen.

Den Gutachtern danke ich für die Mühe, sich in die Thematik eingearbeitet zu haben, und Herrn Prof. Thorsten Burmester danke ich für die Betreuung im Fachbereich Biologie.

Natürlich danke ich außerdem ganz besonders der gesamten Arbeitsgruppe der Experimentellen Unfallchirurgie. Es war eine besondere Erfahrung mit so einem großen Überschuss an Männern zu arbeiten und ich gebe zu, dass es mir gut gefallen hat. Ein besonderer Dank geht dennoch an die wenigen Damen dieser Arbeitsgruppe, die immer da waren, wenn man einfach ein bisschen Ruhe brauchte. Weiterhin möchte ich Dr. Philip Catala-Lehnen danken, der mir bei der Histomorphometrie geholfen hat.

Ein weiterer Dank gilt den hervorragenden Tierpflegern. Besonders möchte ich mich hier bei Susanne Conrad bedanken, die mir immer mit vollem Einsatz und Rat und Tat zur Seite stand, wenn es um das Wohl der Mäuse ging.

Zum Schluß möchte ich auch noch meiner Familie und meinem Freund danken, die mir privat sehr viel Rückhalt gegeben haben. Hier geht ein besonderer Dank an meine Schwester, die es sich nicht hat nehmen lassen, nach der Diplomarbeit auch noch die Dissertation Korrektur zu lesen.

Herzlichen Dank!!!